

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM SAÚDE PÚBLICA

Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso Guimarães

Avaliação da infecção natural de flebotomíneos (Diptera:
Psychodidae) por *Leishmania* spp. no Município de São
Vicente Férrer, Pernambuco

RECIFE
2011

Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso Guimarães

Avaliação da infecção natural de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania* spp. no Município de São Vicente Férrer, Pernambuco

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Sinval Pinto Brandão Filho

Co-orientador: Eduardo Henrique Gomes Rodrigues

Recife

2011

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

G963a Guimarães, Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso.
Avaliação da infecção natural de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania* spp. no Município de São Vicente Férrer, Pernambuco / Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso Guimarães. - Recife: s.n, 2011.
79 p. : ilus., tab.

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

Orientador: Sinval Pinto Brandão Filho; co-orientador: Eduardo Henrique Gomes Rodrigues.

1. Leishmaniose - epidemiologia. 2. *Leishmania* – parasitologia. 3. *Phlebotomus* - parasitologia. 4. Vetores de doenças. 5. Reação em cadeia da polimerase. I. Brandão Filho, Sinval Pinto. II. Rodrigues, Eduardo Henrique Gomes. III. Título.

CDU 616.993.161

Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso Guimarães

**Avaliação da infecção natural de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania*
spp. no Município de São Vicente Férrer, Pernambuco**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sinval Pinto Brandão Filho

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dr. Fábio Lopes de Melo

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dra. Maria de Fátima Freire de Melo Ximenes

Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

A minha querida mãe Auxiliadora, espelho para construção de minha vida.

Ao meu esposo Washington e ao meu filho Caio, que são a minha força.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a realização de mais uma conquista.

À minha família, alicerce de minha vida, por todo amor, força e incentivo.

Ao Dr. Sinval P. Brandão Filho, meu orientador, por me permitir entrar no “mundo” dos flebotomíneos e pela confiança demonstrada desde a iniciação científica.

Ao Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues, meu co-orientador, pelos ensinamentos e estímulo, imprescindíveis para conclusão deste trabalho.

À Dra. Milena de Paiva Cavalcanti, pelo exemplo profissional, pela simplicidade e por estar sempre disposta a ajudar.

À Dra. Maria Edileuza F. de Brito, pelas importantes considerações e disposição em ajudar.

À Dra. Sílvia Carvalho, pela amizade e troca de experiências e ideias durante todo o trabalho.

A Pietra Lemos Costa e Fernando José da Silva, pela amizade, paciência e incansável disposição durante o trabalho de campo.

A Kyldman Thais, Kamila Gaudêncio, Isabele Freitas e Ana Waléria, pela amizade, pelo apoio nos momentos mais difíceis e pela alegria, que deixou tudo mais fácil.

Aos demais colegas do grupo leishmanioses: Júnior, Fábria, Suênia, Edeneide e Éricka que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos Srs. Assis Nunes e Hailton Santos pela presteza na sala de identificação e no NA3.

Aos colegas de turma do mestrado, pela amizade e convívio durante o curso.

Ao grupo “Chagas”, pelo apoio e convivência saudável no dia a dia no laboratório de Imunoparasitologia.

A George Diniz, pela análise estatística.

Aos moradores de Mundo Novo, por permitirem a realização deste estudo e pela receptividade durante o trabalho de campo.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz) por disponibilizar a infra-estrutura necessária para o desenvolvimento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada”.

Albert Einstein

GUIMARÃES, Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso. Avaliação da infecção natural de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania* spp. no Município de São Vicente Férrer, Pernambuco. 2011. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

RESUMO

Nas últimas décadas, tem se observado uma considerável expansão geográfica das leishmanioses em todas as regiões do Brasil. Em Pernambuco, São Vicente Férrer localizado na Zona da Mata Norte do Estado, se destaca pela ocorrência de ambas as formas da doença. De 1999 a 2010 foram registrados 157 casos autóctones de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e 15 de leishmaniose visceral americana (LVA). Este estudo objetivou avaliar a infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp. As capturas foram realizadas no período entre setembro de 2009 e setembro de 2010, com armadilhas luminosas tipo CDC, entre 18:00h e 6:00h, durante quatro noites consecutivas de cada mês, dispostas em diferentes ecótopos: no intradomicílio, peridomicílio e resquícios de mata primária. Adicionalmente, foram realizadas capturas com capturador manual de Castro com o auxílio da armadilha de Shannon. Os espécimes capturados foram identificados de acordo com a classificação proposta por Young & Duncan (1994). Foram formados grupos contendo 10 fêmeas separadas por espécie, para extração e detecção de DNA do parasito através de dois sistemas de PCR, sendo um específico para o complexo *Leishmania braziliensis* (subgênero *Viannia*) e o outro para complexo *donovani* (*Leishmania infantum*). Foram capturados 13.872 flebotomíneos pertencentes a 20 espécies. *L. migonei* foi a espécie mais abundante, com 9.964 exemplares (71%) da fauna, a qual estava presente em todos os ecótopos investigados, com predominância no intradomicílio e peridomicílio. Nos resquícios de mata, as espécies mais frequentes foram *L. complexa* (65%) e *L. sordellii* (20,8%). As taxas de infecção natural encontradas foram: *L. migonei* (2,1%), *L. complexa* (0,5%), *L. sordellii* (5,1%) e *L. walkeri* (50%), sendo todas para a *Leishmania* (*Viannia*) spp. Os dados demonstram uma importante circulação deste parasito em São Vicente Férrer, inclusive em espécies que nunca foram encontrados naturalmente infectados por *Leishmania*, como *L. sordellii* e *L. walkeri*, revelando a necessidade de estudos que esclareçam o real papel destas espécies na epidemiologia da LTA. A infecção natural de *L. migonei*, aliada à significativa taxa de infecção obtida e à sua predominância na área de estudo, sugere a participação desta espécie no ciclo zoonótico da LTA. A infecção natural de *L. complexa* reforça a hipótese da participação da espécie no ciclo enzoótico da LTA na Zona da Mata Norte de Pernambuco.

Palavras chave: 1. Leishmaniose - epidemiologia. 2. *Leishmania* – parasitologia. 3. *Phlebotomus* - parasitologia. 4. Vetores de doenças. 5. Reação em cadeia da polimerase.

GUIMARÃES, Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso. Avaliação de natural infection of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) with *Leishmania* spp. in São Vicente Férrer municipality, Pernambuco. 2011. Dissertation (Academic Master's Degree in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

ABSTRACT

In the latest decades, has been observed a considerable geographic distribution of leishmaniasis in all regions of Brazil. São Vicente Ferrer, located in the northern Zona da Mata of Pernambuco State, is distinguished for occurrence of both manifestations of the disease. From 1999 to 2010, 157 autochthonous cases of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) and 15 of American Visceral Leishmaniasis (VL) have been registered. The objective of this study was to evaluate the phlebotominae natural infection by *Leishmania* spp. The collected were carried from September 2009 to September 2010 with Centers for Disease Control and Prevention (CDC) light traps, from 6:00 pm to 6:00 am, during four successive nights distributed inside houses, peridomicile areas and forest patches. Additionally, were carried collections with Castro catcher and through Shannon trap. The specimens were identified according the classification proposed by Young & Duncan (1994). Pools containing 10 females separated by species were submitted to DNA extraction and detection of parasite by two different systems of PCR, one specific for the *Leishmania braziliensis* complex (subgenus *Viannia*) and other for *donovani* complex (*Leishmania infantum*). A total of 13.872 sand flies belonging the twenty species were captured, with predominance of *L. migonei*, which presented 9,964 specimens (71%), being founded in all investigated ecotopes, with predominance inside houses and peridomicile areas. In the forest patches, the species more frequent were *L. complexa* (65%) and *L. sordellii* (20,8%). The rates of natural infection by *Leishmania* (*Viannia*) spp. were: *L. migonei* (2,1%), *L. complexa* (0,5%), *L. sordellii* (5,1%) and *L. walkeri* (50%). This study evidence the important circulation of the parasite in São Vicente Férrer Municipality, including in species that were never founded naturally infected by *Leishmania*, such as *L. sordellii* and *L. walkeri*, revealing the need of more studies that can elucidate the real role of these species in the LTA epidemiology. The natural infection of *L. migonei*, associated to the significant infection rate that was obtained and its predominance in the study area, suggest its participation in the LTA zoonotic cycle. The natural infection of *L. complexa* strengthens the hypothesis of the participation of this specie in the LTA enzootic cycle at Zona da Mata Norte of Pernambuco State.

Keywords: 1. Leishmaniasis - epidemiology. 2. *Leishmania* – parasitology. 3. *Phlebotomus* - parasitology. 4. Vectors of diseases. 5. Polymerase chain reaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Distribuição dos casos das leishmanioses no mundo.	16
Figura 2-	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	24
Gráfico 1-	Distribuição dos casos de LTA notificados no Brasil por região, durante o período de 2001 a 2010.	25
Gráfico 2-	Casos notificados de LVA por região, durante o período de 2000 a 2008.	27
Figura 3-	Localização da área de estudo no Estado de Pernambuco.	35
Figura 4-	Domicílio na localidade de Mundo Novo, Município de São Vicente Férrer, Pernambuco.	36
Figura 5-	Resquícios de mata primária na localidade de Mundo Novo, Município de São Vicente, Férrer, Pernambuco.	36
Figura 6-	Mapa dos pontos de captura de flebotomíneos por ecótopo.	37
Figura 7-	Armadilha luminosa CDC.	38
Figura 8-	Distribuição das armadilhas CDC nos diferentes ecótopos.	38
Figura 9-	Captura com armadilha de Shannon.	39
Gráfico 3-	Percentual de flebotomíneos capturados mensalmente na localidade de Mundo Novo, Município de São Vicente Férrer, no período de setembro de 2009 a setembro de 2010.	47
Gráfico 4-	Percentual de flebotomíneos capturados mensalmente na localidade de mundo Novo, Município de São Vicente Férrer, em comparação com os parâmetros climáticos de temperatura e pluviosidade, no período de setembro de 2009 a setembro de 2010.	48
Figura 10-	Correlação entre o total de flebtomíneos capturados, a temperatura e a	48

pluviosidade.

- Figura 11- Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando bandas específicas para *Leishmania (Viannia) spp.* limite de detecção de 10fg de DNA padrão. 50
- Figura 12- Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídeo, mostrando bandas específicas para *Leishmania infantum* com limite de detecção de 1fg de DNA padrão. 50
- Figura 13- Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produto de PCR de amostras de *Lutzomyia migonei* amplificado a partir de iniciadores específicos para o complexo *braziliensis* (subgênero *Viannia*). 51
- Figura 14- Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídeo das amostras de DNA de flebotomíneos submetidos à amplificação a partir de iniciadores específicos para o complexo *donovani (Leishmania infantum)*. 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Distribuição por sexo do total de espécies de flebotomíneos capturados em Mundo Novo, Município de São Vicente Férrer, no período de setembro de 2009 a setembro de 2010.	45
Tabela 2-	Espécies de flebotomíneos capturadas nos diferentes ecótopos na localidade de Mundo Novo, Município de São Vicente Férrer, no período de setembro de 2009 a setembro de 2010.	46
Tabela 3-	Espécies de flebotomíneos dissecadas por ecótopos na localidade de Mundo Novo, Município de São Vicente Férrer, no período de setembro de 2009 a setembro de 2010.	49
Tabela 4-	Total de grupos de flebotomíneos separados por espécie e ecótopo avaliados pela PCR na localidade de Mundo Novo, Município de São Vicente Férrer.	51
Tabela 5-	Taxas de infecção natural por espécie de flebotomíneos capturados na localidade de Mundo Novo, Município de São Vicente Férrer.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucléico)
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate (Desoxirribonucleotídeo trifosfatado)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HCl	Ácido Clorídrico
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITEP	Instituto de Tecnologia de Pernambuco
KCl	Cloreto de Potássio
kDNA	Kinetoplastic Deoxyribonucleic Acid (DNA do cinetoplasto)
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MP	Matriz peritrófica
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pb	Pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
SINAN	Sistema de Informação Nacional de Agravos de Notificação
TE	Tampão Tris EDTA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Aspectos gerais das leishmanioses	15
1.2 Aspectos históricos	17
1.3 Etiologia	18
1.4 Hospedeiros reservatórios	19
1.5 Flebotómíneos como vetores da leishmanioses	20
1.6 Características clínicas	22
1.7 Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	23
1.8 Epidemiologia das leishmanioses no Brasil e em Pernambuco	24
1.9 Diagnóstico de infecção natural de flebotómíneos por <i>Leishmania</i> spp.	28
1.10 Estratégias de controle	29
2 JUSTIFICATIVA	31
3 PERGUNTA CONDUTORA	32
4 OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo Geral	33
4.2 Objetivos Específicos	33
5 MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 Desenho do estudo	34
5.2 Área de estudo	34
5.3 Captura dos flebotómíneos	35
5.4 Processamento e acondicionamento dos flebotómíneos capturados	39
5.5 Pesquisa de infecção natural de flebotómíneos por <i>Leishmania</i> spp.	40
5.5.1 <u>Dissecção</u>	40
5.5.2 <u>Extração e purificação de DNA</u>	40
5.5.3 <u>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</u>	41
5.5.4 <u>Análise dos produtos da PCR</u>	42
5.6 Taxa de infecção natural	42
5.7 Dados meteorológicos	42
5.8 Análise estatística	43
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	44

7 RESULTADOS	45
7.1 Captura de flebotomíneos	45
7.2 Infecção natural de flebotomíneos por <i>Leishmania</i> spp.	49
7.2.1 Dissecção	49
7.2.2 Detecção molecular utilizando PCR	49
8 DISCUSSÃO	53
9 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO A – Autorização para atividades com finalidade científica	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). Nas Américas, são transmitidas entre os animais e o homem pela picada das fêmeas de diversas espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (MARZOCHI, 1992; SHAW et al., 1987; YOUNG; DUNCAN, 1994).

No Novo Mundo, apresentam-se sob duas formas clínicas distintas: a leishmaniose tegumentar americana (LTA), que acomete pele e mucosas, e a leishmaniose visceral americana (LVA), que causa comprometimento de órgãos internos, especialmente o fígado e o baço. A importância das leishmanioses reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas graves, com altas taxas de mortalidade nos casos não tratados de LVA e alta morbidade nos casos de LTA, que podem causar desde infecções inaparentes, oligossitomáticas até lesões destrutivas e desfigurantes, constituindo-se em um importante problema de saúde pública (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MARZOCHI, 1992).

No Brasil, os principais agentes etiológicos da LTA e LVA são, respectivamente, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum* (sinonímia de *Leishmania chagasi*). Várias espécies de flebotomíneos têm sido incriminadas na transmissão da LTA, incluindo *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia migonei*, *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia complexa* (MARCONDES, 2001). Com relação à LVA, a principal espécie associada à transmissão é *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON; RANGEL, 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que as leishmanioses ocorram em 88 países de quatro continentes, sendo distribuídas em 16 países desenvolvidos e 72 países em desenvolvimento (DUJARDIN, 2006), com cerca de 12 milhões de pessoas infectadas, 350 milhões expostas ao risco de infecção, e aproximadamente, dois milhões de novos casos por ano com 59 mil óbitos. Encontram-se, inclusive, entre as endemias consideradas prioritárias no mundo (Figura 1) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011).

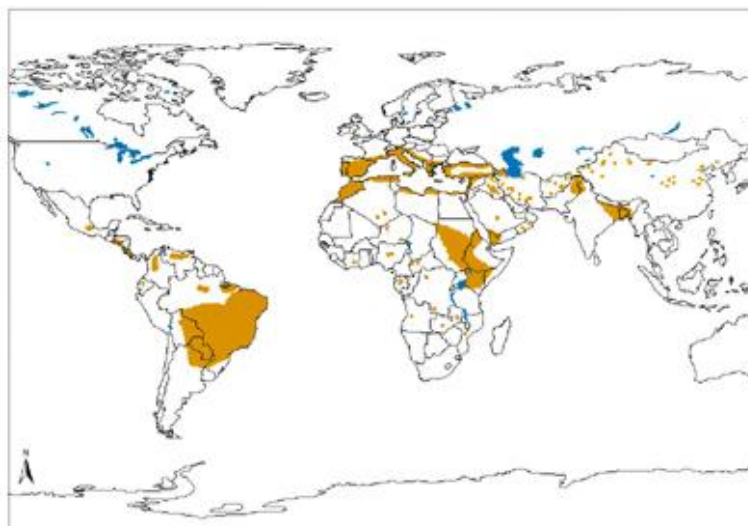


Figura 1- Distribuição dos casos das leishmanioses no mundo.

Nota: ■ Casos de leishmaniose tegumentar

■ Casos de leishmaniose visceral

Fonte: Organização Mundial de Saúde (2011).

Nas últimas décadas, tem se observado uma considerável expansão geográfica das leishmanioses em todas as regiões do Brasil, de maneira que ocorrem em praticamente todos os Estados, sendo a média anual de 35 mil novos casos de LTA e quatro mil de LVA, revelando modificações nos seus perfis epidemiológicos. Este processo vem sendo relacionado a questões ambientais e sociais, incluindo o desflorestamento e a urbanização (ASHFORD, 2000; DESJEUX, 2004).

A ocorrência da LTA era intimamente relacionada aos ambientes silvestres com áreas de vegetação primária (LAINSON, 1988). Mudanças ambientais decorrentes da ocupação de áreas florestais permitiram o estabelecimento de um duplo perfil epidemiológico, expresso pela manutenção de áreas de colonização antiga e o surgimento de novos focos (LAINSON; SHAW, 1998).

A LVA, inicialmente, era considerada uma doença de ambientes rurais, de transmissão peridomiciliar (DEANE; DEANE, 1955). Atualmente, o acelerado processo de urbanização, associada à vulnerabilidade social e a persistência de condições inadequadas de vida, propiciam a elevada frequência de casos em áreas urbanas em diversas regiões do país (COSTA et al., 1990; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006a; LUZ et al., 2001; SILVA et al., 2001), sendo evidente a correlação entre a condição socioeconômica da população e a doença (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; DESJEUX, 2004).

O contínuo crescimento antrópico vivenciado nas áreas urbanas nos últimos anos é responsável por apresentar profundas alterações no meio ambiente, revelando expressivas reduções no espaço ecológico do vetor, acompanhado pelo gradativo aumento da população

de baixa renda, onde a falta de saneamento básico e as más condições contribuem, por consequência, para a composição da fauna de flebotomíneos presente em maior densidade e de forma endêmica sob estas condições (TOLEZANO et al., 2001). Além disso, outros fatores devem estar envolvidos, em especial o potencial de transmissão decorrente da densidade vetorial e a taxa de infecção dos vetores, além da vulnerabilidade das pessoas suscetíveis ao desenvolvimento da doença (MARESCA et al., 2009; MONTEIRO et al., 2005).

Estes cenários propiciam a adaptação de vetores a novos ambientes, em associação com os animais domésticos e reservatórios silvestres e sinantrópicos e, conseqüentemente, a conjunção destes fatores contribui para aumentar a distribuição e incidência das leishmanioses no país (COSTA et al., 2007).

1.2 Aspectos históricos

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

No Brasil, a natureza das lesões cutâneas e nasofaríngeas só foi confirmada, em 1909, por Lindenberg, que encontrou formas de *Leishmania*, idênticas à *Leishmania tropica* do Velho Mundo, em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do Estado de São Paulo. Gaspar Vianna, por considerar o parasito diferente da *Leishmania tropica*, o batizou de *Leishmania braziliensis* (SILVEIRA et al., 2002).

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

A primeira observação dos parasitos da forma visceral ocorreu no final do século XIX em 1855 por Cunningham, na Índia. Em 1903, William Leishman identificou formas amastigotas em esfregaços de fragmento de baço de um soldado inglês morto pela febre Dum-Dum, contraída em Calcutá, Índia. Simultaneamente, Charles Donovan estudando este mesmo parasito o descreve como inédito. No entanto, Ross, com base nos achados anteriores, relaciona o “Calazar” ao novo parasito, nomeando-o como *Leishmania donovani*, criando o gênero *Leishmania* (GENARO, 2005).

No Continente Americano, a primeira descrição da LVA foi realizada por Migone, em 1913, quando relatou um caso no Paraguai de paciente proveniente do Estado de Mato Grosso, Brasil, detectando o parasito em sangue periférico (LAINSON; SHAW, 1998). Porém, apenas em 1934, Henrique Penna observou amastigotas de *Leishmania* em cortes histológicos de fígado de pessoas mortas supostamente por febre amarela (LAINSON; RANGEL, 2003; 2005).

1.3 Etiologia

As *Leishmanias* são parasitos digenéticos, que pertencem à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, sendo agrupadas e classificadas em dois subgêneros: (*Leishmania*) (ROSS, 1903) e (*Viannia*) (LAINSON; SHAW, 1987), sendo esta classificação baseada no desenvolvimento do parasito no inseto vetor. As espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* desenvolvem-se na porção média e anterior do intestino do vetor (seção *Suprasyllaria*), já as espécies do subgênero *Viannia*, desenvolvem-se tanto nas partes anterior e média, como também no intestino posterior, na região do piloro (seção *Perisyllaria*).

Apresentam dois estágios no seu ciclo de vida: a forma promastigota com motilidade flagelar, que vive no trato digestivo dos flebotomíneos, e a forma amastigota, não móvel, que resiste dentro de macrófagos de hospedeiros vertebrados (CUPOLILLO et al., 2000; GRIMALDI JR. et al., 1991).

No Velho Mundo cinco espécies são agentes das leishmanioses em humanos: *Leishmania (L.) major*, *Leishmania (L.) tropica*, *Leishmania (L.) aethiopica*, *Leishmania (L.) donovani* e *Leishmania (L.) infantum*, sendo as três primeiras causadoras da leishmaniose cutânea e as duas últimas agentes da forma visceral (ASHFORD; BATES, 1998; SHAW, 2007).

No Novo Mundo, são conhecidas várias espécies patogênicas de *Leishmania*, ocorrendo no Brasil, sete espécies são causadoras da LTA: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (L.) amazonensis* (LAINSON; SHAW, 1998) e *Leishmania (V.) lindenbergi* (SILVEIRA et al., 2002).

Relatos da autoctonia da LTA no Novo Mundo baseiam-se nas observações das faces deformadas dos “huacos”, que são imagens humanas originárias de populações moches dos Andes e Peru (400 a 900 a.C.), e as lesões atuais observadas nos pacientes com leishmaniose mucosa, uma caracterização da existência da doença antes da invasão espanhola (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003; LAINSON; SHAW, 1998).

A origem do agente etiológico da forma visceral no Continente Americano causa opiniões divergentes entre pesquisadores há vários anos. A doença tem sido atribuída por muitos autores a *L. chagasi*, para o agente etiológico da LVA nas Américas, diferenciando-o da *L. infantum*, própria da região mediterrânea (DESJEUX, 1992; LAINSON et al., 1987). Alguns afirmam que *L. infantum* descrita por Nicolle (1908) e *L. chagasi* descrita por Cunha e Chagas (1937) são idênticas e que foram importadas para o continente durante as invasões portuguesas e espanholas (KILLICK-KENDRICK, 1985; RIOUX et al., 1990), outros acreditam que *L. chagasi* já estava presente no Continente Americano antes da colonização Européia (LAINSON; RANGEL, 2005).

Baseados em estudos bioquímicos e moleculares, alguns autores consideram *L. chagasi* e *L. infantum* como espécies indistintas (DANTAS-TORRES, 2006; MAURÍCIO et al., 1999), outros pesquisadores as consideram como subespécies (LAINSON; RANGEL, 2005). Maurício, Stothard e Miles (2000), afirmam que os resultados destes estudos são irrefutáveis e evidenciam que *L. infantum*, e *L. chagasi*, devem ser consideradas sinônimos, tendo prioridade a nomenclatura mais antiga.

1.4 Hospedeiros reservatórios

No Novo Mundo, mais de 40 espécies de mamíferos são conhecidamente hospedeiros de *Leishmania* spp., com diferentes ciclos de transmissão. Pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) são considerados reservatórios da LTA, enquanto que o homem e alguns animais

domésticos como cães e equinos, são considerados hospedeiros acidentais (ASHFORD, 1996; LAINSON; SHAW, 1987).

O real papel dos cães no ciclo de transmissão da LTA permanece incerto. A alta prevalência da infecção destes animais de áreas endêmicas, a relação próxima entre casos humanos e caninos e a identidade de parasitos infectando ambos, sugere o possível envolvimento destes animais como reservatórios (AGUILAR et al., 1989; CASTRO et al., 2007; FALQUETO et al., 1986, 1991). Estas características compartilhadas entre cães e humanos infectados podem implicar que os cães talvez exerçam um papel na transmissão da doença ou que eles são tão susceptíveis a infecção quanto os humanos, sem uma implicação fundamental na transmissão (PADILLA et al., 2002).

Com relação à LVA, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é o principal reservatório urbano de *L. infantum* por viver próximo ao homem, ser atrativo para os flebotomíneos, apresentar taxas de infecção significativas e, em geral, ser infectivo para o vetor (ALENCAR, 1959; MILES et al., 1999). No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) como o principal reservatório do parasito (ALENCAR, 1956; DEANE, 1958). Marsupiais didelfídeos e roedores (*Nectomys squamipes* e *Rattus rattus*) foram encontrados naturalmente infectados no Brasil e na Venezuela (BARATA et al., 2005; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006b; TRAVI et al., 1998), sugerindo o possível envolvimento destes animais no ciclo de transmissão da doença.

1.5 Flebotomíneos como vetores das leishmanioses

Os flebotomíneos são dípteros que pertencem a família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, estão agrupados nos gêneros: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius* no Velho Mundo e *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya*, no Novo Mundo (YOUNG; DUNCAN, 1994). Na subfamília *Phlebotominae*, os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são os que apresentam importância médica, pela ampla distribuição geográfica e pela capacidade de transmitir *Leishmania*.

São conhecidas mais de 800 espécies destes insetos no mundo e estima-se que 81 delas são capazes de transmitir o parasito (KILLICK-KENDRICK, 1990). Algumas espécies além de transmitirem *Leishmania*, são hospedeiras de cerca de 150 microorganismos, como tripanossomatídeos, vírus e bactérias (SHAW et al., 2003).

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, as larvas desenvolvem-se e alimentam-se de matéria orgânica depositada no solo, enquanto os adultos de ambos os sexos, se alimentam de açúcares de plantas. Somente as fêmeas adultas são hematófagas, sendo o alimento importante para maturação dos ovos. Possuem hábitos crepusculares e noturnos para realizar a hematofagia, embora possuam também hábitos matutinos e vespertinos no interior das matas (FORATTINI, 1973).

Quanto à preferência alimentar, algumas espécies são consideradas ecléticas. *L. longipalpis* é o melhor exemplo, pois tem a capacidade de picar o homem, o cão, as aves e outros animais com bastante avidez no mesmo ecótopo. Outras espécies com características alimentares similares são: *L. intermedia*, *L. migonei* e *L. fischeri* que, em ambientes antrópicos, adaptam-se aos abrigos de animais, invadindo os domicílios para sugar o homem (BRAZIL et al., 1991; RANGEL et al., 1986). A preferência alimentar pode variar em diferentes populações de uma mesma espécie. *L. whitmani*, por exemplo, é zoofílica na região amazônica, todavia é antropofílica no Nordeste e Sudeste do país (AZEVEDO; RANGEL, QUEIROZ, 1990; BRAZIL; MORTON; WARD, 1991).

Das 476 espécies de flebotomíneos encontradas nas Américas, aproximadamente 40 estão envolvidas na transmissão das leishmanioses. Destas, algumas são comprovadamente vetoras, baseando-se nas características antropofílicas, na identificação da infecção natural e na distribuição espacial e sazonal em associação com o registro de casos humanos. Outras espécies são incriminadas por evidências epidemiológicas, acrescidas ou não da infecção natural pelos parasitos (KILLICK-KENDRICK, 1990).

Várias espécies de flebotomíneos têm sido incriminadas na transmissão da LTA no Brasil, ressaltando-se como principais transmissores *L. intermedia*, *L. migonei*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. wellcomei*, e *L. flaviscutellata* (RANGEL; LAINSON, 2003). O encontro de infecção natural de *L. neivai* (PITA-PEREIRA et al., 2009) e *L. fischeri* (ROCHA et al., 2010), reforçaram a suspeita de participação destas espécies na veiculação de *Leishmania* (*V. braziliensis*) e, conseqüentemente, da transmissão da LTA.

Com relação à LVA, a principal espécie associada à transmissão no Brasil, é *L. longipalpis*, que apresenta distribuição abrangente e coincidente com os focos da doença, hábito alimentar eclético, antropofílico, e com comprovação de infecção natural e experimental (LAINSON; RANGEL, 2003; 2005). Recentemente, a importância da espécie *L. cruzi* como vetor da leishmaniose visceral foi registrada na região de Corumbá, Mato Grosso do Sul (PITA-PEREIRA et al., 2008; SANTOS et al., 1998, 2003).

O papel vetorial de outras espécies em áreas endêmicas também é discutido, principalmente onde a presença do vetor clássico não é confirmada, como no Rio de Janeiro e em Pernambuco, em que *L. migonei* apresenta evidências como vetor (CARVALHO et al., 2007, 2010; SOUZA et al., 2003), e *L. forattinii* no Mato Grosso do Sul (PITA-PEREIRA et al., 2008), espécie presente em ambiente domiciliar, e que apresenta estreito grau de parentesco com *L. cruzi* e *L. Longipalpis* (GALATI et al., 1997).

A capacidade de um flebotomíneo atuar como um vetor é determinada pelo sucesso do parasito no interior do tubo digestivo do inseto, que depende de sua habilidade em superar as barreiras existentes no intestino médio do flebotomíneo, tais como, resistir à ação de enzimas digestivas, sua capacidade em atravessar a membrana peritrófica, assim como de adesão às células epiteliais do intestino médio. Por outro lado, o desempenho de determinadas espécies de flebotomíneos em relação à sua incriminação como vetor, implica não apenas na sua habilidade de completar a metaciclologênese do parasito, mas também de ser capaz de realizar a sua transmissão (KILLICK-KENDRICK, 1990).

1.6 Características clínicas

As leishmanioses apresentam-se sob formas clínicas distintas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da resposta imunológica do hospedeiro (LAINSON; SHAW, 1998).

A LTA é uma doença de evolução crônica que se manifesta por lesões cutâneas e mucosas, com lesão ocorrendo no local da picada do inseto vetor. As manifestações clínicas são diversas e incluem a forma cutânea localizada, a mais frequente, com lesão única; a disseminada, que se caracteriza pela presença de várias lesões distribuídas em diversas regiões do corpo; a difusa, em que as lesões se apresentam de forma nodular, e a forma mucocutânea em que pode ocorrer à destruição do septo nasal e boca, resultando em deformidades severas (MURRAY, et al., 2005; PERSON; SOUSA, 1996).

A leishmaniose cutânea pode estar associada a qualquer uma das espécies dermatrópicas. Entretanto, enquanto *Leishmania (V.) braziliensis* é conhecida pela sua capacidade de disseminação para mucosas, a *Leishmania (V.) guyanensis* pode gerar lesões cutâneas múltiplas e as infecções por *Leishmania (L.) amazonensis*, podem se caracterizar como difusas ou serem responsáveis por formas mucosas (BARRAL et al., 1991).

A LVA é uma doença considerada severa devido à gravidade das manifestações clínicas e a alta letalidade. O período de incubação da doença pode variar de meses a anos, durante o qual o parasito se dissemina pelo corpo (OLIVA et al., 2006). A forma clássica caracteriza-se por sinais e sintomas de doença crônica persistente, incluindo febre recorrente, fadiga e perda de peso; a invasão das células sanguíneas e do sistema retículo-endotelial acarreta hepatoesplenomegalia e linfadenopatia (CHAPPUIS et al., 2007; MANNA et al., 2006). Porém, o surgimento da doença e sua evolução são consequências de um complexo de interações entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro (MANNA et al., 2006).

1.7 Ciclo biológico de *Leishmania* spp.

Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, a fêmea de flebotomíneo ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas e no tubo digestivo do inseto vetor, os macrófagos se rompem e liberam as amastigotas que, em seguida, se diferenciam em formas promastigotas procíclicas. Com a desintegração da matriz peritrófica (MP), os parasitos aderem-se ao epitélio do intestino posterior ou médio onde continuam a se dividir rapidamente. A MP é uma camada acelular secretada por células que revestem o epitélio intestinal de um grande número de insetos hematófagos. Atribui-se o escape das promastigotas do saco formado pela MP, a quitinases liberadas pelo próprio parasito (SCHLEIN et al., 1990). Tanto o não escape da matriz, quanto a não adesão à parede do epitélio faz com que os parasitos sejam eliminados ao fim da digestão do sangue pelo inseto. Esta adesão das promastigotas ao epitélio do tubo digestivo do flebotomíneo é proporcionada pelo lipofosfoglicano (LPG) (PIMENTA et al., 1994; SACKS et al., 1984; SARAIVA et al., 1995).

As formas promastigotas aderidas sofrem diferenciação (metaciclogênese) que promove uma modificação estrutural no LPG, o que permite aos parasitos se soltarem do epitélio. As promastigotas metacíclicas (infectantes) migram para a região da válvula estomodeal (cárdia) promovendo a destruição da mesma. A destruição da válvula faz com que o inseto ao tentar sugar o sangue de um vertebrado durante a picada, regurgite uma parte do conteúdo intestinal, carreando os parasitos presentes na porção anterior do tubo digestivo infectando o hospedeiro vertebrado (SCHLEIN et al., 1992). No hospedeiro, as formas promastigotas são endocitadas pelos macrófagos e transformam-se nas formas amastigotas,

capazes de multiplicarem-se no meio ácido encontrado no vacúolo digestivo das células fagocitárias (CHANG; BRAY, 1985). As amastigotas se multiplicam por divisão binária, até provocarem o rompimento da célula. Os parasitos livres são então fagocitados por novos macrófagos, e disseminados pelo organismo (ASHFORD, 2000). Dependendo da espécie do parasito envolvido, provocará lesões que caracterizam a leishmaniose tegumentar ou a leishmaniose visceral (Figura 2).

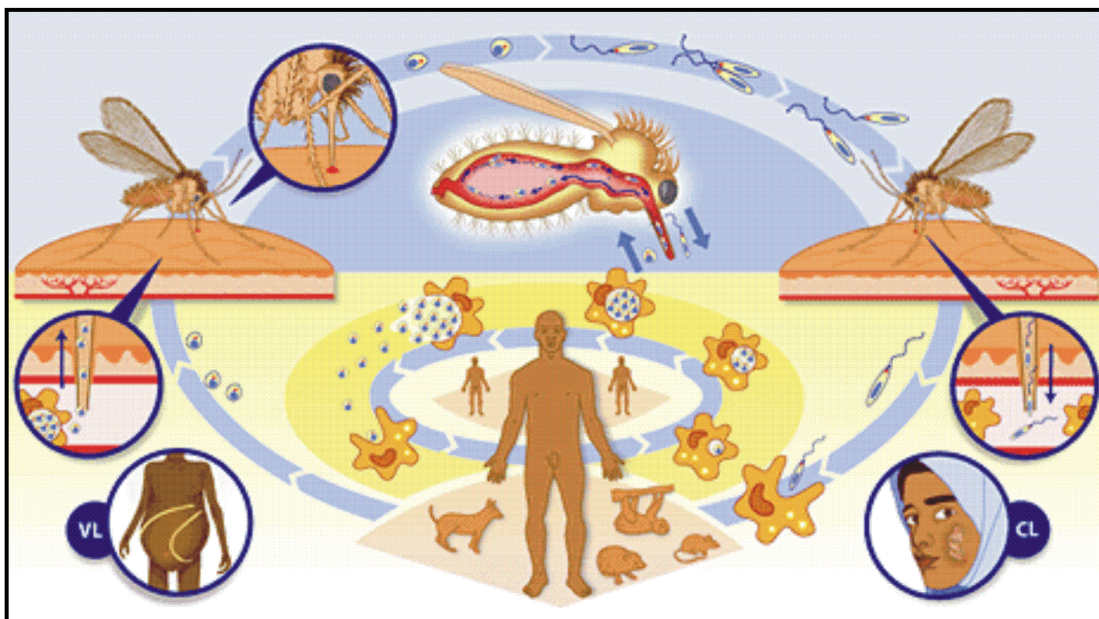


Figura 2- Ciclo biológico de *Leishmania* spp.
Nota: VL- Leishmaniose visceral CL- Leishmaniose tegumentar
Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2010.

1.8 Epidemiologia das leishmanioses no Brasil e em Pernambuco

No Brasil, a LTA apresenta ampla distribuição geográfica com registro de casos em todas as regiões do país com diferentes perfis epidemiológicos. Apesar da subnotificação, no ano de 2008 foram registrados 26 mil novos casos e um coeficiente de detecção médio de 10,5 casos por 100.000 habitantes. Ocorre em ambos os sexos e em todas as faixas etárias, com predominância entre os maiores de 10 anos, representando 90% dos casos e o sexo masculino com prevalência em torno de 73% (LEISHMANIOSE..., 2010).

As regiões Norte e Nordeste concentram mais de 70% do total de casos notificados no Brasil (Gráfico 1).

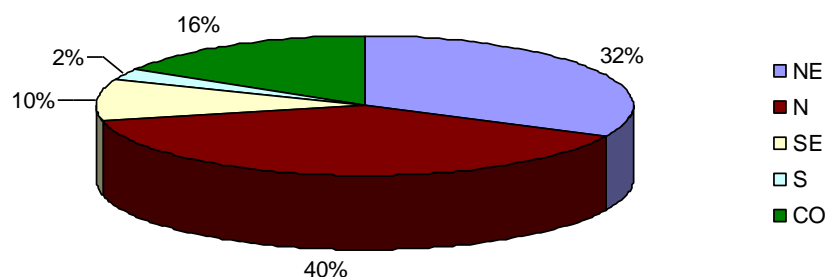


Gráfico 1- Distribuição dos casos de LTA notificados no Brasil por região, durante o período de 2001 a 2010.

Fonte: Sistema de Informação Nacional de Agravos de Notificação (2011).

A incidência da LTA na região Nordeste é verificada tanto nas áreas com resquícios de Mata Atlântica, como em áreas com predominância de mata secundária e diversos tipos de plantações, propícias à colonização dos flebotomíneos e mamíferos silvestres e sinantrópicos, mas também em regiões desmatadas, com adaptação de vetores e reservatórios à ambientes modificados, com transmissão peridomiciliar (MARZOCHI, 1992).

A LTA associada à *Leishmania (V.) braziliensis* apresentou nos últimos anos um processo de expansão em todas as regiões do Brasil, tanto nas áreas endêmicas, como incidência em novas áreas, inclusive na periferia de grandes cidades do país, como Manaus, Rio de Janeiro e Belo Horizonte, constituindo um importante problema de saúde pública (BRANDÃO-FILHO et al., 1994, 1999; GRIMALDI JR; TESH, 1993; MARZOCHI, 1992, MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

No Estado de Pernambuco, a LTA incide em todas as regiões, sendo que 62,4% dos casos humanos ocorrem na Zona da Mata (BRANDÃO-FILHO et al., 1999, 2003). Nos últimos anos, tem se observado uma importante expansão espacial da doença, com o aumento do número de casos nos municípios do Sertão (PERNAMBUCO, 2002).

Estudo relacionado à epidemiologia da LTA no Município de Amaraji, Zona da Mata Sul, incriminou *L. whitmani* como o vetor, devido a sua densidade, antropofilia e adaptação a ambientes antrópicos, além do registro de infecção natural da espécie por *Leishmania (V.) braziliensis*, coincidente com os isolamentos obtidos de lesões de pacientes e de amostras de animais silvestres e sinantrópicos (BRANDÃO-FILHO et al., 2001), sendo esta a principal espécie de *Leishmania* associada à LTA (BRANDÃO-FILHO et al., 1999; 2003; BRITO et al., 2009). Andrade et al. (2005) relataram a ocorrência de surto da doença em centro militar no Município de Paudalho, Zona da Mata Norte do Estado, e sugeriram *L. complexa* como

possível vetor da doença, devido ao encontro de infecção natural da espécie por promastigotas e a sua predominância em resquícios de mata primária, onde eram realizados os treinamentos.

Outro surto foi observado na localidade de três ladeiras, Município de Igarassu, com 32 casos notificados no ano de 2010. Levantamento entomológico realizado na década de 80 já sugeria o risco de infecção para a população devido à maior frequência de *L. whitmani*, representando (98,4%) da fauna (LUCENA, OLIVEIRA, LEAL, 1984).

Recentemente, no Município de Vicência foram registrados 62 casos de LTA (SISTEMA DE INFORMAÇÃO NACIONAL DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2010). Araújo (2010), em estudo na localidade, demonstraram a predominância de *L. whitmani*, espécie amplamente distribuída no país e comprovadamente vetor de *Leishmania (V.) braziliensis*, revelando a necessidade de estudos que esclareçam o papel desta espécie na epidemiologia da LTA neste município.

Com relação à LVA, em 2008 foram registrados casos autóctones em 20 unidades federadas de quatro regiões do Brasil. Apesar de o maior número de casos se concentrarem no nordeste, ao se analisar a série histórica observa-se uma redução dos casos nesta região, que passou de 83% (4.029/4.858) do total de confirmados em 2000, para 45% (1.739/3.852) em 2008. A doença vem se expandindo, de forma gradativa, para as regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste, que passaram de 17% (829/4.858) do total de casos em 2000, para 48% (1.863/3.852) em 2008 (Gráfico 2) (LEISHMANIOSE..., 2010). Apresenta incidência em todas as faixas etárias, acometendo em sua maioria crianças menores de 10 anos, havendo a ocorrência de altas taxas também no grupo de adultos jovens (SILVA et al., 2001).

Fatores como crescimento populacional, desordenado processo de urbanização e o intenso fluxo migratório contribuíram para modificar a propagação da doença, de forma que esta tem sido relatada em importantes centros urbanos (COSTA et al., 1990; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006b; OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2006; SILVA et al., 2001).

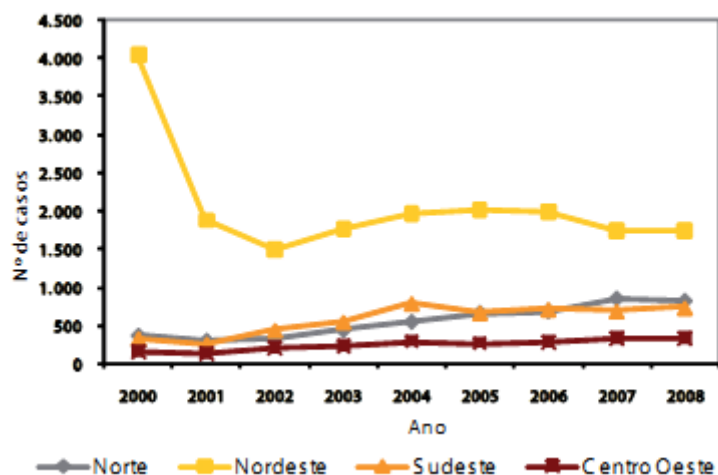


Gráfico 2- Casos notificados de LVA por região, durante o período de 2000 a 2008.
Fonte: Sistema de Informação Nacional de Agravos de Notificação (2010).

A doença tem sido observada no Nordeste do Brasil desde a década de 30 (DEANE; DEANE, 1962), sendo o primeiro relato no Estado de Pernambuco em 1934 com casos humanos esporádicos (ARRUDA et al., 1949). Desde então, houve uma expansão geográfica da LVA no território pernambucano, onde no período entre 1990 e 2001, o número de municípios que haviam notificado um ou mais casos da doença praticamente aumentou cinco vezes, elevando-se de 28 para 144 municípios, de forma que, atualmente a LVA apresenta incidência em todo estado (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006a), inclusive em áreas onde não se verificava notificações de casos autóctones (BRANDÃO-FILHO; SHAW, 1994).

Os casos de LVA em Pernambuco concentram-se nos municípios do Sertão, merecendo destaque Petrolina e Salgueiro. Não menos importantes, Caruaru, Altinho, Surubim, São Caitano e Riacho das Almas, localizados no Agreste do estado, apresentam número significativos de casos, assim como Itamaracá na Região Metropolitana do Recife e Goiana, na Zona da Mata (DANTAS-TORRES; BRANDÃO FILHO, 2005).

O padrão epidemiológico da LVA em Pernambuco possui semelhança com o de outros estados do país, nos quais o aumento da incidência em áreas urbanas está relacionado à pressão antrópica sobre o meio ambiente (AGUIAR et al., 2003; CESSE et al., 2001; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2005; SILVA; VASCONCELOS, 2003), como no município de Petrolina, em que a expansão da LVA está associada ao processo de ruralização das áreas periurbanas (CESSE et al., 2001).

Em Pernambuco, há escassez de trabalhos dedicados ao estudo de *L. longipalpis*, particularmente quanto a sua distribuição geográfica e sazonal. Estudo entomológico realizado no Município de São Vicente Férrer não demonstrou a presença desta espécie. Desta forma, o predomínio de *L. migonei* e sua antropofilia sugeriram sua possível participação no ciclo da LVA (CARVALHO et al., 2007). Além disso, o primeiro achado de infecção natural desta espécie por *Leishmania (L.) infantum* apoiou fortemente a sua identificação como espécie vetor da LVA neste município (CARVALHO et al., 2010).

São Vicente Férrer apresenta incidência de ambas as formas de leishmanioses, inclusive com um importante número de casos de leishmaniose visceral canina (CARVALHO et al., 2007; DANTAS-TORRES et al., 2009; SILVA; BRAGA, 2008). No período entre 1999 e 2010 foram confirmados 157 casos autóctones de LTA e 15 de LVA, sendo seis deles na localidade de Mundo Novo, área selecionada para o estudo.

1.9 Diagnóstico de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp.

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

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

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

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

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

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

1.10 Estratégias de controle

A ocorrência de várias espécies de *Leishmania*, o contínuo aumento das infecções causadas por esses parasitos e as diferentes situações epidemiológicas encontradas, tanto em regiões de colonização recente, quanto antiga, com tendência à urbanização, vem impondo novos desafios para as estratégias de controle das leishmanioses no Brasil (COSTA, 2005).

Atualmente, as estratégias de controle são centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, na redução da população de flebotomíneos, em atividades de educação em saúde e na eutanásia dos cães para LVA, devendo ser estas ações integradas para serem efetivas (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990; EVANS, et al., 1992).

Em virtude das características epidemiológicas peculiares da LTA, as estratégias de controle devem ser flexíveis e distintas, adequadas a cada região ou foco particular. A diversidade de agentes etiológicos, hospedeiros, vetores e de características ecológicas, aliadas ao conhecimento ainda insuficiente sobre vários destes aspectos, evidencia a complexidade do controle (COSTA, 2005; GONTIJO; CARVALHO, 2003; REBÊLO et al., 2006). Estas perspectivas em áreas florestais são ainda mais difíceis, em função da mesma

comportar-se como uma zoonose, sendo o homem apenas hospedeiro acidental. Neste cenário, os conhecimentos da biologia e da preferência alimentar das várias espécies de flebotomíneos podem contribuir para a prevenção da infecção. Outra possibilidade seria o desenvolvimento de vacinas e a utilização dos cuidados de proteção individuais (COSTA, 2005; MARTINS, 2002).

O Ministério da Saúde reconhece que a estratégia de controle da LVA instituída no país ainda é pouco efetiva (BRASIL, 2007), o que pode estar contribuindo para o aumento da importância da LVA como doença parasitária emergente (TESH, 1995). Os principais fatores relacionados ao insucesso das medidas de controle são: a falta de padronização dos métodos de diagnóstico da infecção humana e canina; a discordância entre os estudos que avaliam o impacto da eliminação de cães soropositivos na prevalência da infecção humana; a demonstração de que outros reservatórios podem ser fontes de infecção de *L. infantum*, como os canídeos silvestres e os marsupiais; e a escassez de estudos sobre o impacto das ações de controle dirigidas contra os vetores (COSTA; VIEIRA, 2001; GONTIJO; MELO, 2004).

Nesse contexto, estudos recentes sobre a dinâmica de transmissão da LVA enfatizam duas variáveis a serem consideradas nos programas de controle: a variação sazonal da população de flebotomíneos e o número de cães infectados (MARESCA et al., 2009; MONTEIRO et al., 2005). Dessa forma, o controle do vetor pode então representar uma solução menos onerosa e prática, como uma medida preventiva eficaz para um significativo número de focos de leishmaniose. Portanto, o entendimento das interações entre as mudanças do meio ambiente e o comportamento dos flebotomíneos vetores, constituem um pré-requisito fundamental para o desenvolvimento de ações apropriadas de prevenção e estratégias de controle (GONTIJO; MELO, 2004).

Uma melhor definição das áreas prioritárias de controle da LVA, assim como a implantação de um sistema de monitoramento das atividades dirigidas para o controle e vigilância epidemiológica da doença, permitiria a avaliação dos programas nas diversas regiões do país e, conseqüentemente, atingiria melhores resultados (COSTA; VIEIRA, 2001; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006b).

2 JUSTIFICATIVA

A incidência das leishmanioses tem sido registrada em todas as regiões do Estado de Pernambuco, onde se verifica uma expansão progressiva nos últimos vinte anos. Diante da persistência e do aumento do número de casos, estas zoonoses vem causando um grande impacto na saúde pública. Apesar disso, ainda existem grandes lacunas na epidemiologia destas endemias, como em relação às populações de flebotomíneos e identificação de vetores envolvidos na transmissão. O diagnóstico da infecção natural de flebotomíneos representa um dos critérios para a incriminação de uma espécie como vetor do parasito. No entanto, os métodos clássicos utilizados para este fim, além de serem extremamente laboriosos e exigirem tempo considerável para a confirmação dos resultados, apresentam baixa sensibilidade. Neste sentido, métodos de biologia molecular têm permitido o diagnóstico da infecção natural com maior sensibilidade contribuindo para a melhor compreensão das relações existentes entre os vetores e os parasitos na natureza, uma vez que os registros de infecção natural de flebotomíneos em seus diversos ecótopos ainda são escassos, sugerindo novos estudos para o entendimento da epidemiologia das diferentes formas da doença. Neste cenário, a identificação da infecção natural pode contribuir como um indicador da intensidade da transmissão em áreas endêmicas, associada com a distribuição e abundância dos flebotomíneos envolvidos, permitindo estabelecer medidas de controle mais efetivas para o controle dos vetores.

3 PERGUNTA CONDUTORA

Quais as espécies de flebotomíneos naturalmente infectadas por *Leishmania* ssp. nos ecótopos intradomiciliares, peridomiciliares e silvestres no Município de São Vicente Férrer, Pernambuco?

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a infecção natural de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania* spp. no Município de São Vicente Férrer, Pernambuco.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar as espécies de flebotomíneos envolvidas em área de ocorrência de casos de LTA e LVA;
- b) Verificar a taxa de infecção natural por *Leishmania* spp. em flebotomíneos;
- c) Caracterizar a sazonalidade da fauna de flebotomíneos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Desenho do estudo

Estudo observacional do tipo descritivo como forma de avaliar a infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp. no Município de São Vicente Férrer, Pernambuco.

5.2 Área de estudo

O estudo foi realizado no Município de São Vicente Férrer, situado na Zona da Mata Norte de Pernambuco (Figura 3), limítrofe com a mesorregião Agreste, a 130,5 Km de distância da capital, Recife. O município possui 110.489 Km² e está localizado nas coordenadas geográficas 07°35'28'' S; 35°29'29'' O, a uma altitude de 419m do nível do mar. Limita-se ao norte com o Município de Macaparana, ao sul com Machados, ao leste com Vicência e a oeste com Orobó e o Estado da Paraíba. As vias de acesso são através da BR-232/408; PE-90/089 (AGÊNCIA ESTADUAL DE PLANEJAMENTO E PESQUISAS DE PERNAMBUCO, 2010).

O clima é quente e úmido, com temperatura média de 23°C, sendo a vegetação formada por floresta subcaducifólia. A agricultura é composta predominantemente pelo cultivo da banana, o que lhe tornou conhecido como “terra da banana”. Outras culturas exploradas são a mandioca, fava e cana-de-açúcar. Na pecuária predominam a criação de aves e bovinos, com produção de derivados do leite, ovos e mel de abelha. (AGÊNCIA ESTADUAL DE PLANEJAMENTO E PESQUISAS DE PERNAMBUCO, 2010).

A taxa de urbanização é de 64,9% e a densidade demográfica de 150,22 hab/km², com média de moradores por domicílio de 3,91. A população residente é de 16.598 habitantes, dos quais 10.773 residem na zona urbana e 5.825 na zona rural (IBGE, 2010).

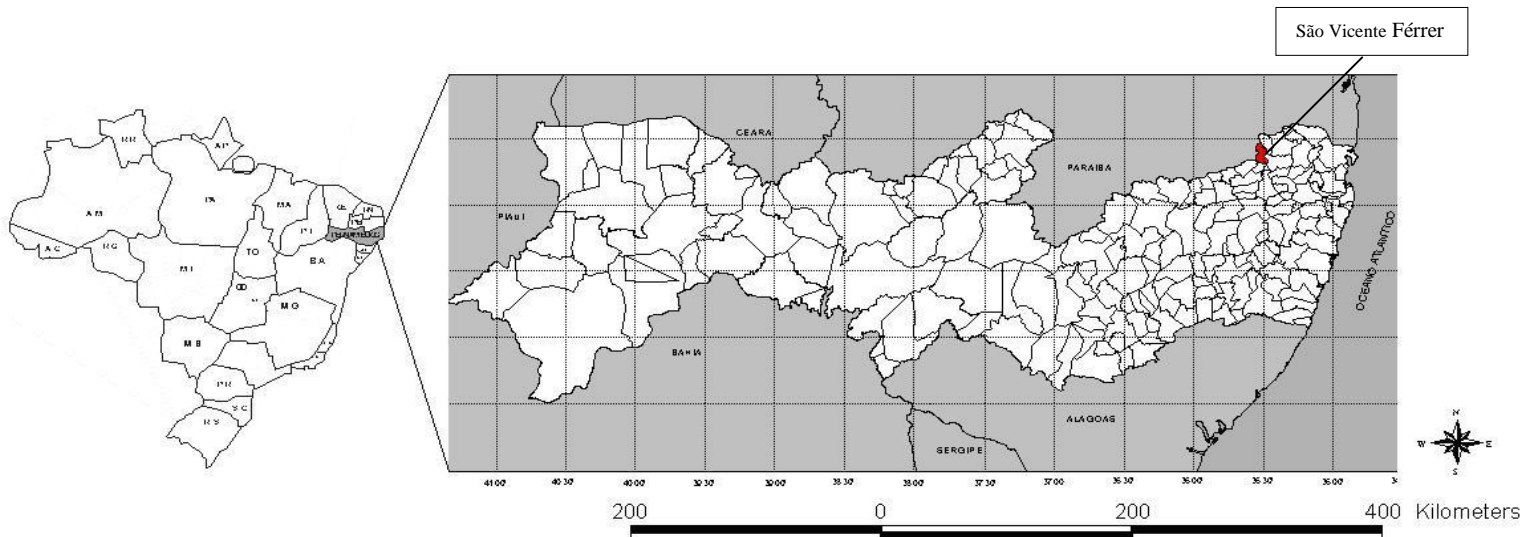


Figura 3- Localização da área de estudo no Estado de Pernambuco.

Fonte: Carvalho (2005).

5.3 Captura dos flebotomíneos

A localidade de Mundo Novo está localizada na zona rural do município e foi selecionada de acordo com a ocorrência de casos humanos de LTA e casos humanos e caninos de LVA. Nesta área, tem ocorrido a substituição da vegetação primária por plantações de banana, sendo observado um perfil favorável à transmissão domiciliar e/ou peridomiciliar, devido à grande proximidade entre os domicílios e anexos aos remanescentes de Mata Atlântica (Figuras 4, 5 e 6).

As coletas foram realizadas com armadilhas luminosas tipo CDC (Figura 7), no período de setembro de 2009 a setembro de 2010, das 18 às 6h, durante quatro noites consecutivas de cada mês. As armadilhas foram dispostas a 1,5m do solo nos seguintes ecótopos (Figura 8):

Ecótopo (E1): galinheiro distante 10 metros da casa 1 e a 153m da mata;

Ecótopo (E2): galinheiro a uma distância de 13m da casa 1 e a 150 m da mata;

Ecótopo (E3): galinheiro a uma distância de 6 metros da casa 2;

Ecótopo (E4): galinheiro a uma distância de 25 metros da casa 2;

Ecótopo (E5): sala da casa 3;

Ecótopo (E6): galinheiro e chiqueiro com cabras a uma distância de 5 metros da casa 3;

Ecótopo (E7): galinheiro a uma distância de 50 metros da casa 4;

Ecótopo (E8): chiqueiro a uma distância de 5 metros da casa 4;

Ecótopo (E9): galinheiro distante 5 metros da casa 5 e a 200m da mata.

Ecótopo (E10): resquícios de Mata Atlântica.



Figura 4- Domicílio na localidade de Mundo Novo, Município de São Vicente Férrer, Pernambuco.

Fonte: Guimarães (2010a).



Figura 5- Resquícios de mata primária na localidade de Mundo Novo, Município de São Vicente, Férrer, Pernambuco.

Fonte: Guimarães (2010b).

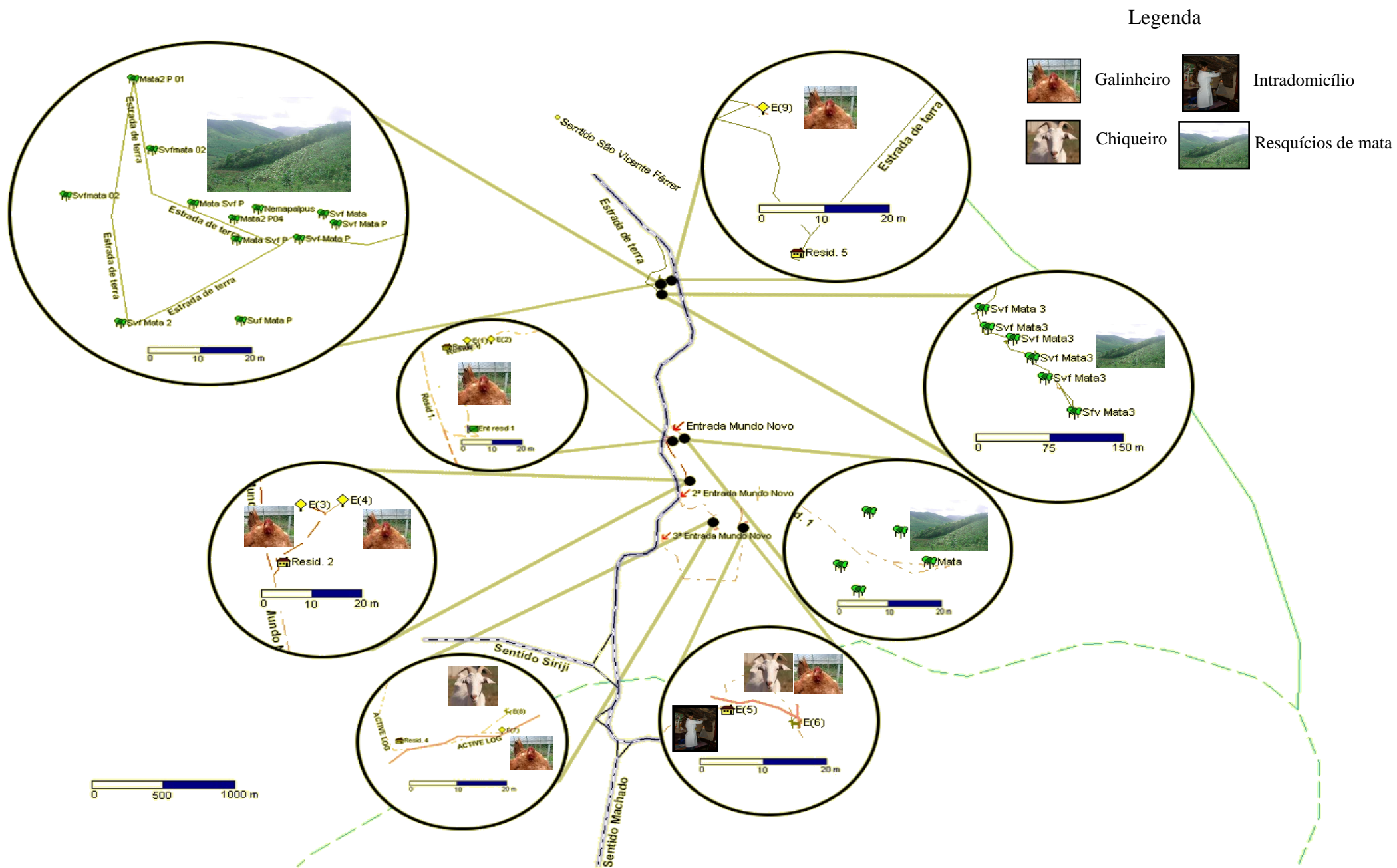


Figura 6- Mapa dos pontos de captura de flebotomíneos por ecótopo.
Fonte: Silva e Matoso (2011).



Figura 7- Armadilha luminosa CDC.
Fonte: Guimarães (2010c).



Figura 8- Distribuição das armadilhas CDC nos diferentes ecótipos.
Fonte: Guimarães (2010d).

Adicionalmente, foram realizadas capturas manuais com capturador de Castro, com auxílio da armadilha de Shannon no horário das 19h às 20h (Figura 9).



Figura 9- Captura com armadilha de Shannon.

Nota: 1. Armadilha de Shannon; 2. Captura manual com capturador de Castro.

Fonte: Guimarães (2010e).

5.4 Processamento e acondicionamento dos flebotomíneos capturados

Todos os espécimes machos coletados foram acondicionados em tubos contendo álcool 70% e transportados para a sala de identificação de flebotomíneos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz) para preparação, montagem e identificação. Inicialmente os insetos foram imersos em solução de hidróxido de potássio a 10% por 3 horas. Em seguida, transferidos para solução de ácido acético a 10% por 20 minutos, seguida por três lavagens de 15 minutos cada em água destilada. Após esta sequência, os insetos foram imersos por 24h no lactofenol, montados entre lâmina e lamínula em solução Berlese e identificados de acordo com a classificação proposta por Young & Duncan (1994).

As fêmeas de flebotomíneos vivas foram dissecadas no laboratório montado no ponto de apoio na área de estudo. Parte das fêmeas foi identificada e formados grupos de 5 ou 10 exemplares separados por espécie e mantidos a -70°C para posterior realização de extração e purificação de DNA. As demais foram preparadas e montadas como os machos para a identificação dos espécimes.

5.5 Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp.

5.5.1 Dissecção

A dissecção foi realizada de acordo com metodologia previamente descrita por Lainson (1997). As fêmeas foram dissecadas em uma gota de solução salina estéril, tratada com antibiótico (200 UI de penicilina e 2,0 mg/mL de estreptomicina) e o tubo digestivo foi separado e examinado entre lâmina e lamínula sob microscopia óptica, aumento de 400x, para verificar a presença de formas flageladas de *Leishmania* spp. A cabeça e os três últimos segmentos do abdômen das fêmeas foram preservados para posterior identificação da espécie.

5.5.2 Extração e purificação de DNA

A extração e purificação de DNA foi realizada com o Kit Illutra™ tissue & cells genomicPrep Mini Spin, com algumas modificações.

Os insetos foram macerados, ainda secos, em tubos de propileno com capacidade para 1,5mL. Em seguida, foi adicionado 1mL de PBS, sendo o macerado centrifugado a 6.000 rpm por 2 minutos. Após descarte do sobrenadante, foram adicionados 100µL de solução de lise tipo 1 às amostras e incubadas a 56°C por 1h. Subsequentemente, foram adicionados 10µL de proteinase K (30mg/mL), seguida de uma segunda incubação a 70°C por 10 minutos, e uma centrifugação a 12.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de mesma capacidade anterior, onde foi adicionado etanol gelado a 100%, num volume igual ao dobro do sobrenadante recuperado. O material foi conservado a -20 °C por um período de 18h. Após este intervalo, o material foi novamente centrifugado a 6.600 rpm por 5 minutos e o precipitado seco em temperatura ambiente e ressuspensão em 50µL de solução de eluição devidamente pré-aquecida a 70°C e estocado a - 20°C. A concentração e o grau de pureza de todas as amostras de DNA foram quantificados através de leitura em espectrofotômetro (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotec).

5.5.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A detecção de DNA foi realizada através da técnica de PCR, utilizando-se como alvo minicírculos do kDNA, a partir de iniciadores específicos para o complexo *Leishmania braziliensis* (subgênero *Viannia*): LEIB1 (5'-GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG-3') e LEIB2 (5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3') (DE BRUIJN; BARKER, 1992).

A PCR foi realizada em um volume final de 25µL contendo Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, gelatina 0,1mg/ml, MgCl₂ 1,5mM, dNTP 0,2mM, 25pmoles de cada um dos iniciadores, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase e 2µL da amostra a ser analisada. O DNA foi submetido à amplificação em um termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf), sendo a programação constituída de 35 ciclos: 94°C (1 min), 65°C (1 min) e 72 (1 min), precedidos de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C.

O outro sistema empregado utiliza como alvo a região conservada do minicírculo do kDNA específico para o complexo donovani (*Leishmania infantum* e *Leishmania donovani*), utilizando os iniciadores específicos Linf1 23F (5'-TCCCAAACCTTTTCTGGTCCT-3') e Linf1 154R (5'-TTACACCAACCCCCAGTTTC-3') (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009).

A PCR foi realizada em um volume final de 25µL de uma solução contendo Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, gelatina 0,1mg/mL, 0,2 mM de cada dNTP, 5 pmoles de cada um dos iniciadores, 2.5U de *Taq* DNA polimerase e 2µL da amostra a ser analisada. A amplificação constituiu-se em 35 ciclos 94°C (30s), 67°C (1 min), 72°C (30s) precedidos de uma desnaturação inicial de 94°C durante 5 minutos.

Em cada reação foi incluído um controle negativo (sem DNA) e controles positivos: DNA purificado da cepa de referência de *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75), cuja concentração foi de 1ng/µL.

5.5.4 Análise dos produtos da PCR

Foram utilizados dez µl dos produtos de PCR para realização da eletroforese em gel de agarose a 1,0% para o alvo de DNA que amplifica um fragmento de 750 pb banda diagnóstica referente à *Leishmania (Viannia) spp.*, e gel de agarose a 1,5% para o alvo de DNA que amplifica um fragmento de 132 pb, cuja banda diagnóstica refere-se à *Leishmania infantum*. Foi utilizado o tampão de corrida TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM) e brometo de etídeo a 10µg/mL como corante. Os produtos amplificados foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados com um sistema de documentação (Gel Logic 100 Imagem System Kodak®).

5.6 Taxa de infecção natural

Considerando o agrupamento de espécimes, a taxa mínima de infecção natural (TMI) foi estimada atribuindo-se o critério de que pelo menos um dos exemplares estava infectado, como descrito por Paiva et al. (2007), que corresponde ao número de grupos positivos (x) 100/ número total de insetos.

5.7 Dados meteorológicos

Os dados climáticos sobre temperatura e índice pluviométrico, referentes ao período de estudo, foram obtidos junto ao Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP).

5.8 Análise estatística

Para a análise comparativa entre flebotomíneos machos e fêmeas e a distribuição nos ecótopos, foi utilizado o teste Qui-quadrado de proporções. Para a comparação das taxas de infecção natural foi utilizado o teste Exato de Fisher.

Para verificar a associação entre os parâmetros climáticos e a curva sazonal de flebotomíneos foram utilizados os coeficientes de Pearson e Spearman.

A análise e o processamento estatístico dos dados obtidos foram realizados através dos Softwares Excel 2000 e o Rv2.10.0. Todas as conclusões foram realizadas numa margem de significância de 5%.

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo possui autorização para captura de flebotomíneos fornecido pelo IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) para o programa intitulado: Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil: incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão (Anexo A).

7 RESULTADOS

7.1 Captura de flebotomíneos

Foi capturado um total de 13.872 flebotomíneos, sendo 7.627 machos (55%) e 6.245 (45%) fêmeas, pertencentes a 20 espécies. A proporção dos machos sobre as fêmeas foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

L. migonei foi a espécie predominante com 71,8% (9.964) espécimes, *L. complexa* com 17,6% (2.447) espécimes e *L. sordellii* com 6,11% (848) foram a segunda e terceira espécies mais abundantes, respectivamente. As demais espécies apresentaram taxa de captura inferior a 1% (Tabela 1).

Tabela 1- Distribuição por sexo do total de espécies de flebotomíneos capturados em Mundo Novo, Município de São Vicente Férrer, no período de setembro de 2009 a setembro de 2010.

Espécies	♀		♂		Total	
	n	%	n	%	n	%
<i>Lutzomyia migonei</i>	3596	57,5	6368	83,5	9964	71,8
<i>Lutzomyia complexa</i>	1742	27,9	705	9,25	2447	17,6
<i>Lutzomyia sordellii</i>	551	8,82	297	3,9	848	6,11
<i>Lutzomyia evandroi</i>	53	0,85	65	0,86	118	0,85
<i>Lutzomyia naftalekatzi</i>	53	0,85	55	0,72	108	0,78
<i>Lutzomyia tupynambai</i>	77	1,23	4	0,05	81	0,59
<i>Lutzomyia shannoni</i>	34	0,54	29	0,39	63	0,45
<i>Lutzomyia capixaba</i>	32	0,51	24	0,31	56	0,4
<i>Lutzomyia walkeri</i>	30	0,48	19	0,25	49	0,35
<i>Lutzomyia ayrozai</i>	28	0,45	16	0,2	44	0,31
<i>Lutzomyia whitmani</i>	11	0,18	22	0,29	33	0,23
<i>Lutzomyia quinquefer</i>	11	0,18	8	0,1	17	0,12
<i>Lutzomyia choti</i>	15	0,24	0	0,00	15	0,1
<i>Lutzomyia furcata</i>	8	0,12	4	0,05	12	0,08
<i>Lutzomyia fischeri</i>	0	0,00	5	0,06	5	0,03
<i>Lutzomyia brasiliensis</i>	2	0,03	3	0,04	5	0,03
<i>Lutzomyia viannamartinsi</i>	1	0,01	2	0,02	3	0,02
<i>Lutzomyia abonnenci</i>	1	0,01	1	0,01	2	0,01
<i>Lutzomyia goiana</i>	1	0,01	0	0,00	1	<0,01
<i>Lutzomyia oswaldoi</i>	1	0,01	0	0,00	1	<0,01
Total	6.245	100	7.627	100	13.872	100

A distribuição das espécies por ecótopos revelou a predominância de flebotomíneos no peridomicílio com 10.057 espécimes (72,5%), seguido dos resquícios de mata com 3.690 (26,6%) e do intradomicílio com 125 espécimes (0,9%), com significância estatística ($p < 0,0001$).

L. migonei apresentou predominância no intradomicílio (86,4%) e nos abrigos de animais no peridomicílio (97%). Nos resquícios de Mata Atlântica, a espécie representou apenas 3% da fauna e foi observada uma importante diversidade de espécies, sendo as mais frequentes *L. complexa* (65%) e *L. sordellii* (20,8%). As demais espécies representaram 14,2% (Tabela 2).

Tabela 2- Espécies de flebotomíneos capturadas nos diferentes ecótopos na localidade de Mundo Novo, Município de São Vicente Férrer, no período de setembro de 2009 a setembro de 2010.

Espécies	Ecótopos					
	Intradomicílio		Peridomicílio		Mata	
	n	%	n	%	n	%
<i>Lutzomyia migonei</i>	108	86,4	9746	97	110	3
<i>Lutzomyia complexa</i>	3	2,4	49	0,48	2395	65
<i>Lutzomyia sordellii</i>	3	2,4	75	0,74	770	20,8
<i>Lutzomyia evandroi</i>	11	8,8	97	0,96	10	0,27
<i>Lutzomyia naftalekatzi</i>	0	0,0	33	0,32	75	2
<i>Lutzomyia tupynambai</i>	0	0,0	1	<0,01	80	2,2
<i>Lutzomyia shannoni</i>	0	0,0	5	0,05	58	1,57
<i>Lutzomyia capixaba</i>	0	0,0	1	<0,01	55	1,5
<i>Lutzomyia walkeri</i>	0	0,0	0	0,00	49	1,32
<i>Lutzomyia ayrozai</i>	0	0,0	0	0,00	44	1,2
<i>Lutzomyia whitmani</i>	0	0,0	33	0,32	0	0,0
<i>Lutzomyia quinquefer</i>	0	0,0	13	0,13	4	0,1
<i>Lutzomyia choti</i>	0	0,0	0	0,00	15	0,4
<i>Lutzomyia furcata</i>	0	0,0	0	0,00	12	0,32
<i>Lutzomyia fischeri</i>	0	0,0	0	0,00	5	0,13
<i>Lutzomyia brasiliensis</i>	0	0,0	4	0,03	1	0,02
<i>Lutzomyia viannamartinsi</i>	0	0,0	0	0,00	3	0,08
<i>Lutzomyia abonnenci</i>	0	0,0	0	0,00	2	0,05
<i>Lutzomyia goiana</i>	0	0,0	0	0,00	1	0,02
<i>Lutzomyia oswaldoi</i>	0	0,0	0	0,00	1	0,02
Total	125	100	10.057	100	3.690	100

Com relação aos flebotomíneos capturados em armadilha de Shannon com auxílio de capturador de Castro, apenas a espécie *L. migonei* foi coletada, num total de 13 fêmeas e 44 machos, em duas capturas realizadas.

Considerando a sazonalidade dos flebotomíneos, observou-se três picos de captura nos meses de fevereiro, maio e setembro de 2010. O padrão da curva sazonal é delineado, majoritariamente por *L. migonei*, única espécie capturada em todos os meses do estudo. Analisando o padrão apresentado pelas espécies *L. complexa* e *L. sordellii*, as mais frequentes nos resquícios de mata, observa-se que a primeira apresentou maior densidade no mês de março/2010, enquanto que a segunda apresentou pico no mês de abril/2010. A densidade destas espécies no decorrer do ano apresentou algumas semelhanças, como nos meses de outubro/2009 e julho/2010, e grande divergência nos meses de janeiro a maio/2010, quando exibiram alternância no pico de densidade de suas populações (Gráfico 3).

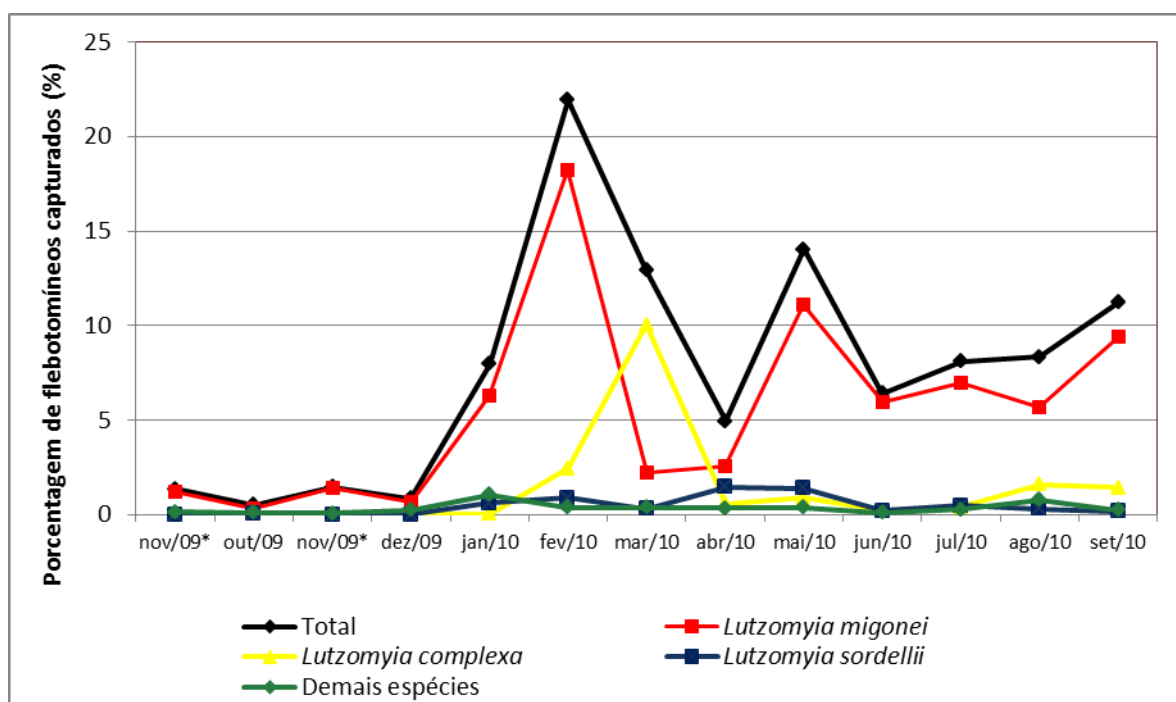


Gráfico 3- Percentual de flebotomíneos capturados mensalmente na localidade de Mundo Novo, Município de São Vicente Férrer, no período de setembro de 2009 a setembro de 2010.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: * Não houve captura na mata

A ocorrência de maior número de flebotomíneos coincidiu com os períodos antes e após as chuvas (Gráfico 4). A densidade populacional das espécies de flebotomíneos foi comparada com os parâmetros climáticos: temperatura média e pluviosidade, que variaram entre 23,3°C e 28,3°C e 6,60mm³ e 417,60mm³, respectivamente. As análises de correlação entre o número total de flebotomíneos capturados, a média de temperatura mensal ($r_{\text{pearson}} = 0,13$; $p = 0,6764$; $\rho_{\text{spearman}} = 0,05$; $p = 0,8775$) e a pluviosidade ($r_{\text{pearson}} = 0,02$; $p = 0,9463$; $\rho_{\text{spearman}} = 0,37$; $p = 0,2166$) não foram estatisticamente significativas (Figura 10).

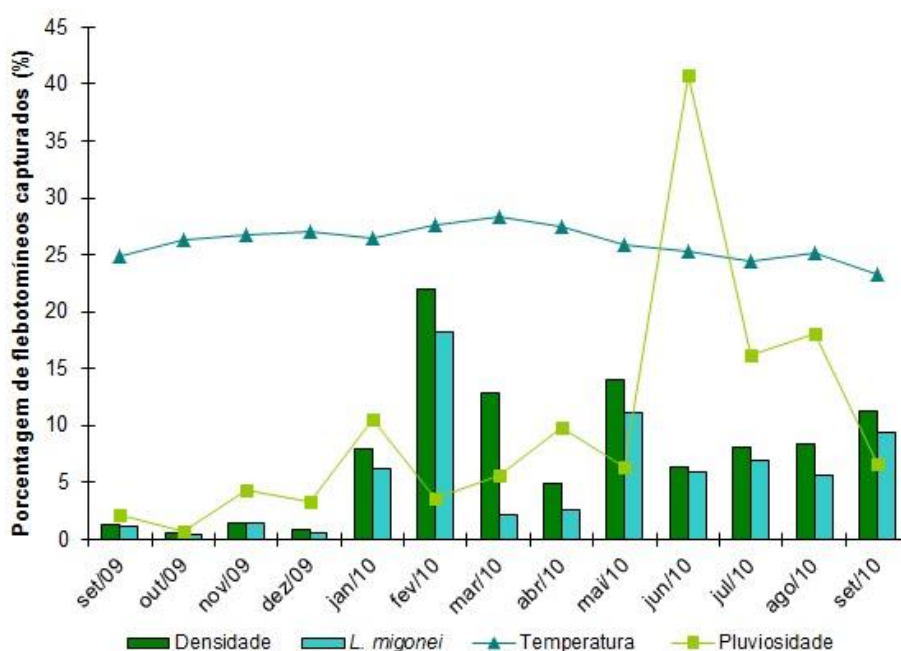


Gráfico 4- Percentual de flebotomíneos capturados mensalmente na localidade de Mundo Novo, Município de São Vicente Férrer, em comparação com os parâmetros climáticos de temperatura e pluviosidade, no período de setembro de 2009 a setembro de 2010.

Fonte: Elaborado pela autora.

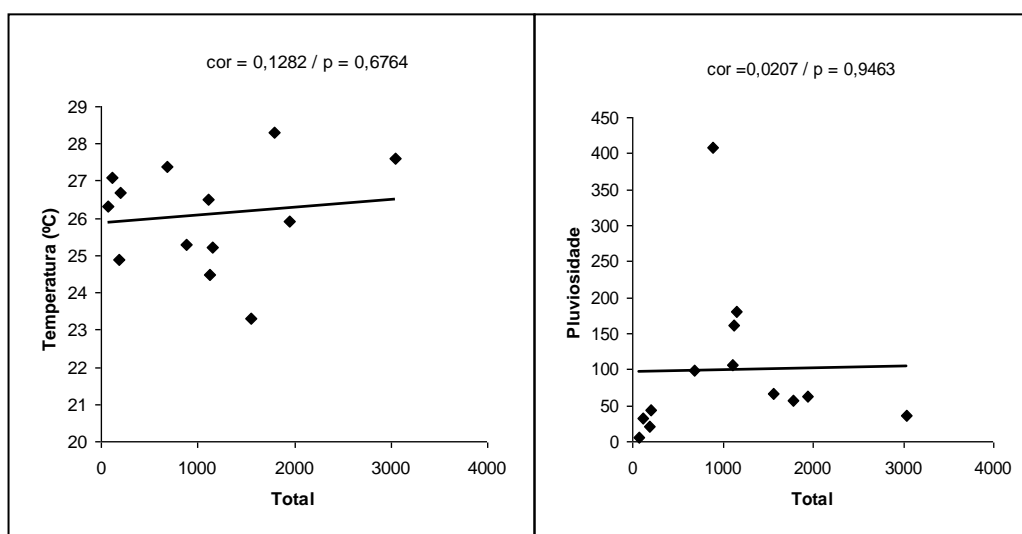


Figura 10- Correlação negativa entre o total de flebotomíneos capturados, a temperatura e a pluviosidade.

Fonte: Guimarães (2011f).

7.2 Infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp.

7.2.1 Dissecção

Foram dissecados 114 espécimes capturados nos diferentes ecótopos e nenhum deles apresentou formas flageladas de *Leishmania* spp (Tabela 3).

Tabela 3- Espécies de flebotomíneos dissecadas por ecótopos na localidade de Mundo Novo, Município de São Vicente Férrer, no período de setembro de 2009 a setembro de 2010.

Espécies	Intradomicílio	Peridomicílio	Mata	Total
<i>Lutzomyia migonei</i>	2	102	1	105
<i>Lutzomyia shannoni</i>	0	2	0	2
<i>Lutzomyia sordellii</i>	0	1	2	3
<i>Lutzomyia naftalekatzi</i>	0	0	1	1
<i>Lutzomyia furcata</i>	0	0	1	1
<i>Lutzomyia tupynambai</i>	0	0	1	1
<i>Lutzomyia brasiliensis</i>	0	1	0	1
Total	2	106	6	114

7.2.2 Detecção molecular utilizando PCR

A avaliação da sensibilidade dos sistemas de PCR revelou limites de detecção para *Leishmania* (*Viannia*) spp. e *Leishmania infantum* de 10fg/ μ L e 1fg/ μ L, respectivamente (Figuras 11 e 12).

Foram analisadas 4.440 fêmeas de flebotomíneos pertencentes a 12 espécies, para detecção do DNA de *Leishmania* por PCR, sendo formados 443 grupos constituídos por 10 exemplares e dois grupos (um de *L. evandroi* e um de *L. sordellii*) com cinco exemplares, correspondendo aos diferentes ecótopos (Tabela 4).

A infecção natural por *Leishmania* (*Viannia*) spp. foi observada em oito grupos, sendo quatro de *L. migonei*, dois de *L. sordellii*, um de *L. complexa* e um de *L. walkeri* (Figura 13). Nenhum grupo apresentou positividade para *Leishmania infantum* (Figura 14).

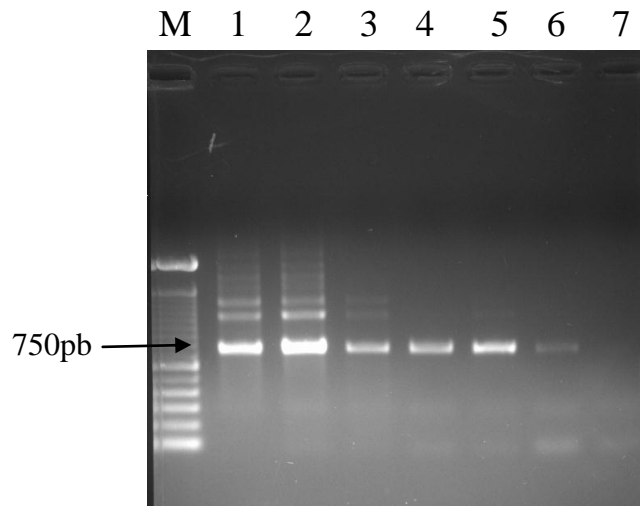


Figura 11- Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando bandas específicas para *Leishmania (V.) braziliensis* com limite de detecção de 10fg de DNA padrão.

Nota: M (Marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb, Invitrogen) (2072, 1500, 600, 100pb), linhas 1 a 7 (concentrações de DNA: 10ng, 100pg, 10 pg, 1 pg, 100fg, 10fg/ μ l).

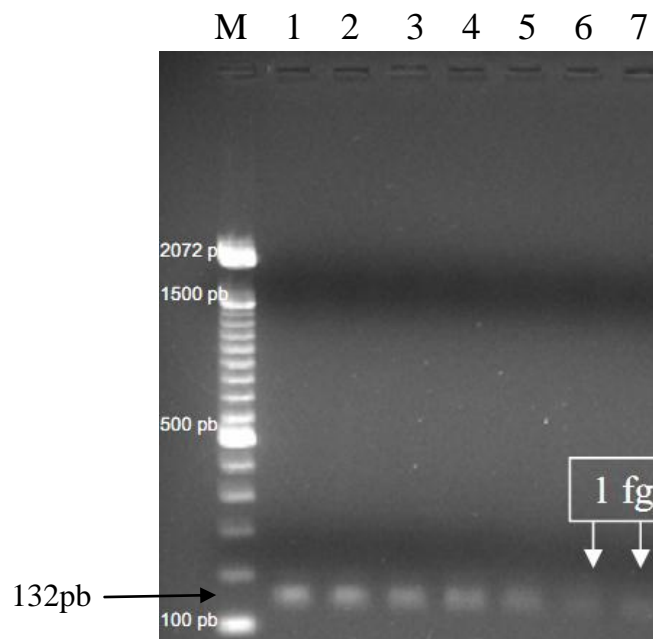
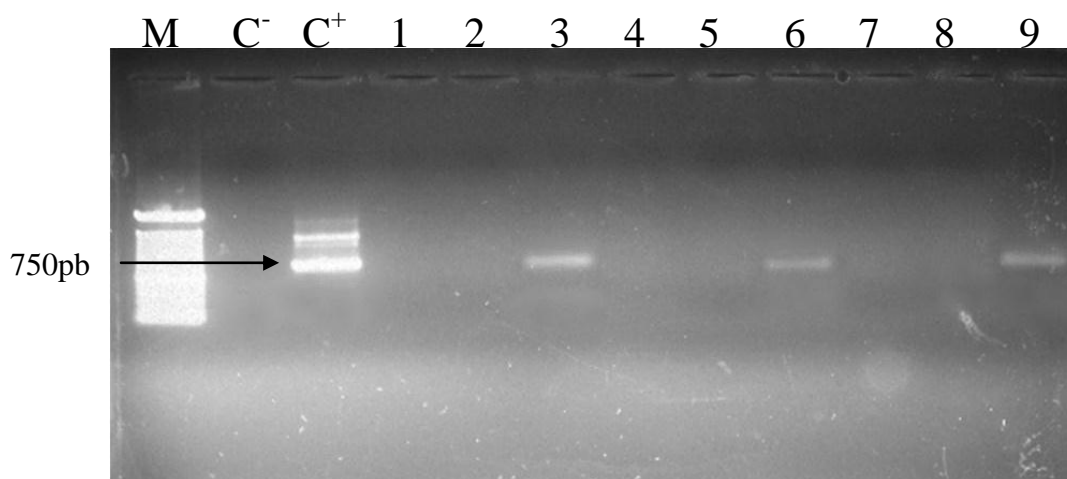


Figura 12- Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídeo, mostrando bandas específicas para *Leishmania infantum* com limite de detecção de 1fg de DNA padrão.

Nota: M (Marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb, Invitrogen) (2072, 1500, 600, 100pb), linhas 1 a 7 (concentrações de DNA: 100pg, 10 pg, 1 pg, 100fg, 10fg e 1fg/ μ l).

Tabela 4- Total de grupos de flebotomíneos separados por espécie e ecótopo avaliados pela PCR na localidade de Mundo Novo, Município de São Vicente Férrer.

Espécies	Ecótopos			Total de grupos avaliados
	Intradomicílio	Peridomicílio	Mata	
<i>Lutzomyia complexa</i>	0	0	204	204
<i>Lutzomyia migonei</i>	4	178	2	184
<i>Lutzomyia sordellii</i>	0	1	37	38
<i>Lutzomyia naftalekatzi</i>	0	0	4	4
<i>Lutzomyia capixaba</i>	0	0	3	3
<i>Lutzomyia tupynambai</i>	0	0	3	3
<i>Lutzomyia evandroi</i>	0	1	1	2
<i>Lutzomyia walkeri</i>	0	0	2	2
<i>Lutzomyia choti</i>	0	0	2	2
<i>Lutzomyia whitmani</i>	0	1	0	1
<i>Lutzomyia shannoni</i>	0	0	1	1
<i>Lutzomyia abonnenci</i>	0	0	1	1
Total	4	181	260	445

**Figura 13-** Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produto de PCR de amostras de *Lutzomyia migonei* amplificado a partir de iniciadores específicos para o complexo *braziliensis* (subgênero *Viannia*).

Nota: M (Marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb, Invitrogen) (2072, 1500, 600, 100pb), controle negativo (C⁻), controle positivo (C⁺ 1ng/μl), amostras de DNA de flebotomíneos positivas (3, 6 e 9). O produto de amplificação do fragmento de 750 pb encontra-se indicado por seta.

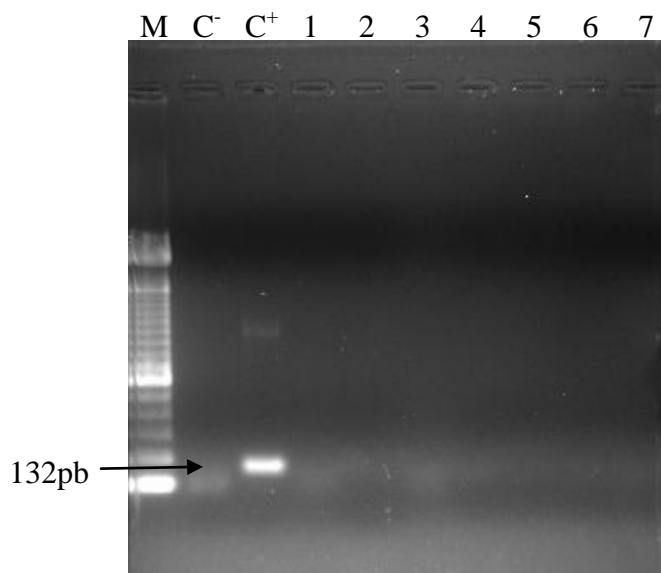


Figura 14- Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídeo das amostras de DNA de flebotomíneos submetidos à amplificação por iniciadores específicos para o complexo *donovani* (*Leishmania infantum*).

Nota: M (marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb, Invitrogen) (2072, 1500, 600, 100pb), controle negativo (C^-), controle positivo (C^+ 1ng/ μ l), amostras de DNA de flebotomíneos negativas (1-7). O produto de amplificação do fragmento de 132 pb encontra-se indicado por seta.

A ocorrência de flebotomíneos infectados concentrou-se em três ecótopos: no galinheiro localizado na casa 2, que apresentou dois grupos de *L. migonei* positivos, no galinheiro localizado na casa 4 também com dois grupos de *L. migonei*, e nos resquícios de mata com dois grupos de *L. sordellii*, um de *L. complexa* e um de *L. walkeri*.

As taxas de infecção natural obtidas foram: *L. migonei* (2,1%), *L. sordellii* (5,2%), *L. complexa* (0,5%) e *L. walkeri* (50%) (Tabela 5). Não houve diferença estatística quando foram comparadas as taxas de infecção entre as espécies *L. migonei* x *L. sordellii* ($p=0,2733$), *L. migonei* x *L. complexa* ($p=0,1946$) e *L. sordellii* x *L. complexa* ($p=0,0651$). Considerando um único flebotomíneo infectado em cada grupo positivo, observou-se uma taxa mínima de infecção natural para a área de estudo de 0,18%.

Tabela 5- Taxas de infecção natural por espécie de flebotomíneo capturados na localidade de Mundo Novo, Município de São Vicente Férrer.

Espécies	Total de grupos avaliados	grupos positivos	Taxa de infecção natural (%)
<i>L. migonei</i>	184	4	2,1
<i>L. sordellii</i>	38	2	5,2
<i>L. complexa</i>	204	1	0,5
<i>L. walkeri</i>	2	1	50

8 DISCUSSÃO

A correta identificação das espécies de vetores que ocorrem em uma área endêmica para leishmanioses, bem como a estimativa das taxas de infecção natural pelas diferentes espécies de *Leishmania*, auxiliam a compreensão da epidemiologia da doença e também na adoção de medidas de prevenção e controle. Neste cenário, estudos têm sido conduzidos em diversas áreas endêmicas através da dissecação de flebotomíneos e identificação do parasito *in situ*, ou através da aplicação de técnicas moleculares para a detecção do DNA de *Leishmania* spp. (CARVALHO et al., 2008; PEREZ et al., 1994; SILVA; GRÜNEWALD, 1999).

Embora a dissecação do tubo digestivo de flebotomíneos seja o método clássico para diagnosticar a infecção natural em áreas endêmicas, o processo é laborioso e requer extrema habilidade técnica. Além disso, em casos onde a presença de parasitos é escassa, este procedimento pode fornecer resultados falso-negativos, revelando taxas de infecção bem mais baixas do que a realidade. Alternativamente, ferramentas moleculares vêm substituindo a dissecação, por permitir a detecção de DNA de um único parasito (PITA-PEREIRA et al., 2005) e representar um método de diagnóstico mais sensível do que a dissecação seguida de microscopia (NASCIMENTO et al., 2007).

Numerosos estudos têm revelado as dificuldades envolvidas na detecção de *Leishmania* através do método de dissecação, mostrando geralmente taxas de infecção abaixo de 1% para distintas áreas endêmicas no Brasil e também em outros países da América do Sul (GALATI et al., 1996; LUZ et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 1999).

Em estudo desenvolvido no Paraná, Neitzke et al. (2008) analisaram 2.487 exemplares e verificaram uma infecção de 0,04% por flagelados através da dissecação. Estudo similar foi realizado por Queiroz et al. (1994) no Ceará, onde foi registrada uma taxa de infecção de 0,42% (44/10.612). Silva e Grünwald (1999) no Rio Grande do Sul encontraram três fêmeas infectadas entre as 920 dissecadas, revelando uma positividade de 0,6%. No presente estudo, não foi encontrada nenhuma forma flagelada nas fêmeas dissecadas, o que é corroborado por outros autores em diferentes áreas de estudo (CASTRO et al., 2005; FEITOSA; CASTELLÓN, 2004; SILVA; GOMES, 2001; SCODRO et al., 2008).

Em Pernambuco, apesar da elevada endemicidade das leishmanioses, estudos sobre a investigação da taxa de infecção de flebotomíneos por *Leishmania* spp. são escassos. O primeiro isolamento e identificação de *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* em flebotomíneos foi realizado por Brandão-Filho et al. (2003) no Município de Amaraji, Zona da Mata Sul, que

encontrou um exemplar de *L. whitmani* infectado de um total de 5.626 dissecados, sendo esta a única espécie incriminada até o momento como vetor da LTA no Estado. Mesmo com o avanço de novos ensaios para a detecção da infecção natural em flebotomíneos, apenas um estudo foi realizado na Zona da Mata Norte de Pernambuco, utilizando a PCR como ferramenta molecular para a busca de flebotomíneos naturalmente infectados (CARVALHO et al., 2010), região onde há incidência de ambas as formas de leishmanioses.

Um achado importante do presente estudo para o entendimento da epidemiologia da LTA em Pernambuco, foi a detecção da infecção de *L. migonei* por *Leishmania* (*Viannia*) spp., através da técnica de PCR, uma vez que nenhum relato até então havia sido descrito. A primeira evidência sobre a infecção de *L. migonei* foi verificada no Estado de São Paulo, quando esta espécie foi encontrada infectada por flagelados, possivelmente *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* (PESSOA; COUTINHO, 1949). Mais recentemente, relatos de infecção natural foram observados no Ceará (AZEVEDO; RANGEL; QUEIROZ, 1990; AZEVEDO; RANGEL, 1991; QUEIROZ et al., 1991) e no Rio de Janeiro, onde a espécie pode estar atuando como vetor secundário (PITA-PEREIRA et al., 2005). Além disso, *L. migonei* apresenta importância epidemiológica crescente como vetor de *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, sendo a sua prevalência em localidades de ocorrência de LTA frequentemente mencionadas (ANDRADE-FILHO; BRAZIL, 2009; SILVA; GRÜNEWALD, 1999; TEODORO et al., 1993).

São raros os estudos que estimam a taxa de infecção natural desta espécie por PCR. Pita-Pereira et al. (2005) no Estado do Rio de Janeiro, utilizando ensaio de PCR multiplex seguido de hibridização, demonstraram uma positividade de 60% para *Leishmania* (*Viannia*) spp., sendo bastante superior a relatada no presente estudo. No entanto, deve-se considerar o número bastante limitado de grupos testados por estes autores.

O encontro de infecção natural de *L. complexa* evidencia a importância da espécie na região da Zona da Mata Norte do Estado e reforça as hipóteses levantadas por Brandão-Filho et al. (2001) e Andrade et al. (2005), em estudos realizados no Município de Paudalho, onde observaram evidências de infecção natural através de formas flageladas em microscopia e sugeriram o envolvimento de *L. complexa* na manutenção do ciclo enzoótico da LTA, por sua predominância nos resquícios de mata primária aliada a seu comportamento antropofílico. Soma-se a isto o fato da espécie ser considerada como um dos principais vetores de *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* na região Amazônica, com registro de infecção natural e isolamento do parasito em quatro espécimes na região de Paragominas, Estado do Pará (SOUZA et al., 1996).

Com relação a *L. sordellii* e *L. walkeri*, não se pode sugerir o envolvimento destas espécies na epidemiologia da LTA em São Vicente Férrer, uma vez que este constitui o primeiro relato de infecção natural. Este achado indica a presença do parasito, sem determinar a capacidade de metaciclogênese de *Leishmania (Viannia)* spp. e a capacidade vetorial das espécies. Desta forma, mesmo diante da taxa de infecção significativa obtida, deve-se considerar o pequeno número de grupos analisados de *L. walkeri*, o que não permite realizar maiores inferências.

A ocorrência de *L. sordellii* é verificada em todas as regiões do país (RANGEL; LAINSON, 2003), sendo relatada em anexos de animais domésticos (galinheiros, chiqueiros e currais), domicílios, troncos de árvores, fendas de rochas e grutas de diferentes áreas do Brasil (BRANDÃO-FILHO et al., 2011; CARVALHO et al., 2007; GALLATI et al., 1996, 1997). *L. walkeri* possui uma ampla distribuição geográfica e tem preferência por habitats florestais, como tronco e oco de árvores (RANGEL; LAINSON, 2003). Estudos sobre a distribuição destas espécies, contudo, não estão associados a aspectos comportamentais consistentes que as incriminem na transmissão da doença.

Em relação à LVA, é importante ressaltar que em São Vicente Férrer, até o ano de 2003, 14 casos autóctones da doença foram notificados. Nos anos seguintes, um caso foi notificado no primeiro semestre de 2009. Durante o período de estudo não ocorreu nenhum registro da doença e nenhum flebotomíneo analisado estava infectado por *Leishmania (L.) infantum*.

Apesar de não ter sido verificada a infecção natural de *L. migonei* por *Leishmania (L.) infantum* neste estudo, a participação desta espécie no ciclo de transmissão da LVA tem sido sugerida em áreas, as quais, *L. longipalpis* não tem sido relatada. Souza et al. (2003) em estudo conduzido no Rio de Janeiro, não observaram a presença de *L. longipalpis* em seis áreas de ocorrência de casos autóctones de LVA. Nesta ocasião, os autores sugeriram a importância epidemiológica de *L. migonei* na transmissão da doença.

Aspectos epidemiológicos desta espécie também foram estudados na Argentina, em área de transmissão da doença, na qual foi relatada a sua elevada densidade associada a casos humanos e caninos no ambiente peridomiciliar (SALOMÓN et al., 2009). Estudo prévio realizado em São Vicente Férrer demonstrou a predominância de *L. migonei* na fauna local, como em habitações e abrigos de animais no peridomicílio, sendo apontada como possível transmissora do parasito (CARVALHO et al., 2007). Posteriormente, o encontro de infecção natural reforçou as evidências da sua participação no ciclo epidemiológico da LVA nesta área (CARVALHO, et al., 2010). De acordo com os critérios do Manual de Controle do Ministério

da Saúde, o Município de São Vicente Férrer está classificado como área de transmissão esporádica de LVA, o que poderia justificar a ausência de infecção natural por *Leishmania (L.) infantum* nos flebotomíneos analisados durante este estudo.

Utilizando a PCR para detecção da infecção natural, foi possível estabelecer uma taxa de infecção mínima de 0,18% para *Leishmania (Viannia) spp.* De fato, as taxas de infecção de flebotomíneos por *Leishmania* são frequentemente baixas, mesmo em áreas de elevada endemicidade (MARINHO et al., 2008; MIRANDA et al., 2002; TRAVI, et al., 1998). Jorquera et al. (2005) e Feliciangeli et al. (1994) relataram taxas de infecção de 1,3% e 1,1%, respectivamente, em diferentes áreas na Venezuela, Acardi et al. (2010) na Argentina de 0,47%, Perez et al., (1994) de 1,1% no Peru, e Kato et al. (2005) de 3,3% no Equador. No Brasil, a estimativa de taxas de infecção são de 0,4% na Bahia e no Maranhão (MIRANDA et al., 2002; OLIVEIRA-PEREIRA, et al., 2006), 0,7% no Mato Grosso (MISSAWA et al., 2010), 0,9% em Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008), 2%, 1,1% e 0,3% nos Municípios do Rio de Janeiro, Corumbá e Porto Alegre, respectivamente (PITA-PEREIRA et al., 2005, 2008, 2009). Desta forma, a taxa de infecção mínima obtida neste estudo mostrou-se próximas as relatadas nas Américas.

É importante ressaltar que o fato da ocorrência de infecção natural não é suficiente para afirmar a participação de uma espécie como vetor no ciclo de transmissão das leishmanioses. Como estabelecido por Killick-Kendrick (1990), para se definir que uma espécie de flebotomíneo é vetor de uma determinada espécie de *Leishmania*, é preciso que a espécie seja abundante no foco de leishmaniose, ser antropofílica, apresentar o desenvolvimento do parasito no intestino na ausência de sangue e o parasito isolado do inseto deve ser indistinguível daqueles isolados de casos humanos.

Considerando a descrição da fauna de flebotomíneos, aspectos interessantes do presente estudo foram às mudanças observadas na população e na distribuição geográfica de algumas espécies de flebotomíneos em São Vicente Férrer. Carvalho et al. (2007) descreveram uma diversidade de 17 espécies nesta área. No presente estudo, foram relatadas 20 espécies, onde se observa o primeiro relato de *L. ayrozai*, *L. goiana* e *L. viannamartinsi*. Apenas *L. schreiberi*, que estava presente no levantamento anterior, não foi coletada durante este estudo. Assinala-se ainda a presença de *L. shannoni*, *L. naftalekatzi*, *L. tupynambai*, *L. brasiliensis* e *L. capixaba* no ambiente peridomiciliar, o que não foi relatado anteriormente. Embora com registro esporádico, a presença destas espécies aparentemente raras neste ecótopo, reflete claramente a consequência das alterações ambientais ocorridas na área de estudo.

Com relação à incidência de flebotomíneos nos ecótopos estudados, obteve-se maior número de exemplares capturados no peridomicílio. Camargo-Neves et al. (2001) consideram a necessidade de analisar a densidade vetorial e correlacioná-la com os aspectos ambientais do peridomicílio, tais como presença de vegetação, raízes, troncos de árvores e matéria orgânica no solo, representando possíveis abrigos e criadouros para o vetor. Em São Vicente Férrer, é notória a relação existente entre a densidade de flebotomíneos e a presença de animais domésticos no peridomicílio, assim como a proximidade com os resquícios de mata primária, que têm sido progressivamente substituídos por plantações de banana.

A predominância de *L. migonei* no intra e peridomicílio e a sua presença constante durante o período de estudo, revelam a adaptação da espécie ao ambiente antrópico. Tal comportamento tem sido observado em outras regiões do país, tais como em São Paulo, no Paraná e em Minas Gerais (CAMARGO-NEVES et al., 2002; MASSAFERA et al., 2005; SARAIVA et al., 2006; TEODORO et al., 1993). Aguiar, Vilela e Lima (1987), destacam a capacidade de adaptação da espécie aos ambientes que sofreram intensa modificação, além do seu alto grau de antropofilia e da sua baixa ocorrência em ambientes silvestres. Sendo esta característica corroborada com o presente estudo, em que *L. migonei* representou apenas 3% da fauna neste ecótopo.

Nos resquícios de mata, destacou-se a predominância de *L. complexa*, espécie que possui distribuição considerável em Pernambuco, sendo relatada também na capital, Recife, em Paudalho (Zona da Mata Norte) e Amaraji (Zona da Mata Sul) (ANDRADE et al., 2005; BALBINO et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2010). Em concordância com o presente estudo, Brandão-Filho et al. (1998) relatam a preferência da espécie por habitats florestais e a sua relação com o ciclo enzoótico da LTA. A espécie possui também uma ampla distribuição geográfica no Estado do Pará e ao Sul do Rio Amazonas, incluindo a Ilha de Marajó (Souza et al., 1996), sendo altamente antropofílica, preferindo se alimentar de sangue humano ao de cães e galinhas (CAMPBELL-LENDRUM et al., 1999).

A curva sazonal da fauna de flebotomíneos, representada principalmente por *L. migonei*, demonstrou uma distribuição irregular, em que o aumento da densidade populacional ocorreu no período que antecedia ou sucedia as chuvas. Semelhante relato foi descrito por Gomes et al. (2003) ao estudar a população de *L. umbratilis* na Amazônia. No entanto, estes dados contradizem outros autores, que apontam para a maior ocorrência de flebotomíneos durante as estações chuvosas (BARATA et al., 2004; GALATI et al., 1997; SALOMÓN et al., 2002).

De acordo com Ximenes et al. (2006), o padrão de variação sazonal das espécies de flebotomíneos sofre influência de diversos fatores abióticos, e o perfil deste também depende da espécie e da área geográfica em que o estudo é realizado. Assim, devido à variação dos fatores climáticos ao longo do tempo, uma mesma espécie pode apresentar diferentes padrões sazonais em uma mesma área geográfica.

A correlação entre o número total de espécimes capturados e as variações climáticas, demonstrou que a temperatura e a pluviosidade não influenciaram na população de flebotomíneos, assim como observado por Dias et al. (2007) e Souza et al. (2004) em Minas Gerais, e por Missawa e Dias (2007) no Mato Grosso. A influência de fatores climáticos na densidade de vetores pode variar e apresentar maior ou menor importância a depender da região analisada. Estudo realizado em Minas Gerais por Barata et al. (2004) indicou uma correlação significativa entre o número de flebotomíneos capturados, a pluviosidade e a umidade, enquanto a temperatura não teve efeito significativo sobre a dinâmica destes insetos. Já Marcondes et al. (2001), em estudo realizado no Paraná, relataram influência significativa da pluviosidade na densidade dos vetores.

Em São Vicente Férrer, a ocorrência de casos das leishmanioses pode estar associada a *L. migonei*, espécie possivelmente associada ao ciclo zoonótico da LVA, e a *L. complexa*, espécie possivelmente envolvida no ciclo enzoótico da LTA, como sugerido por Carvalho et al (2007). No entanto, os resultados encontrados na análise de infecção natural do presente estudo, apontam a possibilidade de eventos mais complexos. As evidências encontradas sugerem que *L. migonei* pode estar envolvida também na transmissão de *Leishmania (Viannia) spp.*, indicando a necessidade de estudos que reforcem esta hipótese.

Outro aspecto relevante observado no presente estudo foi a circulação de *Leishmania (Viannia) spp.* nos resquícios de mata primária em espécies de flebotomíneos que, até então, não tinham sido encontrados naturalmente infectados por *Leishmania*, como *L. sordellii* e *L. walkeri*. Estes achados revelam a necessidade de estudos que esclareçam o real papel destas espécies na epidemiologia da LTA.

Em Pernambuco, a LTA é associada predominantemente à *Leishmania (V.) braziliensis* (BRANDÃO-FILHO et al., 1999, 2003; BRITO et al., 2009). Neste contexto, baseando-se no alto grau de antropofilia de *L. migonei*, no registro de casos autóctones de LTA e na abundância e distribuição desta espécie coincidente com a área de ocorrência da doença, pode-se sugerir sua participação no ciclo de transmissão da LTA em São Vicente Férrer, podendo está associada ao ciclo zoonótico da doença. Além disso, o achado de

infecção natural de *L. complexa*, associada à sua predominante presença em resquícios de mata primária, evidenciam um possível envolvimento no ciclo enzoótico da LTA.

Considerando que cada área possui particularidades relacionadas ao ambiente, espécies de vetores e parasitos, o presente estudo fornece dados que sugerem a participação de espécies no ciclo de transmissão da LTA em São Vicente Férrer e contribui com a identificação do período em que poderá haver maior risco de transmissão, auxiliando nas medidas de prevenção e controle das leishmanioses.

9 CONCLUSÕES

- a) A infecção natural de *L. migonei* por *Leishmania (Viannia)* spp., aliada à significativa taxa de infecção obtida e a sua predominância na área de estudo, sugerem a participação desta espécie no ciclo zoonótico da LTA;
- b) O registro de infecção natural de *L. complexa* reforça as hipóteses da participação desta espécie no ciclo enzoótico da LTA na Zona da Mata Norte de Pernambuco;
- c) O primeiro relato de infecção natural de *L. sordellii* e *L. walkeri* por *Leishmania (Viannia)* spp., evidencia a importância de novos estudos que esclareçam a possível participação destas espécies na epidemiologia da LTA;
- d) A curva sazonal dos flebotomíneos teve picos de ocorrência nos meses de fevereiro, maio e setembro, que podem representar o período de maior risco de infecção para a população;

REFERÊNCIAS

ACARDI, S. A. et al. Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: the first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n. 6, p. 796-799, 2010.

ADINI, I. et al. Species-specific detection of *Leishmania* in sand flies using an enzyme-linked immunosorbent assay. Transaction of the Royal Society of Tropical Medical and Hygiene, London, v. 92, p. 35-37, 1998.

AGÊNCIA ESTADUAL DE PLANEJAMENTO E PESQUISAS DE PERNAMBUCO. Perfil do município de São Vicente Férrer. Disponível em: <http://www.atendimentoagcondepe_fidem@fisepe.pe.gov.br> Acesso em: 15 mar. 2010.

AGUIAR, G. M.; VILELA, M. L.; LIMA, R. B. Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in State of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 82, n. 4, p. 583-584, out./dez, 1987.

AGUIAR, V. et al. Distribuição dos casos de leishmaniose visceral humana em Pernambuco, Brasil em 2002. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 36, s. 2, p. 39-40, 2003.

AGUILAR, C. M. et al. Zoonotic cutaneous leishmaniosis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 84, n. 1, p. 19-28, jan./mar, 1989.

ALENCAR, J. E. Leishmaniose visceral no Novo Mundo. Publicações Médicas, São Paulo, v. 27, n. 196, p. 1-12, 1956.

ALENCAR, J. E. Calazar Canino: contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. 1959. Tese (Livre Docência) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1959.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J. et al. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós colombianas. História, Ciências e Saúde – Manguinhos, Rio de Janeiro, v. 10, n. 3, p. 853-882, 2003.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. Trends in

Parasitology, Oxford, v. 22, n. 12, p. 552-557, dez. 2006.

ANDRADE, M. S. et al. Sand fly fauna in a military training area endemic for American tegumentary leishmaniasis in the Atlantic Rain Forest region of Pernambuco, Brazil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 1761-1767, 2005.

ANDRADE-FILHO, J. D.; BRAZIL, R. P. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of Alagoas State, Northeast of Brazil. Neotropical Entomology, Londrina, v. 38, n. 5, p. 688-690, 2009.

ARAÚJO, A. I. F. Roedores silvestres e flebotomíneos envolvidos na transmissão da leishmaniose tegumentar americana no município de Vicência, Pernambuco, Brasil. 2010. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

ARANSAY, A. M.; SCULICA, E., TSELENTIS, Y. Detection and Identification of *Leishmania* DNA within Naturally Infected Sand Flies by Seminested PCR on Minicircle Kinetoplastic DNA. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 66, n. 5, p. 1933-1938, mai. 2000.

ARRUDA, W. et al. Leishmaniose Visceral Americana. Brasil-Médico, Rio de Janeiro, v. 63, p. 64-65, 1949.

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clinics in Dermatology, Philadelphia, v. 14, n. 5, p. 523-532, 1996.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. International Journal for Parasitology, New York, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

ASHFORD, R. W.; BATES, P. A. Leishmaniasis in the Old World. In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology, London, v. 5, p. 241-266, 1998.

AZEVEDO, A. C.; RANGEL, E. F.; QUEIROZ, R. G. *Lutzomyia migonei* (França 1920) naturally infected with peritrypanid flagellates in Baturité, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará State, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, p. 479, nov./dez. 1990.

AZEVEDO, A. C.; RANGEL, E. F., A study of sandfly species (Diptera: Psychodidae: Plebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Baturité, Ceará, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 86, n. 4, p. 405-410, 1991.

BALBINO, V. Q. et al. Sand flies (Diptera: Psychodidae) in Pernambuco State, northeastern Brazil: the presence of species incriminated as vectors of cutaneous leishmaniasis in the Amazon region in Pernambuco State, northeastern Brazil. Zootaxa, New Zealand, v. 1078, p. 25-32, 2005.

BARATA, R. A. et al. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, p. 481-487, 2004.

BARATA, R. A. et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 38, n. 5, p. 421-425, 2005.

BARCKER, D. C. Molecular approaches to DNA diagnosis. Parasitology, Oxford, v. 99, p.125-146, 1989.

BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. American Journal of Tropical Medicine Hygiene, Baltimore, v. 44, n. 5, p. 536-546, 1991.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: Eco-epidemiological aspects in 'Zona da Mata' region. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 89, p. 445-449, 1994.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in Brazil. Parasitology Today, Cambridge, v. 10, n. 9, p. 329-330, 1994.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 31 p. 575-578, 1998.

BRANDÃO FILHO, S. P. et al. Epidemiological Surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene, London, v.93 p. 488-494, 1999.

BRANDÃO FILHO, S. P. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar americana associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis* na Zona da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil. 2001. Tese (Doutorado em Ciências)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BRANDÃO FILHO, S. P. et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous Leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brasil. Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene, London, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.

BRANDÃO FILHO, S. P. et al. Spatial and temporal patterns of occurrence of *Lutzomyia* sand fly species in an endemic area for cutaneous leishmaniasis in the Atlantic Forest region of northeast Brazil. Journal of Vector Ecology, Santa Ana, v. 36, p. 71-76, 2011.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2007.

BRAZIL, R. P.; MORTON, I. E.; WARD, R. D. Notes of the feeding habits of *Lutzomyia (N) withmani* (Diptera: Psychodidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 86, p. 497-498, 1991.

BRAZIL, R. P. et al. Chicken house as a resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. Parassitologia, Roma, v. 33, p. 113-117, 1991.

BRITO, M. E. F. et al. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. Tropical Medicine and International Health, Nijmegen, v. 14, p. 1278-1286, 2009.

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

CAMARGO-NEVES, V. L. F. et al. Use of spacial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, São Paulo, Brazil, 1998 – 1999. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 17, n. 5, p. 1263-1267, 2001.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. et al. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 35, n. 4, p. 299-306, 2002.

CAMPBELL-LENDRUM, D. H. et al. Experimental comparison of anthropophily between geographically dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae). Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 13, p. 299–309, 1999.

CARVALHO, G. M. L. et al. Naturally infected *Lutzomyia* sandflies and the transmission of leishmaniasis in an endemic area of Brazil. Vector-Borne Zoonotic Diseases, New York, v. 8, p. 407-414, 2008.

CARVALHO, M. R. Eco-epidemiologia da Leishmaniose Visceral Americana na Zona da Mata Norte de Pernambuco. 2005. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)-Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2005.

CARVALHO, M. R. et al. Phlebotomine sandfly species from an American visceral leishmaniasis area in the Northern Rainforest region of Pernambuco State, Brazil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 23, n. 5, p. 1227-1232, 2007.

CARVALHO, M. R. et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. Acta Tropica, Basel, v. 116, n. 1, p. 108-110, maio. 2010.

CASTRO, E. A. et al. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Parana State, Brazil, Acta Tropica, Basel, v. 93, p. 141-149, 2005.

CASTRO, E. A. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the state of Parana (Brazil). Experimental Parasitology, New York, v. 117, p. 13–21, 2007.

CESSE, E. A. P. et al. Organização do espaço urbano e expansão do calazar. Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil, Recife, v. 1, n. 2, p. 167-166, 2001.

CHANG, K. P.; BRAY, R. S. Leishmaniasis. In: _____. Human parasitic disease, Oxford, Ed: K.-P., 1985. v. 1, p. 140-141.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nature Reviews Microbiology, London, v. 5, p. 873-882, Nov. 2007.

COSTA, C. H. N., PEREIRA, H. F., ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 24, p. 361-372, 1990.

COSTA, C. H.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 34, n. 2, p. 223-228, mar./abr. 2001.

COSTA, J. M. L. Leishmanioses: situação epidemiológica atual no Brasil. Gazeta Médica da Bahia, Salvador, v. 75, n. 1, p. 3-17, 2005.

COSTA, S. M. et al. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s. I. Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil – Mini-review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, p. 149-153, 2007.

CUPOLILLO, E. et al. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. Parasitology Today, Cambridge, v. 16, p. 142-144, 2000.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 117-118, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO FILHO, S. P. Distribuição espacial da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 38, p. 411-412, 2005.

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

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: Revisiting Paradigms of Epidemiology and Control. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 151-156, maio/jun. 2006b.

DANTAS-TORRES, F. et al. Ectoparasite infestation on rural dogs in the municipality of São Vicente Férrer, Pernambuco, Northeastern Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 75-77, jul./set. 2009.

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

DEANE, L. M. Epidemiologia e profilaxia do calazar americano. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais, Brasília, v. 4, n. 10, p. 431-449, 1958.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. O Hospital, Rio de Janeiro, v. 48, p. 61-76, 1955.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 4, p.108-212, 1962.

DE BRUIJN, M.H.L.; BARKER, D.C. Diagnosis of new world leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta Tropica, Cambridge, v. 52, n. 1, p. 45-58, 1992.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. World health statistics Quarterly, Geneve, v.45, p. 267-275, 1992.

DESJEUX, P. Leishmaniniais: current situation and new perspectives. Comparative, Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, Oxford, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DIAS, E. S. et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 40, n. 1, p. 49-52, 2007.

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

EVANS, T. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. Journal of Infectious Diseases, Chicago, v. 166, p.1124-32, 1992.

FALQUETO, A. et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 81, p. 155-163, 1986.

- FALQUETO, A. et al. Leishmaniosis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo State, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 86, p. 499-500, 1991.
- FELICIANGELI, M. D. et al. Vectors of cutaneous leishmaniasis in North-Central Venezuela. Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 8, p. 317-324, 1994.
- FORATTINI, O. P. *Psychodidae, Phlebotominae*, Leishmanioses, Bartonelose. In: Edgard Blücher. Entomologia Médica, São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo, 1973, v. 4.
- FEITOSA, M. A. C.; CASTELLON, E.G. Sand fly faune (Díptera:Psychodidae) in Forest fragments around hosing complexes in the Manaus municipality, Amazonas Brazil: II. Horizontal stratification. Acta Amazônica, Manaus, v. 34, p. 121-127, 2004.
- GALATI, E. A. B. et al. Study of the phlebotomines (Diptera, Psychodidae), in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 115-128, 1996.
- GALATI, E. A. B. et al. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 31, p. 378-390. 1997.
- GARCIA, A. L. et al. Epidemiological monitoring of American tegumentar leishmaniasis: molecular characterization of a peridomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 101, p. 1208-1213, 2007.
- GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D. P. Parasitologia Humana. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 10, p. 67-83.
- GOMES, L.H.M. Variação mensal e infecção em *Lutzomyia umbratilis* Ward & Fraiha 1977, *Lutzomyia anduzei* Rozeboom 1942, *Lutzomyia flaviscutellata* Mangabeira 1942 e *Lutzomyia olmeca* nociva Young & Arias 1982 (Diptera: Psychodidae) por tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em áreas de treinamento militar na Amazônia. 2003. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2003.
- GÓMEZ- SALADÍN, E. et al. Short report: surveillance of *Leishmania* sp. among sand flies in Sicily (Italy) using a fluorogenic real time polymerase chain reaction. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 72, n. 2, p. 138-141, 2005.

GONTIJO B.; CARVALHO M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 36, n. 1, p. 71-80, jan./ fev. 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Revista Brasileira de Epidemiologia, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, set. 2004.

GRIMALDI Jr., G. et al. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild animals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. American Journal of the Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 44, p. 645-661, 1991.

GRIMALDI Jr., G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Journal Clinical microbiology, Washington, v. 6, p. 230-250, 1993.

GUIMARÃES, V. C. F. V. Domicílio na localidade de Mundo Novo, município de São Vicente Férrer. São Vicente Férrer, 2010a. 1 fotografia.

GUIMARÃES, V. C. F. V. Resquícios de mata primária na localidade de Mundo Novo, município de São Vicente, Férrer. São Vicente Férrer, 2010b. 1 fotografia.

GUIMARÃES, V. C. F. V. Armadilha luminosa CDC. São Vicente Férrer, 2010c. 1 fotografia.

GUIMARÃES, V.C.F.V. Distribuição das armadilhas CDC nos diferentes ecótopos. São Vicente Férrer , 2010d. 1 fotografia.

GUIMARÃES, V.C.F.V. Captura com Armadilha de Shannon. São Vicente Férrer, 2010e. 2 fotografias.

GUIMARÃES, V.C.F.V. Correlação negativa entre o total de flebotômíneos capturados, a temperatura e pluviosidade. São Vicente Férrer, 2011f. 2 fotografias.

IBGE. @cidades. Pernambuco. Recife. Disponível em:
< <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1> > Acesso em: 20 jul. 2010.

JORQUERA, A. et al. Multiplex-PCR for detection of natural Leishmania infection in Lutzomyia spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in State of Sucre,

Venezuela. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 100, n. 1, p. 45-48, fev. 2005.

KATO, H. et al. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sandflies in the Andean areas of Equador by a polymerase chain reaction. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 72, n. 1, p. 87-93, 2005.

KILLICK-KENDRICK, R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmania and their phlebotomine vectors. Bulletins de la Societé de Pathologie Exotique et de ses Filiales, Paris, v. 78, p. 747-755, 1985.

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

LAINSON, R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. Philosophical Transactions of Royal Society of London, London, v. 321, p. 380-404, 1988.

LAINSON, R. On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the Neotropics. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 92, n. 3, p. 377-387, mai./jun, 1997.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. Ecologia das Leishmanioses: *Lutzomyia longipalpis* e a Eco-epidemiologia da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) no Brasil. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2003, p. 311-336.

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

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.) The leishmaniasis in Biology and Medicine, London: Academic Press, 1987, v. 1, p. 1-120.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis: The neotropical leishmania species. In: Cox Feg, Kreier JP, Wakelin D. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology, London, v. 5, p. 241-266, 1998.

LEISHMANIOSE tegumentar e visceral. Boletim..., Brasília, DF, n. 2, 2010. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/svs>>. Acesso em 2 abr. 2010.

LUCENA, D. T.; OLIVEIRA, M. H. C. C.; LEAL, M. C. A. Variação mensal dos flebotômíneos (Diptera: Psychodidae) de Igarassu, PE. Caderno Ômega da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, v. 1, n. 1, p. 19-27, 1984.

LUZ, E. et al. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania* (V.) *braziliensis* in Paraná state, southern Brazil. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Liverpool, v. 94, n. 6, p. 623-631, 2000.

LUZ, Z. M. P. et al. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 34, p. 249-254, 2001.

MANNA, L. et al. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 142, p. 271-280, 2006.

MARCONDES, C. B. et al. Ecology of Phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in Brazilian Atlantic Forest. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 34, p. 255-260, 2001.

MARESCA, C. et al. Survey on canine leishmaniasis and phlebotomine sand flies in central Italy. Research in Veterinary Science, London, v. 87, p. 36-38, 2009.

MARINHO, R. M. et al. Flebotômíneos (Diptera, Psychodidae) em reservas florestais da área metropolitana de São Luís, Maranhão, Brazil. Revista Brasileira de Entomologia, São Paulo, v. 52, p. 112-116, 2008.

MARTIN-SÁNCHEZ, J. et al. Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera: Phlebotominae) Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 100, n. 6, p. 527-532, 2006.

MARTINS, L. M. Análise da associação entre a cobertura vegetal e a ocorrência de Leishmaniose Tegumentar (LT) em Buriticupu, Amazônia do Maranhão. 2002. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente)-Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2002.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; CARVALHO, R. W. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. Parasitology Today, Cambridge, v. 10, n. 1, p. 34-37, 1994.

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

MASSAFERA, R. et al. Fauna de flebotomíneos do município de Bandeirantes, no estado do Paraná. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 39, p. 571-577, 2005.

MAURÍCIO, I. L. et al. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. Parasitology, London, v. 119, p. 237-246, 1999.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitology Today, Cambridge, v. 16, n. 5, p. 188-189, maio 2000.

MICHALSKY, E. M. et al. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 44, p. 255- 259, 2002.

MILES, M.A. et al. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. In: International Canine Leishmaniasis Forum, 1999. Barcelona. Proceedings...Barcelona: Killick-Kendrick, 1999. p. 46-53.

MIRANDA, J. C. et al. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polimerase chain reaction. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 97, n. 2, p. 185-188, mar. 2002.

MISSAWA, N. A.; DIAS, E. S. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Várzea Grande: na area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, p. 913-918, 2007.

MISSAWA, N. A. *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania (L.) chagasi* in Várzea Grande, Mato Grosso State, Brazil, an area of intense transmission of visceral leishmaniasis. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 26, n. 12, p. 2414-2419, 2010.

MONTEIRO, E. M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 38, n. 2, p.147-152, 2005.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. The Lancet, London, v. 366, p. 1561-1577, oct. 2005.

NASCIMENTO, J. C. et al. Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a viscera-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 119-122, 2007.

NEITZKE, H. C. et al. Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 41, n. 1, p. 17-22, 2008.

OLIVA, A. et al. Incidence and time course of *Leishmania* infections detected by parasitological, serologic and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons, Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 44, p. 1318-1322, 2006.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N. et al. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp na Amazônia maranhense. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 39, n. 6, p. 540-543, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Leishmaniasis: disease information. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/resources/en/>>. Acesso em: 8 abril 2011.

PADILLA, A. M. et al. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 110, p. 1-10, 2002.

PAIVA, B. R. et al. Padronização de condições para a detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 23, p. 87-94, 2007.

PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. Veterinary Journal, London, 189, p. 356-358, 2009.

PEARSON, R. D.; SOUZA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. Clinical infectious diseases, Chicago, v. 22, p.1-11, 1996.

PEREZ, J. E. et al. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. Transaction of the Royal Society of Tropical Medical and Hygiene, London, v. 88, p. 1614, 1994

PEREZ, J. E. et al. Isolation and molecular identification of *Leishmania (Viannia) peruviana* from naturally infected *Lutzomyia peruensis* (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 655-658, 2007.

PERNAMBUCO. Secretaria de Saúde do estado. Boletim epidemiológico - Leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco. Diretoria de Informação da Secretaria Estadual de Saúde. a.1 n° 3. 2002.

PESSOA, S.B.; COUTINHO, J.O. Infecção natural de *Phlebotomus migonei* por formas leptomonas, provavelmente da *Leishmania braziliensis*. Revista de Biologia e Higiene, São Paulo, 1949, v. 10, p.139—142.

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

PIMENTA, P. F. et al. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 1391, n. 19, p. 9155-9156, 1994.

PITA-PEREIRA, D. et al. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 99, n. 12, p. 905-913, 2005.

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

PITA-PEREIRA, D. et al. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of South Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. American Journal and Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 80, p. 593-595, 2009.

QUEIROZ, R.G. et al. Phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna survey in an American cutaneous leishmaniasis (ACL) focus in Baturité, Ceará State, northeast Brazil. Parassitologia, Roma, v. 33, p. 159-167, 1991.

QUEIROZ, R. et al. Cutaneous leishmaniasis in Ceará in Northeastern Brazil: Incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. American Journal Tropical of Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 50, p. 693-698, 1994.

RANASINGHE, S. et al. A real time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 102, p. 875-882, 2008.

RANGEL, E. F. et al. Flebótomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 81, p. 347-349, 1986.

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

REBÊLO, J. M. M. et al. Nota preliminar das espécies do gênero *Lutzomyia*, França 1924 (Psychodidae, Phlebotominae) do estado do Maranhão, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 12, p. 545-549, 1996.

RIOUX, J. A. et al. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for new classification, Annales de parasitologie humaine et comparee, Paris, v. 65, p. 111-125, 1990.

ROCHA, L.S. et al. Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 104, p. 461-466, 2010.

RODRIGUEZ, N. et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 9, p. 2246-2252, 1994.

RODRIGUEZ, N. et al. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 93, p. 47-49, 1999.

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

SACKS, D.L. et al. Identification of a infectiv stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, Washington, v. 2233, p. 1417-1419, 1984.

SALOMÓN, O. D. et al. Leishmaniosis tegumentaria em Las Lomitas, provincia de Formosa, Argentina, 1992-2001. *Medicina (Buenos Aires)*, Buenos Aires, v. 62, p. 562-568, 2002.

SALOMÓN, O. D. et al. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. *Acta Tropica*, Basel, v. 113, n. 1, p. 84-87, 2009.

SANTOS, S. O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, St Albans, v. 12, n. 3, p. 315- 317, 1998.

SANTOS, S. O. et al. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul State. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília, v. 36, n. 5, p. 633-634, 2003.

SARAIVA, E. M. et al. Changes in lipophosphoglycan and gene expression. Associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology*, London, v. 111, p. 275-287, 1995.

SARAIVA, L. et al. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília, v. 39, n. 1, p. 56-63, 2006.

SCHLEIN, Y. et al. Released glycoconjugate of indigeneous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 84, n. 3, p. 353-355, 1990.

SCHLEIN, Y. et al. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 15, n. 20, p. 9944-9948, 1992

SCODRO, R. B. L. et al. Investigation of Natural Infection by *Leishmania* in Sandflies of Paraná State, Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 51, n.3, p. 483-491, 2008.

SHAW, J.J. et al. Leishmaniasis in Brazil XXIII. The identification of *Leishmania braziliensis* *braziliensis* in wild-caught sandflies, using monoclonal antibodies. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, Baltimore, v. 81, n. 1, p. 69-72, 1987.

SHAW, J. J. et al. Transmissão de colaboradores agentes: Os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro, Ed: Guanabara Koogan, 2003, p. 337-351.

SHAW, J. J. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A mini review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 541-547, ago. 2007.

SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96, p. 285-291, 2001.

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

SILVA, D. F., VASCONCELOS, S. D. A ten year (1990-1999) survey on leishmaniasis incidence in Pernambuco State, Northeastern Brazil. Revista de Patologia Tropical, Goiania, v. 32, n. 1, p. 53-61, 2003.

SILVA, O. A., BRAGA, G. M.S. Leishmaniose visceral canina no município de São Vicente Férrer, Estado de Pernambuco, Brasil. Revista Brasileira de Ciência Veterinária, Niterói, v. 15, n. 2, p. 101-102, 2008.

SILVA, A. C., GRUNEWALD, J. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotomine) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 94, p. 579-582, 1999.

SILVEIRA, F. T. et al. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon Region. Parasite, Paris, v. 9, p. 3-50, 2002.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (Brasil). leishmaniose tegumentar americana - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def>>. Acesso em: 4 abr. 2010.

SOUZA, A. A. et al. *Psychodopygus complexus*, a new vector of *Leishmania braziliensis* to humans in Pará State, Brazil. Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene, London, v. 90, n. 2, p. 112-113, 1996.

SOUZA, C. M. et al. Study on Phlebotomine Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Fauna in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, n. 8, p. 795-803, 2004.

SOUZA, M. B. et al. Ausência de *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no município do Rio de Janeiro. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 19, p. 109-118, 2003.

TEODORO, U. et al. 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, São Paulo, v. 27, p. 242-249, 1993.

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: Is it time to changes strategies? American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 52, n.3, p.287-292, 1995.

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

TOLEZANO, J. R. et al. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Estado de São Paulo. III. Influência da ação antrópica na sucessão vetorial da LTA. Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 60, n. 1, p. 47-51, 2001.

TRAVI, B. L. et al. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: Clinical and Parasitological Observation in experimentally Infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis. Experimental Parasitology, New York, v. 88, p. 73-75, 1998.

XIMENES, M. F. F. M. et al. Effect of abiotic factors on seasonal population dynamics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Northeastern Brazil. Journal of Medical Entomology, Honolulu v. 43, n. 5, p. 990-995, 2006.

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

ANEXO A - Autorização para atividades com finalidade científica



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

Autorização para atividades com finalidade científica

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

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Colonização de <i>Bolomys lasiurus</i> , <i>Nectomys squamipes</i> , <i>Gale a spixii</i> e <i>Rattus rattus</i>	08/2007	08/2012
2	Colonização de <i>Lutzomyia migonei</i> , <i>Lutzomyia whitmani</i> e <i>Lutzomyia longipalpis</i>	08/2007	08/2012
3	Realização de ensaios de infeciosidade	08/2007	08/2012
4	Coleta de pequenos roedores e flebotomíneos	02/2011	08/2012
De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.			



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

Autorização para atividades com finalidade científica

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

Atividades X Táxons

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

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

Material e métodos

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

Destino do material biológico coletado

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