

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS CONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina**  
**Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

ESTUDO DA INFECÇÃO NATURAL DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* POR  
*LEISHMANIA INFANTUM* E A FLUTUAÇÃO MENSAL DE FLEBOTOMÍNEOS  
COLETADOS NO MUNICÍPIO DE CAMAÇARI, ESTADO DA BAHIA

**ORLANDO MARCOS FARIAS DE SOUSA**

**Salvador – Brasil**

**2013**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa**

ESTUDO DA INFECÇÃO NATURAL DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* POR  
*LEISHMANIA INFANTUM* E A FLUTUAÇÃO MENSAL DE FLEBOTOMÍNEOS  
COLETADOS NO MUNICÍPIO DE CAMAÇARI, ESTADO DA BAHIA

**ORLANDO MARCOS FARIAS DE SOUSA**

Orientadora: Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras

Co-orientador: Dr. Edelberto Santos Dias

Dissertação apresentada para a obtenção do  
grau de mestre em Biotecnologia aplicada a  
Saúde, no Curso de Pós-Graduação em  
Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa/FIOCRUZ

**Salvador - Brasil**

**2014**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S725e Sousa, Orlando Marcos Farias de  
Estudo da infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania infantum* e a  
flutuação mensal de flebotomíneos coletados no município de Camaçari, Estado da  
Bahia .[manuscrito] / Orlando Marcos Farias de Sousa . - 2014.  
110 f.; 30 cm

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (Mestrado) Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo  
Moniz. Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, 2014.  
Orientadora: Dr<sup>a</sup>.: Patrícia Sampaio Tavares Veras

1. *Lutzomyia longipalpis* 2. Infecção natural. 3. Leishmaniose visceral 4.  
Flutuação mensal I. Título.

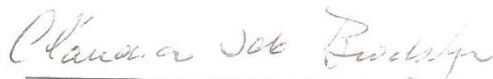
CDU 616.993.161

“ESTUDO DA INFECÇÃO NATURAL DE LUTZOMYIA LONGIPALPIS POR LEISHMANIA INFANTUM  
E A TENDÊNCIA SAZONAL DE FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS NO MUNICÍPIO DE CAMACARI,  
ESTADO DA BAHIA”

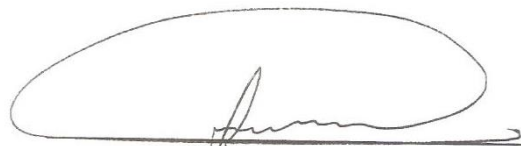
**ORLANDO MARCOS FARIAS DE SOUZA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

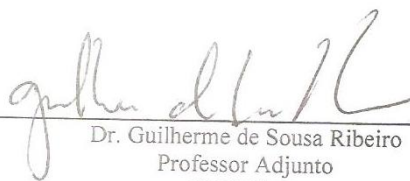
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr<sup>a</sup>. Claudia Ida Brodskyn  
Pesquisadora Titular  
CPqGM/FIOCRUZ



Dr. José Carlos Miranda  
Pesquisador Titular  
CPqGM/FIOCRUZ



Dr. Guilherme de Sousa Ribeiro  
Professor Adjunto  
ISC/UFBA

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer imensamente a todos que contribuíram para que essa conquista fosse realizada. Foram tantas as pessoas envolvidas, de tantas maneiras diferentes nesse processo, que faltam adjetivos suficientes para cada uma delas.

Agradeço a minha orientadora Dra. Patrícia pela oportunidade, toda paciência, pelas horas dedicadas, ao entusiasmo pelo tema novo que assumiu nessa orientação, pelos conselhos, compreensão, pelo exemplo de ética, paixão pelo trabalho. Sempre bastante inspiradora.

Agradeço a minha co-orientadora Dra. Deborah pela paciência, por ter compartilhado de sua experiência profissional, pelo exemplo de dedicação em todos os momentos possíveis e pelas palavras de incentivo que me ajudaram muito nos momentos finais, pelos momentos de descontração.

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Edelberto Santos Dias, pela honra de poder compartilhar de sua larga experiência, por toda a consultoria que foi dada a esse trabalho, pelas histórias de campo que poucos conhecem, pela receptividade e suporte dado pelo seu Laboratório no CPqRR.

Aos meus familiares que sempre me fizeram diretamente ser quem sou, especialmente a minha mãe dona Sandra, que sempre movimentou montanhas para me mostrar o melhor caminho a seguir.

A Niara, por ter me feito uma pessoa melhor, pela paciência nos momentos difíceis, pelo companheirismo, carinho, por ter feito meus dias mais felizes, e descobrir o sentido do amor.

Aos meus colegas do LPBI Isaac, Lairton, José Geraldo, Carlos Eduardo, Beatriz, Luana, Manuela, Samira, Marcelo, Vic, Antonio, Rodrigo, Estefane, Ana Caroline, Vitória, Bruna, Junior Guedes, Luciano, Liliane e Leila, pelos momentos compartilhados de certezas e incertezas, bancada, aprendizado, Pelos vários momentos extra trabalho: LPBI's Fest, clube do bolinha, MMA, viagens dentre outros momentos que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal

Aos outros colegas do LPBI, pesquisadores e colegas da Fiocruz pelos momentos e ensinamentos compartilhados.

À administração do LPBI, em especial à Flavia, Natali e Ana Paula sempre dedicadas, e geralmente pelo “bom dia” do dia.

À todos os amigos da Entomologia LACEN-BA, em especial à Bruno, Zé, Roberto, Eduardo e Helena, pelo companheirismo, sobretudo à Deni, pelas horas dedicadas a identificação taxonômica desse trabalho e pelos ensinamentos e consultorias especialmente de Roberto e Eduardo Oyama.

Aos agentes de Saúde, técnicos de laboratório e coordenadores do CCZ de Camaçari, Gilmar Pereira, Sandra Passos, Hélio Trigueiros, Dílson Estevão

Batista, especialmente a Djalma Alves de Melo (o índio) pelo seu esforço por minha parte muito reconhecido, dedicação e disponibilidade de logística.

Aos técnicos Antônio do CPqGM e Jeferson da UFBA, por se disporem a labuta no trabalho em campo.

A todos os colegas e amigos do curso de biotecnologia, pelos momentos de estudo e diversão passados juntos dentro e fora das salas de aula;

À Coordenação do curso Biotecnologia CPqGM-Fiocruz;

À Capes pela bolsa de mestrado que ajudou na realização deste projeto;

À Fiocruz e ao CPqGM, pela infraestrutura física e pessoal que possibilitaram a execução dos experimentos desta dissertação.

E à todos que indiretamente tiveram participação na realização desse trabalho. A todos estes um grande Obrigado.

SOUSA, Orlando Marcos Farias de. Estudo da infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania infantum* e a flutuação mensal de flebotomíneos coletados no município de Camaçari, Estado da Bahia. 109 f. if Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2010.

## RESUMO

No município de Camaçari, considerado área endêmica para leishmaniose visceral (LV), foi realizado estudo objetivando determinar a influência das variáveis climáticas sobre a flutuação mensal da população flebotomínica e a taxa de infecção natural desses flebotomíneos por *Leishmania infantum*. Para o levantamento entomológico foram realizadas capturas sistemáticas de flebotomíneos utilizando armadilhas tipo HP, tanto no peri como no intradomicílio. As residências foram selecionadas em bairros pertencentes a zona urbana orla e zona urbana sede, onde casos humanos de LV no foram registrados município. As capturas foram realizadas entre dezembro de 2011 e novembro de 2012. A relação entre pluviosidade, umidade relativa do ar e temperatura e a proporção de flebotomíneos foi calculada utilizando o coeficiente de Spearman. Para o estudo da infecção natural dos flebotomíneos foi utilizada a técnica de qPCR. Os *pools* avaliados foram compostos por flebotomíneos da mesma espécie, distribuídos pelas residências, às quais foram investigadas no intra e peridomicílio. Além disso, os *pools* foram distribuídos de acordo com os 12 meses de coleta. Os resultados mostraram que a fauna flebotomínica é diversificada, sendo composta por quatro gêneros com ocorrência de cinco espécies. Espécimes de interesse epidemiológico foram encontrados com predominância para a espécie *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (98,4%). Foi observada correlação positiva entre a densidade de flebotomíneos e a variável pluviosidade na zona urbana sede durante o período de coleta ( $r = 0,66$ ,  $p < 0,02$ ). A correlação entre as variáveis bioclimáticas e a densidade dos flebotomíneos também foi avaliada em bairros que se destacaram individualmente pela densidade de flebotomíneos, sendo encontrado correlação positiva para a variável umidade relativa do ar ( $r = 0,58$   $p < 0,04$ ) e associação similar para a variável precipitação durante o período de coleta ( $r = 0,67$   $p < 0,01$ ). As análises moleculares mostraram infecção natural por *Leishmania infantum* em 10 *pools* de 78 de *pools* de *Lutzomyia longipalpis* analisados. Estes achados aliados à presença do vetor competente da LV, *Lutzomyia longipalpis* em elevada proporção, e os estudos das variáveis climáticas alertam para a necessidade de vigilância epidemiológica e constituem em ferramenta útil para o planejamento de medidas de controle contra LV no município de Camaçari.

**Palavras-chave:** *Lutzomyia longipalpis*, Infecção Natural, Leishmaniose Visceral, Flutuação Mensal

SOUSA, Orlando Marcos Farias de. Study of natural infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania infantum* and monthly fluctuation of sandflies collected in Camaçari, State of Bahia. 109 f. if Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2010.

## ABSTRACT

In Camaçari city, considered an endemic area for visceral leishmaniasis (VL), the study was conducted aiming to determine the climatic variables influence on the sandflies monthly fluctuation and the natural infection rates by *Leishmania infantum* in the sandflies. The entomological inventory was performed with sandflies systematic captures using HP traps, both in peridomiciliar well as in intradomiciliar. The residences were selected in districts belonging to the coastline urban zone and headquarters urban zone, where human cases of VL were recorded in the city. Captures were performed between December 2011 and November 2012. The correlation between the number of sandflies and the different climatic variables was calculated using Spearman's coefficient. The sandfly natural infection was evaluated by qPCR technique. Pools reviews were composed by sand flies of the same species, distributed among households, which were investigated in peridomiciliare and intradomiciliare. Additionally, pools were distributed according to the 12-month sampling. The results showed that the phlebotomine fauna is diverse, consisting of four genera and five species. Specimens of epidemiological interest were found predominantly for *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (98.4%). In addition, a positive correlation between sandfly density and pluviosity at headquarters urban zone was observed during the collection period. ( $r = 0.66$ ,  $p < 0.02$ ). The correlation between bioclimatic variables and density of sandflies was also evaluated in neighborhoods that stood out individually by the sandfly density. A positive correlation was observed for the variable relative humidity during the collection period ( $r = 0.58$   $p < 0.04$ ) and similar association for precipitation variable in the same period ( $r = 0.67$   $p < 0.01$ ). Molecular analysis showed natural infection by *Leishmania infantum* in 10 pools of 78 pools of *Lutzomyia Longipalpis* analyzed. In summary, these findings combined with the presence of VL competent vector, *Lutzomyia Longipalpis* in high density, and studies of climate variables warn of the need for epidemiological surveillance and constitute a useful tool for planning control measures against VL in Camaçari.

**Keis Word:** *Lutzomyia longipalpis*, Natural infection, visceral leishmaniasis, Monthly Fluctuation



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1.** Situação da distribuição dos casos de leishmaniose visceral e do vetor *Lu. longipalpis* na Bahia até o ano de 2011..... 18
- FIGURA 2.** Mapa de distribuição da espécie *Lu. Longipalpis* no Estado da Bahia até o ano de 2011..... 27
- FIGURA 3.** Território do Município de Camaçari - BA com as demarcações dos seus distritos (Vila de Abrantes, Monte Gordo e Sede) e os limites do município.....29
- FIGURA 4.** Armadilha tipo HP instalada no interior de um galinheiro para coleta de flebotomíneos. ....31
- FIGURA 5.** Diferentes locais de instalação das armadilhas nas residências para captura dos flebotomíneos. ....32
- FIGURA 6.** Fotografias de microscopia óptica demonstrando as principais estruturas morfológicas utilizadas na identificação de fêmeas de flebotomíneos.....36
- FIGURA 7.** Relação entre a influência das variáveis independentes climáticas, e a variável dependente densidade mensal de flebotomíneos na zona urbana orla.....48
- FIGURA 8.** Relação entre a influência das variáveis independentes climáticas, e a variável dependente densidade mensal de flebotomíneos na zona urbana sede.....49
- FIGURA 9.** Relação entre a influência das variáveis independentes climáticas, e a variável dependente densidade mensal de flebotomíneos no bairro Parque Verde Il.....50
- FIGURA 10.** Distribuição dos flebotomíneos identificados durante o estudo sistemático que foram usados para composição dos *pools* a serem analisados no estudo da verificação da infecção natural.....52

## LISTAS DE TABELAS

- TABELA 1.** Número total de flebotomíneos coletados no estudo piloto distribuídos por bairros de coleta, o sexo dos flebotomíneos e o número de casos de Leishmaniose visceral humana notificados entre 2007 e 2011.....42
- TABELA 2.** Número total de espécimes de flebotomíneos identificados e distribuídos de acordo com os bairros onde foram capturadas nas zonas urbana orla e urbana sede do município de Camaçari-BA.....45
- TABELA 3.** Número total de flebotomíneos coletados mensalmente entre dezembro de 2011 à julho de 2012 distribuídos pelos bairros da Zona Urbana Orla e Zona Urbana Sede do município de Camaçari-BA.....46
- TABELA 4.** Distribuição dos flebotomíneos capturados segundo a espécie e o setor da residência investigado pela exposição das armadilhas, entre o período de dezembro de 2011 a novembro de 2012 no município de Camaçari BA.....47
- TABELA 5.** Distribuição dos *pools* positivos por bairros e meses de coleta entomológica no município de Camaçari BA.....55
- TABELA 6.** Distribuição dos *pools* positivos por bairros e a Taxa Mínima de Infecção Natural.....53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>CCZ</b>	Centro de Controle de Zoonoses
<b>CPqGM</b>	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
<b>CT</b>	<i>Threshold Cycle</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsufóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>FUNASA</b>	Fundação Nacional de Saúde
<b>GPS</b>	Sistema de Posicionamento Global
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>INMET</b>	Instituto Nacional de Meteorologia
<b>kDNA</b>	DNA Cinetoplasto
<b>LACEN</b>	Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz
<b>LAPEN</b>	Laboratório de Parasitologia e Entomologia
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>LVC</b>	Leishmaniose Visceral Canina
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> – (Reação em cadeia da polimerase)
<b>qPCR</b>	<i>Real time PCR</i> – (PCR quantitativo)
<b>RIFI:</b>	Reação de Imunoflorescência Indireta
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>ROC</b>	<i>Receiver operating characteristic</i>
<b>SUVISA</b>	Superintendência de Vigilância e Proteção da Saúde
<b>TE</b>	Tampão de Eluição
<b>WHO</b>	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
2.1 Epidemiologia.....	17
2.2 Agente etiológico.....	19
2.3 Ciclo biológico do parasito.....	20
2.4 Reservatórios hospedeiros.....	21
2.5 Vetor .....	22
2.6 Métodos para detecção de <i>Leishmania</i> em flebotomíneos.....	23
2.7 Estudo da infecção natural de flebotomíneos.....	24
2.8 Distribuição da <i>Lutzomyia longipalpis</i> na Bahia.....	25
2.9 Influência das variáveis ambientais sobre a população dos flebotomíneos.....	26
<b>3 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 ESPECÍFICOS.....</b>	<b>28</b>
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>29</b>
4.1 Local do estudo.....	29
4.2 Estudo piloto.....	30
4.3 Estudo sistemático.....	30
4.3.1 Seleção das residências para coleta dos flebotomíneos.....	30
4.3.2 Captura sistemática dos flebotomíneos.....	31
4.4 Ética: Termo de consentimento livre e esclarecido.....	32
4.5 Aplicação de questionário.....	33
4.6 Georeferenciamento e obtenção de dados climáticos.....	33
4.7 Preparo, montagem e Identificação dos flebotomíneos.....	34
4.8 Composição dos <i>pools</i> de flebotomíneos.....	37
4.9 Extração de material genômico de flebotomíneos.....	37
4.10 PCR quantitativa (qPCR).....	38
4.10.1 Gene constitutivo específico de flebotomíneo.....	38
4.10.2 Detecção de DNA de <i>Leishmania spp.</i> em flebotomíneos.....	39
4.11 Cálculo da taxa mínima de infecção natural.....	40
4.12 Influência das variáveis climáticas sobre os flebotomíneos.....	41

<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
5.1 Distribuição de flebotomíneos no município.....	42
5.1.1 <i>Estudo piloto para captura de flebotomíneos.....</i>	<i>42</i>
5.1.2 <i>Estudo sistemático para captura de flebotomíneos.....</i>	<i>43</i>
5.2 Influência das variáveis climáticas sobre a densidade da população flebotomínica.....	47
5.3 Detecção de DNA de Leishmania spp. em flebotomíneos.....	51
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>74</b>
ANEXO 1: Bairros avaliados pelo estudo sistemáticos entre dezembro de 2011 e novembro de 2012 com seus respectivos pontos georreferenciados.....	74
ANEXO 2: Termo de consentimento livre e esclarecido.....	75
ANEXO 3: Ficha de captura de flebotomíneos.....	77
ANEXO 4: Densidade de flebotomíneos coletados no estudo piloto por coordenada geográfica.....	79
ANEXO 5: dados microclimáticos compilados através do termo-higro-anemômetro no momento da instalação das armadilhas para captura dos flebotomíneos – FIOCRUZ – CPqGM – LPBI.....	80
ANEXO 6: Artigo.....	85

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa considerada negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010c). Apresenta amplo espectro epidemiológico no mundo, podendo apresentar-se como zoonose, antroponose ou antropozoonose (Saúde, 2008). A LV é uma doença que afeta principalmente regiões pobres de países em desenvolvimento. Sabe-se que ela está associada a fatores como desnutrição, movimentos populacionais em massa, condições precárias de habitação, analfabetismo e baixa imunidade do hospedeiro (WHO, 2010). Assim como em outras partes do mundo, no Brasil a ocorrência da LV estava limitada inicialmente a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas (Saúde, 2008). Modificações no ambiente e a emergência de focos da doença em áreas urbanas são fatores que predisõem a expansão dessa doença (Silva *et al.*, 2001; Travi *et al.*, 2002). Hoje, a LV encontra-se em franca expansão, com incidência elevada em grandes centros urbanos (De Santis *et al.*, 2011; Carranza-Tamayo *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2011).

A LV é causada por protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Ross, 1903). No Brasil, o agente etiológico é a *Leishmania infantum*, sinônimo de *Leishmania chagasi* (Mauricio *et al.*, 2000). Os parasitos são transmitidos ao hospedeiro mamífero, sejam eles cães, raposas, macacos, ratos ou homem, pela picada de fêmeas de flebotomíneos, que ao realizar o repasto sanguíneo inocula as formas promastigotas flageladas na pele desses animais (Alvar *et al.*, 2004).

Os vetores transmissores da LV são flebotomíneos pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, sendo o gênero *Lutzomyia* (França, 1924) responsável pela transmissão das leishmanioses no Novo Mundo (Young & Duncan, 1994). A espécie *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) é considerada a principal espécie vetora responsável pela transmissão da LV no Brasil. No entanto, foi assinalado o encontro de fêmeas de *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) infectadas em área endêmica para LV em Corumbá, Mato Grosso do Sul, indicando que essa espécie é transmissora da doença nessa área endêmica (Santos *et al.*, 1998).

No Brasil, o controle da transmissão da *Leishmania infantum* é centrado na redução da população flebotomínica e nas medidas de combate ao reservatório pelo diagnóstico e eutanásia de cães soropositivos. Outras medidas existentes são o diagnóstico e tratamento de casos humanos, além de atividades de educação em saúde, entretanto o impacto dessas medidas na transmissão da LV é baixa quando são utilizadas na ausência das medidas de controle do vetor e reservatório (WHO, 2010b; Brasil, 2006)

Os estudos sobre o comportamento das espécies de flebotomíneos são imprescindíveis para a aplicação correta das medidas de controle químico do vetor (Barata *et al.*, 2005). O monitoramento entomológico para avaliação da flutuação da fauna flebotomínica correlacionando-a com fatores climáticos, como temperatura, umidade relativa do ar, índices pluviométricos e fatores fisiográficos vem sendo realizado (Oliveira *et al.*, 2008; Michalsky *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2012; Queiroz *et al.*, 2012; Saúde, 2008), porém são necessárias mais informações. Outro fator de fundamental importância para o entendimento da cadeia de transmissão da LV é a identificação das espécies vetoras, o conhecimento de sua biologia e a determinação da taxa de infecção natural dos flebotomos, nas áreas endêmicas para leishmaniose. A consolidação destas informações é fundamental para a proposição de medidas de controle mais efetivas (Silva, 2011).

No estado da Bahia, existem alguns estudos sobre a identificação de flebotomíneos em áreas consideradas endêmicas para LV como no município de Jacobina, Camaçari e Jequié (Deane, 1956; Sherlock e Santos, 1964; Sherlock e Guitton, 1969). No entanto, pouco se conhece sobre a fauna dos flebotomíneos nas áreas urbanas da sede e orla no município de Camaçari, considerada área de transmissão intensa para LV (Brasil, 2006). Estudos para a elucidação do papel destes insetos na cadeia de transmissão da doença nessa área podem contribuir para a correta implementação de medidas de controle do vetor e, em consequência, da disseminação da LV na região.

Nossa primeira hipótese é que a proporção dos flebotomíneos na área estudada segue um padrão de variações mensais considerando fatores bióticos, abióticos e sociais, e está subestimada. A segunda hipótese desse estudo é que a prevalência da infecção natural da população flebotomínica por *Leishmania infantum* está subestimada. Sendo assim o principal objetivo do nosso estudo foi

determinar a flutuação mensal e a taxa de infecção natural por *Leishmania* da população flebotomínica nas áreas urbanas da sede e orla no município de Camaçari.



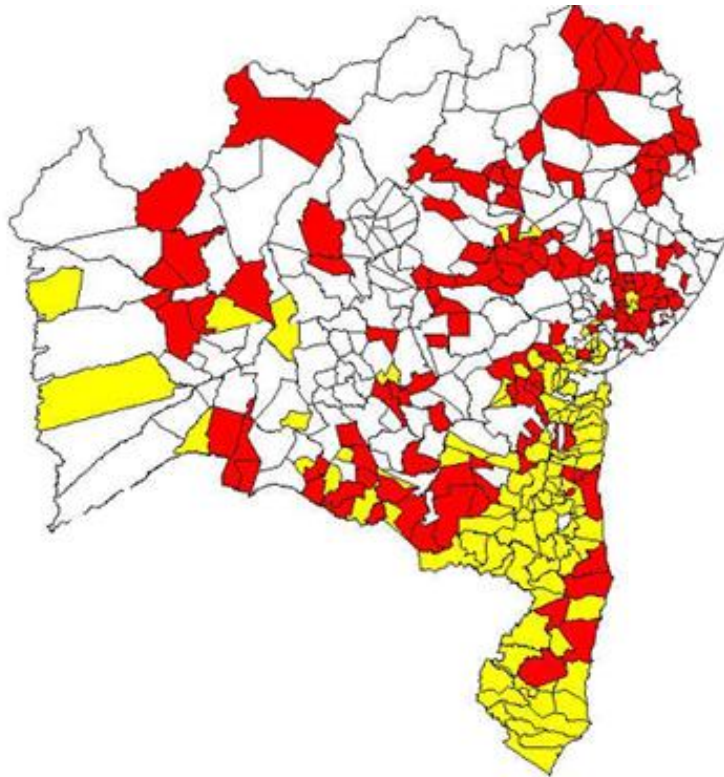
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Epidemiologia

Atualmente, a LV é reconhecida como uma das mais importantes zoonoses pela Organização Mundial de Saúde, devido a sua incidência e alta letalidade, representando um desafio para os profissionais de saúde (WHO, 2010b; Brasil, 2006). Em países do Velho Mundo, a LV pode assumir um caráter antroponótico e zoonótico e a doença tem basicamente uma distribuição rural, podendo ocorrer também em regiões periurbanas nessas localidades (Bern *et al.*, 2010; Postigo, 2010; Who, 2010c). No Novo Mundo, essa enfermidade não tem uma distribuição rural, e, sim, urbana e periurbana (Harhay *et al.*, 2011). Estima-se que 500 mil novos casos de LV ocorram anualmente no mundo, dos quais, aproximadamente 90% dos casos registrados nas Américas ocorrem no Brasil (Albuquerque *et al.*, 2009). Nesse país, a doença tem se concentrado em áreas urbanas nos últimos 40 anos. Foram registrados 59.129 casos de LV entre 1980 a 2005, dos quais, 82,5% ocorreram no Nordeste. Mais recentemente, a incidência no país vem aumentando em outras regiões com concomitante redução percentual de casos no Nordeste, o que pode dar uma ideia errônea de melhora dos índices nessa região. Os dados epidemiológicos dos últimos 10 anos revelaram aumento do número total de casos no país, além de periurbanização e urbanização da LV em grandes centros urbanos. Assim, existem relatos de ocorrência de surtos em cidades como Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Natal (RN), Fortaleza (CE), Camaçari (BA), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (Saúde, 2008), além de ter sido detectada, mais recentemente, prevalência elevada de LV em Cuiabá (De Santis *et al.*, 2011), São Luiz (Felipe *et al.*, 2011), Brasília (Carranza-Tamayo *et al.*, 2010), Rio de Janeiro (Silva *et al.*, 2011) e Teresina (Soares *et al.*, 2011).

O Estado da Bahia tem as mais altas taxas da doença e o maior número de casos novos no Brasil. Inicialmente, o problema foi concentrado no centro do Estado, mas nos últimos anos a doença expandiu-se para o oeste, norte, nordeste e também para as zonas costeiras sobretudo ao norte da capital, Salvador (Franke *et al.*, 2002; Oliveira e Araújo, 2003) (figura 1). Nesta região,

apesar do crescente volume de casos caninos, os registros de casos humanos ainda são escassos ou, por vezes, concentrados em focos epidêmicos. Camaçari é o município dessa região que registra o maior número de casos humanos e caninos de LV da região, com registro de um surto epidêmico de LV em 1991. Uma avaliação da prevalência soropidemiológica da população do município de Camaçari foi realizada em 243 indivíduos, e 30% destes apresentaram resultado positivo na intradermorreação e 14% na sorologia. Nesse estudo, 460 cães foram avaliados quanto a soropositividade, sendo que 6,3% apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* (Cunha *et al.*, 1995).



**FIGURA 1:** Situação da distribuição dos casos de LV e do vetor *Lutzomyia longipalpis* na Bahia entre os anos de 2009 e 2011: Em amarelo estão representados os Municípios sem ocorrência de casos e sem a presença do vetor; em vermelho: Municípios sem casos e com a presença do vetor e em branco: Municípios com registros de casos. Fonte: LACEN/SUVISA (2009-2011).

## 2.2 Agente etiológico

Os parasitos causadores da LV no mundo são protozoários que pertencem à classe Zoomastigophorea, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Mauricio *et al.*, 1999). Estes parasitos apresentam no seu citoplasma uma organela característica da ordem Kinetoplastida, o cinetoplasto, composto de uma rede de moléculas de DNA circulares (kDNA), que são divididos em maxicírculos e minicírculos (Simpson, 1987). O gênero *Leishmania* pode ser dividido em dois subgêneros de acordo com seu desenvolvimento no intestino do vetor em *Leishmania* e *Viannia*. Segundo Lainson & Shaw (1987), os parasitos que apresentam um desenvolvimento suprapilário aderindo-se à porção anterior e média do intestino são agrupados no subgênero *Leishmania*, já os que apresentam um desenvolvimento peripilário, no qual apresentam uma fase de divisão que se aderem à parede do intestino posterior, pertencem ao subgênero *Viannia*.

A *Leishmania* spp. é um protozoário bifásico, que encontra-se, nos mamíferos, na forma intracelular obrigatória, aflagelada, denominada amastigota (Antoine *et al.*, 1990; Alexander *et al.*, 1999; Kaye e Scott, 2011), enquanto que no trato digestório do hospedeiro invertebrado, vetor fletotomínico, apresenta-se na forma denominada de promastigota. Esta forma é caracterizada por ser extracelular e apresentar flagelo, estrutura que propicia mobilidade ao parasita (Killick-Kendrick e Killick-Kendrick, 1991)

O agente causal da Leishmaniose visceral no leste da África e no subcontinente indiano é a *Leishmania donovani* e na Europa, Norte da África e América Latina, *Leishmania infantum* (Chappuis *et al.*, 2007). O agente etiológico no Brasil foi por muitos anos classificada como *Leishmania chagasi*. Adicionalmente, alguns autores consideravam que *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* seriam subespécies (Lainson e Rangel, 2005). No entanto, Mauricio e colaboradores (Mauricio *et al.*, 2000) demonstraram em estudos baseados em métodos moleculares que *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* são similares geneticamente, evidenciando pertencerem a uma mesma espécie, devendo ser consideradas sinônimos, tendo-se dado prioridade a identificação *Leishmania infantum* por ter sido a espécie primeiramente descrita.

### 2.3 Ciclo biológico do parasito

O ciclo biológico da *Leishmania* começa durante o repasto sanguíneo das fêmeas dos flebotomíneos, que injetam na pele do hospedeiro juntamente com a saliva, as formas promastigotas metacíclicas do parasito (Killick-Kendrick, 1999). As células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro, macrófagos da pele do hospedeiro mamífero, fagocitam as formas promastigotas do parasito. Após a fagocitose, as formas promastigotas no interior de vacúolos parasitóforos se transformam em amastigotas, que multiplicam-se por divisão binária longitudinal. Em razão da multiplicação intensa, células infectadas podem sofrer ruptura ou realizar exocitose dos protozoários, infectando outros macrófagos presentes na pele do hospedeiro (Rittig e Bogdan, 2000). A partir dessa fase, macrófagos e células dendríticas podem fagocitar as formas amastigotas liberadas no meio extracelular e migrar para os linfonodos de drenagem (Moll, 1993; Muraille *et al.*, 2003). Posteriormente, a disseminação do protozoário poderá ocorrer para diversos órgãos do sistema fagocítico-mononuclear (como fígado, baço, medula óssea e linfonodos). Ao se alimentar em um hospedeiro infectado, a fêmea do flebotomíneo ingere os macrófagos presentes na pele e no sangue do hospedeiro contendo as formas amastigotas, que sofrem divisão binária no seu intestino, transformando-se em promastigotas. Estas formas também multiplicam-se por divisão binária longitudinal, passando por mudanças morfológicas e fisiológicas. O primeiro estágio no vetor é chamado promastigota procíclica, que possui baixa motilidade e se replica no interior da matriz peritrófica, estrutura quitinosa que separa o sangue ingerido, do epitélio intestinal (Secundino *et al.*, 2005). Após alguns dias, os parasitos se diferenciam em formas alongadas e com alta motilidade, chamadas nectomonas. Estas se dirigem para o exterior da matriz peritrófica e aderem ao epitélio intestinal. As nectomonas se diferenciam em leptomonas, formas curtas que continuam a se replicar. A partir daí, alguns parasitos se diferenciam em forma aptomonas e outros em promastigotas metacíclicas, que são formas longas, apresentam um longo flagelo, alta motilidade e não mais se dividem. As promastigotas metacíclicas se desprendem da parede do inseto vetor, e são as formas infectivas para o hospedeiro vertebrado. Em um segundo repasto sanguíneo, realizado pela fêmea do flebotomíneo, as formas metacíclicas podem ser

injetadas na derme do hospedeiro mamífero o que permite manter o ciclo (Ashford, 2000; Choi e Lerner, 2001; Bates, 2007).

## 2.4 Reservatórios Hospedeiros

Os cães domésticos e selvagens (*Canis familiaris*) são considerados os mais importantes reservatórios de *Leishmania infantum* (Deane & Deane, 1955; Laison & Rangel, 2005). Em regiões urbanas, existem fortes evidências de que os cães são os principais reservatórios da LV zoonótica, dentre eles destacam-se: I - cães são altamente susceptíveis à infecção, apresentam intenso parasitismo cutâneo e vivem em proximidade ao homem (Dantas-Torres, 2006); II) epidemias caninas precedem as epidemias humana em centros urbanos (Bevilacqua *et al.*, 2001; Alvar *et al.*, 2004); III) a transmissão de *Leishmania infantum* é mantida através de ciclo entre o cão e o inseto em comunidades urbanas e periurbanas (Lanotte *et al.*, 1979; Berrahal *et al.*, 1995,8); IV) a prevalência canina se mantém alta, mesmo em períodos em que a prevalência de casos humanos é baixa (Fraga *et al.*, 2012); V) a Leishmaniose visceral canina (LVC) está presente em cerca de 50 dos 88 países afetados pela LV, sendo os três maiores focos: a bacia do Mediterrâneo, a China e a América do Sul (Alvar *et al.*, 2004).

Existem estudos que sugerem que além do cão, outros animais silvestres e domésticos podem ser considerados reservatórios da LV. Raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) são os principais reservatórios em ambiente silvestre. Segundo Cabrera e colaboradores (2003), os gambás podem assumir um papel muito importante na epidemiologia da doença em áreas urbanas endêmicas para LV, onde a maioria dos mamíferos silvestres não são normalmente encontrados. Além disso, em ambiente doméstico, existem evidências de alta soroprevalência em gatos (*Felis catus*). Em um estudo de marcadores de infecção por *Leishmania*, Martin-Sanchez e colaboradores (2006), pesquisaram 183 gatos do sul da Espanha, encontrando uma soropositividade de 60% pela aplicação da técnica de RIFI. Nesse mesmo estudo, cerca de 25,7% dos gatos estudados apresentaram parasitemia, identificada por cultura do parasito e PCR. O papel epidemiológico desses animais ainda não está definido e deve ser melhor estudado. A infecção de

outros animais de grande porte como cavalos também já foi descrita utilizando técnicas sorológicas (Fernandez-Bellon *et al.*, 2006). Ainda segundo o autor, a rara ocorrência de casos de leishmaniose em cavalos sugere que a resposta imunitária nessa espécie é eficaz no controle da infecção.

## 2.5 Vetor

Os flebotomíneos transmissores da LV são pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, sendo o gênero *Phlebotomus* (Rondani & Berté, 1840) e *Lutzomyia* (França, 1924) responsáveis pela transmissão das leishmanioses no Velho Mundo e no Novo Mundo, respectivamente.

A espécie *Lutzomyia longipalpis* no Brasil foi descrita inicialmente por Lutz & Neiva em 1912 e, redescrita por França, em 1920, como *Phlebotomus longipalpis*, (Mangabeira, 1969). A espécie *Lutzomyia longipalpis* é considerada um complexo de espécies com elevada capacidade de colonizar diferentes habitats (Lainson e Rangel, 2005). Ela predomina na fauna flebotomínica das áreas endêmicas para LV, adaptando-se facilmente ao peridomicílio e a variações de temperatura, podendo ser encontrada no interior dos domicílios e em abrigos de animais domésticos (Sherlock, 1996). A ocorrência desta espécie vem aumentando no interior e ao redor de habitações humanas, facilitando a transmissão da doença, devido a sua grande capacidade de adaptar-se aos vários ambientes (Barata *et al.*, 2005). Além disso, a *Lutzomyia longipalpis* demonstra avidez para sugar o sangue humano e de várias outras espécies de mamíferos silvestres e domésticos (Deane, 1956; Saraiva, Andrade Filho, Falcao, De Carvalho, De Souza, Freitas, Gomes Lopes, Moreno e Melo, 2011; Afonso *et al.*, 2012; Brasil, 2006).

Existem evidências que apontam a *Lutzomyia longipalpis* como a principal espécie vetora transmissora da LV no Brasil, como: I) ocorrência de casos humanos e caninos de LV associada às distribuições geográficas desta espécie de flebotomíneo; II) encontro de *Lutzomyia longipalpis* naturalmente infectado com *Leishmania infantum*; III) possibilidade de se obter *Lutzomyia longipalpis* infectados experimentalmente com *Leishmania infantum*; IV) atração de *Lutzomyia longipalpis* para reservatórios de *Leishmania infantum* (cães e

raposas); e V) estabelecimento de um modelo experimental de transmissão de *Leishmania infantum* pela picada de *Lutzomyia longipalpis* infectado (Deane, 1956; Laisson *et al.*, 1977; Sherlock 1996, 1997). Alguns autores defendem a participação de outras espécies de flebotomíneos na transmissão da LV na América com base na sua distribuição coincidente com a doença e infecção natural dos vetores (Davies *et al.*, 2000; Gontijo *et al.*, 2008; Saraiva *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2010). A espécie *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) foi incriminada como vetor da LV, devido ao seu encontro na região de Ladário e Corumbá no Estado do Mato Grosso do Sul, onde casos de LV foram identificados dissociados da presença de *Lutzomyia longipalpis* (Galati *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 1998).

## 2.6 Métodos para detecção de *Leishmania* em flebotomíneos

A determinação das taxas de infecção natural por *Leishmania* de flebotomíneos em áreas endêmicas e a identificação correta da espécie de *Leishmania* constituem importantes ferramentas para os estudos epidemiológicos das leishmanioses, devendo ser imprescindíveis para a aplicação correta das medidas de controle da doença (Sherlock, 1995,8; Michalsky *et al.*, 2002).

Diversas técnicas têm sido empregadas para detecção de *Leishmania* spp. em insetos vetores. Os métodos clássicos utilizados para a detecção da infecção natural nos flebotomíneos, são o método parasitológico com observação da infecção por *Leishmania* após a dissecação do trato digestivo do vetor e identificação dos parasitos *in situ*, ou a inoculação em animais de laboratório (Carvalho *et al.*, 2008; Michalsky *et al.*, 2002).

A técnica da dissecação do trato digestivo do vetor e pesquisa direta do parasito foi empregada por diversos autores (Rangel *et al.*, 1984; Feliciangeli *et al.*, 1988; Azevedo *et al.*, 1990; Garrido *et al.*, 1990; Carvalho *et al.*, 2008). No entanto, existem fatores que limitam a detecção do parasito no interior dos vetores: – i) a dificuldade e demora no processamento de um grande número de amostras; ii) a baixa prevalência de infecção por *Leishmania* encontrada nos vetores em áreas endêmicas (Ashford *et al.*, 1992); e –iii) baixa especificidade

devido a fatores de confundimento no diagnóstico, como por exemplo, a presença de outros tipos de parasitos albergados pelas fêmeas de flebotomíneos como algumas espécies de *Trypanosoma* e *Endotrypanum*, que passam por estágio de promastigota que é indistinguível do mesmo estágio de *Leishmania* (Barbosa *et al.*, 2006; De Paiva *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008).

Atualmente, a técnica da dissecação vem sendo substituída por métodos moleculares, com o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR), que consiste na amplificação do DNA do parasito. Esta técnica apresenta como principais vantagens, especificidade e sensibilidade elevadas (Paiva *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008; Marcondes *et al.*, 2009).

Uma série de ensaios de PCR para detecção de DNA de *Leishmania*, têm sido aplicados aos estudos das taxas de infecção natural de flebotomíneos com resultados de sensibilidade e especificidade diferentes, (Aransay *et al.*, 2000; Marcondes *et al.*, 2009; Pita-Pereira *et al.*, 2009). A PCR quantitativa (qPCR), a tipagem de espécies de *Leishmania* com RFLP, hibridação ou sequenciamento do DNA de *Leishmania* amplificado por PCR com iniciadores espécie-específicos também tem sido utilizadas (Jorquera *et al.*, 2005; Garcia e Dujardin, 2007; Ranasinghe *et al.*, 2008; Saraiva, L. *et al.*, 2009).

## 2.7 Estudo da Infecção natural de flebotomíneos

Diversos autores capturaram espécimes de *Lutzomyia longipalpis* e demonstraram infecção natural por *Leishmania infantum* utilizando distintas técnicas diagnósticas (Silva *et al.*, 2007; Savani *et al.*, 2009; Missawa *et al.*, 2010; Michalsky *et al.*, 2011; Freitas *et al.*, 2012). A taxa de infecção natural desses insetos em áreas endêmicas relatadas é baixa, variando de 0,2% a 2% (Miranda, *et al.*, 2002; Oliveira-Pereira, Rebêlo, Moraes, *et al.*, 2006). Esse dado contrasta com a alta incidência da doença nessas regiões (Rodriguez *et al.*, 1999a; Luz *et al.*, 2000). Em outros estudos a infecção natural dos flebotomíneos não foi detectada, quando a técnica utilizada foi a dissecação das fêmeas para visualização do parasito (Carvalho *et al.*, 2008; Mayrink *et al.*, 1979; Vexenat *et al.*, 1986)

Além das espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lu. cruzi*, outras espécies de flebotomíneos também têm sido sugeridas como vetores potenciais da LV no



continente americano, sendo encontradas infectadas naturalmente, como *Pintomyia (Pifanomyia) evansi* (Nunez-Tovar, 1924) na Colômbia (Davies *et al.* 2000), *Migonemyia (Migonemyia) migonei* (França, 1920) em Pernambuco (Carvalho *et al.*, 2010), *Lutzomyia (Lutzomyia) forattinii* em Mato Grosso (Pita-Pereira *et al.*, 2008), *Evandromyia (Barretomyia) cortelezzi* (Brèthes, 1923) em Minas Gerais (Gontijo *et al.*, 2008), *Evandromyia (Barretomyia) sallesi* e *Nyssomyia neivai* (Saraiva *et al.*, 2009) em Minas Gerais. O resultado desses estudos sugerem a necessidade de constante monitoramento dessas espécies nas áreas endêmicas onde são capturados para avaliação de sua participação no ciclo de transmissão da LV.

## **2.8 Distribuição da *Lutzomyia longipalpis* na Bahia**

Os vetores das leishmanioses têm sido estudados desde o ano de 1958 por diversos autores que investigaram a ocorrência destes em grande parte do território da Bahia, possibilitando o conhecimento da fauna e distribuição desses flebotomíneos, principalmente do *Lu. longipalpis* (Mangabeira & Sherlock, 1958; Forattini *et al.*, 1973). No Estado da Bahia, foram detectadas 76 espécies de flebotomíneos (Sherlock & Dias-lima, 1995). Em um estudo realizado pela equipe do Laboratório de Parasitologia e Entomologia (LAPEN) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM – Fiocruz), a espécie *Lutzomyia longipalpis* representou 70,6% do total de 108.113 exemplares capturados. Ainda de acordo com dados de notificação do LAPEN e da FUNASA, essa espécie esteve presente em 121, dos 417 municípios baianos (Sherlock; Dias-Lima, 1995). Mais recentemente, relatórios elaborados pelo Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz (LACEN) em trabalhos de monitoramento realizados na Bahia entre os anos de 2009 e 2011, revelaram que a *Lutzomyia longipalpis* está presente em 300 dos 417 municípios baianos (Figura 2).

Em um estudo realizado na localidade de Monte Gordo, situada na zona litorânea do município de Camaçari, região norte do Estado da Bahia, foram realizadas capturas entomológicas em áreas de florestas e áreas desmatadas com a ocorrência da espécie *Lutzomyia longipalpis* (Dias-Lima, 2004). Em anos

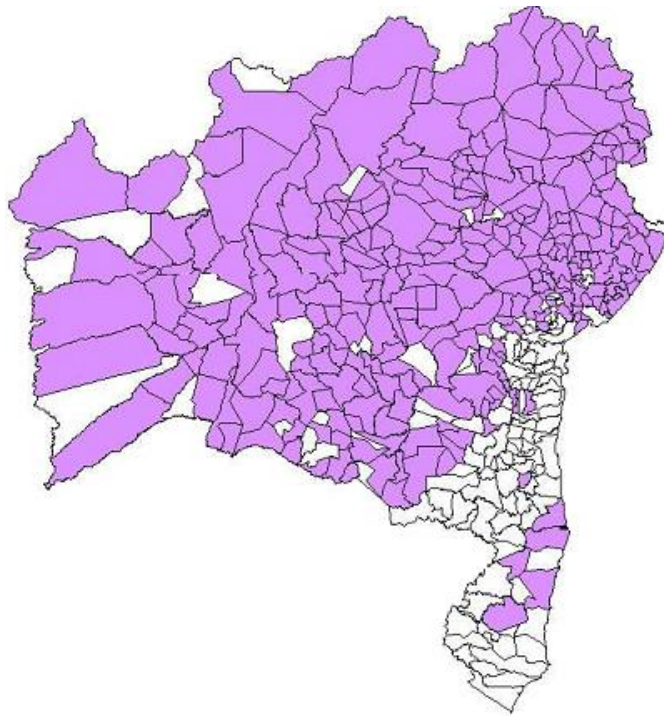
posteriores, um estudo realizado por Julião *et al.*, (2007) neste mesmo município, detectou a presença de *Lutzomyia longipalpis* em 50% das áreas investigadas

## 2.9 Influência das variáveis ambientais sobre os flebotomíneos

A avaliação de ocorrência de variação sazonal na fauna flebotomínica é importante para a compreensão da biologia, da relação entre a espécie e seu habitat, , assim como, da importância epidemiológica dos vetores e sua dinâmica na transmissão da leishmaniose (Macedo *et al.*, 2008). Os dados encontrados nesses estudos são importantes para propor medidas de controle que possam diminuir a proporção de flebotomíneos nos locais avaliados.

Diversos autores têm sugerido uma relação clara entre os fatores bioclimáticos, como temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade e a proporção de flebotomíneos, demonstrando que esses fatores podem influenciar a ocorrência desses insetos em determinadas áreas (Macedo *et al.*, 2008; Michalsky *et al.*, 2009; Amora, 2010). O aumento na proporção da população de flebotomíneos foi relatado em diversos estudos durante os meses chuvosos, sugerindo que a ocorrência de períodos de alta umidade é um fator favorável para a proliferação e sobrevivência de *Lutzomyia longipalpis* (Salomon *et al.*, 2002; Barata *et al.*, 2004; Ximenes *et al.*, 2006). Por outro lado, outros estudos mostraram redução na frequência de flebotomíneos concomitantemente com altos índices pluviométricos (Souza *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2007). Segundo Franke e colaboradores (2002), o fenômeno El Niño é um fator que poderia estar influenciando na variação da incidência anual de LV, assim como na variação da ocorrência de flebotomíneos. É possível que a ocorrência de um longo período seco desencadeado por esse fenômeno possa influenciar negativamente na presença e distribuição dos vetores e na intensidade da transmissão da doença. Em relação a temperatura, não foi encontrada correlação entre a presença de flebotomíneos e a variação de temperatura. Porém a ausência de correlação pode ter ocorrido devido à pequena variação de temperatura que ocorreu durante o período estudado (Macedo *et al.*, 2008). Nos *habitats* naturais dos flebotomíneos, Dias e colaboradores (2007), mostraram evidências de que pequenas variações na temperatura e umidade são suficientes para alterar a

dinâmica das populações de flebotomíneos favorecendo aumento da proliferação destes insetos.



**FIGURA 2:** Mapa de distribuição da espécie *Lutzomyia longipalpis* no Estado da Bahia até o ano de 2011. Os municípios marcados em roxo representam aqueles em que foram encontrados a espécie *Lutzomyia longipalpis* nos monitoramentos entomológicos realizado pelo LACEN/SUVISA no estado da Bahia.

### **3 OBJETIVO GERAL**

Determinar a flutuação mensal e a taxa de infecção natural por *Leishmania* na população flebotomínica em áreas urbanas e periurbanas em bairros do município de Camaçari-BA

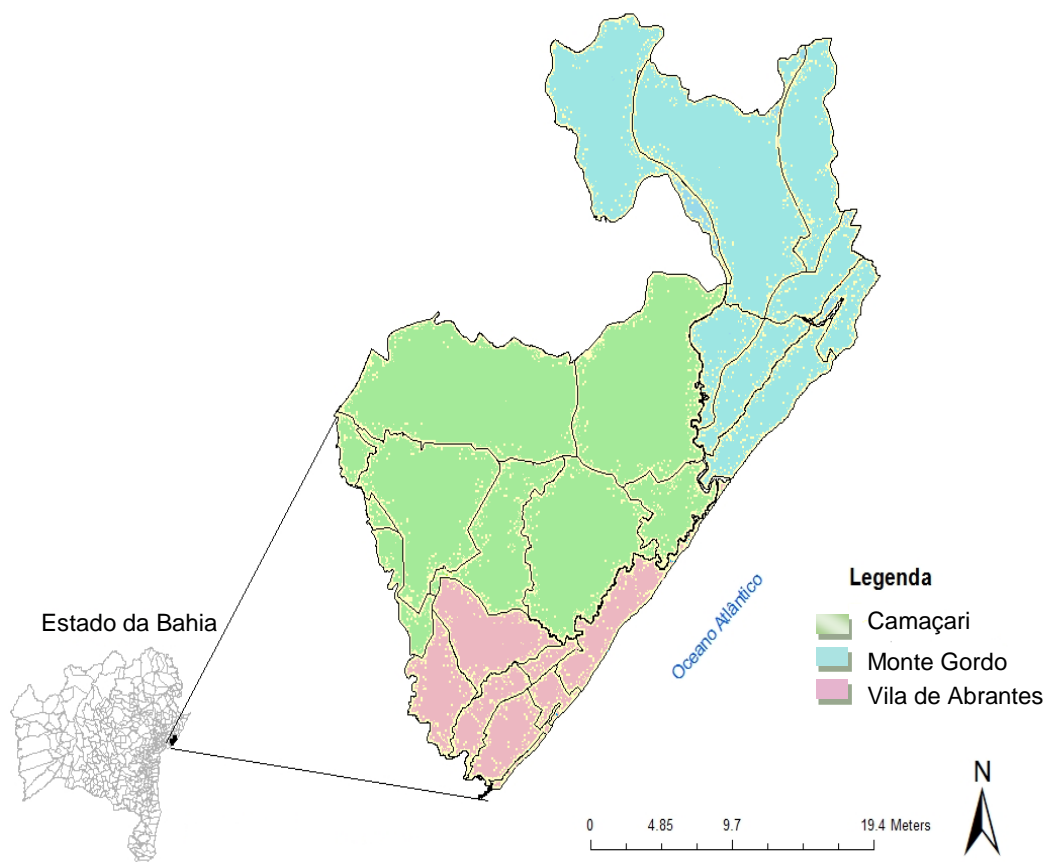
#### **3.1 ESPECÍFICOS**

- Identificar a fauna flebotomínica nas zonas urbana orla e urbana sede do município
- Determinar a diferença do perfil de distribuição dos flebotomíneos nas zonas estudadas
- Determinar a influência das variáveis climáticas sobre a população flebotomínica
- Determinar a frequência da infecção natural dos flebotomíneos nos meses de estudo

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Local do estudo

O estudo foi realizado no município de Camaçari (Figura 3), que é dividido em três distritos sanitários: Camaçari (sede), Vila de Abrantes e Monte Gordo. Os bairros dos distritos estão organizados em quatro zonas: zona urbana orla, zona urbana sede, zona rural orla e zona rural sede. Camaçari tem o maior território da região metropolitana de Salvador, distante da capital do estado da Bahia em cerca de 41 km (SESAU-Camaçari, 2010). Camaçari limita-se ao norte com Mata de São João, ao sul com Lauro de Freitas, ao sudoeste com Simões Filho, a oeste com Dias D'Ávila e a leste com o Oceano Atlântico. Seu território é de 785 Km<sup>2</sup> e sua faixa litorânea é de 42 Km.



**FIGURA 3.** Território do Município de Camaçari - BA com as demarcações dos distritos (Vila de Abrantes, Monte Gordo e Sede) e os limites do município. Fonte PERH, 2005. Modificado por LANDOSIG - UFBA 2012.

Camaçari situa-se na latitude 12°41'51" e longitude 38°19'27". Segundo o IBGE, sua população é de 275.575 habitantes, (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2013). O município possui clima tropical úmido com temperatura média de 26°C. Possui três áreas de proteção ambiental (APAs): Joanes/Ipitanga, Rio Capivara e Lagoas de Guarajuba, além de dunas, manguezais, restingas, mata ciliar e mata atlântica compondo as coberturas vegetais (Prefeitura municipal de Camaçari, 2012).

## **4.2 Estudo Piloto**

Residências foram selecionadas no município de Camaçari para a realização de um estudo piloto entre maio e agosto de 2011, visando conhecer previamente a fauna flebotomínica do local. Para escolha dos bairros e das residências foi utilizado um banco de dados contendo os casos de LV do município. Também foram utilizados croquis dos bairros do município fornecidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Camaçari, que auxiliaram na localização dos casos da doença e na escolha das áreas para instalação das armadilhas. Nesse estudo foram realizadas coletas não sistemáticas com instalação de armadilhas para coleta de flebotomíneos, por três dias consecutivos, em 14 bairros do município que haviam apresentado casos de LV humana e/ou canina.

As coletas de flebotomíneos foram realizadas com armadilhas luminosas do tipo HP (Pugedo *et al.*, 2005) (Figura 4). As armadilhas foram instaladas nas residências selecionadas em dois pontos, uma no intradomicílio e outra no peridomicílio (quintal e abrigos de animais) (Figura 5) e ficaram expostas das 17:00h às 6:00h da manhã seguinte, perfazendo um total de 13 horas de coleta ininterrupta. A instalação das armadilhas foi repetida por três noites consecutivas nos mesmos locais, conforme preconizado pelo Manual de Vigilância e Controle da LV (Brasil, 2006).

## **4.3 Estudo Sistemático**

### **4.3.1 Seleção das residências para coleta de flebotomíneos**

Para o estudo realizado com coletas sistemáticas dos flebotomíneos, durante o período de dezembro de 2011 a novembro de 2012, foram selecionadas 15 residências segundo critérios epidemiológicos e ambientais. Foram selecionadas residências consideradas receptivas à presença do vetor flebotomínico *Lutzomyia longipalpis* que apresentaram características tais como: a) presença no peridomicílio de matéria orgânica em abundância, b) áreas com sugestão de ocorrência de alta umidade, c) abrigo de animais próximo às residências humanas, d) presença de árvores com raízes e/ou ocorrência de buracos em pedras que são locais onde pode haver oviposição do vetor. Como base para os critérios epidemiológicos também foi considerada a presença de casos de LV humana e/ou canina notificados na residência e/ou vizinhança nos últimos cinco anos. Algumas residências do estudo piloto, que atendiam aos critérios epidemiológicos acima descritos, foram incluídas no estudo sistemático.



**FIGURA 4:** Armadilha tipo HP instalada no interior de um galinheiro.

#### **4.3.2 Captura sistemática dos flebotomíneos**

Durante o estudo sistemático, a metodologia utilizada para captura dos flebotomíneos foi similar a utilizada no estudo piloto, distinguindo-se desta, pela repetição mensal das coletas realizadas nas mesmas residências selecionadas durante 12 meses ininterruptos, entre os meses de dezembro de 2011 a novembro de 2012.



Para a coleta dos flebotomíneos foram utilizadas 30 armadilhas instaladas em 11 bairros do município: 5 bairros pertencentes à zona urbana orla - Barra de Pojuca, Monte Gordo, Barra de Jacuípe, Areias e Jauá, e 6 bairros da zona urbana sede do município - Parque Real Serra Verde, Jardim Limoeiro, Verde Horizonte, Nova Vitória, Parque Verde II e Phooc III (Anexo 1). As coletas foram realizadas preferencialmente nas duas primeiras semanas de cada mês. Sendo que, na primeira semana de cada mês, foram avaliados os bairros da zona urbana orla e, na segunda semana, os bairros da zona urbana sede.



**FIGURA 5:** Diferentes locais de instalação das armadilhas nas residências para captura dos flebotomíneos A) Intradomicílio de uma residência em Monte Gordo sem reboco na parede e com presença de buracos; B) Peridomicílio de uma residência em Monte Gordo com a presença de galinheiro e vegetação no seu entorno; C) Exemplo de peridomicílio de residência em Barra de Pojuca com presença de matéria orgânica, raízes de árvores e vegetação próxima a um abrigo de cão; D) Peridomicílio de uma residência em Barra de Jacuípe com criação de galináceos e vegetação no entorno da criação dos animais.

#### 4.4 Ética: Termo de consentimento livre e esclarecido



Para inclusão das residências no estudo, cada proprietário assinou um termo de consentimento livre e esclarecido, contendo o título do projeto, seus objetivos e os procedimentos a serem adotados durante o estudo (Anexo 2).

#### **4.5 Aplicação de questionário**

Após a assinatura do termo de consentimento para participação voluntária, o estudo foi iniciado com a aplicação de um questionário ao proprietário da residência (Anexo 3). O questionário aplicado consistiu em uma ferramenta para coleta dos dados referentes a informações de: I) dados cadastrais do proprietário da residência, II) dados de georreferenciamento da residência, III) medidas de controle para insetos adotadas na área do estudo, IV) tipo de ambiente investigado, VI) informações a respeito da ocorrência de casos de LV humana e/ou canina nas residências investigadas e na vizinhança, VII) presença de fatores de risco ambientais ligados à presença de flebotomíneos, como a presença de animais domésticos e/ou animais de criação e más condições de conservação do peridomicílio. Outros dados observados foram o tipo de parede, de chão e teto das residências avaliadas, presença de vegetação, jardins, árvores, madeiras empilhadas, folhas e troncos podres, canais de águas pluviais e esgotos abertos, fatores que representam risco para a presença de criadouros de flebotomíneos. Também foram anotados dados relacionados à instalação das armadilhas e coleta de flebotomíneos.

Todos os dados pessoais/confidenciais obtidos pela aplicação desse questionário foram mantidos em banco de dados criado no programa Epiinfo, com acesso restrito e os questionários foram mantidos em armários trancados.

#### **4.6 Georreferenciamento e obtenção de dados climáticos**

No momento da aplicação do questionário e da instalação das armadilhas para levantamento da fauna de flebotomíneos, foi utilizado um aparelho *Global Positioning System* (GPS) modelo Garmin® eTrex HC para georreferenciar as residências investigadas.

Com a finalidade de obter dados microclimáticos de temperatura, umidade relativa do ar e velocidade dos ventos nos locais de instalação das armadilhas foi utilizado um aparelho termo-higro-anemômetro. Os dados foram compilados uma vez por mês no peridomício das residências nos locais exatos de instalação das armadilhas, durante todo o estudo. Dados mensais de pluviosidade foram compilados do banco de dados históricos do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia), 4º distrito da Bahia. Esses dados de pluviosidade foram referentes a base meteorológica de Ondina, situada na capital Salvador. As variáveis microclimáticas de temperatura, umidade e pluviosidade foram utilizadas para avaliação de correlação entre elas e a proporção dos flebotomíneos capturados ao longo do estudo, assim como a flutuação mensal de insetos capturados.

#### **4.7 Preparo, montagem e Identificação dos flebotomíneos**

As armadilhas provenientes do campo foram recolhidas e levadas ao laboratório do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Camaçari-BA, onde os insetos capturados foram triados com o auxílio de microscópio estereoscópico, identificando os flebotomíneos dentre os outros insetos. As outras espécies de insetos foram descartadas e os flebotomíneos foram triados por sexo e acondicionados em tubos devidamente catalogados, apresentando informações quanto à quantidade de flebotomíneos capturados, data e local de captura. Os flebotomíneos machos e fêmeas foram acondicionados inicialmente em tubos contendo álcool 70% e mantidos a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

No dia seguinte à captura, os flebotomíneos mantidos nos tubos foram levados para o Laboratório de Patologia e Biointervenção (LPBI) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – CPqGM, onde os machos permaneceram acondicionados em tubos contendo álcool 70% e as fêmeas foram acondicionadas em tubos com dimetilsufóxido (DMSO) a 6%. Os tubos foram mantidos a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento da identificação.

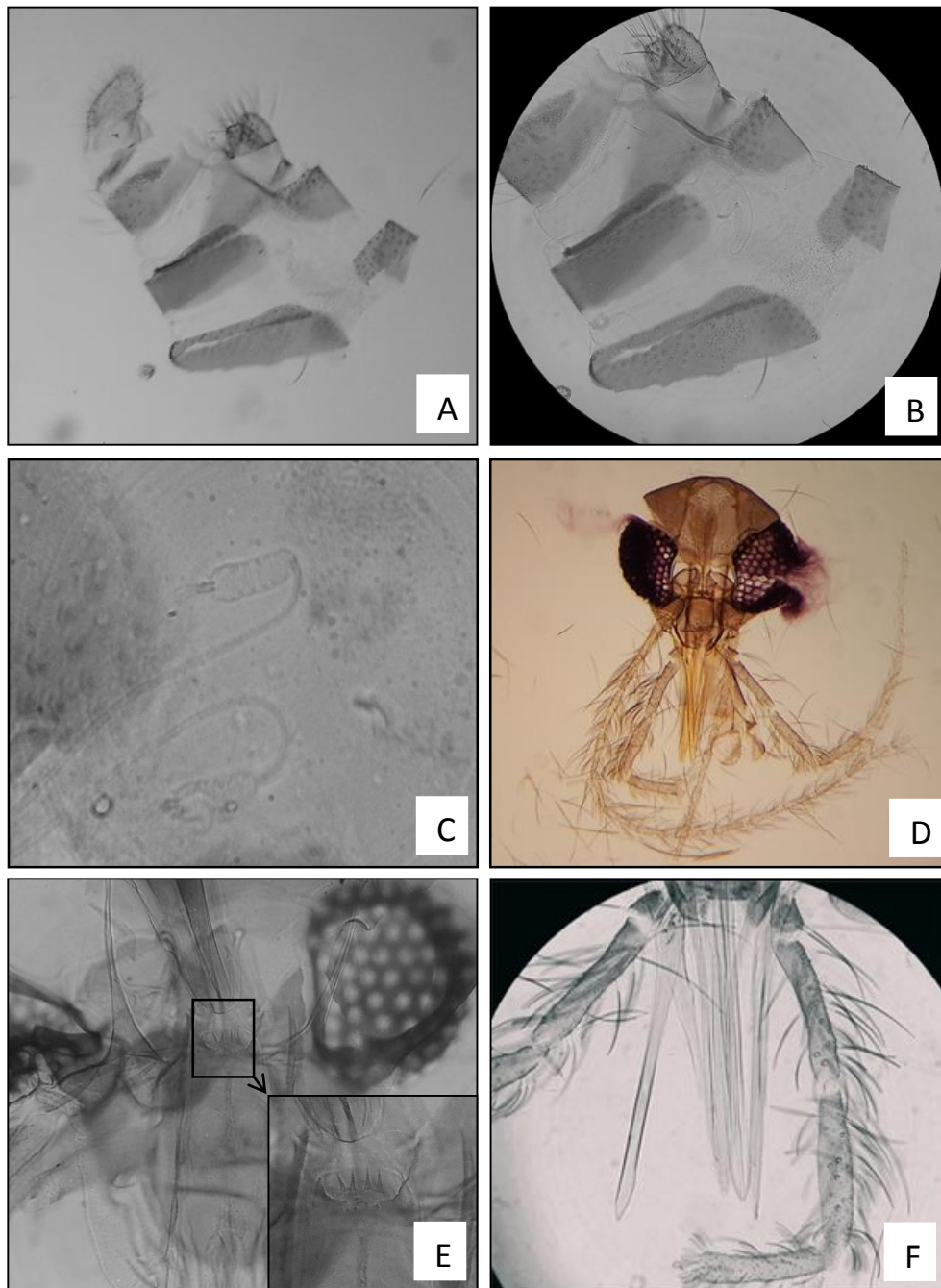
A identificação taxonômica dos flebotomíneos foi realizada no LPBI-CPqGM e a confirmação da identificação das espécies foi realizada de forma cega pela equipe do laboratório de entomologia do LACEN.

Os flebotomíneos capturados foram identificados utilizando descrições específicas, chaves taxonômicas e comparações com exemplares da coleção de referência do laboratório de entomologia do LACEN. A classificação adotada foi a proposta por Galati (2003). Alguns exemplares não estavam íntegros, apresentando somente parte do material, o que permitiu a identificação do gênero, mas não da espécie do inseto.

Os flebotomíneos machos foram preparados para a identificação da espécie, de acordo com as técnicas padronizadas pelo setor de entomologia do LACEN. Os espécimes foram submetidos ao processo de diafanização ou clarificação, em três etapas: i) incubação em uma solução de hidróxido de potássio 20% por 24 horas, ii) incubação em ácido acético 10% por 40 minutos e 3 lavagens com H<sub>2</sub>O destilada, com imersão por 15 min em cada lavagem e iii) incubação em uma solução de lacto-fenol por 24h. Em seguida, os flebotomíneos clarificados foram dispostos em lâminas para avaliação quanto às suas características morfológicas específicas, utilizando microscópio óptico (100x e 400x).

Para identificação dos espécimes fêmeas dos flebotomíneos, estas tiveram o corpo dissecado para separar a cabeça e os dois últimos segmentos abdominais. Foi utilizado o protocolo padronizado pelo Laboratório de Leishmanioses (LALEI) do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR). A cabeça e o fragmento do abdômen foram montados entre lâmina e lamínula, utilizando-se líquido de Berlese de acordo com a técnica de Langeron (1949) modificada (Figura 6). O restante do corpo de cada fêmea dissecada (fragmento contendo tórax e resto de abdômen) foi novamente acondicionado em dimetilsufóxido a 6% e os tubos foram mantidos a -70°C, até a extração do DNA genômico. Para cada fragmento de fêmea mantido em dimetilsufóxido a 6%, uma lâmina foi montada contendo cabeça e abdômen devidamente identificados. Os insetos identificados foram catalogados no LPBI para consultas posteriores, os

machos foram mantidos em solução de lacto-fenol e as fêmeas permaneceram montadas em lâminas.



**FIGURA 6:** Fotografias de microscopia óptica demonstrando as principais estruturas morfológicas utilizadas na identificação de fêmeas de flebotomíneos. A) e B) Segmentos dissecados do abdômen de fêmea da espécie *Lutzomyia longipalpis* aumentada em 100x e 400x respectivamente; C) Espermateca de fêmea da espécie *Lutzomyia longipalpis* aumentada em 1000x; D) Cabeça de uma fêmea de flebotomíneo; E) Região da cabeça de uma fêmea da espécie *Lutzomyia evandroi* destacando a região com a presença do cibário em destaque; F) Região da cabeça de uma fêmea de *Lutzomyia longipalpis* contendo peças bucais como faringe, labrofaringe e presença dos palpômeros.

#### 4.8 Composição dos *pools* de flebotomíneos

Após a identificação das fêmeas, o material restante da dissecação contendo fragmentos do tórax e restos de abdômens de cada fêmea foram reunidas em *pools* para processamento de extração de DNA. Os *pools* foram compostos por flebotomíneos coletados da mesma espécie, nas mesmas residências, divididos quanto a intradomicílio e peridomicílio e de acordo com os meses de coleta no estudo. Os *pools* foram compostos por uma única espécie variando de 2 a 10 fragmentos de fêmeas por *pool*.

#### 4.9 Extração de material genômico de flebotomíneos

A identificação das fêmeas foi realizada por um método diferente daquele utilizado para identificação dos espécimes machos, pois para que fosse extraído DNA do flebotomíneo e do parasito para realização da qPCR, as fêmeas não passaram pelo processo de diafanização (item 4.7). Os flebotomíneos fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* selecionados para composição dos *pools* segundo os critérios supracitados foram transferidos para tubos “eppendorfs” de 1,5 mL de fundo oval. A extração de DNA foi realizada de acordo com os protocolos de Souza e colaboradores (2004) e Michalsky e colaboradores (2002) modificados. Para obtenção do DNA dos *pools* de fêmeas, os *pools* compostos por 2 a 10 abdômens foram macerados em tubos de 1,5 mL contendo 60 µl de tampão de lise celular (100mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, pH 8,0) e 10 µL de solução de proteinase K a 1 mg/mL (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) com o auxílio de um pistilo plástico (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, USA) autoclavado. Em seguida, o material macerado foi incubado em banho-maria a 37°C por um período de 16 a 18 h. Ao final do período de incubação, foram adicionados aos extratos de DNA: 70 µL de água miliQ ultrapura e 120 µl de fenol saturado em tampão (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA). Em seguida, esses extratos foram homogeneizados e centrifugados a 14.000 x g durante 5 min à temperatura ambiente. Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para novos tubos de 1,5mL. No novo tubo foram adicionados 120 µl de uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), seguido de centrifugação por 5 min a 14.000 x g. Em seguida, os sobrenadantes obtidos

foram novamente transferidos para novos tubos de 1,5 mL e foram precipitados em 200 µl de etanol absoluto a 4°C e 20 µl de acetato de sódio (3M, pH 5.2) *overnight* a -20°C. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 14.000 x g por 20 min. Os sobrenadantes foram então descartados e os *pellets* lavados por centrifugação com 100 µl de etanol absoluto e submetidos a uma última centrifugação a 18.500 x g por 20 min. Os sobrenadantes obtidos foram descartados e os tubos mantidos à temperatura ambiente para secagem do restante do álcool presente na parede do tubo. Após a secagem, as amostras de DNA foram ressuspensas em 50 µl de tampão Tris-EDTA 1X (TE). Posteriormente, a concentração das amostras foi determinada usando espectrofotômetro digital (Nanodrop® ND-1000 Thermo Scientific, Wilmington, USA). Por fim, as amostras de DNA foram aliquotadas na concentração de 20 ng/µL e estocadas no freezer a -20°C até sua utilização.

#### **4.10 PCR quantitativa (qPCR)**

##### **4.10.1 Gene constitutivo específico de flebotomíneo**

Na PCR em tempo real realizada foram utilizados *primers* adequados para sonda TaqMan que têm como alvo o gene da periodicidade de *Lutzomyia longipalpis* (GenBank AF446142; Bauzer *et al.* (2002) e que não amplificam o DNA genômico da *Leishmania*. O valor de amplificação do gene controle de flebotomíneos foi utilizado para normalizar a concentração da amostra de DNA de *Leishmania* presente nas amostras dos *pools* de fêmeas de flebotomíneos, bem como para assegurar que os resultados negativos no teste não ocorreram devido a problemas na amostra, como degradação de DNA ou presença de inibidores de PCR. Para amplificar o gene da periodicidade como referência interna do DNA genômico de flebotomíneo, foram usados o *pre-developed* TaqMan assay reagents (Perkin-Elmer Applied Biosystems). As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo: 5 µL da amostra de DNA flebotomínico, diluído com água deionizada na concentração de 20 ng/µL, e 20 µL de mistura de PCR, que consiste em 12,5 µL da Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA), *primer forward* 5'-A ATTTCTTTTCCTTAGGACCATCGA-3' (Fleb-F) e *primer reverse* 5'-

TAGGACATCTTCGGAAAATTGTTG-3' (Fleb-R), 1,5 µL ambos em uma concentração final de 900 nM, e uma sonda fluorogênica 5'-AMTCCTCASAGTCTTTGACTCCACGTTGGTT-3' que foi sintetizada junto com uma molécula TAMRA *reporter* ligado à extremidade 5', assim como um MGB-QNQ *quencher* ligado à extremidade 3' (Perkin-Elmer Applied Biosystems), 2,5 µL em uma concentração final de 200 nM e 2µl de BSA (2,5µg) para completar o volume final da reação de 25 µL. Para cada reação de amplificação foi realizada uma curva padrão para o gene controle cuja concentração variou entre 100 a 6,25 ng, utilizando DNA extraído de *pools* de flebotomíneos machos oriundos de colônias. A reação de amplificação foi realizada em duplicata para cada amostra usando o ABI Prism 5900 *sequence detection system* (Perkin-Elmer Applied Biosystems). As condições de temperatura da reação foram de 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Para cada amostra, a quantidade de DNA amplificado do gene controle foi determinada pela comparação entre os valores do Ct das amostras com o Ct da curva padrão. O *slope* da curva padrão do gene (periodicidade) foi calculado e correspondeu a -3,67 (DP 0,29), que representa a média dos valores de *slope* de 3 experimentos independentes com o coeficiente de correlação correspondente ( $r^2$ ) de 0.994 (DP 0,0001). Somente foram utilizadas para avaliação da infecção natural por *Leishmania* amostras de DNA que amplificaram o gene da periodicidade.

#### 4.10.2 Detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos

A PCR quantitativa foi utilizada para determinar a quantidade de DNA de *Leishmania* presente nas amostras dos *pools* de fêmeas de flebotomíneos capturadas. Os ensaios de qPCR realizados foram baseados no protocolo descrito por Francino e colaboradores (2006). O alvo da reação foi uma região conservada do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania infantum* que amplifica um fragmento de 120 pares de base (bp). As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL, consistindo de 5 µL de DNA em 20 ng/µL (para os *pools* de flebotomíneos) e 20 µL de mistura de PCR, que consiste em: 12,5 µL da Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA), *primer forward* 5'-AACTTTTCTGGTCTCCGGGTAG-3'

(Leish-1) e *primer reverse* 5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3' (Leish-2), ambos em uma concentração final de 900 nM, uma sonda fluorogênica 5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3' que foi sintetizada junto com uma molécula FAM *reporter* ligada à extremidade 5', assim como um MGB-QNQ *quencher* ligado à extremidade 3' (*Perkin-Elmer Applied Biosystems*), em uma concentração final de 200 nM. A quantificação de DNA de *Leishmania* foi realizada utilizando-se um método absoluto com base na comparação dos valores do *threshold Cycle* (Ct) em relação aos valores de Ct da curva padrão construída a partir de diluições seriadas de 10 vezes de DNA de *Leishmania* extraído a partir de culturas axênicas de promastigotas com  $10^5$  até  $10^{-1}$  parasitas em triplicata. A reação de amplificação foi realizada utilizando o sistema de detecção ABI Prism 5900 (*Perkin-Elmer Applied Biosystems*) com as amostras em triplicata. As condições estabelecidas para a reação foram de 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, e 40 ciclos a 95°C durante 15 s e 60°C durante 1 min. Com intuito de minimizar as variações entre as placas, os valores obtidos em cada placa foram normalizados a partir de um *threshold* comum. Posteriormente, o valor do Ct de cada amostra foi calculado com base na determinação do ponto em que a fluorescência gerada na reação excedeu o *threshold*. Para determinação do *cut-off* definido como ponto de corte, a reação de amplificação para kDNA de *Leishmania* foi realizada utilizando na mesma placa amostras de DNA extraídas de 13 flebotomos machos como controle negativos e 13 amostras de DNA extraídas de flebotomos machos misturadas ao DNA de *Leishmania* como controle positivo. Uma curva ROC foi construída e o ponto de corte correspondeu aquele que forneceu os maiores valores de sensibilidade e especificidade para o teste. Assim, o Ct de cada amostra testada foi considerado positivo ou negativo de acordo com o valor do ponto de corte estabelecido que ficou definido em  $Ct < 28,83$ . A carga parasitária foi expressa pelo número de parasitos e normalizada para a quantificação média da amplificação do gene controle da periodicidade de cada *pool* de fêmeas de flebotomíneos.

#### 4.11 Cálculo da taxa de infecção natural

A taxa de infecção natural das fêmeas de flebotomíneo foi calculada de acordo com Paiva e colaboradores (2007) e Thies e colaboradores (2013), pela



fórmula: número de *pools* de cada espécie em que houve detecção de DNA de *Leishmania* multiplicado por 100 e dividido pelo número total de indivíduos dos *pools* da espécie.

#### **4.12 Influência das variáveis climáticas sobre os flebotomíneos**

Para verificar a influência dos fatores ambientais sobre a flutuação mensal da população dos flebotomíneos ao longo de um ano foram utilizados dados climáticos de temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e pluviosidade (mm<sup>3</sup>) referentes ao período de dezembro de 2011 a novembro de 2012. Para as análises foram considerados os valores das médias mensais para cada uma das variáveis de associação avaliadas. A correlação entre as variáveis bioclimáticas e a proporção populacional de flebotomíneos foi calculada utilizando o coeficiente de correlação não paramétrica de Spearman (valor  $p \leq 0.05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Distribuição de flebotomíneos no município

#### 5.1.1 Estudo piloto para captura de flebotomíneos

No período de maio a agosto de 2011 foi realizado um estudo entomológico piloto objetivando conhecer a fauna flebotomínica no município de Camaçari. Foram capturados 624 espécimes, sendo 450 (72,1%) machos e 174 (27,9%) fêmeas. Nesse estudo, a presença de flebotomíneos foi detectada em 9 dos 14 bairros investigados (Anexo 4). O número total de flebotomíneos coletados no estudo piloto distribuídos por bairros e sexo pode ser observado resumidamente na Tabela 1. Ainda é possível observar nessa tabela, os casos notificados de LV humana entre os anos de 2007 a 2011 nos bairros investigados do município. Conjuntamente, os dados de coleta dos flebotomíneos e os dados notificados da LV humana, nos auxiliou na seleção dos bairros a serem investigados no estudo sistemático.

**TABELA 1.** Número total de flebotomíneos coletado no estudo piloto distribuído por bairros e sexo e o número de casos de LV humana notificados entre 2007 e 2011.

Bairros investigados	Nº de flebotomos coletados			Pontos por bairro	LVH 2007 a 2011
	♂	♀	Total		
Jardim Limoeiro	44	14	58	5	1
Nova Vitória	-	4	4	4	3
Parque Real Serra Verde	111	40	151	6	1
Jauá	62	32	94	5	5
Alto da Cruz	9	6	15	4	-
Camaçari de Dentro	7	3	10	5	-
Parque Florestal	5	4	9	5	-
Parafuso	5	1	6	4	-
Areias	207	70	277	3	-
Natal	-	-	-	5	-
Gravatá	-	-	-	4	-
Verde Horizonte	-	-	-	4	1
Parque Verde	-	-	-	4	1
Machadinho	-	-	-	6	-
<b>Total</b>	<b>450</b>	<b>174</b>	<b>624</b>	<b>64</b>	<b>12</b>

### 5.1.2 Estudo sistemático para captura de flebotomíneos

No período de dezembro de 2011 à novembro de 2012 foi realizado um estudo sistemático nos bairros selecionados para o estudo da flutuação mensal e infecção natural dos flebotomíneos. Nesses bairros foram coletados 5.745 flebotomíneos, sendo 4.374 (76%) machos e 1.371 (24%) fêmeas. A relação encontrada entre machos e fêmeas foi de 3:1.

Do total de 5.745 espécimes de flebotomíneos coletados, apenas 5.319 espécimes foram identificados quanto à espécie específica considerando as características morfológicas usadas para identificação. A soma restante, 426 (7,4%) foi identificada somente quanto ao gênero, pois não apresentavam todas as estruturas necessárias para identificação. Os espécimes fêmeas identificados somente quanto ao gênero, bem como aquelas que se apresentaram alimentadas não foram incluídas na composição dos *pools* para verificação da infecção natural dos flebotomíneos. A Tabela 2 lista as espécies de flebotomíneos identificadas e sua distribuição de acordo com os bairros onde foram capturadas nas zonas urbana orla e urbana sede do município de Camaçari-BA.

A fauna flebotomínica obtida em nosso estudo apresentou uma diversidade representativa de espécies de flebotomíneos no município. A fauna encontrada foi composta por quatro gêneros, com ocorrência de 5 espécies: *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (98,4%) (Lutz & Neiva, 1912), *Evandromyia (Barretomyia) sallesi* (0,81%) (Galvão & Coutinho 1939), *Evandromyia (Aldamyia) evandroi* (0,42%) (Costa Lima & Antunes, 1936), *Nyssomyia whitmani* (0,22%) (Antunes & Coutinho, 1939), *Pressatia choti* (0,14%) (Floch & Abonnenc, 1941). Espécimes de *Evandromyia (Barretomyia) serie cortelezzii* (0,08%) foram identificados somente quanto ao gênero.

A fauna flebotomínica encontrada nos bairros investigados em nosso estudo foi concentrada na zona urbana orla e zona urbana sede do município. Cerca de 95,8% dos flebotomíneos foram coletados na zona urbana orla, tendo sido Monte Gordo o bairro com maior proporção de flebotomíneos capturados. Outros bairros da zona urbana orla que se destacaram pela coleta de flebotomíneos foram Areias e Barra de Jacuípe. As residências incluídas no estudo, situadas nos bairros de Barra de Pojuca e Jauá foram descontinuadas

durante o período de coleta dos flebotomíneos e mensuração dos dados microclimáticos, representando uma perda de seguimento no estudo. A proporção de flebotomíneos coletados em bairros da zona urbana sede do município foi de apenas 4,12%. Dentre esses bairros, destacou-se o Parque Verde II.

A menor proporção de flebotomíneos foi identificada no mês de novembro de 2012 (2,67%) enquanto a maior proporção foi identificada em setembro de 2012 (19,29%). O número total de flebotomíneos coletados distribuídos mensalmente e pelos bairros da zona urbana orla e zona urbana sede do município de Camaçari-BA pode ser observada na Tabela 3.

Quanto ao comportamento de endofilia e exofilia dos flebotomíneos capturados no município de Camaçari, 93,8% dos espécimes foram encontrados no peridomicílio, enquanto que 6,2% foram capturados no intradomicílio. A tabela 4 mostra a distribuição dos flebotomíneos capturados segundo a espécie e o setor da residência investigado pela exposição das armadilhas, entre o período de dezembro de 2011 a novembro de 2012 no município de Camaçari – BA.

**TABELA 2.** Número total de espécimes de flebotomíneos identificados e distribuídos de acordo com os bairros onde foram capturadas nas zonas urbana orla e urbana sede do município de Camaçari-BA

Nº de pontos de coleta	Flebotomíneos coletados na Zona Urbana Orla						Total de flebotomos (%)	Flebotomíneos coletados na Zona Urbana Sede												Total de flebotomos (%)	Total (%) de flebotomos (Geral)				
	6		4		2			2		2		2		2		2									
	Monte Gordo		Barra de Jacuipe		Areia			Pq Real Serra Verde		Verde Horizonte		Nova Vitória		Parque Verde II		Phoc III		Jjardim Limoeiro							
Espécies identificadas	♂	♀	♂	♀	♂	♀	N	(%)	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	N	(%)	N	(%)	
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	3189	810	403	79	526	78	5085	95,60	19	3	1	1	2	-	95	13	1	-	11	4	150	2,8	5235	98,42	
<i>Evandromyia sallesi</i>	-	-	-	-	3	8	11	0,21	-	-	1	1	2	29	-	-	-	-	-	-	-	33	0,6	44	0,81
<i>Evandromyia evandroi</i>	5	11	-	-	-	1	17	0,32	-	-	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	4	0,1	21	0,42
<i>Nyssomyia whitmani</i>	-	-	-	-	-	1	1	0,02	-	-	-	-	-	-	3	5	-	-	-	1	9	0,2	10	0,22	
<i>Pressatia choti</i>	1	1	-	-	-	-	2	0,04	-	-	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	3	0,1	5	0,14
<i>(Serie cortellezzi)</i>	4	-	-	-	-	-	4	0,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0	4	0,08	
<b>Total</b>	<b>3199</b>	<b>822</b>	<b>403</b>	<b>79</b>	<b>529</b>	<b>88</b>	<b>5120</b>	<b>95,8</b>	<b>19</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>29</b>	<b>100</b>	<b>18</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>11</b>	<b>5</b>	<b>199</b>	<b>3,8</b>	<b>5319</b>	<b>100</b>	

\*Do total de 5.745 espécimes de flebotomíneos coletados, apenas 5.319 espécimes foram identificados quanto à espécie específica utilizando as características morfológicas usadas para identificação.

**TABELA 3.** Número total de flebotomíneos coletados mensalmente entre dezembro de 2011 à julho de 2012 distribuídos pelos bairros da Zona Urbana Orla e Zona Urbana Sede do município de Camaçari-BA

Período do estudo		Flebotomíneos coletados na Zona Urbana Orla)						Total de flebotomos (%)		Flebotomíneos coletados na Zona Urbana Sede										Total de flebotomos (%)		Total (%) de flebotomos (Geral)			
		Monte Gordo		Barra de Jacuipe		Areias				Parque Real Serra Verde		Jardim Limoeiro		Verde Horizonte		Nova Vitória		Parque Verde II						Phoc III	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	N	(%)	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	N	(%)	N	(%)
2011	DEZ	177	46	-	-	7	4	234	4,07	1	-	-	-	-	-	2	-	18	5	-	-	26	0,45	260	4,53
	JAN	246	56	4	1	31	8	346	6,02	9	1	-	2	-	-	-	-	1	-	-	-	13	0,23	359	6,25
	FEV	347	85	96	16	32	10	586	10,20	-	1	-	-	1	2	-	1	5	2	-	-	12	0,21	598	10,41
	MAR	272	81	35	4	72	14	478	8,32	-	-	3	3	-	-	1	1	3	3	-	-	14	0,24	492	8,56
	ABR	265	100	81	21	56	13	536	9,33	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	0,17	546
2012	MAI	167	90	67	24	82	13	443	7,71	-	-	-	1	1	-	4	17	69	6	1	-	99	1,72	542	9,43
	JUN	230	93	7	1	24	4	359	6,25	-	-	6	-	-	-	-	-	3	3	-	-	12	0,21	371	6,46
	JUL	207	85	45	13	24	2	376	6,54	-	1	1	-	-	1	4	9	7	3	-	-	26	0,45	402	7,00
	AGO	449	43	17	4	19	7	539	9,38	4	1	-	1	-	-	-	-	2	-	-	-	8	0,09	547	9,52
	SET	708	279	16	4	74	23	1104	19,22	-	-	-	-	-	-	1	-	2	1	-	-	4	0,08	1108	19,29
	OUT	154	97	19	9	67	14	360	6,27	4	-	2	-	-	-	1	-	1	-	-	-	8	0,09	368	6,41
	NOV	39	10	22	8	57	11	147	2,56	2	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	5	0,09	152	2,65
Total		3261	1065	409	105	545	123	5508	95,87	20	16	12	7	2	3	13	29	111	23	1	-	237	4,12	5745	100
%*		75,20%		8,95%		11,63%				0,63%		0,33%		0,09%		0,73%		2,33%		0,02%					

\* O percentual abaixo do número total de flebotomíneos coletados em cada bairro foi calculado com base no total dos flebotomíneos coletados nas duas zonas investigadas.

**TABELA 4.** Distribuição dos flebotomíneos capturados segundo a espécie e o setor da residência investigado pela exposição das armadilhas, entre o período de dezembro de 2011 a novembro de 2012 no município de Camaçari – BA

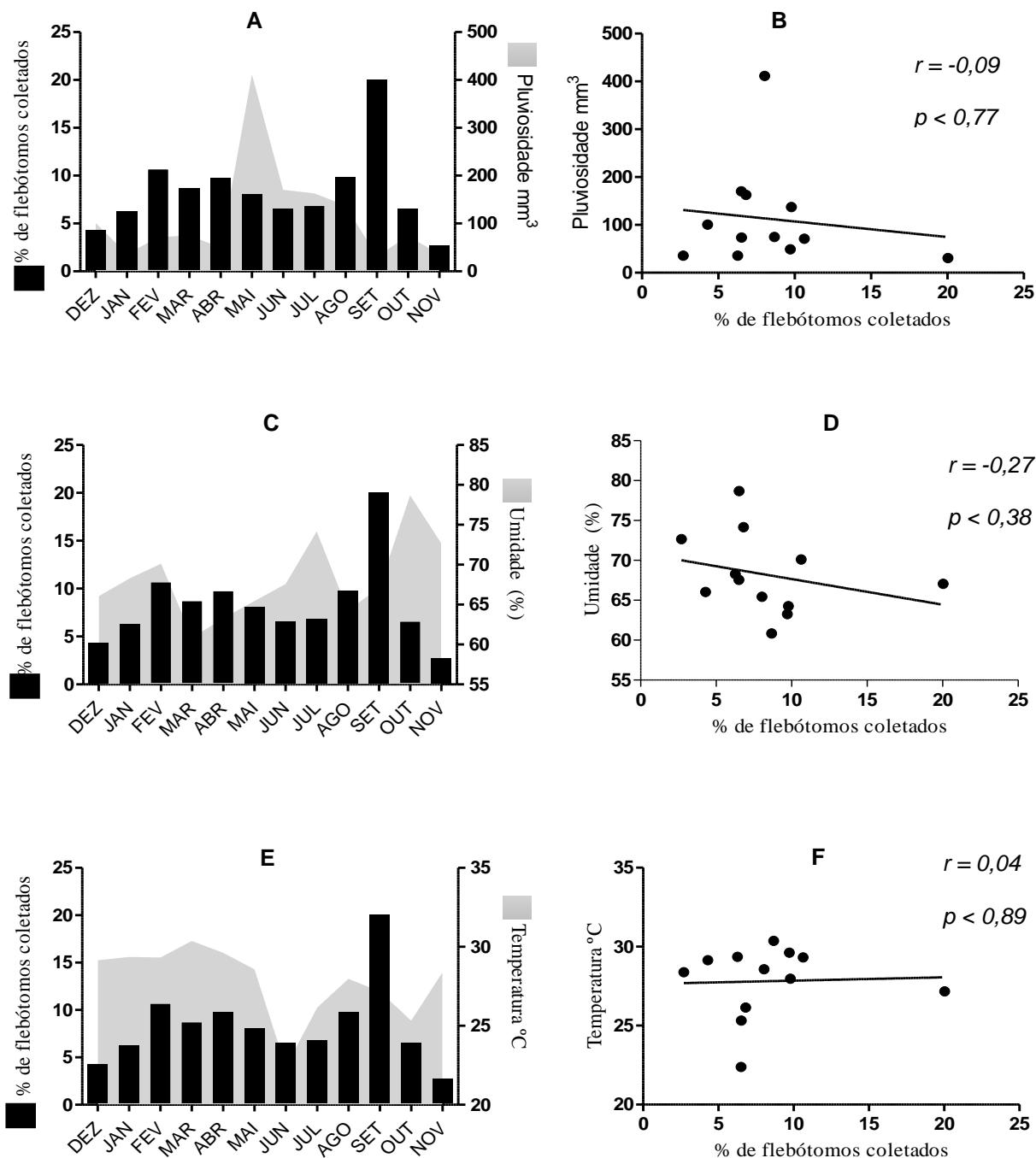
Espécies identificadas	Intradomicílio		Peridomicílio		Total	%
	♂	♀	♂	♀		
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	256	58	3990	931	5235	98,4
<i>Evandromyia sallesi</i>	2	1	1	40	44	0,81
<i>Evandromyia evandroi</i>	4	7	5	5	21	0,42
<i>Nyssomyia whitmani</i>	2	-	1	7	10	0,22
<i>Pressatia choti</i>	1	-	3	1	5	0,14
<i>Serie cortelessi</i>	-	-	4	-	4	0,08
Sub –Total (%)	265 (4,97)	66 (1,24)	4004 (75,2)	984 (18,5)	5319	(100)
Total (%)	331 (6,2)		4988 (93,8)			

## 5.2 Influência das variáveis climáticas sobre a proporção da população flebotomínica

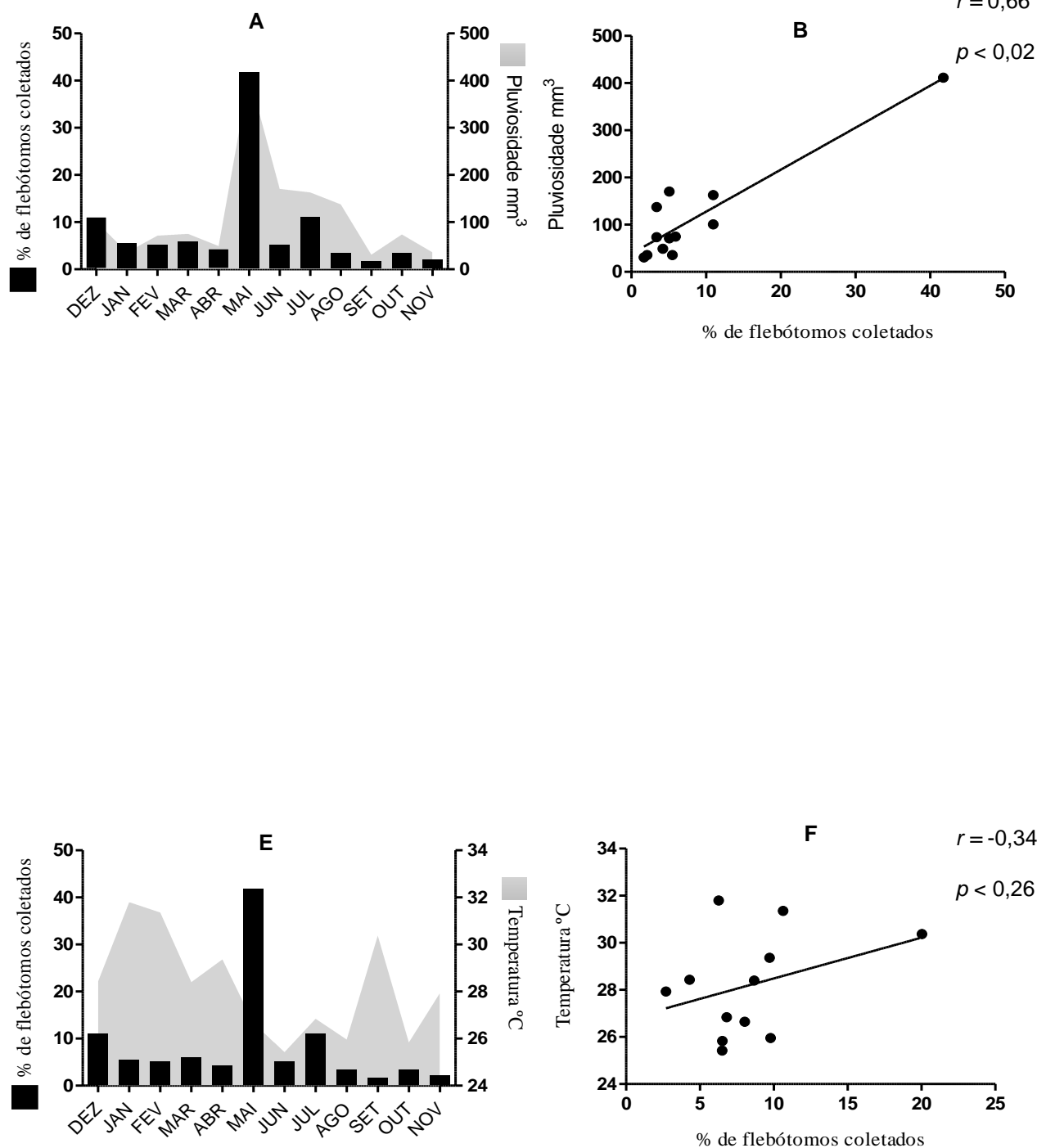
A influência de variáveis climáticas sobre a proporção dos flebotomíneos coletados mensalmente pelo estudo sistemático nas zonas urbana orla e urbana sede foi avaliada (Figuras 7 e 8). Dentre as variáveis bioclimáticas estudadas nessas duas zonas, apenas a variável pluviosidade apresentou correlação positiva significativa em relação à proporção total de flebotomíneos coletados na zona urbana sede ( $r = 0,66$  e  $p < 0,02$ ) (Figura 10B). As demais variáveis estudadas, umidade relativa do ar (Figura 9D; 10D) e temperatura (Figura 9 F; 10F) não apresentaram correlação estatisticamente significativa com a proporção flebotomínica.

Os coeficientes de correlação de *Spearman* e os valores de  $p$ , entre a variável dependente proporção mensal de flebotomíneos e as variáveis independentes climáticas estão representados nas Figuras 7 e 8 e complementam a análise da relação de associação entre estas variáveis, utilizado um modelo de regressão linear simples.



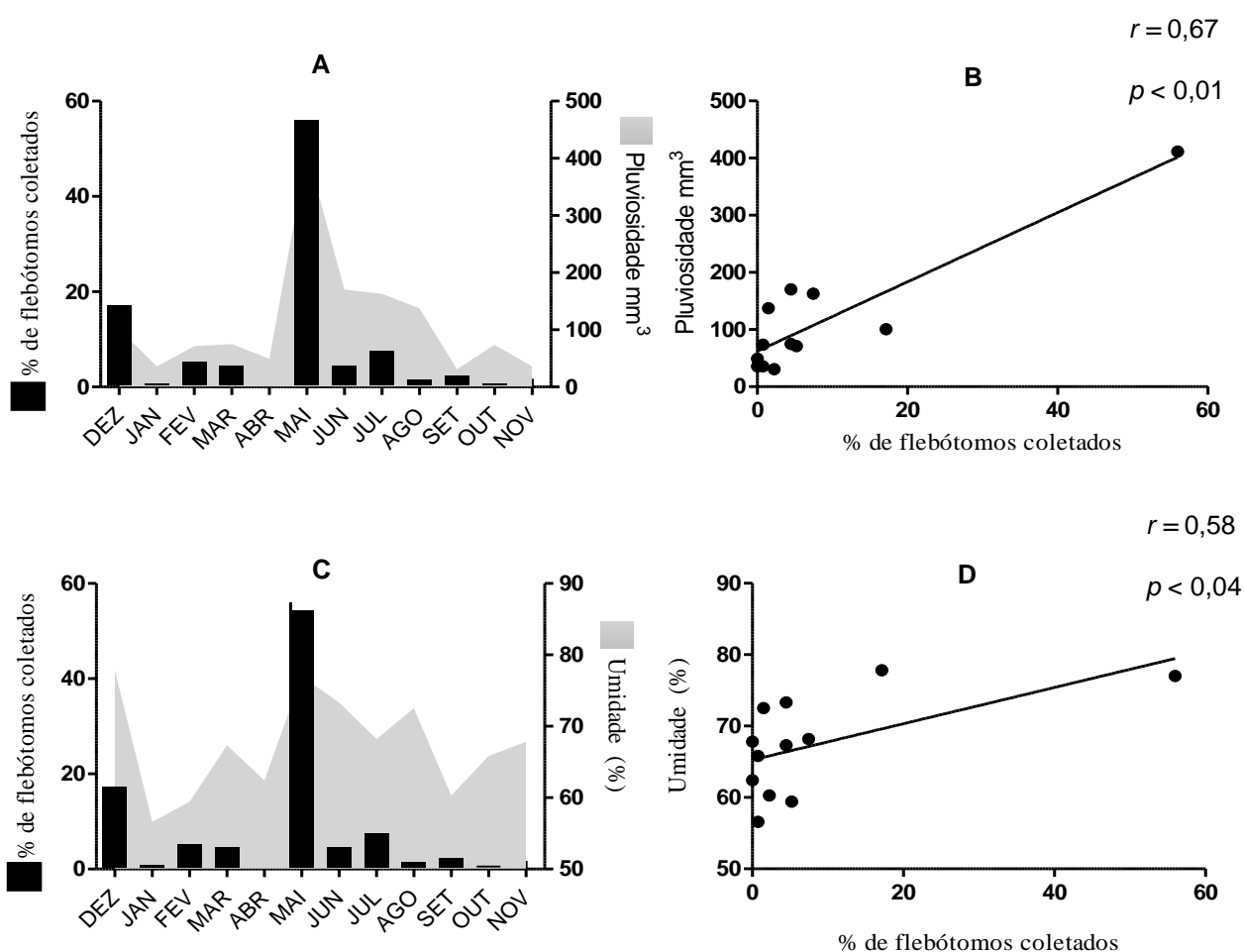


**FIGURA 7.** Avaliação da influência das variáveis independentes climáticas, sobre a variável dependente de proporção mensal de flebotomíneos na zona urbana orla. (A) distribuição da média mensal de chuvas em relação à proporção dos flebotomíneos; (B) correlação entre a proporção de flebotomíneos e a variável pluviosidade; (C) distribuição da média mensal da umidade relativa do ar em relação à proporção dos flebotomíneos; (D) correlação entre a proporção de flebotomíneos e a variável umidade relativa do ar; (E) distribuição da média mensal de temperatura em relação à proporção dos flebotomíneos; (F) correlação entre a proporção de flebotomíneos e variável temperatura. A variável proporção de flebotomíneos representou o percentual total dos flebotomíneos capturados mensalmente entre dezembro de 2011 a novembro de 2012 na zona urbana orla. A correlação entre as variáveis climáticas e a proporção dos flebotomíneos foram obtidas pelo coeficiente de Spearman e modelo de regressão linear simples e foram consideradas significantes somente quando  $p < 0,05$ .



**FIGURA 8.** Avaliação da influência das variáveis independentes climáticas, sobre a variável dependente proporção mensal de flebotomíneos na zona urbana sede. (A) distribuição da média mensal de chuvas em relação à proporção dos flebotomíneos; (B) correlação entre a proporção de flebotomíneos e a variável pluviosidade; (C) distribuição da média mensal da umidade relativa do ar em relação à proporção dos flebotomíneos; (D) correlação entre a proporção de flebotomíneos e variável umidade relativa do ar; (E) distribuição da média mensal de temperatura em relação à proporção dos flebotomíneos; (F) correlação entre a proporção de flebotomíneos e a variável temperatura. A variável proporção de flebotomíneos representou o percentual total dos flebotomíneos capturados mensalmente entre dezembro de 2011 a novembro de 2012 na zona urbana sede. A correlação entre as variáveis climáticas e a proporção dos flebotomíneos foram obtidas pelo coeficiente de Spearman e modelo de regressão linear simples e foram consideradas significantes somente quando  $p < 0,05$ .

A influência de variáveis climáticas sobre a proporção dos flebotomíneos coletados mensalmente também foi avaliada nos bairros que se destacaram individualmente pela proporção dos flebotomíneos coletados - como os bairros de Monte Gordo, Barra de Jacuipé e Areias, pertencentes à zona urbana orla e o bairro Parque Verde II pertencente à zona urbana sede. Apenas o bairro Parque Verde II mostrou uma correlação positiva significativa entre as variáveis bioclimáticas, umidade relativa do ar ( $r = 0,67$  e  $p < 0,01$ ) e pluviosidade ( $r = 0,58$  e  $p < 0,04$ ) em relação à proporção de flebotomíneos coletados mensalmente (Figura 9-B e 9D).



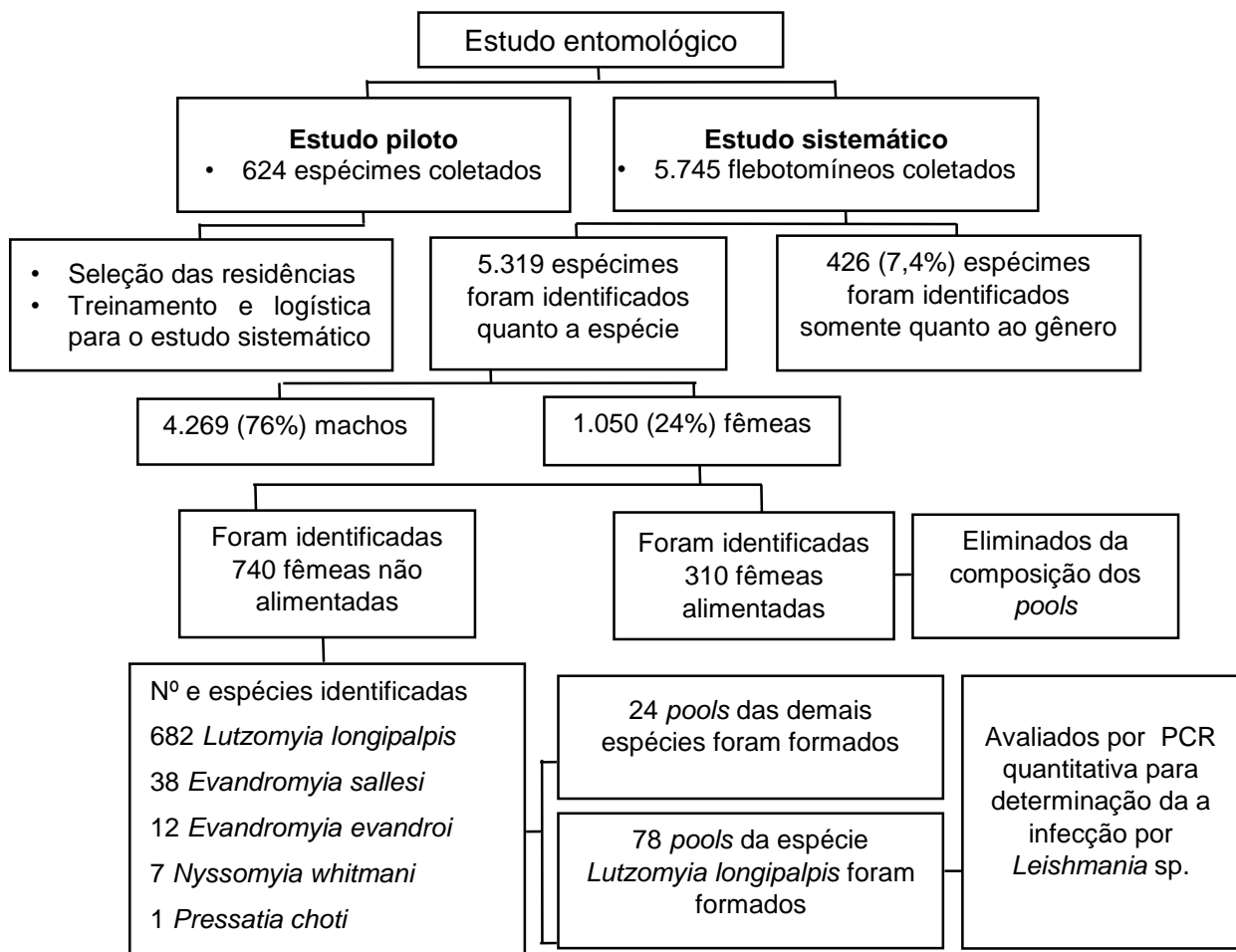
**FIGURA 9.** Avaliação da influência das variáveis independentes climáticas, sobre a variável dependente proporção mensal de flebotomíneos no bairro Parque Verde II. (A) distribuição da média mensal de chuvas em relação à proporção dos flebotomíneos; (B) correlação entre a proporção de flebotomíneos e a variável pluviosidade; (C) distribuição da média mensal da umidade relativa do ar em relação à proporção dos flebotomíneos; (D) correlação entre a proporção de flebotomíneos e a variável umidade relativa do ar. A variável proporção de flebotomíneos representou o percentual total dos flebotomíneos capturados mensalmente entre dezembro de 2011 a novembro de 2012 bairro Parque Verde II. A correlação entre as variáveis climáticas e a proporção dos flebotomíneos foram obtidas pelo coeficiente de Spearman e modelo de regressão linear simples e foram consideradas significantes somente quando  $p < 0,05$ .

### 5.3 Detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos

Em nosso estudo foram capturadas 1.371 fêmeas. Destas, foi possível realizar identificação de 1.050 espécimes, sendo que 310 fêmeas foram excluídas do teste para verificação da infecção natural por se apresentarem alimentadas. Um total de 740 fêmeas que não se encontravam alimentadas foram distribuídas em *pools* por espécie variando de 2 a 10 fêmeas por *pool*, totalizando 102 *pools* formados. Deste total, 78 *pools* foram compostos de espécimes de *Lutzomyia longipalpis*, representando a única espécie utilizada para a determinação da infecção natural dos flebotomíneos coletados. Por outro lado, 24 *pools* contendo flebotomíneos de outras espécies identificadas não foram incluídos na verificação da infecção natural. O organograma da Figura 10 representa as etapas do estudo entomológico, mostrando a distribuição dos flebotomíneos coletados, sua identificação e caracterização de acordo com as espécies que foram utilizadas para composição dos *pools* para determinação da presença de infecção natural.

Em um total de 10 *pools* de flebotomíneos de 78 avaliados da espécie *Lutzomyia longipalpis* foi identificada infecção natural pela detecção de DNA de *Leishmania* utilizando qPCR. Segundo análise da expressão do gene constitutivo de flebotomíneos, todas as 78 amostras testadas foram positivas, apresentando amplificação do gene controle da periodicidade de *Lutzomyia*. A infecção natural dos flebotomíneos foi analisada de acordo com a distribuição dos bairros e pelos meses que seguiram o estudo. Os locais onde foi detectada infecção natural dos flebotomíneos foram os bairros de Monte Gordo (nove *pools* positivos) e o bairro Parque Verde II (1 *pool* positivo). A taxa mínima de infecção natural total do estudo foi de 1,46% (Tabela 5 e 6).

A infecção natural dos flebotomíneos foi avaliada em todos os meses do estudo e foi detectada nos meses de dezembro de 2011, fevereiro, março, maio e setembro de 2012. A distribuição dos *pools* positivos quanto aos bairros e meses de coleta entomológica podem ser observados na Tabela 5.



**Figura 10.** Distribuição dos flebotomíneos identificados durante o estudo sistemático que foram usados para composição dos *pools* a serem analisados no estudo da verificação da infecção natural

**TABELA 5.** Distribuição dos *pools* positivos por bairros de acordo com os meses da coleta entomológica no município de Camaçari - BA

Período estudo	Monte Gordo		Barra de Jacuípe		Parque verde II		Total de <i>pools</i>	Total <i>pools</i> positivos	TMI(%)	
	<i>Pools</i>	<i>Pools</i> positivos	<i>Pools</i>	<i>Pools</i> positivos	<i>Pools</i>	<i>Pools</i> positivos				
2011	DEZ	3	2	-	-	-	-	3	2	0,29
	JAN	4	-	-	-	-	-	4	-	-
	FEV	5	2	-	-	-	-	5	2	0,29
	MAR	4	-	2	-	1	1	7	1	0,14
2012	ABR	5	-	1	-	1	-	7	-	-
	MAI	5	3	1	-	-	-	6	3	0,43
	JUN	6	-	-	-	-	-	6	-	-
	JUL	1	-	-	-	-	-	1	-	-
	AGO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SET	25	2	-	-	1	-	26	2	0,29
	OUT	10	-	1	-	1	-	12	-	-
NOV	-	-	-	-	1	-	1	-	-	
Total	68	9	5	-	5	1	78	10	1,46	

**TABELA 6.** Distribuição dos *pools* positivos por bairros e a Taxa Mínima de Infecção Natural

<i>Pools</i> por bairro	Total <i>Pools</i> / TMI (%)	
	<i>Pools</i>	
Monte Gordo	<i>Pools</i>	68
	<i>Pools</i> positivos	9
Barra de Jacuípe	<i>Pools</i>	5
	<i>Pools</i> positivos	-
Parque Verde II	<i>Pools</i>	5
	<i>Pools</i> positivos	1
Total de <i>pools</i>		78
Total de <i>pools</i> positivos		10

## 6 DISCUSSÃO

Em resumo, o presente estudo mostrou que a fauna flebotomínica no município de Camaçari foi diversificada, tendo sido encontrados espécimes de interesse epidemiológico, com grande predomínio de *Lutzomyia longipalpis*. Foi adicionalmente demonstrado para um dos bairros de Camaçari que há correlação positiva significativa entre a proporção de flebotomíneos e as variáveis de pluviosidade e umidade relativa do ar. Demonstrando que flebotomíneos podem ser sensíveis a mudanças nessas variáveis bioclimáticas. De acordo com as análises moleculares os resultados mostraram a ocorrência de infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania infantum* em 10 *pools* de 78 avaliados nas zonas estudadas no município.

A LV tem se dispersado, nos últimos 30 anos, atingindo a periferia de grandes cidades inclusive localidades nas zonas costeiras onde as características ecológicas eram anteriormente consideradas como inadequadas para a presença da *Lutzomyia longipalpis* e para instalação da doença (Sherlock, 1996). Um dos exemplos trata-se do município de Camaçari que possui uma larga faixa litorânea. Esse município registra o maior número de casos humanos e caninos de LV dentre os municípios pertencentes à Região Metropolitana de Salvador (RMS) (Cunha *et al.*, 1995; Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008; Julião, 2004; Barboza *et al.*, 2006).

No município de Camaçari, ao longo das últimas décadas foram se acumulando danos ambientais ocasionados em sua grande parte pela ocupação imobiliária, pelas áreas de mineração e indústrias, dando origem a situações críticas como a degradação da cobertura vegetal (Souza, 2006). Apesar das condições fitogeográficas atuais, os achados entomológicos do nosso estudo revelaram que a fauna flebotomínica em Camaçari é diversificada em áreas sob impacto antrópico. Resultados semelhantes têm sido obtidos em outras cidades brasileiras (Andrade-Filho *et al.*, 2001; Silva, A. M. *et al.*, 2008).

No estado da Bahia o estudo dos vetores das leishmanioses teve início no ano de 1958 (Mangabeira e Sherlock, 1961) e a detecção de *Lutzomyia longipalpis* já havia sido assinalada no município de Camaçari na localidade de Monte Gordo, em especial em áreas com florestas e áreas desmatadas.

Efetivamente, durante os anos de 1983 a 2003 (Banco de dados do Laboratório LAPEN - CPqGM), foi capturado um total de 146 flebotomíneos nessa localidade, sendo todos da espécie *Lutzomyia longipalpis*.

Em nosso estudo foi observada a predominância de flebotomíneos coletados na zona urbana orla em comparação com a zona urbana sede do município. Esse achado demonstra que existe um perfil distinto de dispersão e de proporção desses dípteros, de acordo com o tipo de ambiente investigado. Nossos dados estão de acordo com Teodoro e colaboradores, (1993) e Saraiva e colaboradores, (2011) que apontam que o perfil de distribuição das espécies de flebotomíneos pode variar consideravelmente de acordo com a área investigada. Efetivamente as duas zonas do município avaliadas em nosso estudo apresentam perfis distintos de cobertura vegetal. Bairros pertencentes à zona urbana situada na orla do município apresentam maiores coberturas vegetais em comparação com os bairros pertencentes à zona urbana sede. Esse dado reforça a ideia de se realizar uma análise estratificada dos dados de coleta entomológica de acordo com o tipo da área estudada.

As altas proporções de flebotomíneos evidenciadas em nosso estudo sobretudo no peridomicílio dos bairros pertencentes a zona urbana orla, provavelmente contribuem para o crescimento da transmissão da LV nesses locais. Similarmente, outros autores relataram resultados semelhantes em outras localidades (Barros 1985; Forantine 1960; 1976; Martins 1978; Rangel 1989, 1990; Tolezano 1989). Nossos dados de distribuição dos flebotomíneos nos diferentes setores das residências estão de acordo com estudos anteriores que mostraram alta proporção de flebotomíneos sendo capturados no peridomicílio das residências (Resende *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2012; Rangel *et al.*, 2012). Adicionalmente, o encontro de flebotomíneos no intradomicílio em nosso estudo, apesar da baixa proporção em relação a do peridomicílio, sugere que a transmissão também possa estar ocorrendo dentro das residências, evidenciando a importância epidemiológica desse achado. É importante salientar que foram observados na maioria das coletas realizadas no intradomicílio, uma alta proporção de fêmeas de flebotomíneos alimentadas, representadas principalmente pela espécie *Lutzomyia longipalpis*. Assim pode-se inferir que a capacidade de endofilia dessa espécie observada em nosso estudo parece ser elevada. Esse nosso achado está de acordo com Resende e



colaboradores, (2006) que evidenciou o mesmo comportamento no vetor *Lutzomyia longipalpis*.

A *Lutzomyia longipalpis*, representou à única espécie considerada vetora da LV contida na fauna fbotomínica do município de Camaçari. A detecção dessa espécie em alta proporção (98,4%), com relação as outras espécies, está de acordo com inquéritos entomológicos realizados em outras áreas endêmicas estudadas anteriormente (Souza *et al.*, 2004; Jeraldo *et al.*, 2012). Oliveira e colaboradores (2011) encontraram predominância similar (95,1%) da espécie *Lutzomyia longipalpis* em relação aos nossos resultados.

Evidenciamos uma grande diversidade e riqueza de animais domésticos no peridomicílio das residências amostradas, sobretudo na região litorânea. Este achado já foi observado em outros trabalhos na literatura (Barata *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2012). Camargo-Neves e colaboradores, (2001) consideram importante a correlação entre proporção do vetor e aspectos ambientais do peridomicílio, como presença de animais domésticos, que provavelmente servem de fonte para alimentação dos flebotomíneos.

Durante o período de coleta entomológica evidenciamos maiores proporções da espécie *Lutzomyia longipalpis* em galinheiros. Esse achado confirma a importância epidemiológica dos galináceos em regiões endêmicas para a LV e corrobora estudos anteriores (Rebêlo *et al.*, 1999; França-Silva *et al.*, 2003; Mestre *et al.*, 2011). Sabe-se que os galinheiros próximos às residências servem como atrativos para os flebotomíneos, uma vez que este local é rico em matéria orgânica, torna-se propício ao desenvolvimento das formas imaturas, e assim, aumenta o contato dos vetores com os humanos, facilitando a domiciliação do vetor (Afonso *et al.*, 2008). Diversos autores que avaliaram a preferência alimentar dos flebotomíneos, encontraram maior destaque para os galináceos servindo como fonte alimentar para o *Lutzomyia longipalpis* (Alexander *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2003; De Oliveira *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2008).

Missawa e colaboradores, (2008) em um estudo realizado no estado de Mato Grosso demonstrou que fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentam-se preferencialmente em aves (30,8%) e roedores (21,2%), mas também com sangue de humanos, gambás, vacas, cavalos e cães, evidenciando a natureza oportunista desta espécie. Em nosso estudo mostramos a presença de várias

outras espécies de animais nas residências amostradas que serviriam como fonte alimentar para os flebotomíneos. A presença de cães foi verificada em todas as residências e em grande quantidade nas ruas dos bairros investigados. Vale salientar ainda que alguns desses animais apresentavam aspectos sugestivos de calazar. Segundo Teodório e colaboradores (1993) e Castellón, (1999), a criação de animais acompanhada de condições de higiene precárias cria um ambiente favorável à atração dos vetores da leishmaniose visceral. Em nosso estudo, esses fatores considerados de risco, propiciando a instalação de criadouros naturais para flebotomíneos, foram observados mais frequentemente na região litorânea. Em nosso estudo, podemos inferir que o encontro desses fatores justifica a alta proporção dos flebotomíneos coletados nessa região do município.

Apesar da predominância de *Lutzomyia longipalpis* dentre os espécimes coletados, foi capturado em um bairro da zona urbana sede, amostras de *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), que é considerada espécie vetora de leishmaniose tegumentar, veiculando *Leishmania braziliensis* em algumas regiões do Brasil (Queiroz *et al.*, 1994; Luz *et al.*, 2000). A detecção dessa espécie em nosso estudo deve ser analisada de forma crítica, pois não houve relato de casos comprovadamente autóctones de leishmaniose tegumentar no município. A proporção dessa espécie de flebotomíneo foi muito pequena, sugerindo que não esteja participando na transmissão de leishmaniose tegumentar. Nossos achados apontam para a necessidade de uma vigilância entomológica mais rigorosa para que a doença não venha a se tornar endêmica na região.

Diversos autores na literatura apontam a importância do monitoramento de espécies de flebotomíneos encontradas infectadas naturalmente (Pita-Pereira *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2009; Saraiva, L *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2010; Rosa *et al.*, 2012). Além disso, a investigação da taxa de infecção natural nas espécies de flebotomíneos mais frequentes no ambiente investigado também tem sido evidenciada (Oliveira-Pereira, Rebêlo, Morais, *et al.*, 2006). O encontro da espécie *Evandromyia (barretomyia) sallesi*, embora em baixa proporção, merece destaque, pois a mesma já foi verificada infectada naturalmente por *Leishmania infantum* (Saraiva, L *et al.*, 2009). Em nosso estudo, esta espécie representou a segunda maior proporção dentre os flebotomíneos coletados.

Esse nosso achado sugere a necessidade de constante monitoramento desta espécie no município de Camaçari.

Em nosso estudo, a espécie *Lutzomyia longipalpis* foi encontrada em todos os meses do ano. Esse achado entomológico já foi verificado em estudos similares realizados em outros estados brasileiros que investigaram áreas distintas dentro dos municípios (Resende *et al.*, 2006; Mestre *et al.*, 2011). Na Bahia, Sherlock (1997) afirma que apesar da espécie *Lutzomyia longipalpis* ser abundante em todos os meses do ano, ela é mais abundante nos meses de abril a junho. Meses em que concentra-se o período de chuvas em nossa área de estudo. A influência das variáveis climáticas sobre a população dos flebotomíneos foi avaliada estratificando o município em zona urbana orla e urbana sede. Avaliamos também isoladamente a mesma influência dos fatores bioclimáticos nos bairros que se destacaram pela alta proporção de flebotomíneos coletados. Foram observados picos de proporção de flebotomíneos após o período de chuvas na zona urbana orla. Esse achado está de acordo com estudo de autores que têm afirmado que a ocorrência de maior proporção de flebotomíneos corresponde a período com precipitação elevada, atingindo valores máximos logo após o fim da estação chuvosa (Lainson *et al.*, 1983; De Aguiar *et al.*, 1987; Oliveira *et al.*, 2008) . Além do mais, nossos resultados na zona urbana sede e no bairro Parque verde II mostraram que o vetor *Lutzomyia longipalpis* foi menos abundante durante os períodos mais secos e mais abundante durante o período chuvoso. Esse achado também foi verificado por Resende e colaboradores (2006) e diversos outros autores no Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, que demonstraram a tendência dos flebotomíneos especialmente da espécie *Lutzomyia longipalpis* de maior ocorrência durante a estação chuvosa (Barata *et al.*, 2004; Deane, 1956; Galati *et al.*, 2003, 2006; Margonari *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2003; Rebelo, 2001; Resende *et al.*, 2006; Sherlock e Guitton, 1969). Em suma, nossos dados entomológicos, estão de acordo com autores como Souza e colaboradores (2004) e Michalsky e colaboradores (2009), que verificaram o aumento da proporção populacional dos vetores flebotomíneos durante ou após os períodos de chuva.

As correlações entre as variáveis bioclimáticas de umidade e pluviosidade e a proporção de flebotomíneos capturados que foram observadas neste estudo

e em estudos anteriores, reforçam a ideia que esses insetos são sensíveis às variações de umidade e chuvas. Já a temperatura não foi um fator determinante na proporção de flebotomíneos, como demonstrado por Missawa & Dias, 2007; Dias e colaboradores, 2007; Michalsky e colaboradores, 2009. Barata e colaboradores (2004) mostraram que a umidade e pluviosidade influenciaram significativamente a proporção de flebotomíneos, enquanto a temperatura não teve efeito significativo sobre a população dos mesmos. É importante salientar que não há uma regra; e que os dados da literatura não mostram coerência a respeito de quais fatores ou variáveis influenciam efetivamente na flutuação da população desses flebotomíneos (Missawa & Dias, 2007; Dias *et al.*, 2007; Michalsky *et al.*, 2009), tendo resultados variáveis dependendo da região avaliada e o padrão de distribuição de chuvas. É possível que essas discrepâncias dos dados da literatura, em relação aos fatores climáticos e ambientais que influenciam a distribuição do vetor, estejam relacionadas a variações geográficas entre as regiões estudadas. Essas observações reforçam a ideia de que o vetor *Lutzomyia longipalpis* se adapta facilmente em diferentes habitats.

A indisponibilidade de dados pluviométricos oficiais para o município de Camaçari foi considerada uma limitação em nosso estudo. Os dados usados foram referentes à estação meteorológica de Salvador, cidade vizinha a nossa área de estudo. Nossos dados pluviométricos podem não ter refletido efetivamente as condições de microclima dos locais de captura dos flebotomíneos, podendo ter influenciado os resultados das correlações. No entanto, nosso estudo traz um fator positivo e inovador que consistiu na utilização de dados microclimáticos como temperatura e umidade relativa do ar mensurados mensalmente nos locais das coletas entomológicas, refletindo as condições exatas dos ecótopos investigados. Nossas observações de 12 meses da flutuação mensal da população dos flebotomíneos não foram suficientes para sugerir um período mais favorável do ano para iniciar as intervenções contra o vetor *Lutzomyia longipalpis*, sendo necessário um mínimo de 24 meses como é preconizado pelo manual do programa de controle da leishmaniose visceral. Entretanto, encontramos em nosso estudo, elevada proporção de flebotomíneos coincidindo com baixos índices pluviométricos durante os meses de fevereiro, março e abril. A intervenção para o controle desses insetos nesse período

impediria a reprodução dos adultos e a consequente elevação dos índices de transmissão nos meses pós-chuva. No entanto, há necessidade de dados mais concretos obtidos a partir de capturas de flebotomíneos por um período mais prolongado e em maior número de áreas no município de Camaçari, para obtenção de um panorama mais amplo dos fatores climáticos que podem influenciar na distribuição e proporção dos flebotomíneos nessa área endêmica. Assim, o Serviço Municipal de Controle de Zoonoses (CCZ) poderia otimizar os recursos, priorizando as áreas e o período mais indicado para um controle mais eficaz de LV.

A determinação da infecção natural por *Leishmania* nos flebotomíneos é em geral estimada pela identificação microscópica de flagelados no tubo digestivo do vetor e / ou isolamento do parasita em meios de cultura (Feliciangeli *et al.*, 1988; Azevedo *et al.*, 1990; Garrido *et al.*, 1990). No entanto, o uso destes métodos demandam muito tempo, especialmente quando se considera a baixa prevalência de infecção encontrada em focos endêmicos (Ashford *et al.*, 1991). Dessa maneira o desenvolvimento da PCR constitui uma alternativa prática e vantajosa, devido à alta sensibilidade e especificidade, tendo sido atualmente utilizada na detecção de DNA de *Leishmania* em vetores e reservatórios animais (Rodrigues *et al.*, 2002; Oliveira-Pereira, Rebêlo, Morais, *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2007).

Nossos resultados referentes às análises moleculares, apontaram para infecção em 10 dos 78 *pools* de flebotomíneos correspondentes a espécie *Lutzomyia longipalpis*, sendo a taxa de infecção natural de 1,46%. Esse achado está de acordo com os dados da literatura em outras áreas endêmicas (Miranda, J. C. *et al.*, 2002; Missawa *et al.*, 2010; Paiva *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2010; Pita-Pereira *et al.*, 2011). Geralmente, as taxas nos focos endêmicos na América Latina variam em torno de 0,2% a 10%, sendo que este número contrasta com a alta incidência da doença nestas regiões (Rodriguez *et al.*, 1999b; Miranda *et al.*, 2002; Oliveira-Pereira, Rebêlo, Morais, *et al.*, 2006; Paiva *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2008; Pita-Pereira *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008).

A infecção natural em nosso estudo esteve concentrada em apenas dois bairros. O bairro de Monte Gordo, onde os exemplares de 9 “pools” infectados foram capturados, apresenta o maior número de casos da doença canina e humana no município, e demonstrou ser também a localidade com maior

proporção de flebotomíneos coletados. Já o bairro Parque Verde II onde os exemplares de 1 “pool” infectado foram capturados, representa o bairro periférico com maior proporção de flebotomíneos coletada dentre àqueles da zona urbana sede e onde vêm sendo notificados casos de LVH.

Em conjunto, esses dados sugerem que a alta ocorrência de flebotomíneos nesses bairros, com evidência de infecção natural tem provável correlação com a alta prevalência de LVC e aparecimento de casos de LV. Outros autores como Michalsky e colaboradores, (2011) concluíram em seu estudo que a infecção natural de flebotomíneos ocorrendo em bairros de transmissão intensa foi ocasional, sendo necessários estudos relacionados com outros possíveis vetores da LV.

A detecção de infecção natural do vetor *Lutzomyia longipalpis* evidenciado em nosso estudo, sobretudo no bairro Monte Gordo, demonstra a importância de intervenções para a minimização das notificações de LV canina e humana na faixa litorânea do município. Já no bairro Parque Verde II esse achado demonstra a adaptação do vetor ao ambiente modificado pelo homem e a possível emergência de urbanização da transmissão da LV em bairros mais centralizados do município de Camaçari.

Em suma, o encontro da espécie *Lutzomyia longipalpis* durante todos os meses do estudo e a verificação da infecção natural por *Leishmania infantum* indica a urgência de uma vigilância entomológica rigorosa e de ações que visem diminuir o ambiente propício para os flebotomíneos, haja vista o predomínio desse vetor nos ambientes peridomésticos.

## 7 CONCLUSÕES

A fauna flebotomínica da área estudada foi considerada diversificada, com predomínio da espécie vetora *Lutzomyia longipalpis*.

A fauna flebotomínica predominou na zona urbana orla em comparação com a zona urbana sede do município, demonstrando a existência de um perfil distinto de dispersão desses dípteros na dependência do tipo de ambiente investigado.

Os dados de correlação evidenciados em nosso estudo estão de acordo com alguns autores e reforçam a ideia de que a umidade e pluviosidade podem influenciar significativamente a proporção de flebotomíneos, enquanto a temperatura não tem efeito significativo.

A taxa mínima de infecção natural do vetor *Lutzomyia longipalpis* em nossa área de estudo demonstrou estar de acordo com dados da literatura.

Em nosso estudo não foi possível correlacionar a frequência da infecção natural dos flebotomíneos nos meses de estudo e a proporção desses insetos coletados mensalmente.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, M. M.; DUARTE, R.; MIRANDA, J. C.; CARANHA, L.; RANGEL, E. F. 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**, v. 2012, p. 858-857, 2012.
- AGUIAR, G. M.; VILELA, M. L.; LIMA, R. B.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; FRAIHA, H. Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro. . **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 4, p. 583-4, Oct-Dec 1987.
- ALBUQUERQUE, P. L.; SILVA JUNIOR, G. B.; FREIRE, C. C.; OLIVEIRA, S. B.; ALMEIDA, D. M.; SILVA, H. F.; CAVALCANTE MDO, S.; SOUSA ADE, Q. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceara, Brazil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 26, n. 4, p. 330-3, Oct 2009.
- ALEXANDER, B.; DE CARVALHO, R. L.; MCCALLUM, H.; PEREIRA, M. H.; MORRISON, A. C.; FERRO, C.; TESH, R. B. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 12, p. 1480-5, Dec 2002.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112, n. 18, p. 2993-3002, Sep 1999.
- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv Parasitol**, v. 57, p. 1-88, 2004.
- AMÓRA, S. S. A.; OLIVEIRA, P. G. M.; ALVES, N. D.; BEVILAQUA, C. M. L.; PEIXOTO, G. C. X.; OLIVEIRA, L. M. B.; FEIJÓ, F. M. C.; SOUSA, R. N.; MACEDO, I. T. F. Sandflies (Psychodidae: Phlebotominae) survey in an urban transmission area of visceral leishmaniasis, Northeastern Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 19, p. 233-237, 2010.
- ANDRADE-FILHO, J. D.; VALENTE, M. B.; ANDRADE, W. A.; BRAZIL, R. G.; FALCÃO, A. L. Flebotomíneos do Estado de Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 4, p. 323-329, jul-ago 2001.
- ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; JOUANNE, C.; BONGRAND, P. Parasitophorous Vacuoles of *Leishmania Amazonensis*-Infected Macrophages Maintain an Acidic Ph. **Infect Immun**, v. 58, n. 3, p. 779-787, Mar 1990.
- ARANSAY, A. M.; SCOULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 5, p. 1933-8, May 2000.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol Int**, v. 30, p. 1269- 81, 2000.
- ASHFORD, R. W.; DESJEUX, P.; DERAADT, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. **Parasitol Today**, v. 8, n. 3, p. 104-5, Mar 1992.



ASHFORD, R. W.; DESJEUX, P.; RAADT, P. Estimation of population at risk of infection with leishmaniasis. **Immunology Today** v. 8, p. 104-105, 1991.

AZEVEDO, A. C.; RANGEL, E. F.; COSTA, E. M.; DAVID, J.; VASCONCELOS, A. W.; LOPES, U. G. Natural infection of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) by *Leishmania* of the *braziliensis* complex in Baturite, Ceara State, northeast Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 2, p. 251, Apr-Jun 1990.

BARATA, R. A.; FRANCA-SILVA, J. C.; MAYRINK, W.; SILVA, J. C.; PRATA, A.; LOROSA, E. S.; FIUZA, J. A.; GONCALVES, C. M.; PAULA, K. M.; DIAS, E. S. [Aspects of the ecology and behaviour of phlebotomines in endemic area for visceral leishmaniasis in State of Minas Gerais]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, n. 5, p. 421-5, Sep-Oct 2005.

BARBOSA, A. F.; OLIVEIRA, S. M. P.; BERTHO, A. L.; FRANCO, A. M. R. Single and concomitant experimental infections by *Endotrypanum* spp. and *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 101(8), p. 851- 856, 2006.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmaniametacyclic* promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int. J. Parasitol Int**, v. 37(10), p. 1097-106, 2007.

BAUZER, L. G.; SOUZA, N. A.; WARD, R. D.; KYRIACOU, C. P.; PEIXOTO, A. A. The period gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. **Insect Mol Biol**, v. 11, n. 4, p. 315-23, Aug 2002.

BERN, C.; COURTENAY, O.; ALVAR, J. Of cattle, sand flies and men: a systematic review of risk factor analyses for South Asian visceral leishmaniasis and implications for elimination. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 2, p. e599, 2010.

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **Am J Trop Med Hyg**, v. 55, n. 3, p. 273-7, Sep 1995,8.

BEVILACQUA, P. D.; PAIXAO, H. H.; MODENA, C. M.; CASTRO, M. C. P. S. Urbanization of visceral leishmaniose in Belo Horizonte, Brazil. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia**, v. 53, n. 1, p. 1-8, Feb 2001.

BRASIL. SAÚDE, M. D. SAÚDE, S. D. V. E. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. , p. 122, 2006.

CABANILLAS, M. R.; CASTELLÓN, E. G. Distribution of sandflies (Diptera:Psychodidae) on tree-trunks in a non-flooded area of the Ducke Forest Reserve, Manaus, AM, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94(3), p. 289-95,8, May-Jun 1999.

CARRANZA-TAMAYO, C. O.; CARVALHO MDO, S.; BREDT, A.; BOFIL, M. I.; RODRIGUES, R. M.; SILVA, A. D.; CORTEZ, S. M.; ROMERO, G. A. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 4, p. 395,8-9, Jul-Aug 2010.

CARVALHO, G. M.; ANDRADE FILHO, J. D.; FALCAO, A. L.; ROCHA LIMA, A. C.; GONTIJO, C. M. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 8, n. 3, p. 407-14, Jun 2008.

CARVALHO, G. M. L.; FILHO, J. D. A.; FALCÃO, A. L.; ANA C.V.M. ROCHA LIMA; GONTIJO, A. C. M. F. Naturally Infected Lutzomyia Sand Flies in a Leishmania-Endemic Area of Brazil. **VECTOR-BORNE AND ZOOTIC DISEASES**, v. 8, 2008.

CARVALHO, M. R.; VALENÇA, H. F.; DA SILVA, F. J.; DE PITA-PEREIRA, D.; DE ARAÚJO PEREIRA, T.; BRITTO, C.; BRAZIL, R. P.; FILHO, S. P. B. Natural Leishmania infantum infection in Mignonemyia migonei (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Trop**, v. 116, n. 1, p. 108-110, 2010.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, W. R.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? . **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 11, p. 873-82, 2007.

CHOI, C. M.; LERNER, E. A. Leishmaniasis as an Emerging Infection. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc**, v. 6, p. 175-182, 2001.

CUNHA, S.; FREIRE, M.; EULALIO, C.; CRISTOVAO, J.; NETTO, E.; JOHNSON JR, W. D.; REED, S. G.; BADARÓ, R. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan área of Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 89,, p. 155-158, 1995.

DANTAS-TORRES, F. Do any insects other than phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) transmit Leishmania infantum (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from dog to dog? **Vet Parasitol**, v. 136, n. 3-4, p. 379-80, Mar 31 2006.

DE PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F.; PIMENTA, P. F.; GALATI, E. A.; ANDRADE JUNIOR, H. F.; MALAFRONTA RDOS, S. [Standardization of conditions for PCR detection of Leishmania spp. DNA in sand flies (Diptera, Psychodidae)]. **Cad Saude Publica**, v. 23, n. 1, p. 87-94, Jan 2007.

DE SANTIS, B.; SANTOS, E. G.; CUPOLILLO, E.; PORROZZI, R.; CAVALCANTI ADOS, S.; DOS SANTOS, B. N.; DE MOURA, S. T.; MALHADO, K.; CHAVES, S. A. Characterization of Leishmania infantum species in dogs from the urban area of Cuiaba, State of Mato Grosso, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 6, p. 771-3, Nov-Dec 2011.

DEANE, L. M. Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. **Tese (Livre Docência)**, p. p. 143, 1956.

DIAS, F. O.; LOROSA, E. S.; REBELO, J. M.; ALEXANDER, B.; DE CARVALHO, R. L.; MCCALLUM, H.; PEREIRA, M. H.; MORRISON, A. C.; FERRO, C.; TESH, R. B. Blood feeding sources and peridomiciliation of Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cad Saude Publica**, v. 19, n. 5, p. 1373-80, 2003.

FELICIANGELI, M. D.; REYES, R. M.; LIMONGI, J. E. Natural infection of lutzomyia ovallesi with parasites of the leishmania brasiliensis in northern Venezuela. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 83(3), p. 393-394, jul./set 1988.

FELIPE, I. M.; AQUINO, D. M.; KUPPINGER, O.; SANTOS, M. D.; RANGEL, M. E.; BARBOSA, D. S.; BARRAL, A.; WERNECK, G. L.; CALDAS ADE, J. Leishmania infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhao, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 207-11, Mar 2011.

FERNANDEZ-BELLON, H.; SOLANO-GALLEGO, L.; BARDAGI, M.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. **Vet Parasitol**, v. 135, n. 2, p. 181-5, Jan 30 2006.

FRAGA, D. B. M.; SOLCA, M. S.; SILVA, V. M. G.; BORJA, L. S.; NASCIMENTO, E. G.; OLIVEIRA, G. G. S.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; VERAS, P. S. T.; DOS-SANTOS, W. L. C. Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: A 13 years survey and association with human disease. **Vet Parasitol**, v. 190, n. 3-4, p. 591-594, Dec 21 2012.

FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; SIQUEIRA, A. M.; MACHADO-COELHO, J. L. L.; COSTA, C. A.; MAYRINKA, W.; VIEIRA, E. P.; COSTA, J. S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 111, p. 161-173, 2003.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SANCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. **Vet Parasitol**, v. 137, n. 3-4, p. 214-21, Apr 30 2006.

FRANKE, C. R.; ZILLER, M.; STAUBACH, C.; LATIF, M. Impact of the El Niño/Southern Oscillation on Visceral Leishmaniasis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 914-917, 2002.

FREITAS, V. C.; PARREIRAS, K. P.; DUARTE, A. P.; SECUNDINO, N. F.; PIMENTA, P. F. Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in its natural sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, n. 4, p. 606-12, Apr 2012.

GARCIA, A. L., TELLEZ, T., PARRADO, R., ROJAS, E., BERMUDEZ, H., DUJARDIN, J. C. Epidemiological monitoring of American tegumentary leishmaniasis: molecular characterization of a periodomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 101, p. 1208-1213, 2007.

GARRIDO, R. B.; URDANELA, R.; URDANELA, I.; ALVARADO, J. Natural infection of *Lutzomyia trinidadensis* With *leishmania* in Barquisimeto, venezuela. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 477, oct./dec 1990.

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol**, v. 27, n. 9, p. 403-9, Sep 2011.

JERALDO, V. L. S.; GOES, M. A.; CASANOVA, C.; MELO, C. M.; ARAUJO, E. D.; BRANDAO FILHO, S. P.; CRUZ, D. E.; PINTO, M. C. Sandfly fauna in an area endemic for visceral leishmaniasis in Aracaju, State of Sergipe, Northeast Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 3, p. 318-22, Jun 2012.

JORQUERA, A.; GONZALEZ, R.; MARCHAN-MARCANO, E.; OVIEDO, M.; MATOS, M. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 45-8, Feb 2005.

JULIÃO, F. S. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesq. Vet. Bras**, v. v. 27, n. 8, p. 319-324, 2007.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-615, Aug 2011.

KILLICK-KENDRICK, M.; KILLICK-KENDRICK, R. The Initial Establishment of Sandfly Colonies. **Parassitologia, Vol 33, Suplemento, December 1991**, p. 315-320, 1991.

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

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-27, Dec 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; FRAIHA, H. Leishmaniasis in Brazil. XIX: visceral leishmaniasis in the Amazon Region, and the presence of Lutzomyia longipalpis on the Island of Marajo, Para State. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 77, n. 3, p. 323-30, 1983.

LANGERON, M. *Precis de microscopie*. v. 7 ed. Paris: Masson e Cie, p. 1429, 1949.

LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PERIERES, J.; VOLLHARDT, Y. Ecology of Leishmaniasis in the South of France .10. Developmental Stages and Clinical Characterization of Canine Leishmaniasis in Relation to Epidemiology. **Ann Parasitol Hum Comp**, v. 54, n. 3, p. 277-295, 1979.

LUZ, E.; MEMBRIVE, N.; CASTRO, E. A.; DEREURE, J.; PRATLONG, E.; DEDETY, A. Lutzomyia whitmani (Diptera: Psychodidae) as vector of Leishmania (V.) braziliensis in Paraná state, southern Brazil. **Ann. Trop. Med. Parasitol**, v. 94, p. 623- 631, 2000.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, N. B.; LINHARES, F. G.; SOUSA, L. C.; AMÓRA, S. S. A.; OLIVEIRA, L. M. B. Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. **Ciência Animal**, v. 18(2), p. 67-74, 2008.

MACHADO, T. O.; BRAGANCA, M. A.; CARVALHO, M. L.; ANDRADE FILHO, J. D. Species diversity of sandflies (Diptera: Psychodidae) during different seasons and in different environments in the district of Taquarucu, state of Tocantins, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 7, p. 955-9, Nov 2012.

MANGABEIRA, F. O.; SHERLOCK, I. A. Descrição de 4 novas espécies de phlebotomine da Bahia, Brasil (Diptera, Psychodidae). **Rev. Bras. Biol**, v. 21, p. 265-276, 195,81.

MARCONDES, C. B.; BITTENCOURT, I. A.; STOCO, P. H.; EGER, I.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Natural infection of Nyssomyia neivai (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by Leishmania (Viannia) spp. in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 103, n. 11, p. 1093-7, Nov 2009.

MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the Leishmania donovani complex. **Parasitology**, v. v. 119 ( Pt 3), p. p. 237-46, Sep 1999.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**, v. 16, n. 5, p. 188-9, May 2000.

MAYRINK, W.; WILLIAMS, P.; COELHO, M. V.; DIAS, M.; MARTINS, A. V.; MAGALHÃES, P. A. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. **Annals of Trop. Med. Parasitol.**, v. 73(2), p. 123-37, 1979.

MESTRE, G. L.; RIBEIRO, A. L.; MIYAZAKI, R. D.; RODRIGUES, J. S.; DE ALMEIDA ADO, B.; SOUSA, V. R.; MISSAWA, N. A. Phlebotomine sand flies and canine infection in areas of human visceral leishmaniasis, Cuiaba, Mato Grosso. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 20, n. 3, p. 228-34, Jul-Sep 2011.

MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; FRANCA-SILVA, J. C.; ROCHA, M. F.; BARATA, R. A.; DIAS, E. S. Association of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) population density with climate variables in Montes Claros, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1191-3, Dec 2009.

MICHALSKY, É. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; DIAS, E. S. Avaliação do PCR na investigação de *Leishmaniaspp* em flebotomíneos experimentalmente infectados (diptera: psychodidae: phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 255-259, 2002.

MICHALSKY, E. M.; GUEDES KDE, S.; LARA E SILVA FDE, O.; FRANCA-SILVA, J. C.; DIAS, C. L.; BARATA, R. A.; DIAS, E. S. [Natural infection with *Leishmania infantum chagasi* in *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sandflies captured in the municipality of Janauba, State of Minas Gerais, Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 1, p. 58-62, Jan-Feb 2011.

MIRANDA, J. C.; REIS, E.; SCHRIEFER, A.; GONÇALVES, M.; REIS, M.; CARVALHO, L. Frequency of Infection of *LutzomyiaPhlebotomines* with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian Endemic Area as Assessed by Pinpoint Capture and Polymerase Chain Reaction. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 97(2), p. 185-188, 2002.

MIRANDA, J. C.; REIS, E.; SCHRIEFER, A.; GONCALVES, M.; REIS, M. G.; CARVALHO, L.; FERNANDES, O.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Frequency of infection of *Lutzomyia phlebotomines* with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 185-8, Mar 2002.

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. [Feeding preference of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in transmission area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 4, p. 365-8, Jul-Aug 2008.

MISSAWA, N. A.; MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; SANTOS DIAS, E. *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania (L.) chagasi* in Varzea Grande, Mato Grosso State, Brazil, an area of intense transmission of visceral leishmaniasis. **Cad Saude Publica**, v. 26, n. 12, p. 2414-9, Dec 2010.

MOLL, H. Experimental Cutaneous Leishmaniasis - Langerhans Cells Internalize *Leishmania*-Major and Induce an Antigen-Specific T-Cell Response. **Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology**, v. 329, p. 587-592, 1993.

MURAILLE, E.; DE TREZ, C.; PAJAK, B.; TORRENTERA, F. A.; DE BAETSELIER, P.; LEO, O.; CARLIER, Y. Amastigote load and cell surface phenotype of infected cells from lesions and lymph nodes of susceptible and resistant mice infected with *Leishmania major*. **Infect Immun**, v. 71, n. 5, p. 2704-2715, May 2003.

NASCIMENTO, J. C.; PAIVA, B. R.; SANTOS MALAFRONTA, R.; FERNANDES, W. D.; GALATI, E. A. Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a visceral-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 49, n. 2, p. 119-22, Mar-Apr 2007.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N.; REBÊLO, J. M. M.; MORAES, J. L. P.; PEREIRA, S. R. F. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmaniasp.* na Amazônia maranhense. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39(6), p. 540-543, 2006.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N.; REBÊLO, J. M. M.; MORAIS, J. L. P.; PEREIRA, S. R. F. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania sp* na Amazônia maranhense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 540-543, 2006.

OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A.; FERNANDES, C. E.; DORVAL, M. E.; BRAZIL, R. P. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in endemic area of visceral leishmaniasis, Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Trop**, v. 105, n. 1, p. 55-61, Jan 2008.

OLIVEIRA, D. M.; SARAIVA, E. M.; ISHIKAWA, E. A.; SOUSA, A. A.; SILVA, E. O.; SILVA, I. M. Distribution of phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) across an urban-rural gradient in an area of endemic visceral leishmaniasis in northern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 1039-44, Dec 2011.

OLIVEIRA, E. F.; SILVA, E. A.; FERNANDES, C. E.; PARANHOS FILHO, A. C.; GAMARRA, R. M.; RIBEIRO, A. A.; BRAZIL, R. P.; OLIVEIRA, A. G. Biotic factors and occurrence of *Lutzomyia longipalpis* in endemic area of visceral leishmaniasis, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, p. 395,8-401, May 2012.

OLIVEIRA, S. S.; ARAÚJO, T. M. Avaliação das Ações de Controle da Leishmaniose Visceral (calazar) em uma Área Endêmica do Estado da Bahia, Brasil (1995-1999). **Cad Saúde Pùb**, v. 19, p. 1681-1690, 2003.

PAIVA, B. R.; OLIVEIRA, A. G.; DORVAL, M. E.; GALATI, E. A.; MALAFRONTA, R. S. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 126-30, Jul-Aug 2010.

PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F.; NASCIMENTO, J. C.; PIMENTA, P. F.; GALATI, E. A.; JUNIOR, H. F.; MALAFRONTA, R. S. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Trop**, v. 99, n. 2-3, p. 252-9, Oct 2006.

PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; GALATI, E. A. B.; ANDRADE - JÚNIOR, H. F.; MALAFRONTA, R. S. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmaniaspp.* em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. **Cad Saúde Pública** v. 23, p. 87-94, 2007.

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A. B.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. 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 Trop**, v. 107, n. 1, p. 66-69, 2008.

PITA-PEREIRA, D.; SOUZA, G. D.; PEREIRA TDE, A.; ZWETSCH, A.; BRITTO, C.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia* (*Pintomyia*) *fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American cutaneous leishmaniasis: detection of natural infection by *Leishmania* (*Viannia*) DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. **Acta Trop**, v. 120, n. 3, p. 273-5, Dec 2011.

PITA-PEREIRA, D.; SOUZA, G. D.; ZWETSCH, A.; ALVES, C. R.; BRITTO, C.; RANGEL, E. F. First report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. **Am J Trop Med Hyg**, v. 80, n. 4, p. 593-5, Apr 2009.

POSTIGO, J. A. Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. **Int J Antimicrob Agents**, v. 36 Suppl 1, p. S62-5, Nov 2010.

PUGEDO, H.; BARATA, R. A.; FRANCA-SILVA, J. C.; SILVA, J. C.; DIAS, E. S. [HP: an improved model of suction light trap for the capture of small insects]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, n. 1, p. 70-2, Jan-Feb 2005.

QUEIROZ, M. F.; VARJAO, J. R.; MORAES, S. C.; SALCEDO, G. E. Analysis of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Barra do Garcas, State of Mato Grosso, Brazil, and the influence of environmental variables on the vector density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 3, p. 313-7, Jun 2012.

RANASINGHE, S.; ROGERS, M. E.; HAMILTON, J. G.; BATES, P. A.; MAINGON, R. D. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 102, n. 9, p. 875-82, Sep 2008.

RANGEL, E. F.; DE SOUZA, N. A.; WERMELINGER, E. D.; BARBOSA, A. F. [Natural infection of *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912, in an endemic area of visceral leishmaniasis of Rio de Janeiro]. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 3, p. 395-6, Jul-Sep 1984.

RANGEL, O.; SAMPAIO, S. M.; CIARAVOLO, R. M.; HOLCMAN, M. M. The distribution pattern of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in the peridomiciles of a sector with canine and human visceral leishmaniasis transmission in the municipality of Dracena, Sao Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 163-9, Mar 2012.

REBÊLO, J. M. M.; JACK ANY CARVALHO DE ARAÚJO, M. L.; CARVALHO, V. L. L. B., FRANCINALDO SOARES SILVA E; OLIVEIRA, S. T. D. Flebótomos (Diptera, Phlebotominae) da Ilha de São Luis, zona do Golfão Maranhense, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 247-253, 1999.

RESENDE, M. C.; CAMARGO, M. C.; VIEIRA, J. R.; NOBI, R. C.; PORTO, M. N.; OLIVEIRA, C. D.; PESSANHA, J. E.; CUNHA MDA, C.; BRANDAO, S. T. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 1, p. 51-5, Jan-Feb 2006.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: Complexities and alternative views. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 292-297, Jul 2000.

ROCHA, L. S.; FALQUETO, A.; DOS SANTOS, C. B.; FERREIRA, A. L.; DA GRACA, G. C.; GRIMALDI, G., JR.; CUPOLILLO, E. Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 104, n. 7, p. 461-6, Jul 2010.

RODRIGUES, E. H. G.; BRITO, M. E. F.; MENDONÇA, M. G.; WERKHAUSER, R. P.; COUTINHO, E. M.; SOUZA, W. V. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. **J. Clin. Microbiol**, v. 40, p. 3572-3576, 2002.

RODRIGUEZ, N.; AGUILAR, C. M.; BARRIOS, M. A.; BARKER, D. C. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 93, p. 47-49, 1999a.

RODRIGUEZ, N.; AGUILAR, C. M.; BARRIOS, M. A.; BARKER, D. C. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 93, p. 47-9, 1999b.

ROSA, J.; PEREIRA, D. P.; BRAZIL, R. P.; FILHO, J. D.; SALOMON, O.; SZELAG, E. Natural infection of *Cortelezzii* complex (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) with *Leishmania braziliensis* in Chaco, Argentina. **Acta Trop**, v. 123, n. 2, p. 128-31, Aug 2012.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; DE PAIVA HOFFMANN, M.; DE FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med Vet Entomol**, v. 12, n. 3, p. 315-7, Jul 1998.

SARAIVA, L.; ANDRADE FILHO, J. D.; FALCAO, A. L.; DE CARVALHO, D. A.; DE SOUZA, C. M.; FREITAS, C. R.; GOMES LOPES, C. R.; MORENO, E. C.; MELO, M. N. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: characterization of favored locations as determined by spatial analysis. **Acta Trop**, v. 117, n. 2, p. 137-45, Feb 2011.

SARAIVA, L.; ANDRADE FILHO, J. D.; FALCAO, A. L.; DE CARVALHO, D. A.; DE SOUZA, C. M.; FREITAS, C. R.; GOMES LOPES, C. R.; MORENO, E. C.; MELO, M. N.; FERNANDEZ-BELLON, H.; SOLANO-GALLEGO, L.; BARDAGI, M.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: characterization of favored locations as determined by spatial analysis Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. **Acta Trop**, v. 117, n. 2, p. 137-45, Jan 2011.

SARAIVA, L.; CARVALHO, G. M.; GONTIJO, C. M.; QUARESMA, P. F.; LIMA, A. C.; FALCAO, A. L.; ANDRADE FILHO, J. D. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **J Med Entomol**, v. 46, n. 5, p. 1159-63, Sep 2009.

SARAIVA, L.; GUSTAVO M. L. CARVALHO; CELIA M. F. GONTIJO; PATRÍCIA F. QUARESMA; ANA C.V.M.R. LIMA; ALDA L. FALCAO; FILHO, J. D. A. Natural Infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **Entomological Society of America**, 2009 2009.

SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde: Guia de Vigilância Epidemiológica. **Caderno 11 Brasília, Ministério da Saúde**, p. 120, 2008.



SAVANI, E. S.; NUNES, V. L.; GALATI, E. A.; CASTILHO, T. M.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 160, n. 1-2, p. 18-24, Mar 9 2009.

SECUNDINO, N. F. C.; EGER, M. I.; BRAGA, E. M.; SANTORO, M. M.; PIMENTA, P. F. P. *Lutzomyia longipalpis* Peritrophic Matrix: Formation, Structure, and Chemical Composition. **J. Med. Entomol**, v. 42(6), p. 928-938, 2005.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671-83, Nov-Dec 1995,8.

SHERLOCK, I. A.; GUITTON, N. [Findings on kala-zar in Jacobina, Bahia. IV. Seasonal and hourly variations of *Phlebotomus longipalpis*]. **Rev Bras Malariol Doencas Trop**, v. 21, n. 4, p. 715-27, Oct-Dec 195,89.

SHERLOCK, I. A.; SANTOS, A. C. [Visceral leishmaniasis in the region of Jequié, state of Bahia]. **Rev Bras Malariol Doencas Trop**, v. 16, n. 4, p. 441-8, Oct-Dec 195,84.

SILVA, A. M.; CAMARGO, N. J.; SANTOS, D. R.; MASSAFERA, R.; FERREIRA, A. C.; POSTAI, C.; CRISTÓVÃO, E. C.; KONOLSAISEN, J. F.; JÚNIOR, A. B.; PERINAZO, R.; TEODORO, U.; GALATI, E. A. Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. **Neotrop Entomol**, v. 37, p. 209-225, 2008.

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; TEIXEIRA, A. C.; DE SOUZA, C. M.; FIGUEIREDO, F. B. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Vet Parasitol**, v. 179, n. 1-3, p. 257-61, Jun 30 2011.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; DIAS, E. S.; BARROS, J. C.; BRAZUNA, J. C. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Exp Parasitol** v. 119, p. 343-8, 2008.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R. S.; FIUZA, V. O. P.; BRAZIL, R. P. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95,8 (3), p. 285- 291, 2001.

SILVA, J. G.; WERNECK, G. L.; CRUZ MDO, S.; COSTA, C. H.; DE MENDONCA, I. L. Natural infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* sp. in Teresina, Piauí State, Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 23, n. 7, p. 1715-20, Jul 2007.

SIMPSON, L. The Mitochondrial Genome of Kinetoplastid Protozoa: Genome Organization, Transcription, Replication and Evolution. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 41, p. 363-82, 1987.

SOARES, M. R.; DE MENDONCA, I. L.; DO BONFIM, J. M.; RODRIGUES, J. A.; WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta Trop**, v. 117, n. 1, p. 6-9, Jan 2011.

SOUZA, C. M.; PESSANHA, J. E.; BARATA, R. A.; MONTEIRO, E. M.; COSTA, D. C.; DIAS, E. S. Study on Phlebotomine Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Fauna in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro** v. Vol. 99(8), p. 795-803, December 2004.

SOUZA, J. G. Camaçari, as Duas Faces da Moeda: Crescimento Econômico X Desenvolvimento Social. v. Salvador/BA, 2006.

TEODORO, U.; FILHO, V. L. S.; LIMA, D. M.; SPINOSA, R. P.; BARBOSA, O. C.; FERREIRA, M. E. C.; ; LONARDONI, M. V. C. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. **Revista de Saúde pública**, v. 27, p. 242-249, 1993.

THIES, S. F.; RIBEIRO, A. L.; MICHALSKY, E.; MIYAZAKI, R. D.; FORTES-DIAS, C. L.; FONTES, C. J.; DIAS, E. S. Phlebotomine sandfly fauna and natural Leishmania infection rates in a rural area of Cerrado (tropical savannah) in Nova Mutum, State of Mato Grosso in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 3, p. 293-8, May-Jun 2013.

TRAVI, B. L.; ADLER, G. H.; LOZANO, M.; CADENA, H.; MONTOYA-LERMA, J. Impact of Habitat Degradation on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of Tropical Dry Forests in Northern Colombia. **J. Med. Entomol**, v. 39 (3), p. 451-456, 2002.

VEXENAT, J. A.; BARRETO, A. C.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D. Características Epidemiológicas da Leishmaniose Tegumentar Americana em uma região endêmica do estado da Bahia. III. Fauna Flebotomínica. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** , v. 81(3), p. 293-301, 1986.

WHO. Control of the leishmaniasis. **World Health Organ Tech Rep Ser**, n. 949, p. xii-xiii, 1-186, back cover, 2010a.

\_\_\_\_\_. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. p. p. 202, 2010b.

**ANEXO – 1 Bairros avaliados pelo estudo sistemático entre dezembro de 2011 e Novembro de 2012 com seus respectivos pontos georreferenciados.**

<b>BAIRROS TRABALHADOS</b>	Nº de residências amostradas	Nº de armadilhas instaladas	Coordenadas Geográficas Latitude/longitude
<b>ZONA URBANA ORLA</b>			
<b>Barra de Pojuca*</b>	2	4	0602339 / 8007888 0603391 / 8607383
<b>Monte Gordo</b>	3	6	0599081 / 8604020 0599096 / 8601590 0596753 / 8600147
<b>Barra de Jacuípe</b>	2	4	0594543 / 8598707 0594580 / 8596311
<b>Areias</b>	1	2	0582587 / 08584349 0582773 / 8582453
<b>Jauá**</b>	1	2	
<b>ZONA URBANA SEDE</b>			
<b>Pq. Real Serra Verde</b>	1	2	0576376 / 8591818
<b>Jardim Limoeiro</b>	1	2	0576200 / 8595483
<b>Verde Horizonte</b>	1	2	0574243 / 8592558
<b>Nova Vitória</b>	1	2	0574736 / 8595890
<b>Parque Verde II</b>	1	2	0573485 / 8591549
<b>Phooc III</b>	1	2	

(\*), (\*\*) as residências incluídas no estudo, situadas nos bairros de Barra de Pojuca e Jauá foram descontinuadas durante o período de coleta dos flebotomíneos e mensuração dos dados microclimáticos, representando perda de seguimento no estudo.

**ANEXO - 2****TERMO DE CONSENTIMENTO  
LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do Projeto:** Estudo da infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania infantum* e a tendência sazonal de flebotômíneos coletados no município de Camaçari, Estado da Bahia

**Nome do Participante:** \_\_\_\_\_

**Nº Identificação da Residência:** \_\_\_\_\_

**Introdução:** As informações que se seguem, descrevem o estudo que estamos desenvolvendo e seu papel como participante. O entrevistador responderá a quaisquer perguntas que você tiver sobre este questionário ou sobre o estudo. Por favor, ouça com atenção e não hesite em fazer qualquer pergunta sobre a informação que está fornecendo.

**Objetivo do Estudo de Pesquisa:** Estamos realizando um estudo de pesquisa sobre Leishmaniose, pela Fundação Oswaldo Cruz em parceria com a Secretaria de Saúde do seu município. A leishmaniose Visceral conhecida como “calazar” é um grande problema de saúde pública na Bahia e no Brasil. As pessoas podem pegar leishmaniose nas próprias casas ao serem picadas pelo vetor da doença o “mosquito asa dura” (ou pólvora) cientificamente conhecido como flebótomo. Ele é freqüente nos domicílios, bastante ávido para sugar o sangue humano. Alimenta-se também do sangue de vários outros mamíferos, é dessa forma que ele transmite a doença; ele possui hábito crepuscular e noturno. A atividade de alimentação começa no entardecer e atinge o seu pico entre 21 e 23 horas, quando o número de insetos começam a decrescer, desaparecendo entre 5 e 6 horas da manhã. Em horários mais tardios, consegue-se detectá-las repousando nos lugares sombreados dos dormitórios ou escondidos atrás das camas, quadros e nas frestas das paredes. O propósito deste estudo é investigar a presença desses insetos que transmite a doença e avaliar se eles estão infectados e transmitindo a doença nesse município. A informação que você poderá fornecer irá auxiliar no desenvolvimento de novas intervenções contra esse inseto e conseqüentemente as medidas de controle para a doença.

**Procedimentos:** Serão realizadas capturas dos insetos com o auxílio de armadilhas luminosas, que permite detectar a abundância dos flebótomos na área de estudo. As armadilhas serão instaladas por um período de três noites consecutivas em sua residência. Elas serão ativadas no entardecer por técnicos da FIOCRUZ e agentes de saúde do município e retiradas por eles na manhã seguinte até as 7 horas. Essa metodologia é a mesma utilizada pelo Manual de Vigilância e Controle da leishmaniose visceral onde serão instaladas duas armadilhas por residência, um no peridomicílio (quintal e abrigos de animais) e outra no intradomicílio interior da residência.

**A quem contatar:** Caso você tenha alguma pergunta no que se refere às coletas em sua residência, por favor, entre em contato com nossa equipe na FIOCRUZ, pelos telefones: (71) 31762269, 31762322 ou 31762263 e procure pelo biólogo Orlando Marcos.

**Participação voluntária:** A participação de sua residência neste estudo de pesquisas depende de seu consentimento. Você pode recusar a participação em qualquer momento do estudo de pesquisa. Sua recusa em participar no estudo de pesquisa ou em parte do mesmo, não afetará sua relação com a FIOCRUZ. Uma cópia deste formulário será dada para você. Você não será responsável por nenhuma despesa associada a este estudo.

**Consentimento:**

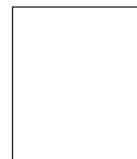
Eu ouvi e entendi este formulário de consentimento. Minhas dúvidas foram respondidas. Eu, voluntariamente, consinto que minha residência participe deste estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Proprietário

\_\_\_\_\_  
Data

Impressão Digital do dono da residência

\_\_\_\_\_  
Assinatura do investigador



1 DADOS DE CONTROLE:		
Data Início ___/___/___ hora ___:___	Data termino ___/___/___ hora ___:___	IN ___/___/___ HORI ___:___ TER ___/___/___ HORTE ___:___
Iniciais do técnico: _____		INTEC _____
N° controle: _____		N°CONT _____
GPS: _____ ALTITUDE ___		GPS: _____
Endereço completo captura: Rua: _____ Bairro: _____ ①Z urbana orla    ②Z urbana sede    ③z rural sede    ④z rural orla  Município: ①Salvador    ①Lauro de Freitas    ②Camaçari		RUAEND: _____  BAIRRO: _____  ZONA _____  MUN _____
Nome do Proprietário: _____		NOMP: _____
Telefone para contato: ( ) _____		TELC: _____
2 DADOS GEOREFERENCIADOS		
Esgoto a céu aberto na rua: Sim ① Não ②		ESGOTCA ___
Rua pavimentada: Sim ① Não ②		RUAPAVM ___
Casa: Tijolo ① Rebocada ② Compensado ③		CATRSC ___
Tem piso no chão (da casa): Sim ① Não ②		PISOCH ___
3 DADOS RELACIONADOS A COLETA E CONTROLE DOS INSETOS NA ÁREA		
Tipo de captura: ① Coleta ã sistemática ② Coleta sistemática		TIPCOL ___
Instrumento de captura: ① Armadilha CDC ① Outras		INSTCAP ___
Quantidades de pontos amostrados: _____		QTPON ___
Quantidade de armadilhas instaladas: _____		QTARM ___
Flebótomos coletados: Sim ① Não ① Total _____		FLECOL ___ TOT ___
Realização de borrifações anteriores Sim ① Não ① ⑧ Não se lembra		REABO ___
4 TIPOS DE AMBIENTE:		
Ambientes amostrados: ① Residência ① Canil ② Mata ③ Terreno aberto		AMB ___
Residência: ① Intradomicílio ① Peridomicílio ② Intra/peri ⑧ ã se aplica		RES ___
<b>Amostragem no Peridomicílio:</b> A) Abrigo e/ou presença de galináceos na residência Sim ① Não ①		AMOGA ___
B) presença de galináceos na rua Sim ① Não ①		
C) Abrigo e/ou presença de cães Sim ① Não ①		AMOCA ___
D) Abrigo e/ou presença de suínos Sim ① Não ①		AMOSU ___



#### ANEXO - 4. Proporção de flebotômíneos coletados no estudo piloto por coordenada geográfica.

Localidade	Latitude/Longitude	M F		Localidade	Latitude/Longitude	M F	
		M	F			M	F
JD. LIMOEIRO A1, A2, A3, A4, A5	+ 8595319 / 573523	4	2	CAMAÇARI DE DENTRO D1, D2, D3, D4, D5	- 8594805 / 0571893	-	-
	+ 8595584 / 0574883	4	-		- 8595708 / 0572079	-	-
	+ 8594978 / 0575253	13	2		- 8595109 / 0572198	-	-
	+ 8594910 / 0575467	2	-		+ 8595598 / 0571840	2	2
	+ 8594711 / 0575171	21	10		+ 8595611 / 0571346	5	1
NOVA VITÓRIA F1, F2, F3, F4	- 8595799 / 0573853	-	-	PARQUE FLORESTAL E1, E2, E3, E4, E5	+ 8597066 / 057844	2	2
	- 8595673 / 0573644	-	-		- 859711940 / 573994	-	1
	- 8594882 / 0573199	-	3		+ 85972620 / 573735	-	1
	- 8595284 / 0573094	-	1		+ 85971160 / 573726	1	-
+ 85969500 / 573694	2	-					
PQ. SERRA VERDE B1, B2, B3, B4, B5, B6	+ 8589781 / 0 577060	11	3	NATAL I1, I2, I3 ,I4, I5	- 85964150 / 573308/	-	-
	- 8590276 / 0577044	-	-		- 85964810 / 573302	-	-
	+ 8589951 / 0577793	6	2		- 85964720 / 573274	-	-
	+ 8589178 / 0576434	80	11		- 85965190 / 573196	-	-
	+ 8590166 / 0575777	10	13		- 85965050 / 573399	-	-
PARAFUSO L1, L2, L3, L4	+ 8588848 / 0573385	4	-	GRAVATÁ J1, J2, J3, J4	- 85975300 / 572226	-	-
	- 8588478 / 0575024	-	1		- 85973670 / 571949	-	-
	- 8587356 / 0571720	-	-		- 85969700 / 572374	-	-
	+ 8588041 / 573009	1	-		- 85971390 / 572597	-	-
AREIAS N1, N2, N3	+ 1249321/ 03814595	2	1	VERDE HORIZONTE G1, G2, G3, G4, G5	- 85931320 / 574368	-	-
	+ 1249165/ 03814352	70	50		- 85925500 / 574253	-	-
	+ 1248303/ 03814349	135	19		- 85924320 / 5739952	-	-
+ 1249367 /03814405	1	-	- 85938360 / 5758862		-	-	
+ 1249378 /03814198	28	19	- 85941720 / 573678		-	-	
JAUÁ M1, M2, M3, M4, M5, M6	- 1249124 /03814034	-	2	PARQUE VERDE H1, H2, H3, H4, H5	- 85932680 / 572967	-	-
	+ 1249646 /03813859	3	-		- 85930940 / 573295	-	-
	+ 1249609 /03814048	30	11		- 85938630 / 5734441	-	-
+ 8595721 / 0571913	5	-	- 85883490 / 577120		-	-	
- 8595282 / 0571625	-	5	- 8588245 / 0577159		-	-	
ALTO DA CRUZ C1, C2, C3, C4	- 8595412 / 0572319	-	1	MACHADINHO * Zona rural orla	- 8588450 / 0577235	-	-
	+ 8596024 / 0572270	4	-		- 8588585 / 0577355	-	-
					- 8588435 / 0577174	-	-
			- 8588720 / 0577434		-	-	

Os sinais (+) e (-), referem-se a presença ou não de flebotômíneos nos pontos amostrais que estão representados pelas letras maiúsculas e números.



## ANEXO – 5. Dados microclimáticos compilados através de termo-higro-anemômetro no momento da instalação das armadilhas para captura dos flebotomíneos – FIOCRUZ – CPqGM – LPBI

Fotografias referentes às residências amostradas

B. DE POJUCA	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV
<b>Micro clima</b>	Med.	Med.	Med.	Med.	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med
<b>Temperatura</b>	31,3	29,9	30,2	31,2	30,5	29,5	s/d	27,1	29,2	27,3	25,8	27,9
<b>Unidade</b>	60,7	61,8	68,2	58,2	63,8	60	s/d	71,3	62,1	69,9	77,4	78,6
<b>Vel. ventos</b>	0,6	4,2	2,2	3,2	1,7	1	s/d	0,9	0	0,7	1,9	0,5
<b>Pluviosidade</b>	100,7	35,7	70,9	74,7	48,8	411,5	170,2	162,5	137,4	30,7	73,6	35,5



MONTE GORDO	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV
<b>Micro clima</b>	Med.	Med.	Med.	Med.	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med
<b>Temperatura</b>	29,2	27,9	28,6	29,8	28,5	28,4	26,9	25,7	27,7	27,5	25	27,4
<b>Unidade</b>	65,5	73,1	71	60,8	63,4	66	70,3	73,3	64,2	64,2	78,8	73,9
<b>Vel. Ventos</b>	2,4	1,1	1	0	1,3	0,6	0,7	0	0,4	2,0	0,7	1,2
<b>Pluviosidade</b>	100,7	35,7	70,9	74,7	48,8	411,5	170,2	162,5	137,4	30,7	73,6	35,5



MONTE GORDO	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV
<b>Micro clima</b>	Med.	Med.	Med.	Med.	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med
<b>Temperatura</b>	30,1	30,4	30,7	30,9	31,4	29,6	29,6	27,2	28,4	27,6	25,2	29,5
<b>Unidade</b>	61,4	66	66,4	56,1	56,4	59,3	62	72,9	62,7	63,9	76,1	67
<b>Vel. Ventos</b>	0	1	0,5	0,7	0,4	0	0	0	0,4	1,2	1	0,8
<b>Pluviosidade</b>	100,7	35,7	70,9	74,7	48,8	411,5	170,2	162,5	137,4	30,7	73,6	35,5



B DE JACUIPE	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV
<b>Micro clima</b>	Med.	Med.	Med.	Med.	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med
<b>Temperatura</b>	28,2	28,9	28,9	28,6	28,5	27,6	27,7	25,9	27,5	27,1	25,6	28
<b>Unidade</b>	69,8	68,5	69,8	64,4	67,4	70,9	69	72,4	65,5	67	78,4	76
<b>Vel. Ventos</b>	1	4,9	0,8	0,6	0,4	2,8	1,7	0,4	0	4,1	0,5	1,5
<b>Pluviosidade</b>	100,7	35,7	70,9	74,7	48,8	411,5	170,2	162,5	137,4	30,7	73,6	35,5



B DE JACUIPE	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV
<b>Micro clima</b>	Med.	Med.	Med.	Med.	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med
<b>Temperatura</b>	29,4	31,3	29,6	31,3	30,2	28,9	27,7	25,9	27,5	27,1	25,6	29,3
<b>Unidade</b>	63,6	64,8	70,5	62,1	59,7	64,5	69	72,4	65,5	67	78,4	67,5
<b>Vel. Ventos</b>	0,4	1,1	1,1	1,3	0,5	0	1,7	0,4	0	4,1	0,5	0,9
<b>Pluviosidade</b>	100,7	35,7	70,9	74,7	48,8	411,5	170,2	162,5	137,4	30,7	73,6	35,5





AREIAS	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV
<b>Micro clima</b>	Med.	Med.	Med.	Med.	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med
<b>Temperatura</b>	26,7	27,7	27,9	30,4	28,6	27,4	s/d	25,1	27,5	26,4	24,7	28,2
<b>Unidade</b>	75,2	75,5	74,8	63,4	68,9	72	s/d	82,6	65,5	70,3	83,1	73
<b>Vel. Ventos</b>	0,5	0,5	0,9	0,4	0,4	0,8	s/d	0	0	0,6	0	0,5
<b>Pluviosidade</b>	100,7	35,7	70,9	74,7	48,8	411,5	170,2	162,5	137,4	30,7	73,6	35,5



V. HORIZONTE	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV
<b>Micro clima</b>	Med.	Med.	Med.	Med.	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med
<b>Temperatura</b>	27,2	33,7	30	s/d	31	25,4	25,2	27,5	25,6	29,8	27,2	28,8
<b>Unidade</b>	78,4	58	56,9	s/d	58,4	81,4	75	69	73,8	60,6	67,6	67,6
<b>Vel. Ventos</b>	1,5	0	0	s/d	0,4	0	0,6	0,4	0,6	0,6	40	1,2
<b>Pluviosidade</b>	100,7	35,7	70,9	74,7	48,8	411,5	170,2	162,5	137,4	30,7	73,6	35,5



JD LIMOEIRO	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV
<b>Micro clima</b>	Med.	Med.	Med.	Med.	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med
<b>Temperatura</b>	27,7	33,4	35	s/d	s/d	28,2	25,5	27,1	32,5	31,2	24,6	26
<b>Unidade</b>	76,5	52,8	60,5	s/d	s/d	66,7	72,1	69,7	57,5	56,5	70,4	74,5
<b>Vel. Ventos</b>	0,6	0	0	s/d	s/d	0,2	1	05	0,4	1,8	0,2	1,0
<b>Pluviosidade</b>	100,7	35,7	70,9	74,7	48,8	411,5	170,2	162,5	137,4	30,7	73,6	35,5





<b>N. VITORIA</b>	<b>DEZ</b>	<b>JAN</b>	<b>FEV</b>	<b>MAR</b>	<b>ABR</b>	<b>MAI</b>	<b>JUN</b>	<b>JUL</b>	<b>AGO</b>	<b>SET</b>	<b>OUT</b>	<b>NOV</b>
<b>Micro clima</b>	Med.	Med.	Med.	Med.	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med
<b>Temperatura</b>	27,9	31,2	29,9	s/d	29,7	27	s/d	25,4	23,9	28,5	25,4	26,6
<b>Unidade</b>	74,9	56,8	61,4	s/d	60,9	71,4	s/d	75,2	73	62,1	71,8	71
<b>Vel. Ventos</b>	0,9	1,7	2,3	s/d	3,7	1,1	s/d	1	0,6	1,1	0,6	2,5
<b>Pluviosidade</b>	100,7	35,7	70,9	74,7	48,8	411,5	170,2	162,5	137,4	30,7	73,6	35,5



<b>PQ.VERDE II</b>	<b>DEZ</b>	<b>JAN</b>	<b>FEV</b>	<b>MAR</b>	<b>ABR</b>	<b>MAI</b>	<b>JUN</b>	<b>JUL</b>	<b>AGO</b>	<b>SET</b>	<b>OUT</b>	<b>NOV</b>
<b>Micro clima</b>	Med.	Med.	Med.	Med.	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med
<b>Temperatura</b>	26,9	31	32,1	28,4	29,7	27,4	25,9	27,7	25,8	29,8	27,9	28,6
<b>Unidade</b>	77,8	56,6	59,4	67,3	62,4	77	73,3	68,2	72,5	60,3	65,8	67,8
<b>Vel. Ventos</b>	4,7	0	0	s/d	0,9	1,2	0	1,5	1,3	1,8	3,6	1,3
<b>Pluviosidade</b>	100,7	35,7	70,9	74,7	48,8	411,5	170,2	162,5	137,4	30,7	73,6	35,5



<b>PQ R S VERDE</b>	<b>DEZ</b>	<b>JAN</b>	<b>FEV</b>	<b>MAR</b>	<b>ABR</b>	<b>MAI</b>	<b>JUN</b>	<b>JUL</b>	<b>AGO</b>	<b>SET</b>	<b>OUT</b>	<b>NOV</b>
<b>Micro clima</b>	Med.	Med.	Med.	Med.	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med
<b>Temperatura</b>	30,1	31,3	30,5	s/d	28,9	25,2	25	26,5	23,2	32,3	23,6	28,1
<b>Unidade</b>	67,2	54,8	66,1	s/d	63,5	82,9	74,6	70,9	81,6	51,4	80,5	66
<b>Vel. Ventos</b>	0,8	0	0	s/d	0,4	0	1,1	2,8	2	2,5	0,9	4,0
<b>Pluviosidade</b>	100,7	35,7	70,9	74,7	48,8	411,5	170,2	162,5	137,4	30,7	73,6	35,5



PHOC III	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV
<b>Micro clima</b>	Med.	Med.	Med.	Med.	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med
<b>Temperatura</b>	30,8	30,2	30,6	s/d	27,5	26,7	25,5	s/d	24,7	30,6	26,3	29,5
<b>Unidade</b>	51,4	58,4	62,1	s/d	64,4	84,3	72,1	s/d	75,1	60,6	74,8	64,8
<b>Vel. Ventos</b>	2,4	0	2	s/d	0,3	0,8	1	s/d	1,6	0	0,5	0,5
<b>Pluviosidade</b>	100,7	35,7	70,9	74,7	48,8	411,5	170,2	162,5	137,4	30,7	73,6	35,5



## ANEXO - 6 ARTIGO

### Título

ESTUDO DA INFECÇÃO NATURAL DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* POR  
*LEISHMANIA INFANTUM* E A FLUTUAÇÃO MENSAL DE FLEBOTOMÍNEOS  
COLETADOS NO MUNICÍPIO DE CAMAÇARI, ESTADO DA BAHIA

### Nome dos autores e Afiliações

Orlando Marcos Farias de Sousa<sup>1</sup>; Lairton Souza Borja<sup>1</sup>; Djalma Alves de Melo <sup>2</sup>;  
Edelberto Santos Dias<sup>3</sup>; Deborah Bittencourt Mothé Fraga<sup>1,4</sup>; Patrícia Sampaio Tavares  
Veras<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz

<sup>2</sup>Centro de Controle de Zoonoses/ Camaçari-BA

<sup>3</sup> Centro de pesquisa René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz

<sup>4</sup>Escola de Medicina Veterinária/ Universidade Federal da Bahia

### \*Autor correspondente

Patrícia Sampaio Tavares Veras, PhD, MD

Laboratório de Patologia e Biointervenção, CPqGM, FIOCRUZ

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal

Salvador/BA, Brazil; CEP 40296-710

Tel: + 55 (71) 3176-2263

Fax: + 55 (71) 3176-2290

E-mail: [pveras@bahia.fiocruz.br](mailto:pveras@bahia.fiocruz.br)

### Resumo

No município de Camaçari, considerado área endêmica para leishmaniose visceral (LV), foi realizado estudo objetivando determinar a influência das variáveis climáticas sobre a flutuação mensal da população flebotomínica e a taxa de infecção natural desses flebotomíneos por *Leishmania infantum*. Para o levantamento entomológico foram realizadas capturas sistemáticas de flebotomíneos utilizando armadilhas tipo HP, tanto no peri como no

35 intradomicílio. As residências foram selecionadas em bairros pertencentes a  
36 zona urbana orla e zona urbana sede, onde casos humanos de LV foram  
37 registrados. As capturas foram realizadas entre dezembro de 2011 e novembro  
38 de 2012. A correlação entre pluviosidade, umidade relativa do ar e temperatura  
39 e a proporção de flebotomíneos foi calculada utilizando o coeficiente de  
40 *Spearman*. Para o estudo da infecção natural dos flebotomíneos foi utilizada a  
41 técnica de qPCR. Os *pools* avaliados foram compostos por flebotomíneos da  
42 mesma espécie, distribuídos pelas residências, no intra e peridomicílio. Além  
43 disso, os *pools* foram distribuídos de acordo com os 12 meses de coleta. Os  
44 resultados mostraram que a fauna flebotomínica é diversificada, sendo composta  
45 por quatro gêneros com ocorrência de cinco espécies. Espécimes de interesse  
46 epidemiológico foram encontrados com predominância para a espécie *Lutzomyia*  
47 (*Lutzomyia*) *longipalpis* (98,4%). Foi observada correlação positiva entre a  
48 densidade de flebotomíneos e a variável pluviosidade na zona urbana sede  
49 durante o período de coleta ( $r = 0,66$ ,  $p < 0,02$ ). A correlação entre as variáveis  
50 bioclimáticas e a densidade dos flebotomíneos também foi avaliada em bairros  
51 que se destacaram individualmente pela densidade de flebotomíneos, sendo  
52 encontrada correlação positiva para a variável umidade relativa do ar ( $r = 0,58$   $p$   
53  $< 0,04$ ) e associação similar para a variável precipitação ( $r = 0,67$   $p < 0,01$ ). As  
54 análises moleculares mostraram infecção natural por *Leishmania infantum* em  
55 10 de 78 *pools* de *Lutzomyia longipalpis* analisados. Estes achados aliados à  
56 presença do vetor competente da LV, *Lutzomyia longipalpis* em elevada  
57 proporção, e os estudos das variáveis climáticas alertam para a necessidade de  
58 vigilância epidemiológica e constituem em ferramenta útil para o planejamento  
59 de medidas de controle contra LV no município de Camaçari.

60

## 61 **Abstract**

62

63 In Camaçari city, considered an endemic area for visceral leishmaniasis  
64 (VL), the study was conducted aiming to determine the climatic variables  
65 influence on the sandflies monthly fluctuation and the natural infection rates by  
66 *Leishmania infantum* in the sandflies. The entomological inventory was  
67 performed with sandflies systematic captures using HP traps, both in  
68 peridomiciliar well as in intradomiciliar. The residences were selected in districts

69 belonging to the coastline urban zone and headquarters urban zone, where  
70 human cases of VL were recorded in the city. Captures were performed between  
71 December 2011 and November 2012. The correlation between the number of  
72 sandflies and the different climatic variables was calculated using Spearman's  
73 coefficient. The sandfly natural infection was evaluated by qPCR technique.  
74 Pools reviews were composed by sand flies of the same species, distributed  
75 among households, which were investigated in peridomiciliare and  
76 intradomiciliare. Additionally, pools were distributed according to the 12-month  
77 sampling. The results showed that the phlebotomine fauna is diverse, consisting  
78 of four genera and five species. Specimens of epidemiological interest were  
79 found predominantly for *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (98.4%). In addition,  
80 a positive correlation between sandfly density and pluviosity at headquarters  
81 urban zone was observed during the collection period. ( $r = 0.66$ ,  $p < 0.02$ ). The  
82 correlation between bioclimatic variables and density of sandflies was also  
83 evaluated in neighborhoods that stood out individually by the sandfly density. A  
84 positive correlation was observed for the variable relative humidity during the  
85 collection period ( $r = 0.58$   $p < 0.04$ ) and similar association for precipitation  
86 variable in the same period ( $r = 0.67$   $p < 0.01$ ). Molecular analysis showed natural  
87 infection by *Leishmania infantum* in 10 pools of 78 pools of *Lutzomyia Longipalpis*  
88 analyzed. In summary, these findings combined with the presence of VL  
89 competent vector, *Lutzomyia Longipalpis* in high density, and studies of climate  
90 variables warn of the need for epidemiological surveillance and constitute a useful  
91 tool for planning control measures against VL in Camaçari.

92

## 93 **1. Introdução**

94

95 A leishmaniose visceral é uma doença infecciosa considerada  
96 negligenciada pela Organização Mundial da Saúde. A LV é causada por  
97 protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida, família  
98 Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Ross, 1903). No Brasil, o agente  
99 etiológico é a *Leishmania infantum (Leishmania infantum)*, sinônimo de  
100 *Leishmania chagasi* (Mauricio *et al.*, 2000). A leishmaniose visceral afeta  
101 principalmente regiões pobres de países em desenvolvimento (Who, 2010c).  
102 Assim como em outras partes do mundo, no Brasil a ocorrência da leishmaniose



103 visceral estava limitada inicialmente à áreas rurais e a pequenas localidades  
104 urbanas (Saúde, 2008). Modificações no ambiente e à emergência de focos da  
105 doença em áreas urbana são fatores que predispõem a ocorrência dessa doença  
106 (Silva *et al.*, 2001; Travi *et al.*, 2002). Hoje, ela encontra-se em franca expansão,  
107 com o encontro de incidências elevadas em grandes centros urbanos (De Santis  
108 *et al.*, 2011; Carranza-Tamayo *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011; Soares *et al.*,  
109 2011).

110 Os vetores transmissores da leishmaniose visceral são flebotomíneos  
111 pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, sendo o gênero  
112 *Lutzomyia* (França, 1924) responsável pela transmissão das leishmanioses no  
113 Novo Mundo (Young & Duncan, 1994). A espécie *Lutzomyia longipalpis* (Lutz &  
114 Neiva, 1912) é considerada a principal vetora responsável pela transmissão da  
115 doença no Brasil. Nesse país, o controle da transmissão da *Leishmania infantum*  
116 é centrado na redução da população flebotomínica e nas medidas de controle do  
117 reservatório com o diagnóstico e eutanásia de cães soropositivos. Outras  
118 medidas existentes são o diagnóstico e tratamento de casos humanos, além de  
119 atividades de educação em saúde, entretanto o impacto dessas medidas na  
120 transmissão é baixa quando utilizadas na ausência das medidas de controle do  
121 vetor e reservatório (Who, 2010b; Brasil, 2006)

122 Os estudos sobre o comportamento das espécies de flebotomíneos são  
123 imprescindíveis para a aplicação correta das medidas de controle químico da  
124 doença (Barata *et al.*, 2005). Entretanto, ainda são necessários mais trabalhos  
125 de monitoramento entomológico que avaliem a flutuação da fauna flebotomínica  
126 correlacionando-a com fatores climáticos, como temperatura, umidade relativa  
127 do ar, índices pluviométricos e fatores fisiográficos, (Oliveira *et al.*, 2008;  
128 Michalsky *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2012; Queiroz *et al.*, 2012; Saúde, 2008).  
129 Outro fator de fundamental importância para o entendimento da cadeia de  
130 transmissão da leishmaniose visceral em um estudo de caráter epidemiológico  
131 é a identificação das espécies vetoras, o conhecimento da biologia e a  
132 determinação da taxa de infecção natural dos mesmos, principalmente nas áreas  
133 endêmicas. Este conhecimento é fundamental para a proposição de medidas de  
134 controle direcionadas (Silva, 2011).

135 Efetivamente no estado da Bahia, existem alguns estudos sobre a  
136 identificação de flebotomíneos silvestres em áreas consideradas endêmicas

137 para leishmaniose visceral como no município de Jacobina, Camaçari e Jequié  
138 (Deane, 1956; Sherlock e Santos, 1964; Sherlock e Guitton, 1969). No entanto,  
139 pouco se conhece sobre a fauna dos flebotomíneos em áreas urbanas e  
140 periurbanas no município de Camaçari, considerada área de transmissão intensa  
141 para leishmaniose visceral (Brasil, 2006). Estudos para a elucidação do papel  
142 destes insetos na cadeia de transmissão da doença nessa área podem contribuir  
143 para a correta implementação de medidas de controle do vetor e, em  
144 consequência, redução da disseminação da leishmaniose visceral na região.

145 O presente estudo foi desenvolvido no município de Camaçari,  
146 considerada uma área endêmica para leishmaniose visceral. O nosso principal  
147 objetivo foi determinar a flutuação mensal e a taxa de infecção natural  
148 por *Leishmania* da população flebotomínica em áreas urbanas e periurbanas do  
149 município.

150

## 151 **2. Metodologia**

152

### 153 **2.1 Características gerais de Camaçari**

154

155 O estudo foi realizado no município de Camaçari situado na latitude  
156 12°41'51" e longitude 38°19'27", considerado o maior território da região  
157 metropolitana da capital Salvador, distante dela cerca de 41 km (SESAU-  
158 Camaçari, 2010). O município possui seus bairros estratificados em quatro zonas  
159 diferentes: zona urbana orla, zona urbana sede, zona rural orla e zona rural sede.  
160 O município possui clima tropical úmido com temperatura média de 26°C.

161

### 162 **2.2 Área do estudo**

163

164 Residências de bairros pertencentes as zonas urbana orla e zona urbana  
165 sede foram selecionadas considerando conjuntamente a presença de casos de  
166 leishmaniose visceral humana e/ou canina notificados na residência e/ou  
167 vizinhança, além de serem condições que aumentam a receptividade à presença  
168 do vetor flebotomínico *Lutzomyia longipalpis* como: a) presença no peridomicílio  
169 de matéria orgânica em abundância, b) áreas com alta umidade, c) abrigo de

170 animais próximo às residências humanas, d) presença de árvores com raízes e  
171 buracos em pedras, que são locais propícios para oviposição do vetor.

172

### 173 **2.3 Captura e identificação dos flebotomíneos**

174

175 A captura dos flebotomíneos foi realizada durante 12 meses ininterruptos,  
176 entre os meses de dezembro de 2011 a novembro de 2012. Foram utilizadas  
177 armadilhas luminosas do tipo HP (Pugedo *et al.*, 2005), que foram instaladas no  
178 intradomicílio e peridomicílio, sendo expostas das 17:00h às 6:00h da manhã  
179 seguinte durante três noites consecutivas.

180 Foram utilizadas 30 armadilhas distribuídas em 15 residências  
181 pertencentes a 11 bairros: Barra de Pojuca, Monte Gordo, Barra de Jacuípe,  
182 Areias, Jauá, Parque Real Serra Verde, Jardim Limoeiro, Verde Horizonte, Nova  
183 Vitória, Parque Verde II e Phoc III. Um aparelho *Global Positioning*  
184 *System* (GPS) foi utilizado para georreferenciar as residências investigadas.

185 Os flebotomíneos capturados foram identificados utilizando a  
186 classificação proposta por Galati (2003), sendo realizada no Laboratório de  
187 Patologia e Biointervenção do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fundação  
188 Oswaldo Cruz e confirmada de forma cega pelo laboratório de entomologia do  
189 Laboratório Central de Saúde Pública. Os espécimes machos foram submetidos  
190 ao processo de diafanização e montagem em lâmina, enquanto as fêmeas  
191 tiveram o corpo dissecado para separar a cabeça e os dois últimos segmentos  
192 abdominais. Foi utilizado protocolo padronizado pelo Laboratório de  
193 Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou. A cabeça e o fragmento  
194 do abdômen dos espécimes fêmeas foram montados entre lâmina e lamínula,  
195 utilizando-se líquido de Berlese de acordo com a técnica de Langeron (1949)  
196 modificada. O restante do corpo de cada fêmea dissecada foi acondicionado em  
197 dimetilsufóxido a 6% e mantidos a -70°C até a composição dos *pools* e extração  
198 do DNA genômico. Alguns exemplares não estavam íntegros, apresentando  
199 somente parte do material, o que não permitiu a identificação de sua espécie  
200 específica, sendo estes exemplares identificados apenas quanto ao gênero.

201

### 202 **2.4 Obtenção de dados climáticos**

203

204 Com a finalidade de obter dados microclimáticos de temperatura, umidade  
205 relativa do ar e velocidade dos ventos nos locais de instalação das armadilhas  
206 foi utilizado um aparelho termo-higro-anemômetro. Os dados foram compilados  
207 uma vez por mês no peridomício das residências nos locais exatos de  
208 instalação das armadilhas, durante os 12 meses do estudo. Dados  
209 complementares mensais de pluviosidade foram compilados do banco de dados  
210 históricos do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia), 4° distrito da Bahia e  
211 foram referentes a base meteorológica de Ondina, situada na capital Salvador.  
212 As variáveis microclimáticas de temperatura, umidade e pluviosidade foram  
213 utilizadas para avaliação de correlação entre elas e a proporção dos  
214 flebotomíneos capturados ao longo do estudo, assim como a flutuação mensal  
215 de insetos capturados.

216

## 217 **2.5 Influência das variáveis climáticas sobre os flebotomíneos**

218

219 Para verificar a influência dos fatores ambientais sobre a flutuação mensal  
220 da população dos flebotomíneos ao longo de um ano foram utilizados dados  
221 climáticos de temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e pluviosidade (mm<sup>3</sup>)  
222 referentes ao período de dezembro de 2011 a novembro de 2012. Para as  
223 análises foram considerados os valores das médias mensais para cada uma das  
224 variáveis de associação avaliadas. A correlação entre as variáveis bioclimáticas  
225 e a proporção populacional de flebotomíneos foi calculada utilizando o  
226 coeficiente de correlação não paramétrica de *Spearman* (valor  $p \leq 0.05$ ).

227

## 228 **2.6 Extração de material genômico de flebotomíneos**

229

230 Após a identificação morfológica, 682 fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*  
231 foram reunidas em *pools* variando de 2 a 10 fêmeas por *pool*, sendo divididos  
232 quanto ao setor da residência em intradomicílio e peridomicílio e de acordo com  
233 os meses de coleta no estudo. Os *pools* obtidos foram macerados e  
234 homogeneizados em 60 µl de tampão de lise celular (100mM Tris-HCL, 100 mM  
235 NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, pH 8,0) e 10 µL de solução de proteinase K a 1  
236 mg/mL (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, o  
237 material macerado foi incubado em banho-maria por um período de 16 a 18 h a

238 37°C. O DNA foi extraído com fenol e clorofórmio segundo protocolo de Souza e  
239 colaboradores (2004) e Michalsky e colaboradores (2002) modificados. As  
240 amostras de DNA foram ressuspensas em 50 µl de tampão Tris-EDTA 1X (TE).  
241 Posteriormente, a concentração das amostras foi determinada usando  
242 espectrofotômetro digital (Nanodrop® ND-1000 Thermo Scientific, Wilmington,  
243 USA). Por fim, as amostras de DNA foram aliquotadas na concentração de 20  
244 ng/µL e estocadas no freezer a -20°C até sua utilização.

245

## 246 2.7 PCR quantitativa (qPCR)

247

248 Com a finalidade de normalizar a concentração da amostra de DNA de  
249 *Leishmania* presente nas amostras dos *pools* de fêmeas de flebotomíneos, bem  
250 como para assegurar que os resultados negativos no teste não ocorreram devido  
251 a problemas na amostra, como degradação de DNA ou presença de inibidores  
252 de PCR foram utilizados *primers* adequados que têm como alvos o gene da  
253 periodicidade de *Lutzomyia longipalpis* (GenBank AF446142; Bauzer *et al.*  
254 (2002)) e que não amplificam o DNA genômico da *Leishmania*, em PCR em  
255 tempo real.

256 As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo: 5  
257 µL da amostra de DNA flebotomínico, diluído com água deionizada na  
258 concentração de 20 ng/µL, e 20 µL de mistura de PCR, que consiste em 12,5 µL  
259 da Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA),  
260 *primer forward* 5'-A ATTTCTTTTCCTTAGGACCATCGA-3' (Fleb-F) e *primer*  
261 *reverse* 5'-TAGGACATCTTCGGAAAATTGTTG-3' (Fleb-R), 1,5 µL ambos em  
262 uma concentração final de 900 nM, e uma sonda fluorogênica 5'-  
263 AMTCCTCASAGTCTTTGACTCCACGTTGGTT-3' que foi sintetizada junto com  
264 uma molécula TAMRA *reporter* ligado à extremidade 5', assim como um MGB-  
265 QNQ *quencher* ligado à extremidade 3' (Perkin-Elmer Applied Biosystems), 2,5  
266 µL em uma concentração final de 200 nM e 2µl de BSA (2,5µg) para completar  
267 o volume final da reação de 25 µL. As condições de temperatura da reação foram  
268 de 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1  
269 min. Somente foram utilizadas para avaliação da infecção natural por *Leishmania*  
270 amostras de DNA que amplificaram o gene da periodicidade.

271 Os ensaios de qPCR realizados para determinar a quantidade de DNA do  
272 parasito nas amostras dos *pools* de fêmeas de flebotomíneos capturadas foram  
273 baseados no protocolo descrito por Francino e colaboradores (2006). O alvo da  
274 reação foi uma região conservada do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA)  
275 de *Leishmania infantum* que amplifica um fragmento de 120 pares de base (bp).  
276 As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL, consistindo de 5 µL  
277 de DNA em 20 ng/µL (para os *pools* de flebotomíneos) e 20 µL de mistura de  
278 PCR, que consiste em: 12,5 µL da Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied  
279 Biosystems, Carlsbad, CA, EUA), *primer forward* 5'-  
280 AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3' (Leish-1) e *primer reverse* 5'-  
281 ACCCCCAGTTTCCCGCC-3' (Leish-2), ambos em uma concentração final de  
282 900 nM, uma sonda fluorogênica 5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3' que foi  
283 sintetizada junto com uma molécula FAM *reporter* ligada à extremidade 5', assim  
284 como um MGB-QNQ *quencher* ligado à extremidade 3' (*Perkin-Elmer Applied*  
285 *Biosystems*), em uma concentração final de 200 nM. As condições estabelecidas  
286 para a reação foram de 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, e 40 ciclos a  
287 95°C durante 15 s e 60°C durante 1 min. A carga parasitária foi expressa pelo  
288 número de parasitos e normalizada para a quantificação média da amplificação  
289 do gene controle da periodicidade de cada *pool* de fêmeas de flebotomíneos.

290

## 291 **2.8 Cálculo da taxa mínima de infecção natural**

292

293 Para o cálculo da taxa de prevalência da infecção por *Leishmania* nos  
294 *pools* dos flebotomíneos foi utilizada a taxa de infecção mínima, calculada pela  
295 fórmula: número de “*pools*” de cada espécie em que houve detecção de DNA de  
296 *Leishmania* multiplicado por 100 e dividido pelo número total de indivíduos dos  
297 “*pools*” da espécie.

298

## 299 **3. Resultados**

300

### 301 **3.1 Coleta dos flebotomíneos**

302

303 Após a identificação morfológica da fauna flebotomínica foram  
304 encontrados 5.319 flebotomíneos, sendo constituída por apenas um único

305 gênero (*Lutzomyia*), e seis espécies: *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (98,4%),  
306 *Evandromyia (Barretomyia) sallesi* (0,81%), *Evandromyia (Aldamyia) evandroi*  
307 (0,42%), *Nyssomyia whitmani* (0,22%) e *Pressatia choti* (0,14%). Os espécimes  
308 de *Evandromyia (Barretomyia) serie cortelezzii* (0,08%) foram identificados  
309 somente quanto ao gênero. O número total de espécimes de flebotomíneos  
310 identificados e distribuídos de acordo com os bairros onde foram capturados  
311 pode ser observado na tabela 1.

312 A maior proporção da fauna flebotomínica encontrada nos bairros  
313 investigados foi concentrada na zona urbana orla com cerca de 95,8%, enquanto  
314 que nos bairros da zona urbana sede do município foi de apenas 4,2%. A menor  
315 e maior proporção vetorial foi identificada no mês de novembro de 2012 (2,67%)  
316 e setembro de 2012 (19,29%) respectivamente (Tabela 2). Quanto ao  
317 comportamento de endofilia e exofilia dos flebotomíneos capturados no  
318 município de Camaçari, 93,8% dos espécimes foram encontrados no  
319 peridomicílio, enquanto que 6,2% foram capturados no intradomicílio (Tabela 3).

320

### 321 **3.2 Influência das variáveis climáticas sobre a proporção da** 322 **população flebotomínica**

323

324 A associação entre a proporção dos flebotomíneos e os diferentes fatores  
325 climáticos foi avaliada e encontra-se representada na Tabela 4. Observou-se  
326 correlação positiva significativa apenas entre a proporção de flebotomíneos e a  
327 variável pluviosidade na zona urbana sede (Figura 1). As variáveis umidade  
328 relativa do ar e temperatura nessas zonas não apresentaram correlação  
329 estatisticamente significativa com o número de flebotomos capturados. No  
330 entanto, quando a mesma correlação foi avaliada nos três bairros que se  
331 destacaram individualmente pela alta proporção de flebotomíneos, encontrou-se  
332 correlação positiva estatisticamente significativa entre as variáveis bioclimáticas,  
333 umidade relativa do ar e pluviosidade em relação à proporção de flebotomíneos,  
334 Figura 2 e 3.

335

### 336 **3.3 Detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos**

337

338 Um total de 740 fêmeas que não estavam alimentadas foram distribuídas  
339 em *pools* por espécie variando de 2 à 10 fêmeas por *pool*, totalizando 102 *pools*  
340 formados. Deste total, 78 *pools* corresponderam a espécie *Lutzomyia*  
341 *longipalpis*. Essa representou a única espécie utilizada para a determinação da  
342 infecção natural dos flebotomíneos coletados nesse estudo.

343 Do total de 78 *pools* avaliados, em 10 *pools* de flebotomíneos da  
344 espécie *Lutzomyia longipalpis* foi detectada infecção natural pela detecção de  
345 DNA de *Leishmania* utilizando qPCR. Segundo análise da expressão do gene  
346 constitutivo de flebotomíneos, todos 78 *pools* testados foram positivos,  
347 apresentando amplificação do gene controle da periodicidade de *Lutzomyia*. A  
348 infecção natural dos flebotomíneos foi analisada de acordo com a distribuição  
349 dos bairros e pelos meses do estudo. Os locais de detecção da infecção natural  
350 dos flebotomíneos foram representados pelos bairros de Monte Gordo (nove  
351 *pools* positivos) e pelo bairro Areias (1 *pool* positivo). A taxa mínima de infecção  
352 natural total do estudo foi de 1,46% sendo detectada infecção nos flebotomíneos  
353 ao longo dos meses de dezembro de 2011, fevereiro, março, maio e setembro  
354 de 2012 (Tabela 5 e 6).

355

#### 356 4. Discussão

357

358 Em resumo, o presente estudo mostrou que a fauna flebotomínica  
359 detectada no município de Camaçari foi diversificada, tendo sido encontrados  
360 espécimes de interesse epidemiológico, com grande predomínio de *Lutzomyia*  
361 *longipalpis*. Foi adicionalmente demonstrado para um dos bairros de Camaçari  
362 que há correlação positiva significativa entre a proporção de flebotomíneos e as  
363 variáveis de pluviosidade e umidade relativa do ar. Demonstrando que  
364 flebotomíneos podem ser sensíveis a mudanças nessas variáveis bioclimáticas.  
365 De acordo com as análises moleculares os resultados mostraram a ocorrência  
366 de infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania infantum* em 10 de  
367 78 *pools* avaliados.

368 No município de Camaçari, ao longo das últimas décadas foram se  
369 acumulando danos ambientais ocasionados em sua grande parte pela ocupação  
370 imobiliária, pelas áreas de mineração e indústrias, dando origem a situações  
371 críticas como a degradação da cobertura vegetal (Souza, 2006). Apesar das



372 condições fitogeográficas atuais, os achados entomológicos do nosso estudo  
373 revelaram que a fauna flebotomínica em Camaçari é diversificada em áreas sob  
374 impacto antrópico e possui riqueza considerando a espécie vetora. Resultados  
375 semelhantes têm sido obtidos em outras cidades brasileiras (Andrade-Filho *et*  
376 *al.*, 2001; Silva, *et al.*, 2008)

377 Nesse estudo foi observada predominância de flebotomíneos coletados  
378 na zona urbana orla em comparação com a zona urbana sede do município.  
379 Esse achado demonstra que existe um perfil distinto de dispersão e proporção  
380 desses dípteros, de acordo com o tipo de ambiente investigado. Nossos dados  
381 estão de acordo com Teodoro e colaboradores, (1993) e Saraiva e colaboradores  
382 (2011) que apontam que o perfil de distribuição das espécies de flebotomíneos  
383 pode variar consideravelmente de acordo com a área investigada.

384 As altas proporções de flebotomíneos evidenciados em nosso estudo  
385 sobretudo no peridomicílio dos bairros pertencentes a zona urbana orla,  
386 provavelmente contribuem para o crescimento da transmissão da LV nesses  
387 locais. Similarmente, outros autores relataram resultados semelhantes em outras  
388 localidades (Barros 1985; Forantine 1960; 1976; Martins 1978; Rangel 1989,  
389 1990; Tolezano 1989). Nossos dados de distribuição dos flebotomíneos nos  
390 diferentes setores das residências estão de acordo com estudos anteriores que  
391 mostraram alta proporção de flebotomíneos sendo capturados no peridomicílio  
392 das residências (Resende *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2012;  
393 Rangel *et al.*, 2012).

394 A *Lutzomyia longipalpis*, representou à única espécie considerada vetora  
395 da LV contida na fauna flebotomínica do município de Camaçari. O encontro  
396 dessa espécie em alta proporção no nosso estudo (98,4%), está de acordo com  
397 inquéritos entomológicos realizados em outras áreas endêmicas estudadas  
398 anteriormente (Souza *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2011; Jeraldo *et al.*, 2012).

399 Em nosso estudo evidenciamos uma grande diversidade e quantidade de  
400 animais no peridomicílio das residências amostradas, sobretudo na região  
401 litorânea. Este achado já foi observado em outros trabalhos na literatura (Barata  
402 *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2012). Durante o período de coleta entomológica  
403 evidenciamos maiores proporções da espécie *Lutzomyia longipalpis* em  
404 galinheiros. Esse achado confirma a importância epidemiológica dos galináceos  
405 em regiões endêmicas para a LV e corrobora estudos anteriores (Rebêlo *et al.*,

406 1999; França-Silva *et al.*, 2003; Mestre *et al.*, 2011). Diversos autores que  
407 avaliaram a preferência alimentar dos flebotomíneos, encontraram maior  
408 destaque para os galináceos servindo como fonte alimentar para o *Lutzomyia*  
409 *longipalpis* (Alexander *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2003; De Oliveira *et al.*, 2008;  
410 Oliveira *et al.*, 2008). Em nosso estudo evidenciamos a presença de várias outras  
411 espécies de animais nas residências amostradas que serviriam como fonte  
412 alimentar para os flebotomíneos. A presença de cães foi verificada em todas as  
413 residências e em grande quantidade nas ruas dos bairros investigados. Vale  
414 salientar ainda que alguns desses animais apresentavam aspectos sugestivos  
415 de calazar. Segundo Teodório e colaboradores, (1993) e Castellón, (1999), a  
416 criação de animais acompanhados de condições de higiene precárias cria um  
417 ambiente favorável à atração dos vetores da leishmaniose visceral.

418 Apesar da predominância de *Lutzomyia longipalpis* dentre os espécimes  
419 coletados, foi capturado em um bairro da zona urbana sede amostras de  
420 *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), que é incriminada como vetora  
421 da leishmaniose tegumentar, veiculando *Leishmania braziliensis* em algumas  
422 regiões do Brasil (Queiroz *et al.*, 1994; Luz *et al.*, 2000). O achado dessa espécie  
423 em nosso estudo deve ser analisado de forma crítica, pois não houve relato de  
424 casos comprovadamente autóctones de leishmaniose tegumentar no município.

425 Diversos autores na literatura apontam a importância do monitoramento  
426 de espécies de flebotomíneos encontradas infectadas naturalmente (Pita-Pereira  
427 *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2009; Saraiva *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2010;  
428 Rosa *et al.*, 2012). O encontro da espécie *Evandromyia (barretomyia) sallesi*,  
429 embora em baixa proporção, merece destaque, pois a mesma já foi verificada  
430 infectada naturalmente por *Leishmania infantum* (Saraiva *et al.*, 2009). Em nosso  
431 estudo, esta espécie representou a segunda maior proporção dentre os  
432 flebotomíneos coletados sugerindo a necessidade de constante monitoramento  
433 desta espécie no município de Camaçari

434 Em nosso estudo, a espécie *Lutzomyia longipalpis* foi encontrada em  
435 todos os meses do ano. Esse achado entomológico já foi verificado em estudos  
436 similares realizados em outros Estados brasileiros que investigaram áreas  
437 distintas dentro dos municípios (Resende *et al.*, 2006; Mestre *et al.*, 2011). Na  
438 Bahia, Sherlock (1997) afirma que apesar da espécie *Lutzomyia longipalpis* ser  
439 abundante em todos os meses do ano, ela é mais abundante nos meses de abril

440 a junho. Meses em que concentra-se o período de chuvas em nossa área de  
441 estudo. Nós avaliamos a influência das variáveis climáticas sobre a população  
442 dos flebotomíneos estratificando o município em zona urbana orla e urbana sede.  
443 Avaliamos também isoladamente a mesma influência nos bairros que se  
444 destacaram pela proporção dos flebotomíneos coletados. Observamos picos de  
445 proporção de flebotomíneos após o período de chuvas na zona urbana orla. Esse  
446 nosso achado está de acordo com estudo de autores que têm afirmado que a  
447 maior proporção de flebotomíneos corresponde a períodos com precipitação  
448 elevada, atingindo valores máximos logo após o fim da estação chuvosa  
449 (Lainson *et al.*, 1983; De Aguiar *et al.*, 1987; Oliveira *et al.*, 2008). Além do mais,  
450 nossos resultados na zona urbana sede e no bairro Parque verde II mostraram  
451 que o vetor *Lutzomyia longipalpis* foi menos abundante durante os períodos mais  
452 secos e mais abundante durante o período chuvoso. Esse achado também foi  
453 verificado por Resende e colaboradores (2006) e diversos outros autores no  
454 Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, que demonstraram a tendência dos  
455 flebotomíneos especialmente da espécie *Lutzomyia longipalpis* de predominar  
456 durante estação chuvosa (Barata *et al.*, 2004; Deane, 1956; Galati *et al.*, 2003,  
457 2006; Margonari *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2003; Rebelo, 2001; Resende *et al.*,  
458 2006; Sherlock e Guitton, 1969).

459 A correlação entre variáveis bioclimáticas umidade e pluviosidade e a  
460 proporção de flebotomíneos capturados observadas neste estudo e em estudos  
461 anteriores reforçam a ideia que esses insetos são sensíveis às variações de  
462 umidade e chuvas. Já a temperatura não foi um fator determinante da proporção  
463 de flebotomíneos, como demonstrado em estudos anteriores (Missawa & Dias,  
464 2007; Dias *et al.*, 2007; Michalsky *et al.*, 2009). Barata e colaboradores, (2004)  
465 mostraram que a umidade e pluviosidade influenciam significativamente a  
466 proporção de flebotomíneos, enquanto a temperatura não teve efeito significativo  
467 sobre a população dos mesmos. É importante salientar que não há uma regra; e  
468 que os dados da literatura não mostram coerência a respeito de quais fatores ou  
469 variáveis que influenciam efetivamente na flutuação da população desses  
470 flebotomíneos (Missawa & Dias, 2007; Dias *et al.*, 2007; Michalsky *et al.*, 2009),  
471 tendo resultados variáveis a depender da região estudada e o padrão de  
472 distribuição de chuvas. É possível que essas discrepâncias dos dados da  
473 literatura, em relação aos fatores climáticos e ambientais que influenciam a

474 distribuição do vetor, estejam relacionadas a variações geográficas entre as  
475 regiões estudadas. Essas observações reforçam a ideia de que o vetor  
476 *Lutzomyia longipalpis* se adapta facilmente em diferentes habitats.

477 Nossas observações de 12 meses da flutuação mensal da população dos  
478 flebotomíneos não foram suficientes para sugerir um período mais favorável do  
479 ano para iniciar as intervenções contra o vetor *Lutzomyia longipalpis*, sendo  
480 necessário um mínimo de 24 meses como é preconizado pelo manual do  
481 programa de controle da leishmaniose visceral. Entretanto, encontramos em  
482 nosso estudo, elevada proporção de flebotomíneos coincidindo com baixos  
483 índices pluviométricos durante os meses de fevereiro, março e abril. A  
484 intervenção para o controle desses insetos nesse período impediria a  
485 reprodução dos adultos e a conseqüente elevação dos índices de transmissão  
486 nos meses pós-chuva. No entanto, há necessidade de dados mais concretos  
487 obtidos a partir de capturas de flebotomíneos por um período mais prolongado e  
488 em maior número de áreas no município de Camaçari, para ter-se um panorama  
489 mais amplo dos fatores climáticos que podem influenciar na distribuição e  
490 proporção dos flebotomíneos nessa área endêmica. Assim, o Serviço Municipal  
491 de Controle de Zoonoses (CCZ) poderia otimizar os recursos, priorizando as  
492 áreas e o período mais indicado para um controle mais eficaz de LV.

493 Nossos resultados referentes às análises moleculares, apontaram  
494 infecção em 10 dos 78 *pools* de flebotomíneos correspondentes a espécie  
495 *Lutzomyia longipalpis*, sendo a taxa de infecção natural de 1,46%. Esse achado  
496 está de acordo com os dados da literatura em outras áreas endêmicas (Miranda  
497 *et al.*, 2002; Missawa *et al.*, 2010; Paiva *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2010; Pita-  
498 Pereira *et al.*, 2011). Geralmente, estas taxas nos focos endêmicos na América  
499 Latina variam entre 0,2% a 10% sendo que este número contrasta com a alta  
500 incidência da doença nestas regiões (Rodriguez *et al.*, 1999b; Miranda *et al.*,  
501 2002; Oliveira-Pereira, Rebêlo, Morais *et al.*, 2006; Paiva *et al.*, 2006; Carvalho  
502 *et al.*, 2008; Pita-Pereira *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008).

503 A infecção natural em nosso estudo esteve concentrada em apenas dois  
504 bairros. No bairro de Monte Gordo, onde os exemplares de 9 “pools” infectados  
505 foram capturados, que apresenta o maior número de casos da doença canina e  
506 humana do município, e demonstrou ser também a localidade com maior  
507 proporção de flebotomíneos coletados no estudo. Já o bairro Parque Verde II

508 onde os exemplares de 1 “pool” infectado foram capturados, representa o bairro  
509 periférico com maior proporção de flebotomíneos coletada dentre àqueles da  
510 zona urbana sede e onde vêm sendo notificados casos de LVH.

511 Em conjunto, esses dados sugerem que a alta ocorrência nesses bairros,  
512 de flebotomíneos com evidência de infecção natural tem provável correlação  
513 com a alta prevalência de LVC e aparecimento de casos de LV.

514 O encontro da infecção natural do vetor *Lutzomyia longipalpis* evidenciado  
515 em nosso estudo, sobretudo no bairro de Monte Gordo, demonstra a importância  
516 de intervenções para a minimização das notificações de LV canina e humana na  
517 faixa litorânea do município. Já no bairro Parque Verde II esse achado demonstra  
518 a adaptação do vetor ao ambiente modificado pelo homem e a possível  
519 emergência de urbanização da transmissão da LV em bairros mais centralizados  
520 do município de Camaçari.

521 Em suma, o encontro da espécie *Lutzomyia longipalpis* durante todos  
522 os meses do estudo e a verificação da infecção natural por *Leishmania infantum*  
523 indica a urgência de uma vigilância entomológica rigorosa e de ações que visem  
524 diminuir o ambiente propício de contato dos flebotomíneos, haja vista o  
525 predomínio desse vetor nos ambientes peridomésticos.

526

527

528

529 Tabela 1 - Número total de espécimes de flebotomíneos identificados e distribuídos de acordo  
530 com os bairros onde foram capturadas nas zonas urbana orla e urbana sede do município de  
531 Camaçari-BA.

532

533 Tabela 2 - número total de flebotomíneos coletados mensalmente entre dezembro de 2011 à  
534 julho de 2012 distribuídos pelos bairros da zona urbana orla e zona urbana sede do município  
535 de Camaçari-BA.

536

537 Tabela 3 - Distribuição dos flebotomíneos capturados segundo a espécie e o setor da residência  
538 investigado pela exposição das armadilhas, entre o período de dezembro de 2011 a novembro  
539 de 2012 no município de Camaçari-BA.

540

541 Tabela 4 - coeficientes de correlação de spearman obtidos da correlação entre a proporção de  
542 flebotomíneos e as variáveis bioclimáticas (temperatura, pluviosidade e umidade relativa do ar)  
543 entre dezembro de 2011 a novembro de 2012, no município de Camaçari-BA.

544

545 Tabela 5 - Distribuição dos *pools* de *Lutzomyia longipalpis* positivos por bairros e meses de coleta  
546 entomológica no município de Camaçari – BA

547

548 Figura 1- Avaliação da influência da pluviosidade sobre a variável dependente proporção mensal  
549 de flebotomíneos na zona urbana sede

550

551 Figura 2 - Avaliação da influência da pluviosidade sobre a variável dependente proporção mensal  
552 de flebotomíneos no bairro Parque Verde II

553

554 Figura 3 - Avaliação da influência da umidade relativa do ar sobre a variável dependente  
555 proporção mensal de flebotomíneos no bairro Parque Verde II

556

## 557 5. Referências

558

559 1. ALEXANDER, B.; DE CARVALHO, R. L.; MCCALLUM, H.; PEREIRA, M. H.;  
560 MORRISON, A. C.; FERRO, C.; TESH, R. B. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*)  
561 in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil Host preferences of the sand  
562 fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in  
563 Colombia. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 12, p. 1480-5, Dec Jul 2002.

564

565 2. ANDRADE-FILHO, J. D.; VALENTE, M. B.; ANDRADE, W. A.; BRAZIL, R. G.; FALCÃO,  
566 A. L. Flebotomíneos do Estado de Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). **Revista da**  
567 **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 34(4): 323-329, jul-ago 2001.

568

569 3. BARATA, R. A.; FRANCA-SILVA, J. C.; MAYRINK, W.; SILVA, J. C.; PRATA, A.;  
570 LOROSA, E. S.; FIUZA, J. A.; GONCALVES, C. M.; PAULA, K. M.; DIAS, E. S. [Aspects  
571 of the ecology and behaviour of phlebotomines in endemic area for visceral leishmaniasis  
572 in State of Minas Gerais]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, n. 5, p. 421-5, Sep-Oct 2005.

573

574 4. CABANILLAS, M. R.; CASTELLÓN, E. G. Distribution of sandflies (Diptera:Psychodidae)  
575 on tree-trunks in a non-flooded area of the Ducke Forest Reserve, Manaus, AM, Brazil.  
576 **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94(3), p. 289-96, May-Jun 1999.

577

578 5. CARVALHO, G. M.; ANDRADE FILHO, J. D.; FALCAO, A. L.; ROCHA LIMA, A. C.;  
579 GONTIJO, C. M. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area  
580 of Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 8, n. 3, p. 407-14, Jun 2008.

581

582 6. CARVALHO, G. M. L.; JOSÉ D. ANDRADE FILHO; ALDA L. FALCÃO; ANA C.V.M.  
583 ROCHA LIMA; GONTIJO, A. C. M. F. Naturally Infected *Lutzomyia* Sand Flies in a  
584 *Leishmania*-Endemic Area of Brazil. 2008

585

586 7. CARVALHO, M. R.; VALENÇA, H. F.; DA SILVA, F. J.; DE PITA-PEREIRA, D.; DE  
587 ARAÚJO PEREIRA, T.; BRITTO, C.; BRAZIL, R. P.; FILHO, S. P. B. Natural *Leishmania*  
588 *infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920)  
589 (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in  
590 Pernambuco State, Brazil. **Acta Trop**, v. 116, n. 1, p. 108-110, 2010.

591

592 8. DE AGUIAR, G. M.; VILELA, M. L.; LIMA, R. B.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA,  
593 F. T.; FRAIHA, H. Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis  
594 in the State of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae)

595

596 9. Leishmaniasis in Brazil. XIX: visceral leishmaniasis in the Amazon Region, and the  
597 presence of *Lutzomyia longipalpis* on the Island of Marajo, Para State. **Mem Inst**  
598 **Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 4, p. 583-4, Oct-Dec 1987.

- 599 10. DE OLIVEIRA, A. G.; MARASSA, A. M.; CONSALES, C. A.; DORVAL, M. E.;  
600 FERNANDES, C. E.; DE OLIVEIRA, G. R.; BRAZIL, R. P.; GALATI, E. A.; DIAS FDE, O.;  
601 LOROSA, E. S.; REBELO, J. M.; ALEXANDER, B.; DE CARVALHO, R. L.; MCCALLUM,  
602 H.; PEREIRA, M. H.; MORRISON, A. C.; FERRO, C.; TESH, R. B. Observations on the  
603 feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae:  
604 Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato  
605 Grosso do Sul, Brazil **Acta Trop**, v. 107, n. 3, p. 238-41, 2008.  
606
- 607 11. DIAS, F. O.; LOROSA, E. S.; REBELO, J. M.; ALEXANDER, B.; DE CARVALHO, R. L.;  
608 MCCALLUM, H.; PEREIRA, M. H.; MORRISON, A. C.; FERRO, C.; TESH, R. B. Blood  
609 feeding sources and peridomiciliation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912)  
610 (Psychodidae, Phlebotominae) **Cad Saude Publica**, v. 19, n. 5, p. 1373-80, 2003.  
611
- 612 12. FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; SIQUEIRA, A. M.; MACHADO-COELHO, J. L.  
613 L.; COSTA, C. A.; MAYRINKA, W.; VIEIRA, E. P.; COSTA, J. S.; GENARO, O.;  
614 NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of  
615 Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 111,  
616 p. 161-173, 2003.  
617
- 618 13. JERALDO, V. L. S.; GOES, M. A.; CASANOVA, C.; MELO, C. M.; ARAUJO, E. D.;  
619 BRANDAO FILHO, S. P.; CRUZ, D. E.; PINTO, M. C. Sandfly fauna in an area endemic  
620 for visceral leishmaniasis in Aracaju, State of Sergipe, Northeast Brazil. **Rev Soc Bras**  
621 **Med Trop**, v. 45, n. 3, p. 318-22, Jun 2012.  
622
- 623 14. LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; FRAIHA, H. Leishmaniasis in Brazil. XIX:  
624 visceral leishmaniasis in the Amazon Region, and the presence of *Lutzomyia longipalpis*  
625 on the Island of Marajo, Para State. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 77, n. 3, p. 323-30,  
626 1983.  
627
- 628 15. MACHADO, T. O.; BRAGANCA, M. A.; CARVALHO, M. L.; ANDRADE FILHO, J. D.  
629 Species diversity of sandflies (Diptera: Psychodidae) during different seasons and in  
630 different environments in the district of Taquarucu, state of Tocantins, Brazil. **Mem Inst**  
631 **Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 7, p. 955-9, Nov 2012.  
632
- 633 16. MESTRE, G. L.; RIBEIRO, A. L.; MIYAZAKI, R. D.; RODRIGUES, J. S.; DE ALMEIDA  
634 ADO, B.; SOUSA, V. R.; MISSAWA, N. A. Phlebotomine sand flies and canine infection  
635 in areas of human visceral leishmaniasis, Cuiaba, Mato Grosso. **Rev Bras Parasitol Vet**,  
636 v. 20, n. 3, p. 228-34, Jul-Sep 2011.  
637
- 638 17. MICHALSKY, E. M.; GUEDES KDE, S.; LARA E SILVA FDE, O.; FRANCA-SILVA, J. C.;  
639 DIAS, C. L.; BARATA, R. A.; DIAS, E. S. [Natural infection with *Leishmania infantum*  
640 *chagasi* in *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sandflies captured  
641 in the municipality of Janauba, State of Minas Gerais, Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**,  
642 v. 44, n. 1, p. 58-62, Jan-Feb 2011.  
643
- 644 18. MIRANDA, J. C.; REIS, E.; SCHRIEFER, A.; GONCALVES, M.; REIS, M. G.;  
645 CARVALHO, L.; FERNANDES, O.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Frequency of  
646 infection of *Lutzomyia phlebotomines* with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic  
647 area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. **Mem Inst**  
648 **Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 185-8, Mar 2002.  
649
- 650 19. MISSAWA, N. A.; MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; SANTOS DIAS, E.  
651 *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* (L.) *chagasi* in Varzea Grande,  
652 Mato Grosso State, Brazil, an area of intense transmission of visceral leishmaniasis. **Cad**  
653 **Saude Publica**, v. 26, n. 12, p. 2414-9, Dec 2010.  
654
- 655 20. OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N.; REBÊLO, J. M. M.; MORAIS, J. L. P.; PEREIRA, S. R. F.  
656 Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae,  
657 *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp na Amazônia maranhense. **Revista da Sociedade**  
658 **Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 540-543, 2006.

- 659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718
21. OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A.; FERNANDES, C. E.; DORVAL, M. E.; BRAZIL, R. P. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in endemic area of visceral leishmaniasis, Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Trop**, v. 105, n. 1, p. 55-61, Jan 2008.
  22. OLIVEIRA, D. M.; SARAIVA, E. M.; ISHIKAWA, E. A.; SOUSA, A. A.; SILVA, E. O.; SILVA, I. M. Distribution of phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) across an urban-rural gradient in an area of endemic visceral leishmaniasis in northern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 1039-44, Dec 2011.
  23. OLIVEIRA, E. F.; SILVA, E. A.; FERNANDES, C. E.; PARANHOS FILHO, A. C.; GAMARRA, R. M.; RIBEIRO, A. A.; BRAZIL, R. P.; OLIVEIRA, A. G. Biotic factors and occurrence of *Lutzomyia longipalpis* in endemic area of visceral leishmaniasis, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, p. 396-401, May 2012.
  24. PAIVA, B. R.; OLIVEIRA, A. G.; DORVAL, M. E.; GALATI, E. A.; MALAFRONTTE, R. S. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 126-30, Jul-Aug 2010.
  25. PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F.; NASCIMENTO, J. C.; PIMENTA, P. F.; GALATI, E. A.; JUNIOR, H. F.; MALAFRONTTE, R. S. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Trop**, v. 99, n. 2-3, p. 252-9, Oct 2006.
  26. PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A. B.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. 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 Trop**, v. 107, n. 1, p. 66-69, 2008.
  27. PITA-PEREIRA, D.; SOUZA, G. D.; PEREIRA TDE, A.; ZWETSCH, A.; BRITTO, C.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia* (*Pintomyia*) *fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American cutaneous leishmaniasis: detection of natural infection by *Leishmania* (*Viannia*) DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. **Acta Trop**, v. 120, n. 3, p. 273-5, Dec 2011.
  28. RANGEL, O.; SAMPAIO, S. M.; CIARAVOLO, R. M.; HOLCMAN, M. M. The distribution pattern of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in the peridomiciles of a sector with canine and human visceral leishmaniasis transmission in the municipality of Dracena, Sao Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 163-9, Mar 2012.
  29. REBÊLO, J. M. M.; JACK ANY CARVALHO DE ARAÚJO, M. L.; CARVALHO, V. L. L. B., FRANCINALDO SOARES SILVA E; OLIVEIRA, S. T. D. Flebótomos (Diptera, Phlebotominae) da Ilha de São Luis, zona do Golfão Maranhense, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 247-253, 1999.
  30. RESENDE, M. C.; CAMARGO, M. C.; VIEIRA, J. R.; NOBI, R. C.; PORTO, M. N.; OLIVEIRA, C. D.; PESSANHA, J. E.; CUNHA MDA, C.; BRANDAO, S. T. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 1, p. 51-5, Jan-Feb 2006.
  31. ROCHA, L. S.; FALQUETO, A.; DOS SANTOS, C. B.; FERREIRA, A. L.; DA GRACA, G. C.; GRIMALDI, G., JR.; CUPOLILLO, E. Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 104, n. 7, p. 461-6, Jul 2010.
  32. RODRIGUEZ, N.; AGUILAR, C. M.; BARRIOS, M. A.; BARKER, D. C. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction



- 719 33. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 93, p. 47-9, 1999.  
720
- 721 34. ROSA, J.; PEREIRA, D. P.; BRAZIL, R. P.; FILHO, J. D.; SALOMON, O.; SZELAG, E.  
722 Natural infection of *cortelezzii* complex (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) with  
723 *Leishmania braziliensis* in Chaco, Argentina. **Acta Trop**, v. 123, n. 2, p. 128-31, Aug  
724 2012.  
725
- 726 35. SARAIVA, L.; ANDRADE FILHO, J. D.; FALCAO, A. L.; DE CARVALHO, D. A.; DE  
727 SOUZA, C. M.; FREITAS, C. R.; GOMES LOPES, C. R.; MORENO, E. C.; MELO, M. N.;  
728 FERNANDEZ-BELLON, H.; SOLANO-GALLEGO, L.; BARDAGI, M.; ALBEROLA, J.;  
729 RAMIS, A.; FERRER, L. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district  
730 of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: characterization of favored  
731 locations as determined by spatial analysis Immune response to *Leishmania infantum* in  
732 healthy horses in Spain. **Acta Trop**, v. 117, n. 2, p. 137-45, 2011.  
733
- 734 36. SARAIVA, L.; GUSTAVO M. L. CARVALHO; CELIA M. F. GONTIJO; PATRÍCIA F.  
735 QUARESMA; ANA C.V.M.R. LIMA; ALDA L. FALCAO; FILHO, J. D. A. Natural  
736 Infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by  
737 *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **Entomological Society of America**, 2009 2009.  
738
- 739 37. SILVA, A. M.; CAMARGO, N. J.; SANTOS, D. R.; MASSAFERA, R.; FERREIRA, A. C.;  
740 POSTAI, C.; CRISTÓVÃO, E. C.; KONOLSAISEN, J. F.; JÚNIOR, A. B.; PERINAZO, R.;  
741 TEODORO, U.; GALATI, E. A. Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos  
742 (Diptera: Psychodidae) no Paraná. **Neotrop Entomol**, v. 37, p. 209-225, 2008.  
743
- 744 38. SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; DIAS, E. S.; BARROS, J. C.; BRAZUNA, J. C. Detection  
745 of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul,  
746 Brazil. **Exp Parasitol** v. 119, p. 343-8, 2008.  
747
- 748 39. SOUZA, C. M.; PESSANHA, J. E.; BARATA, R. A.; MONTEIRO, E. M.; COSTA, D. C.;  
749 DIAS, E. S. Study on Phlebotomine Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Fauna in  
750 Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**  
751 v. Vol. 99(8), p. 795-803, December 2004.  
752
- 753 41. SOUZA, J. G. Camaçari, as Duas Faces da Moeda: Crescimento Econômico X  
754 Desenvolvimento Social. v. Salvador/BA, 2006.  
755
- 756 42. TEODORO, U.; FILHO, V. L. S.; LIMA, D. M.; SPINOSA, R. P.; BARBOSA, O. C.;  
757 FERREIRA, M. E. C.; ; LONARDONI, M. V. C. Observações sobre o comportamento de  
758 flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de  
759 leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil  
760 **Revista de Saúde pública**, v. 27, p. 242-249, 1993.  
761

762

Tabela 1

763

Nº de pontos de coleta	Flebotomíneos coletados na Zona Urbana Orla						Total de flebotomos (%)	Flebotomíneos coletados na Zona Urbana Sede										Total de flebotomos (%)	Total (%) de flebotomos (Geral)						
	6		4		2			2		2		2		2		2									
Bairros	Monte Gordo		Barra de Jacuipé		Areia		N	N	Pq Real Serra Verde		Verde Horizonte		Nova Vitória		Parque Verde II		Phoc III		JJardim Limoeiro		N	N			
Espécies identificadas	♂	♀	♂	♀	♂	♀			(%)	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂			♀	(%)	(%)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	3189	810	403	79	526	78	5085	95,60	19	3	1	1	2	-	95	13	1	-	11	4	150	2,8	5235	98,42	
<i>Evandromyia sallesi</i>	-	-	-	-	3	8	11	0,21	-	-	1	1	2	29	-	-	-	-	-	-	-	33	0,6	44	0,81
<i>Evandromyia evandroi</i>	5	11	-	-	-	1	17	0,32	-	-	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-	4	0,1	21	0,42	
<i>Nyssomyia whitmani</i>	-	-	-	-	-	1	1	0,02	-	-	-	-	-	-	3	5	-	-	-	1	9	0,2	10	0,22	
<i>Pressatia choti</i>	1	1	-	-	-	-	2	0,04	-	-	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	3	0,1	5	0,14	
(Serie cortellezzi)	4	-	-	-	-	-	4	0,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0	4	0,08	
Total	3199	822	403	79	529	88	5120	95,8,27	19	3	5	2	6	29	100	18	1	-	11	5	199	3,8	5319	100	

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773

774

775

776  
777  
778

Tabela 2

Período do estudo	Flebotomíneos coletados na Zona Urbana Orla)								Flebotomíneos coletados na Zona Urbana Sede										Total de flebotomos (%)		Total (%) de flebotomos (Geral)				
	Monte Gordo		Barra de Jacuipe		Areias		N	N (%)	Parque Real Serra Verde		Jardim Limoeiro		Verde Horizonte		Nova Vitória		Parque Verde II						Phoc III		
	♂	♀	♂	♀	♂	♀			♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	N	(%)	N	(%)	
2011	DEZ	177	46	-	-	7	4	234	4,07	1	-	-	-	-	-	2	-	18	5	-	-	26	0,45	260	4,53
	JAN	246	56	4	1	31	8	346	6,02	9	1	-	2	-	-	-	-	1	-	-	-	13	0,23	359	6,25
	FEV	347	85	96	16	32	10	586	10,20	-	1	-	-	1	2	-	1	5	2	-	-	12	0,21	598	10,41
	MAR	272	81	35	4	72	14	478	8,32	-	-	3	3	-	-	1	1	3	3	-	-	14	0,24	492	8,56
	ABR	265	100	81	21	56	13	536	9,33	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	0,17	546	9,50
2012	MAI	167	90	67	24	82	13	443	7,71	-	-	-	1	1	-	4	17	69	6	1	-	99	1,72	542	9,43
	JUN	230	93	7	1	24	4	359	6,25	-	-	6	-	-	-	-	-	3	3	-	-	12	0,21	371	6,46
	JUL	207	85	45	13	24	2	376	6,54	-	1	1	-	-	1	4	9	7	3	-	-	26	0,45	402	7,00
	AGO	449	43	17	4	19	7	539	9,38	4	1	-	1	-	-	-	-	2	-	-	-	8	0,09	547	9,52
	SET	708	279	16	4	74	23	1104	19,22	-	-	-	-	-	-	1	-	2	1	-	-	4	0,08	1108	19,29
	OUT	154	97	19	9	67	14	360	6,27	4	-	2	-	-	-	1	-	1	-	-	-	8	0,09	368	6,41
NOV	39	10	22	8	57	11	147	2,56	2	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	5	0,09	152	2,65	
Total		3261	1065	409	105	545	123	5508	95,87	20	16	12	7	2	3	13	29	111	23	1	-	237	4,12	5745	100
%		75,20		8,95		11,63				0,63		0,33		0,09		0,73		2,33		0,02					

779

780

781

Tabela 3

782

Espécies identificadas	Intradomicílio		Peridomicílio		Total	%
	♂	♀	♂	♀		
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	256	58	3990	931	5235	98,4
<i>Evandromyia sallesi</i>	2	1	1	40	44	0,81
<i>Evandromyia evandroi</i>	4	7	5	5	21	0,42
<i>Nyssomyia whitmani</i>	2	-	1	7	10	0,22
<i>Pressatia choti</i>	1	-	3	1	5	0,14
<i>Serie cortelessi</i>	-	-	4	-	4	0,08
Sub -Total (%)	265 (4,97)	66 (1,24)	4004 (75,2)	984 (18,5)	5319	(100)
Total / (%)	331 / (6,2)		4988 / (93,8)			

Tabela 4

Variáveis	ZUO		ZUS		Pq. Verde		M.Gordo		B. Jacuípe		Areias	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Fleb X Pluv	-0,09	0,77	<b>0,66</b>	<b>0,02*</b>	<b>0,67</b>	<b>0,01*</b>	-0,17	0,58	0,06	0,85	0,08	0,7
Fleb X Umid	-0,24	0,38	-0,45	0,13	<b>0,58</b>	<b>0,04*</b>	-0,25	0,41	-0,08	0,78	-0,33	0,23
Fleb X Temp	0,04	0,89	-0,34	0,26	-0,24	0,44	0,19	0,52	0,09	0,66	0,15	0,61

Tabela 5

Período estudo	Monte Gordo		Barra de Jacuípe		Parque verde II		Total de pools	Total pools positivos	TMI(%)	
	Pools	Pools positivos	Pools	Pools positivos	Pools	Pools positivos				
2011	DEZ	3	2	-	-	-	3	2	0,29	
	JAN	4	-	-	-	-	4	-	-	
	FEV	5	2	-	-	-	5	2	0,29	
	MAR	4	-	2	-	1	1	7	1	0,14
2012	ABR	5	-	1	-	1	-	7	-	-
	MAI	5	3	1	-	-	-	6	3	0,43
	JUN	6	-	-	-	-	-	6	-	-
	JUL	1	-	-	-	-	-	1	-	-
	AGO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SET	25	2	-	-	1	-	26	2	0,29
	OUT	10	-	1	-	1	-	12	-	-
	NOV	-	-	-	-	1	-	1	-	-
Total	68	9	5	-	5	1	78	10	1,46	

Figura 1

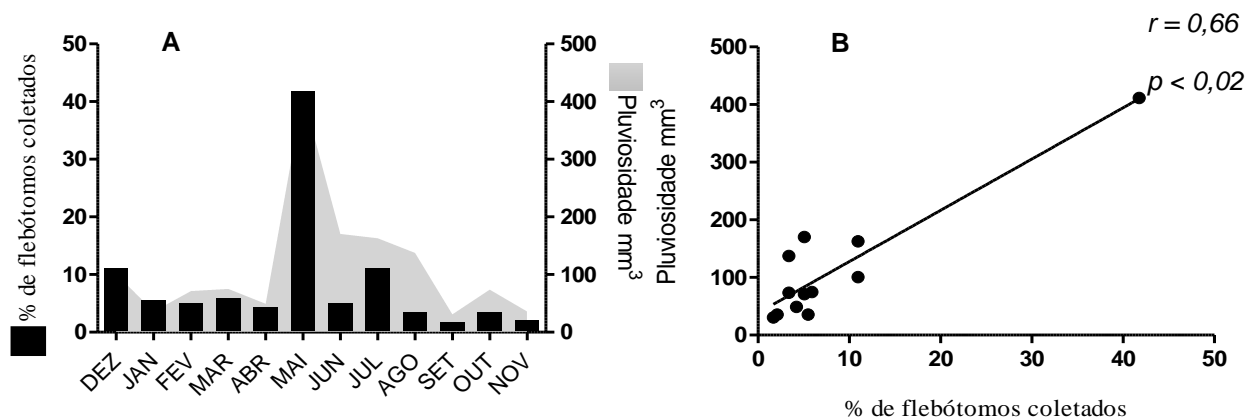


Figura 2

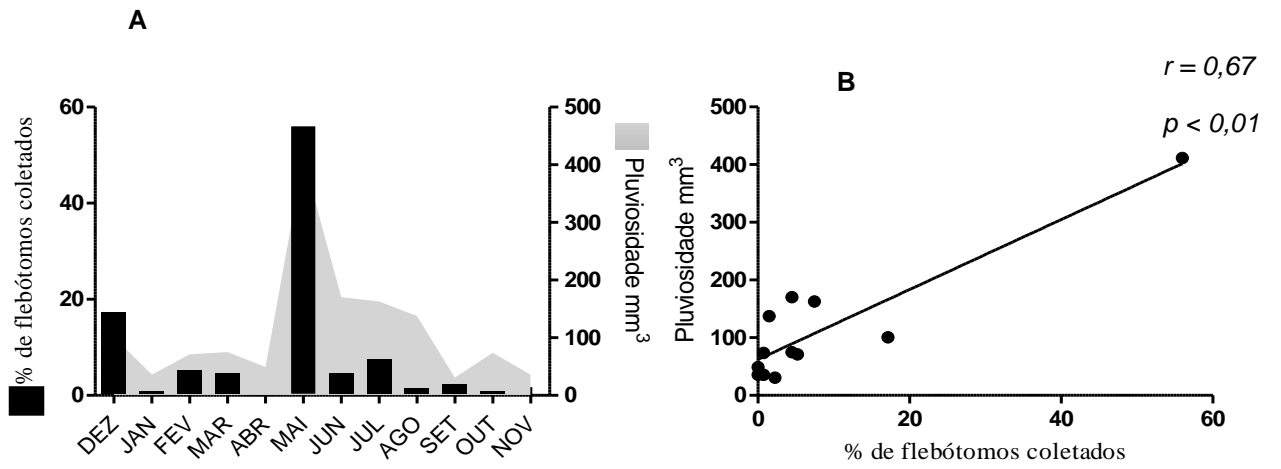


Figura 3

