



FIOCRUZ

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

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Identificação dos Criadouros Naturais de *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA:
PSYCHODIDAE) em área endêmica para a Leishmaniose Visceral, do estado da
Bahia, Brasil.**

DIEGO FERREIRA DE OLIVEIRA

Salvador – Brasil

2013

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MUNIZ**

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

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E MEDICINA INVESTIGATIVA.

**Identificação Criadouros Naturais de *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA:
PSYCHODIDAE) em área endêmica para a Leishmaniose Visceral, do estado da
Bahia, Brasil.**

DIEGO FERREIRA DE OLIVEIRA

Orientador: Prof^o. Dr. José Carlos Miranda

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa para a
obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Brasil

2013

Folha de Aprovação.

Dedicatória

***Dedico aos meus pais, Cristina e Cesar, e aos meus irmãos, Danilo e Daiana,
Com muito amor.***

Epígrafe

“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende.”

Guimarães Rosa

RESUMO

INTRODUÇÃO: Até o momento poucos microhabitats foram identificados como criadouros naturais de flebotomíneos, tendo maior sucesso trabalhos em regiões de clima úmido. **OBJETIVO:** O presente estudo, realizado em uma região de clima semiárido, investigou a ocorrência de criadouros naturais em uma série de microhabitats selecionados de acordo com a presença de umidade e matéria orgânica, além de redução de luminosidade. **MÉTODOS:** 64 amostras de solo foram mensalmente coletadas no ambiente peridomiciliar ou intradomiciliar de cinco casas localizadas em Cavunge, distrito do município de Ipecaetá, uma região do semiárido do estado da Bahia, sendo analisada a emergência de flebotomíneos adultos pelas técnicas de observação direta e formas imaturas pela técnica de flutuação. Capturas de flebotomíneos adultos foram também realizadas, dispondo mensalmente armadilhas luminosas nos ambientes peridomiciliar e intradomiciliar. **RESULTADOS:** Das 1523 amostras de solo coletadas, 49 foram positivas para criadouros naturais, sendo encontrado um total de 64 flebotomíneos, a maioria (n = 40) pertencentes a espécie *Lutzomyia longipalpis*, encontradas principalmente em microhabitats como concavidades rochosas e em ocos de árvores. Dos 2002 flebotomíneos adultos capturados e identificados, a maioria (n = 1907) pertenceu a espécie *L. longipalpis*. Nas relações entre as variáveis climáticas e a emergência de flebótomos e os flebótomos capturados, observou-se uma relação de força moderada, e estatisticamente significativa na temperatura entre uma semana anterior à captura entomológica e densidade de flebótomos, indicando que para uma região semiárida este parâmetro climático é o mais apropriado na previsão de quantidade de formas adultas de flebotomíneos. **CONCLUSÕES:** Em conjunto, nossos resultados tanto acerca da caracterização dos criadouros naturais de flebotomíneos, quanto sua relação com variáveis climáticas, poderá servir como uma ferramenta auxiliar no direcionamento do controle biológico e controle da leishmaniose.

Palavras chave: Flebótomos, Criadouro natural, Forma imatura, Clima.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The majority of work attempting to identify new natural breeding sites for sandflies were performed in areas with humid weather. **OBJECTIVE:** We investigated the occurrence of natural breeding sites in a semi-arid region in a series of micro-habitats selected according to the presence of humidity, organic matter and reduced brightness. **METHODS:** Soil samples were collected monthly (n= 64) in the peridomestic and household environments of five houses located in the district of Cavunge Ipecaetá. Samples were analyzed by direct observation and floating technique. We also performed monthly entomological sand fly captures using light traps in the peridomestic and household areas. **RESULTS:** We were able to identify 49 positive samples from the 1523 soil samples collected and detected a total of 64 sand flies, the majority (n = 40) belonging to the species *Lutzomyia longipalpis*. Similarly, between 2002 sandflies captured and identified, the majority (n = 1907) belonged to the species *L. longipalpis*. There was a correlation of moderate strength between climatic data and the emergence and capture of sand flies and a statistically significant correlation between the temperature one week before the entomological capture and density of sandflies. These results indicate that in a semiarid region this climatic parameter is important to predict the amount of adult forms of sandflies. **CONCLUSIONS:** Taken together, our results on the characterization of natural breeding sites of sand flies and the correlation with climatic variables could contribute as a tool in the direction of vector control.

Keywords: sand fly, natural breeding, immature form, Weather.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura:	Pag.
Figura 01: Representação do ciclo biológico dos flebotomíneos.....	13
Figura 02: Distrito de Cavunge localizada no ponto preto.....	22
Figura 03: Substratos sendo coletado em potes plásticos de 1L com a base engessada. Metodologia antiga para investigação de criadouros.....	23
Figura 04: Amostras acondicionadas em isopor para transporte.....	23
Figura 05: Coleta das amostras na cavidade de uma rocha.....	24
Figura 06: Amostragem nas raízes de um umbuzeiro.....	24
Figura 07: Cavidades no tronco de árvore caído.....	25
Figura 08: Amostragem em uma fenda ao redor de uma caixa d'água, formada pela água que escorre da chuva na parede do reservatório.....	25
Figura 09: Coleta de material na base de potes com a base úmida.....	26
Figura 10: Técnica de observação direta.....	27
Figura 11: Peneiras retiradas da técnica original de Mc Combie-Young.....	27
Figura 12: Técnica de flutuação sem peneiramento.....	28
Figura 13: Armadilha do tipo HP para captura de insetos adultos. No alto uma lâmpada com um ventilador para sucção, na parte inferior uma gaiola para o abrigo dos flebotomíneos adultos e viabilizar o manejo em laboratório.....	29
Figura 14: Exemplos de exúvias emergidas das amostras de solo. À direita (B), parte da região abdominal, à esquerda (A) parte do cefalotórax segmentos abdominais e asas.....	34
Figura 15: À esquerda (A) exemplo de uma exúvia rompida na região do cefalotórax. À direita (B) uma pupa íntegra.	35
Figura 16: Cefalotórax de uma larva e a presença de cerdas (A). À direita (B), corpo de uma larva entre o 2 e 4 estágio de desenvolvimento larval, destacando os pseudópodos e os dois pares cerdas caudais.	35

LISTA DE TABELAS

Tabelas:	Pag.
Tabela 01: Incidência das amostras positiva coletadas no intra, peri e intradomicílio durante a primeira etapa do estudo.....	31
Tabela 02: As amostragens positivas na segunda etapa do estudo.....	32
Tabela 03: Relação das espécies de flebotomíneos adultos, capturados com a armadilha HP.....	32
Tabela 04: Regressão - Múltipla entre as variáveis climáticas e os flebótomos emergidos das amostras.....	33
Tabela 05: Regressão - Múltipla entre as variáveis climáticas e os flebótomos adultos capturados.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz.
LIP	Laboratório de Imunoparasitologia
LT	Leishmaniose Tegumentar.
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana.
LVA	Leishmaniose Visceral Americana.
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MO	Microscópio óptico.
UVS	Unidade de Vigilância Sanitária.
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Os flebotomíneos.....	12
1.2	Formas imaturas.....	13
1.2.1	Ovos.....	15
1.2.2	Larvas.....	15
1.2.3	Pupas.....	15
1.3	Criadouros naturais	16
1.3.1	Histórico dos criadouros.....	17
1.3.2	Controle biológico aplicados a formas imaturas.....	19
2	OBJETIVO	21
2.1	Objetivo geral.....	21
2.2	Objetivo específico.....	21
3	MÉTODOS	22
3.1	Área de estudo.....	22
3.2	Amostragens dos substratos.....	22
3.3	Análises das amostras de solo.....	26
3.4	Captura entomológica.....	28
3.5	Dados climáticos.....	29
3.6	Análises estatísticas.....	30
4	RESULTADOS	31
5	DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÃO	39
7	REFERÊNCIAS	40
8	ANEXOS	44
8.1	Artigo Publicado.....	45
8.2	Dados Climatológicos.....	50
8.2.1	Umidade.....	50
8.2.2	Temperatura.....	54
8.2.3	Chuvas.....	58
8.3	Croqui.....	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os Flebotomíneos

As Leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por parasitas do gênero *Leishmania*. As características epidemiológicas e clínicas da leishmaniose são diversas, em cada área geográfica. O protozoário pertence a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. As leishmanioses podem ser divididas em dois grandes grupos, as Leishmanioses Tegumentares (LT) e a Leishmaniose Visceral (LV) e tem como vetor os insetos flebotomíneos³¹.

Os flebotomíneos são insetos de dimensões que variam entre dois a três milímetros de comprimento, pilosos apresentando uma acentuada curvatura ao longo do corpo. Em diferentes regiões do Brasil estes insetos recebem diferentes nomes populares como: “mosquito-palha”, devido a sua coloração amarelada muito semelhante à palha vegetal; “asa-dura”, por possuírem asas grandes com o formato lanceolado que permanecem eretas durante o pouso; “tatuquira”, atribuído ao frequente encontro destes insetos em buracos de tatu; “pula-pula”, devido ao vôo do tipo saltitante, entre outros²

Pertencem a classe insecta, ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae que alguns autores elevam a categoria de família (Phebotomidae)⁴¹. A subfamília Phlebotominae é constituída por cinco gêneros, sendo as espécies do gênero *Phlebotomus* as responsáveis pela transmissão da leishmaniose no continente europeu, asiático e africano¹⁶. Os flebotomíneos vetores das leishmanioses nas Américas pertencem ao gênero *Lutzomyia*³¹. A *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) já foi encontrada naturalmente infectada em vários focos de Leishmaniose Visceral Americana (LVA). Lainson (1983), demonstrou a sua infecção experimental. Evidências mostram a *L. longipalpis*, como a espécie vetor mais importante da *Leishmania chagasi* nas Américas²¹.

Os flebotomos podem ser encontrados por quase todas as regiões faunísticas do mundo, podendo ser representados por diferentes espécies. Nas regiões tropicais, possuem uma densidade oscilante de acordo com as estações climáticas do ano³⁴.

Os machos dos flebotomíneos são exclusivamente fitófagos, já as fêmeas, além de ingerirem seiva vegetal como fonte de carboidrato também realizam a

hematofagia, como fonte de proteína para a maturação dos ovos. Após a alimentação sanguínea, a fêmea faz a postura dos ovos em locais protegidos da luz, com presença de umidade e matéria orgânica em decomposição. Entre quatro e dez dias, os ovos eclodem e liberam as larvas de primeiro estágio. As larvas alimentam-se de restos de matéria orgânica presente nos substratos e com o passar dos dias vão se desenvolvendo até atingirem o quarto estágio, em um tempo decorrido entre 30 e 60 dias. Uma vez na quarta fase larvar, esta libera o conteúdo gastrointestinal e fixa-se a um substrato para realizar a empupação. Após sete a dez dias, a forma adulta emerge desta pupa através de uma fissura longitudinal ao longo do dorso da pupa. As formas adultas desses insetos vivem entre quinze e vinte sete dias em laboratório²⁹. O ciclo biológico dos flebotomíneos tem um tempo aproximado entre 30 e 70 dias^{24 25 29}.

A taxonomia de flebotomíneos foi declarada como base indispensável para todo o trabalho em competência vetorial e biologia de flebotomíneos, pela Organização Mundial da Saúde⁴⁰. Barretto (1941) e Pessoa (1978) apontaram a escassez de trabalhos com flebotomíneos da região Neotropical e também de estudos de suas formas imaturas^{3 29}.

1.2 Formas Imaturas

Os flebotomíneos são insetos que possuem desenvolvimento indireto e metamorfose completa, por isso são classificados como holometábolos. O seu ciclo de vida é constituído por quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto. Cada estágio evolutivo varia o tempo de permanência de acordo com a espécie e com as condições ambientais a que estão submetidos². A parada longa em um dos estágios do ciclo de vida (diapausa) é um fenômeno que pode ocorrer quando as condições ambientais não estão apropriadas, podendo retardar o desenvolvimento desses insetos¹³ (Figura 01).

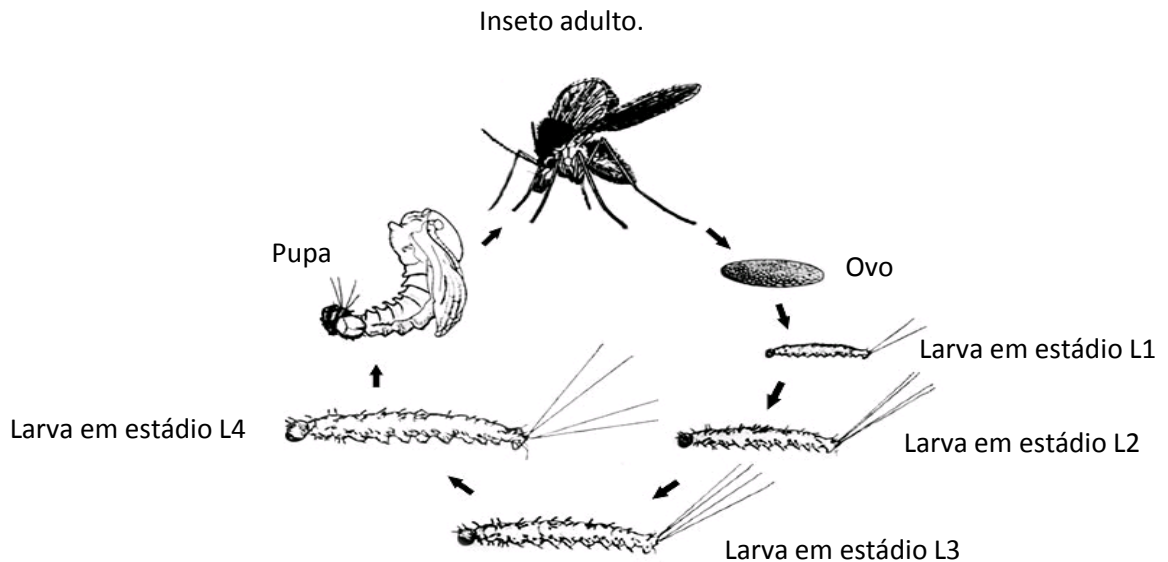


Figura 01: Representação do ciclo biológico dos flebotomíneos; o ovo, as quatro fases larvares, o estágio de pupa, e a forma adulta. Fonte: Internet. (http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life_cycle__habitats.htm)

Diferentes dos outros Psychodidae, os flebotomíneos encontram-se incluídos no grupo dos midobiontes, pois se desenvolvem em locais ricos em matéria orgânica. Adicionalmente, Barretto ³, descreveu que as pupas necessitam de graus de umidade muito pequenos, no entanto os ovos e as larvas, em particular as larvas jovens, necessitam de alto teor de umidade no ambiente onde sobrevivem. É por isso que as larvas na natureza são encontradas em locais úmidos. Este fato explica a grande redução dos criadouros no outono, e como os flebotomíneos se afastam pouco dos locais onde se criam, durante os meses frios e secos são encontrados próximos a córregos, lagoas e outras coleções de água, onde as larvas encontram condições favoráveis à sua evolução ^{4, 27}.

Segundo Feliciangeli e colaboradores (1993) e Fausto (1998), poucos flebotomíneos tiveram os seus estádios imaturos estudados no passado, devido a dificuldade de obtê-los nos meios naturais. Porém, com o desenvolvimento de técnicas de criação e colonização desses insetos em laboratório, houve um incremento em estudos de desenvolvimento mais detalhados de todo ciclo de vida desses insetos ^{10,11}. Porém atualmente, estudos com as formas imaturas ainda não acompanham os trabalhos de sistemática de flebotomos adultos. De 400 espécies listadas na região Neotropical, só 66 tem seus estádios imaturos estudados ^{36, 41}.

1.2.1 Ovos

Durante a oviposição, as fêmeas de flebotomíneos liberam através das glândulas acessórias uma substância viscosa, que auxiliam a fixação dos ovos ao substrato. No momento da postura, os ovos possuem uma coloração esbranquiçada, porém em pouco menos de um dia, adquirem uma coloração acastanhada. Pouco tempo antes da eclosão, os ovos se tornam turgidos, tornando a ornamentação do exocório bem evidente ³, e de acordo com Bahia e colaboradores (2010), tal ornamentação possa servir como estrutura para realização de identificações taxonômicas, uma vez que doze padrões de doze diferentes espécies foram caracterizadas ².

1.2.2 Larvas

No momento da eclosão, as larvas rompem o endocório e exocório dos ovos através de um órgão perfurador presente na cabeça, que desaparecem com o seu desenvolvimento. As larvas apresentam coloração esbranquiçada, com a cabeça escura, corpo dividido em doze segmentos; três torácicos e nove abdominais, sendo os sete primeiros apresentando pseudópodos em sua face ventral e placas terciais nas laterais, já os dois últimos são adaptados para locomoção, sendo o último auxiliar na locomoção e dividido em lóbulos anais e lóbulos caudais. Variam pouco de tamanho entre os quatro estádios larvares, porém a presença de um par de filamentos caudais exclusivamente na primeira fase e a de dois pares da segunda fase até empupar, tornam possível esta diferença do primeiro estádio para os demais. As Larvas necessitam de um ambiente úmido, rico em matéria orgânica em decomposição e ausência de luminosidade ^{23, 24}.

1.2.3 Pupas

É o estágio evolutivo mais resistente às variações ambientais permanecendo imóveis fixadas aos substratos. As pupas possuem coloração esbranquiçada à amarelada, tendendo a ficar mais escura e acastanhada momentos antes da eclosão das formas adultas. Possuem o corpo dividido em cefalotórax e abdome, possuindo quatro segmentos ligeiramente fundidos e nove restantes

individualizados, respectivamente. O corpo pupal, realiza apenas movimentos de extensão e flexão ¹³.

1.3 Criadouros Naturais

A despeito da importância médica das leishmanioses, pouco é conhecido acerca dos criadouros naturais dos seus insetos vetores. Até o momento, a maioria dos trabalhos realizados na região neotropical, na tentativa de identificar substratos preferenciais de oviposição dos flebotomíneos, apresentaram baixo rendimento de formas imaturas nas amostras de solo coletadas ^{5, 6, 12, 30}.

Estudando criadouros naturais de *P. papatasi*, em Malta, Newstead ²⁸ observou uma maior concentração de formas imaturas nos microhábitats que apresentaram condições específicas, como presença de matéria orgânica, umidade e ausência de luminosidade. Estudos realizados em florestas tropicais, tais como os de Hanson ¹⁸ e Alencar ¹, corroboram estas observações, visto a maior quantidade de formas imaturas identificadas em solo sobre serapilheira, entre raízes de árvores e troncos caídos. Tais condições edáficas também foram observadas nos estudos realizados em ambientes secos, como os de Deane ⁷ e Ferreira ¹², estando as formas imaturas concentradas nos microhábitats: solo em cavidades de rochas e cavidades em troncos de árvores.

Regiões de clima seco, devido estarem sujeitas a variações climáticas mais acentuadas que as de climas tropicais úmidos, típicos de florestas tropicais, poderão apresentar características diferenciadas na densidade vetorial ao longo do ano. Nos estudos de Hanson ¹⁸ e Dias-Lima ⁹, realizados em florestas tropicais, a densidade vetorial manteve-se elevada durante todo o período amostrado. De outro modo, estudando a densidade da espécie *L. longipalpis* em uma região de clima seco, Sherlock ³⁴, observou uma característica sazonal, havendo tendências para o aumento da densidade após períodos de chuva.

O conhecimento tanto acerca dos criadouros naturais dos flebotomíneos quanto de características da densidade vetorial, podem fornecer informações valiosas no direcionamento do controle biológico, visando a redução populacional de insetos vetores, e conseqüentemente, de casos da doença ^{32, 37}.

1.3.1 Histórico a respeito dos criadouros.

Vários estudos sobre a fauna de flebotomíneos e as principais espécies envolvidas na cadeia de transmissão já foram realizados em focos do Brasil^{9, 19}. Deane e Deane (1957) apresentaram a alternativa de que os flebotomíneos se desenvolvem de maneira tão espalhada, dispersando as larvas por área tão ampla, que se torna difícil seu encontro em números apreciáveis, ou então, ainda não foram encontrados os verdadeiros criadouros naturais⁷.

Os primeiros estudos sobre criadouros naturais dos flebotomíneos foram desenvolvidos por Grassi (1907) ao verificar larvas de *Phlebotomus papatasi* em porões, particularmente em ralos conservados úmidos pela água suja que neles penetravam. Marret (1910, 1911, 1913 e 1915) em Malta encontrou algumas larvas e pupas em muros e barrancos. Também em Malta, Newstead (1911) encontrou duas larvas em fendas entre pedras soltas. King (1913) no Sudão encontrou uma larva de *P. papatasi*, pesquisando terra coletada em fendas do solo. Posteriormente, o mesmo autor (1914) em Karthoum, observou larvas, pupas e adultos de *P. papatasi*, pesquisando terras coletadas em diversos solos cultivados. Howlett (1913) na Índia, observou larvas, pupas e obteve a eclosão de flebotomíneos adultos. Mitter (1919) encontrou larvas e pupas em porões e galinheiros e obteve adultos de *Phlebotomus minutus* de material coletado em jardins, muros e bases de árvores. Whittingham (1923), em Malta conclui pela existência de criadouros em fendas de muros e rachaduras em solo cultivado, em terra frouxa, na base de paredes e construções¹⁴.

Newstead (1911), estudando criadouros naturais de *P. papatasi*, em Malta, assinala que os lugares em que as larvas eram encontradas apresentaram as seguintes condições: presença de material orgânico, umidade, mas não em excesso e ausência de luz. Mc Combig e colaboradores (1926), estudando amostras de materiais de possíveis criadouros naturais de *P. papatasi* e *P. minutus*, na Índia, encontraram 7 positivas e mostraram que todas estavam misturadas com vegetais orgânicos em decomposição e ausência de luz³.

Pifano (1941), na Venezuela, encontrou cerca de 12 larvas nas frestas da parede de um rancho, assinalando que eram locais úmidos, ricos em matéria orgânica nitrogenada e situavam-se ao abrigo da luz¹⁴.

No Peru (Hertig e Fairchild, 1948) e na Índia (Ghosh, 1950), obtiveram o controle dos flebotomíneos pela aplicação de Inseticida nas casas, criadouros e abrigos nos extra domicílios ou somente nos criadouros ⁸.

São poucas as observações existentes na literatura sobre criadouros naturais de flebotomíneos na região neotropical. No Brasil, o primeiro achado de larvas em natureza foi o de Ferreira e colaboradores (1938), no Pará. Eles encontraram algumas larvas colhidas em torno de troncos de árvores, porém, não chegaram à identificação específica ¹². Lutz (1939) obteve alguns flebotomíneos adultos em gaiolas teladas que ele usava, para cobrir, nas matas, porções do solo. Coutinho e Barreto (1941) observaram larvas e obtiveram adultos de *Phlebotomus fischeri*, examinando material obtido de raspagem do solo, base de árvores ou superfícies de pedras. Hertig (1942), no Peru, encontrou um fragmento de exuvia nas pedras que compunha uma parede. Forattini (1953), em São Paulo, observou a presença de *Lutzomyia intermedia* em chiqueiros ¹⁵.

Forattini (1954), em São Paulo, obteve uma fêmea adulta de *P. pessoai* e uma fêmea de *L. intermedia*, obtidas de terra coletada em base de arbustos e margem de um "esgoto" e seis adultos de *L. intermedia* de amostras de chiqueiros ¹⁴.

Hanson (1961) encontrou 2258 larvas de flebotomíneos, pertencentes a 15 espécies de flebotomíneos existentes no Panamá ¹⁸.

No Brasil, o primeiro encontro comprovado de formas imaturas de *Lutzomyia longipalpis*, foi realizado por Deane (1956), no Ceará, e posteriormente por Deane e Deane (1957) em um mesmo foco de leishmaniose visceral. Após o exame de 187 amostras de terras de várias procedências, encontraram as formas imaturas de *L. longipalpis* em amostras obtidas de currais de jumentos e sob pedras ^{7, 8, 17}.

Forattini (1973) faz ampla revisão dos achados de formas imaturas de flebotomíneos americanos no ambiente domiciliar, peridomiciliar e extradomiciliar, segundo ele, devido a destruição do habitat natural dos flebotomíneos e na dependência das condições favoráveis, os flebotomíneos possuem a capacidade de se adaptarem ao ambiente domiciliar humano e atingirem o meio urbano ¹³.

Deane e Deane (1967) citam que durante as estações secas as condições de trabalho são mais fáceis, pois os trechos com umidade e sombra, que garantem a evolução das fases imaturas dos flebotomíneos, ficam mais reduzidos ⁷.

Com relação ao estudo sobre a fauna de flebotomíneos envolvidos na cadeia de transmissão da LVA em focos do Brasil ficou evidente que a espécie predominante é a *L. longipalpis*^{7, 21, 35}. Apesar de outras espécies como a *Lutzomyia lenti*, *Lutzomyia evandroi* e demais que sugam lacertídeos, como *Lutzomyia trinidadensis*, *Lutzomyia oswaldoi* e *Lutzomyia villelai*, serem encontradas em menor número³⁵.

1.3.2 Controles biológicos aplicados a formas imaturas

Estudos realizados em laboratórios para a manutenção de colônias de *L. longipalpis*, mostraram que estas sofreram interrupções das gerações sucessivas da colônia, pela infecção brusca e maciça das larvas e pupas por fungos e ácaros que destroem também os ovos de *L. longipalpis*. O estudo e aplicação desses agentes biológicos em criadouros naturais de *L. longipalpis*, pode se tornar importante como medida de controle da doença²⁶.

Barjac (1981), demonstrou a susceptibilidade de larvas de *L. longipalpis* e *P. papatasi* ao *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis*, acrescentando doses de cristais, ou esporos e cristais, misturados à dieta larval². Wermelinger et al., (1992), demonstraram a atividade larvicida de uma amostra de *B. thuringiensis* subespécie *israelensis*, isolada em solo brasileiro, sobre larvas de *L. longipalpis*³⁹. Yuval e Warburg (1989) demonstraram experimentalmente, a susceptibilidade de adultos de *P. papatasi*, *P. argentipies*, *P. perniciosus* e *L. longipalpis* a concentrações de toxinas de *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* oferecidas em soluções açucaradas³⁶.

Wermelinger (1996), quantificou a atividade entomopatogênica de quatro linhagens de *Bacillus*, sobre larvas de *L. longipalpis*, determinando como sete dias o período de exposição à ração contaminada com o patógeno e o tempo de duração do bio ensaio até a contagem total das pupas obtidas no tratamento, calculando assim os percentuais de mortalidade. O *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* mostrou-se ativo, retardando significativamente o ciclo de desenvolvimento, sendo que, nas larvas mortas, o tegumento apresentou-se escurecido, sugerindo multiplicação bacteriana no interior do corpo larvar³⁸.

Killick-Kendrick e colaboradores em (1989), durante experimentos de laboratório com um nematódeo tetradonematídeo, encontrado em *P. papatasi* e *Phlebotomus*

sergenti, demonstraram ser facilmente transmitidos às larvas, acarretando nítido atraso no ciclo. Nos adultos infectados, os machos mostraram-se incapazes de acasalamento pelo fato de não conseguirem realizar a rotação normal da genitália; já nas fêmeas houve interferência no repasto sangüíneo, visto que não ingurgitaram, afetando a postura, não proporcionando um número de ovos normais ²⁰.

Secundino e colaboradores (2002) descreveram diversas larvas filiformes e ovos em diferentes estágios de um novo nematódeo com capacidade de interferir no desenvolvimento do ciclo evolutivo de *L. longipalpis* em colônias de laboratório. O nematódeo é encontrado no interior do aparelho digestivo dos adultos emergentes e também nas larvas dos flebotomíneos colonizados, provavelmente pelo hábito das larvas se alimentarem de adultos em decomposição. aplicados no campo, no futuro poderá funcionar como controle biológico em criadouros naturais ³³.

Segundo Feliciangeli et al. (1993) e Fausto (1998), poucos flebotomíneos tiveram os seus estádios imaturos estudados no passado, devido a dificuldade de obtê-los no meio natural. Porém, com o desenvolvimento de técnicas de criação e colonização desses insetos em laboratório, houve um incremento nesses estudos ^{10, 11}.

Até o momento, pouco se conhece sobre o desenvolvimento das formas imaturas dos flebotomíneos na natureza. Tal fato tem direcionado as operações de controle vetorial, utilizando inseticidas para o combate exclusivo dos flebotomíneos adultos. O clima, a vegetação e outros fatores ecológicos, são adequados a cada espécie de flebotomíneos e podem ser utilizados como medidas de controle biológico, a partir do momento que ficar conhecido o ciclo completo dos flebotomíneos.

O estudo em questão na tentativa de obter informações para o direcionamento do controle biológico, visando a redução populacional de insetos vetores, e conseqüentemente, de casos de leishmanioses Para os mosquitos, o combate larvar constitui excelente medida de controle. Para os flebotomíneos este método de controle ainda não é possível, pelo fato, de não serem conhecidos os criadouros naturais.

.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo obter o conhecimento tanto acerca dos criadouros naturais dos flebotomíneos com relação às características da densidade vetorial.

2.2 Objetivos Específicos.

- Identificar os criadouros das formas imaturas de *Lutzomyia longipalpis* no ambiente peridomiciliar e intradomiciliar em uma região do semiárido endêmica para Leishmaniose Visceral Americana.

- Avaliar a relação de possíveis fatores abióticos importantes como pluviosidade, umidade e temperatura, com a densidade vetorial e a emergência de formas imaturas nos criadouros naturais de flebotomíneos.

- Correlacionar aspectos de importância epidemiológica e consequente avaliação de medidas de controle para as leishmanioses.

3. MÉTODOS

3.1 Áreas de estudo

O distrito de Cavunge (12.3 ° Sul e 39.3° Oeste) está situado na região do semiárido do estado da Bahia, há uma distância de aproximadamente 60Km da cidade de Feira de Santana (Figura 02). Apresentando uma população de 15.331 habitantes e uma área dimensionada em 369,883 Km², a Caatinga e Mata Atlântica representam os biomas principais. Este distrito apresenta temperatura e pluviosidade média anuais em torno de 25°C e 95mm, respectivamente.

Foi obtida a densidade flebotomínica em vinte residências. As cinco com maior densidade foram selecionadas para este estudo. As amostras de solo e capturas entomológicas foram realizadas nestas residências.

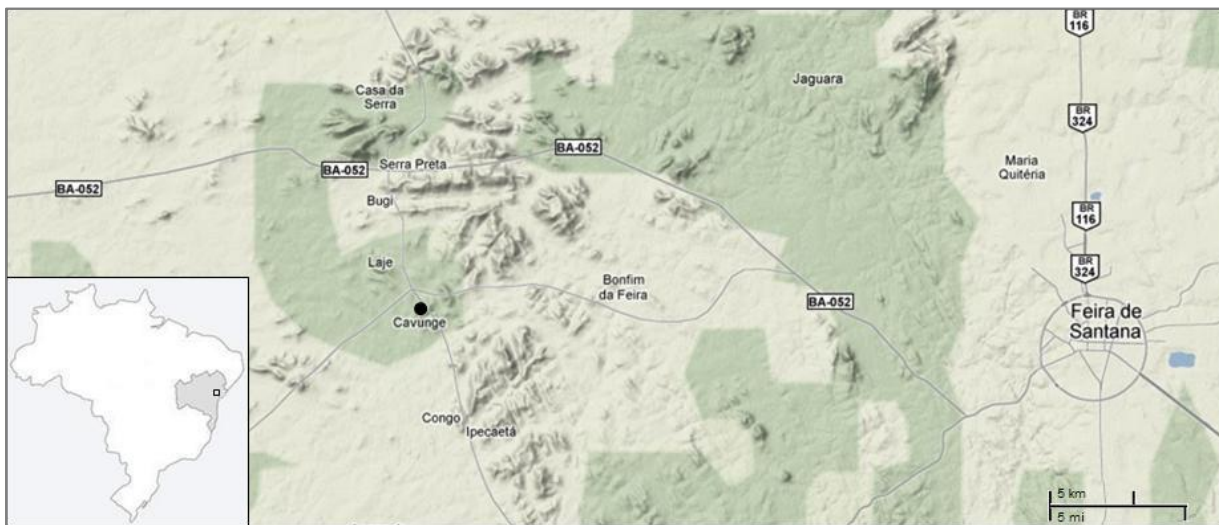


Figura 02: Distrito de Cavunge localizada no ponto preto. Fonte: Google Earth (vista em terreno). Fonte: Equipe do LIP.

3.2 Amostragens dos substratos

A coleta das amostras aconteceu em dois momentos. A primeira amostragem foi realizada no período de Junho de 2007 a Julho de 2008. Na primeira etapa, amostras de solo foram coletadas em pontos com ausência de luminosidade e presença aparente de umidade e matéria orgânica em decomposição, no ambiente intradomiciliar, peridomiciliar e extradomiciliar (delimitado por um raio de 200m das do intradomicílio) das cinco residências selecionadas para o estudo. As amostragens foram realizadas em microhabitats que apresentaram matéria orgânica em aparente decomposição e redução de luminosidade sendo armazenadas em potes circulares de plástico, com a base engessada similar aos utilizados para a manutenção das colônias em laboratório, porém com capacidade para 1L, uma adaptação mais econômica e prática à metodologia anteriormente utilizada para investigação de criadouros naturais (Figura 03). As amostras foram acondicionadas em caixas de isopor contendo chumaços de algodão

umedecidos, com a finalidade preservar a umidade das amostras durante o transporte (Figura 04). Todo o material coletado foi encaminhado à Unidade de Vigilância Sanitária (UVS) do município de Santo Estevão, localizado a aproximadamente 25 Km do distrito de Cavunge. Os microhabitats identificados como positivos, a partir das análises utilizadas, foram então selecionados para serem amostrados preferencialmente durante o período seguinte deste trabalho.



Figura 03: Substratos sendo coletado em potes plásticos de 1L com a base engessada. Fonte: José Carlos Miranda.



Figura 04: Amostras acondicionadas em isopor para transporte. Fonte: José Carlos Miranda.

Entre Agosto de 2008 a Julho de 2010, cerca de 64 amostras de solo foram coletadas mensalmente da mesma forma à da etapa anterior, totalizando 1523 amostras, nas mesmas cinco residências e armazenadas em recipientes semelhantes, porem, as coletas se limitaram ao que correspondiam ao intradomicílio e ao peridomicílio da primeira etapa, neste momento, estratificada de acordo com os microhabitats nessa segunda etapa. Diferentemente da primeira etapa, as coletas não seguiram no extradomicílio por este estudo também objetivar possíveis medidas de controles biológicos, sendo estes aplicados ao intradomicílio e ao peridomicílio das residências, Os microhabitats amostrados foram: cavidades de rochas (figura 05), entre raízes de um umbuzeiro (*Spondias tuberosa*) (figura 06), entre raízes de um flamboyant (*Delonix*

regia); Cavidades em um tronco caído (figura 07), ao redor de caixas d'água (figura 08) e locais úmidos do ambiente intradomiciliar (figura 09), foram selecionados de acordo com resultados prévios da nossa equipe e outros trabalhos publicados. Nesta segunda etapa do estudo, todas as amostras de solo coletadas foram enviadas ao Insetário de flebotomíneos, localizado no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM-FIOCRUZ/BA), sendo então analisadas por diferentes técnicas.



Figura 05: Coleta das amostras na cavidade de uma rocha. Fonte: José Carlos Miranda.



Figura 06: Fotografia de um umbuzeiro (A). Amostragem na raiz do umbuzeiro (B). Fonte: José Carlos Miranda.



Figura 07: Tronco de árvore caído (A). Coleta no tronco caído (B). Fonte: José Carlos Miranda.



Figura 08: Foto da caixa d'água (A). Amostragem em uma fenda ao redor da caixa d'água. Fonte: José Carlos Miranda.



Figura 09: Foto do Intradomicílio (A). Coleta de material na base de potes com a base úmida(B). Fonte: José Carlos Miranda.

3.3 Análises das amostras de solo

Duas técnicas foram utilizadas para identificar a presença de flebotomíneos nas amostras de solo: “Observação direta” e “Flutuação sem peneiramento”.

A técnica de observação direta, consiste na análise diária das amostras sob estereomicroscópio (Figura 05). Para a primeira etapa do projeto esta técnica foi utilizada em todas as 234 amostras em um período de observação correspondente a sessenta dias. Durante a segunda etapa da pesquisa, as 1523 amostras também foram submetidas a observação direta a partir do momento que chegaram no Insetário, e cada amostra foi analisada durante setenta dias, dez dias mais do que o tempo de análise usado na primeira etapa, em uma tentativa de superar possíveis fenômenos de diapausa. Para contabilizar a quantidade de flebotomíneos em uma amostra de solo, de acordo com esta técnica, foram consideradas as formas imaturas que não alcançaram a forma adulta, exúvias já contidas nestas amostras no momento da coleta, somadas as formas adultas emergidas.



Figura 10: Técnica de observação direta. Fonte: José Carlos Miranda.

Devido a ocorrências de formas imaturas (ovos, larvas e pupas) retidas no peneiramento em um teste piloto realizado em laboratório, a técnica de flutuação com peneiramento, de modo similar ao descrito por Mcombic-Young e aprimorado por Hanson, foi utilizada, retirando-se a peneira. De acordo com esta técnica, foi adicionada uma solução supersaturada de sal às amostras de solo, sendo o sobrenadante analisado (Figura 12).

De acordo com esta técnica, foi adicionado nas amostras uma solução supersaturada sal, sendo as formas imaturas ou exúvias em suspensão, coletados diretamente do sobrenadante, com auxílio de um pincel.



Figura 11: Peneiras usadas na técnica de Mc Combie-Young, retiradas no estudo. Fonte: José Carlos Miranda



Figura 12: Técnica de flutuação sem peneiramento. Fonte: José Carlos Miranda.

As amostras de formas imaturas, produto da técnica de flutuação, foram acondicionadas em álcool a 70% para serem submetidas a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com o intuito de melhor identificar e descrever as formas imaturas de flebotomíneos. Na plataforma de MEV, as amostras previamente fixadas em álcool 70% foram reidratadas em álcool 50% por 10 min, em seguida em 10 min no álcool 30%, em seguida foram lavadas três vezes em cacodilato com intervalo de 10 min de sódio a 0.1M e pós fixado em tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% contendo ferricianeto de potássio a 0,8% em tampão cacodilato 0.1M pH7.2 por 2ha temperatura ambiente. Após esta etapa, as amostras foram lavadas três vezes com cacodilato, em seguida com lavagens soluções crescentes de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100) por 10 minutos cada intervalo. A seguir, as amostras foram submetidas a secagem rápida no aparelho de ponto crítico com CO_2 líquido e laminado em ouro em um metalizador, e montadas em suporte para observação no microscópio eletrônico de varredura JSM 5600 JEOL.

3.4 Capturas entomológicas

Durante o período de Agosto de 2008 a Julho de 2010, nas mesmas residências selecionadas para coleta das amostras de solo, mensalmente uma armadilha luminosa do tipo HP (figura 13) foi alocada nos ambientes de peridomicílio e uma no intradomicílio. As armadilhas luminosas, alocadas um dia antes das coletas de amostras de solo, permaneceram nas residências durante o período de 18h as 06h do dia seguinte.

Todos os flebotomos capturados foram transferidos ao Insetário de flebotomíneos, localizado no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM-FIOCRUZ/BA), sendo identificados ao nível de espécie pela chave taxonomia de YOUNG & DUNCAN (1994).



Figura 13: Armadilha do tipo HP para captura de insetos adultos. No alto uma lâmpada com um ventilador para sucção, na parte inferior uma gaiola para permanência/manejo dos flebotomos em laboratório. Fonte: Equipe do LIP.

3.5 Dados climáticos

Os dados climáticos foram coletados através do instituto brasileiro de meteorologia, a partir da estação meteorológica de Feira de Santana. Dados como temperatura e umidade relativa (00 UTC). As médias mensais, foram calculados a partir das médias diárias dos dados de temperatura e umidade relativas, respectivamente. De mesmo modo, a quantidade de dias chuvosos e a média mensal de milímetros de chuva, foram disponibilizadas diretamente a partir da mesma instituição. A partir das médias diárias estabelecemos as médias semanais, e analisamos em uma semana, duas ou três semanas antes da data da coleta das amostras de solo e da captura de adultos.

3.6 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software Minitab Software

Foram realizadas Regressões-Múltiplas entre as variáveis climáticas e a quantidade de flebotomíneos encontrados, tanto em amostras de solo quanto capturados com armadilhas luminosas, a fim de obter a força de associação entre variáveis correlacionadas. Foram considerados dados estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

De Junho de 2007 a Julho de 2008, foram coletadas 234 amostras de solo em cinco residências no distrito de Cavunge. Destas, 12 foram identificadas como positivas entre todas as amostras coletadas nas cinco residências, de acordo com as técnicas de observação direta e flutuação com peneiramento, nos seguintes microhabitats: Cavidades de rochas (2), entre raízes de árvores (3), ao redor de uma caixa d'água (2) e sob fezes de galinha (2). Devido a estes resultados, as coletas de amostras de solo subsequentes foram direcionadas para estas residências e micro habitats, além de troncos caídos (2) e ambiente intradomiciliar (1) (tabela 01).

Tabela 01 Incidência das amostras positiva coletadas no intra, peri e intradomicílio durante a primeira etapa do estudo.

Localização	Amostras coletadas	Amostras positivas (%)	Técnicas utilizadas	
			Estereomicroscópio	Flutuação
Peridomicílio	210	8 (3,8%)	5	3
Intradomicílio	8	1 (12,5%)	0	1
Extradomicílio	16	3 (18%)	3	0
Total	234	12 (5,1%)	8	4

As amostras positivas representam 5,1% do total de amostras coletadas na primeira etapa do estudo.

De Agosto de 2008 a Julho de 2010, foram coletadas uma soma de 1523 amostras de solo provenientes de diferentes microhabitats do peridomicílio e do intradomicílio das mesmas cinco residências da primeira etapa. Utilizando as técnicas de observação direta por setenta dias e flutuação sem peneiramento, foram obtidas ao total 64 flebotomíneos: 40 adultos emergidos, 16 pupas e/ou exuvias e 8 larvas. Todos os 40 adultos foram identificados como *L. longipalpis*. Entre os substratos amostrados proporcionalmente o tronco caído mostrou uma incidência (9,09%) maior que os demais substratos, seguido das cavidades em rochas (4,03%) e a Caixa d'água (3,13%).

Tabela 02: As amostragens positivas na segunda etapa do estudo.

Microhabitats	Amostras coletadas	Amostras positivas (%)	Flebotomín eos
Fezes de galinhas	87	1 (1,15)	1
Tronco caído	55	5 (9,09)	14
Cavidades em paredes	105	1 (0,95)	1
Cavidades em rochas	521	21 (4,03)	24
Raízes de árvores	371	9 (2,43)	11
Fissuras na Caixa d'água	384	12 (3,13)	13
TOTAL	1523	49	64

No total de 1523 amostras, as 49 amostras positivas representam um percentual de 3,21%.

Como esperado em uma região de ocorrência da LVA, a espécie com maior frequência entre os flebotomos emergidos nas amostras de solo e dos capturados pelas armadilhas luminosas foi a *L. longipalpis*, representando no nosso estudo uma frequência de 95,3% dentre todos os indivíduos capturados (tabela 03).

Tabela 03: Relação das espécies de flebotomíneos adultos, capturados com a armadilha HP.

Especies	Intradomicílio		Peridomicílio		TOTAL
	M	F	M	F	
<i>L. evandroi</i>	2	1	4	2	9
<i>L. fischeri</i>	2	0	0	0	2
<i>L. lenti</i>	16	36	6	24	82
<i>L. longipalpis</i>	181	685	237	804	1907
<i>L. peresi</i>	2	0	0	0	2
TOTAL	203	722	247	830	2002

Quando cruzamos os dados climatológicos com a emergência de flebotomíneos nas amostras de solo, e observamos o efeito de cada uma das variáveis uma, duas ou três semanas antes das amostragens de solo, não observamos significância estatística ($p \leq 0,05$) de nenhuma dessas variáveis em relação a emergência de flebotomíneos nas amostras de solo,

assim como uma força de correlação moderada entre temperatura e emergência de flebotomíneos das amostras e uma força de correlação leve entre esta e as demais variáveis.

Tabela 04: Regressão - Múltipla entre as variáveis climáticas e os flebotomos emergidos das amostras.

Variáveis		R²	R²(adjusted)	p-value	
Temperatura	1 semana			0,740	A análi se de Regr essã o- Múlti pla entre as variá veis
	2 semana	9,5%	0,0%	0,825	
	3 semana			0,895	
Chuva (mm)	1 semana			0,903	
	2 semana	1,4%	0,0%	0,938	
	3 semana			0,845	
Dias Chuvosos	1 semana			0,579	
	2 semana	9,7%	0,0%	0,253	
	3 semana			0,640	
Umidade	1 semana			0,535	
	2 semana	13,5%	0,5%	0,422	
	3 semana			0,626	

climáticas e população de flebotomos capturados, revelou uma força de correlação média, em relação a temperatura, e leve entre as demais variáveis. Porém, diferente da correlação com os flebotomos emergidos das amostras, uma significância estatística foi constatada entre as médias semanais da temperatura referente a semana anterior a semana da coleta (tabela 05).

Tabela 05: Regressão - Múltipla entre as variáveis climáticas e os flebotomos adultos capturados.

Variáveis		R²	R²(adjusted)	p-value
Temperatura	1 semana			0,016
	2 semana	43,6%	35,1%	0,134
	3 semana			0,964

Chuva (mm)	1 semana			0,216	A s form as imat uras fora m sub meti
	2 semana	10,0%	0,0%	0,664	
	3 semana			0,747	
Dias Chuvosos	1 semana			0,543	
	2 semana	14,4%	1,5%	0,470	
	3 semana			0,626	
Umidade	1 semana			0,500	
	2 semana	16,4%	3,9%	0,652	
	3 semana			0,910	

dos a MEV (figura 14, 15 e 16).

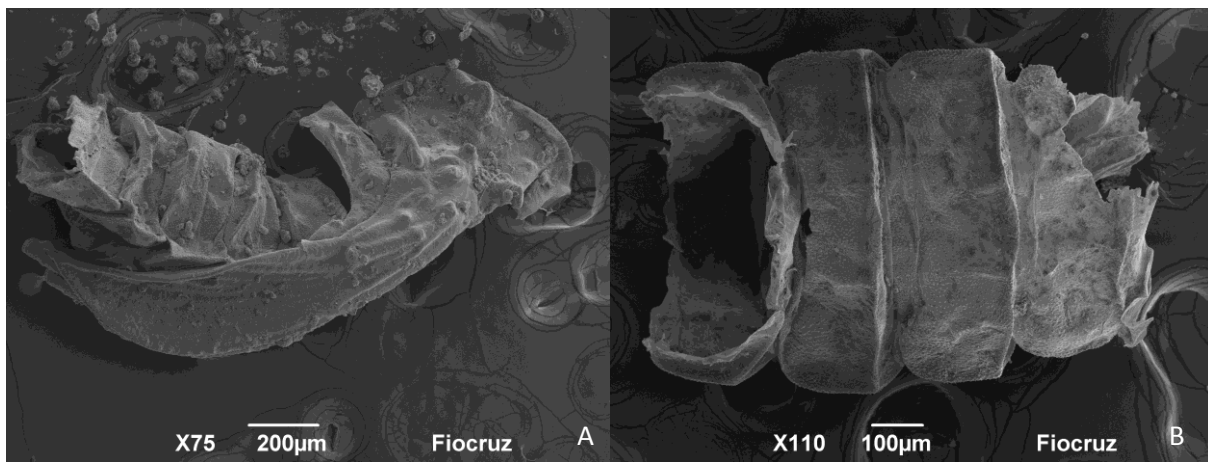


Figura 14: Exemplos de exúvias emergidas das amostras de solo. À direita (B), parte da região abdominal, à esquerda (A) parte do cefalotórax segmentos abdominais e asas. Fonte: Diego Ferreira de Oliveira.

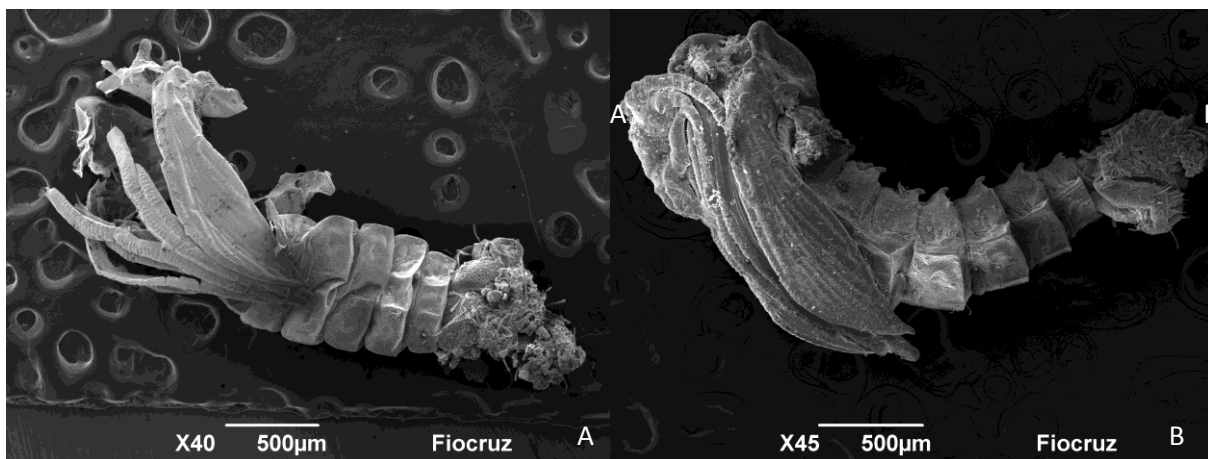


Figura 15: À esquerda (A) exemplo de uma exúvia rompida na região do cefalotórax. A direita (B) uma pupa íntegra. Fonte: Diego Ferreira de Oliveira.

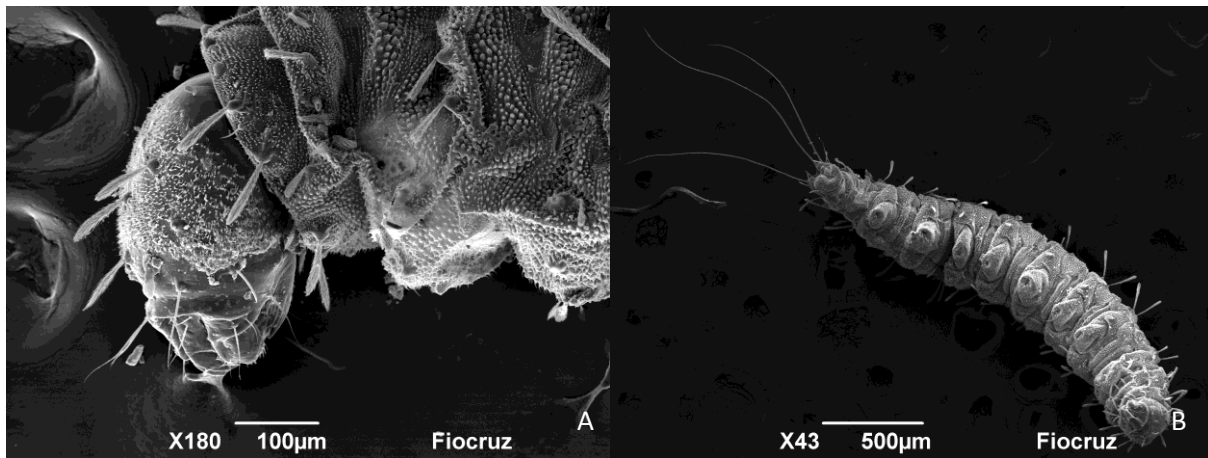


Figura 16: Cefalotórax de uma larva e a presença de cerdas (A). A direita (B), corpo de uma larva entre o 2 e 4 estágio de desenvolvimento larval, destacando os pseudópodos e os dois pares cerdas caudais. Fonte: Diego Ferreira de Oliveira.

5. DISCUSSÃO

A maioria dos lugares prováveis para o desenvolvimento de formas imaturas, os chamados criadouros naturais para flebotomíneos, podem ser representados por microhabitats diferentes, em diferentes regiões.

Em nosso estudo em Cavunge, um distrito com clima semiárido e vegetação tipicamente da caatinga, foram positivos as amostras coletadas em um tronco caído e entre as raízes das árvores, como encontrada em estudos anteriores, realizados em florestas tropicais^{5, 8}. Porém, alguns novos micros habitats como acumulados de solo em cavidade de rocha e nas fissuras do entorno de um tanque d'água, também foram sinalizadas como positivas para criadouros naturais.

Dentre os substratos mais prevalentes para criadouros naturais, o tronco de árvore caído e a caixa d'água, exibiram características previamente identificados por Deane, L e

Deane, M.P. (1957)⁹ e Newstead⁷ como susceptíveis de favorecer o desenvolvimento de formas imaturas. Tanques de água são permanentemente preenchidos com água, o que eleva a umidade, e, conseqüentemente sua presença em fendas no solo. Deane, L.M (1957) também encontrou formas imaturas e observou a emergência de formas adultas de flebótomos nas amostras de terra úmida colhida sob a superfície de pedras pequenas, terra com fezes de animais campestres e no raspado da superfície do tronco e das raízes de duas mangueiras.

Os resultados encontrados, também se assemelham aos estudos de Newstead (1910) quando o mesmo encontrou duas larvas em fendas entre pedras soltas, na cidade de Malta. No ano seguinte, estudando os criadouros naturais também em Malta, assinalou que os lugares em que as larvas foram encontradas apresentavam umidade (porem não excessiva), presença de material orgânico e ausência de luz, assim como foram selecionados os pontos de coleta das amostras do presente estudo.

As amostragens realizadas em galinheiros contendo fezes de galinhas, embora em expressão relativamente pequena, assemelham-se aos resultados de Mitter (1919) quando o mesmo encontrou larvas e pupas em porões e galinheiros, e Forattini (1953), quando o mesmo encontrou um inseto adulto eclodido de um substrato, também contendo fezes de galinhas.

Como esperado em uma região afetada por LVA, a espécie com maior frequência entre os flebótomos emergidos nas amostras de solo e dos capturados pelas armadilhas luminosas foi a *L. longipalpis*. Em estudos realizados em florestas tropicais^{5, 8}, vários dos vetores tipicamente conhecidos pela literatura como vetores para LTA foram abundantes. No entanto, *L. longipalpis* muitas vezes é predominante em locais secos ou urbanos em que a leishmaniose visceral ocorre^{13, 20}.

Com relação à técnica de observação do surgimento e desenvolvimento das formas imaturas, através do estereomicroscópio, se mostrou eficaz, assemelhando-se aos trabalhos de Howlett (1913) na Índia quando o mesmo observou larvas e pupas obteve a eclosão de flebotomíneos adultos, e Alencar et al (2011) quando os mesmos observaram em 200 amostras uma eficiência de 75%, na confirmação de criadouros naturais analisando formas imaturas.

A mudança no tempo de observação das amostras de solo de sessenta dias, durante a primeira etapa do projeto, para setenta dias, foi muito importante, pois acrescentou uma margem de dez dias para a evolução de larvas e principalmente dos insetos adultos, que pudessem estar em diapausa como apontado por Forattini, e, conseqüentemente, facilitando a identificação.

As armadilhas utilizadas por Casanova em seus trabalhos em 2001, são bem empregadas quando se busca a diminuição de interferentes nas análises dos substratos, pois evitam as alterações do manejo das amostras e os interferentes antrópicos causados pela manutenção e observação das amostras, podendo também servir para estimar a produção de flebotomos diária para cada 100 m² assim como Rutledge e O Elenwood (1975) no Panamá e Arias e Freitas em (1982) no Brasil. Em contra partida, o trabalho do mesmo acaba limitando-se a considerar substratos positivos apenas pela eclosão de formas adultas, não submetendo as amostras de solo a técnicas mais sensíveis como a flutuação, na tentativa de encontrar formas imaturas em diapausa, como desenvolvida por este estudo.

A combinação de duas técnicas para a análise das amostras, e conseqüentemente identificação das formas imaturas que não chegaram à fase adulta foram importantes para a confirmação de amostras falso-negativas, caso utilizássemos somente a observação em lupa, possivelmente, as amostras de solo já positivariam se fossem aplicadas diretamente à técnica de flutuação descrita por Hansson, por ser uma técnica mais sensível, o que ao nível de controle biológico e respostas aos órgãos de saúde seria mais interessante, uma vez que, seria economizado os setenta dias de observação em lupa, possibilitando uma resposta mais rápida à intervenção de um controle biológico. Porém, até então, não existem chaves taxonômicas que utilizem formas imaturas para a identificação de flebotomíneos, o que limitaria a sensibilidade da técnica apenas a confirmação de substratos possíveis de serem criadouros naturais, sem identificar as espécies. Alguns estudos mais recente utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) vem caracterizando morfologicamente sensilas, tricoides, superfícies de ovos larvas e pupas de formas imaturas de flebotomíneos, porém, não existe por parte dos entomologistas a definição de uma ou mais estruturas certas de servirem como instrumento taxonômico.

Análise das relações entre a densidade de flebotomos e as variáveis climáticas, resultou em associação de forças moderada quando analisado flebotomos adultos capturados e a temperatura média das semanas anteriores a coletas. Tal relação não foi observada em estudos anteriores de associação entre a densidade de flebotomíneos e variáveis climáticas, nos quais identificaram a ausência de influências climatológicas na densidade de flebotomos ¹¹, ¹² ou uma tendência para aumento, logo após a temporada de chuvas ¹³, ¹⁴. Esta relação estreita possivelmente contribuiu para o quadro ainda incerto de variáveis climáticas possíveis que interferem na densidade flebotomínica em uma região de clima seco.

No estudo de Deane ⁵, a pequena quantidade de flebotomíneos encontrados em amostras de solo não esteve relacionada com a de grande quantidade de adultos capturados, indicando que os criadouros naturais não foram amostrados em quantidade suficiente.

Uma hipótese para a não relação significativa entre a produção de flebótomos nos criadouros e as variáveis climáticas é sugerida por Dias Lima (2002) quando este cita que os ovos postos pelas fêmeas aguardam o momento mais propício, com limites mínimos de umidades para que haja a eclosão das larvas.

As análises entre dados climatológicos com possíveis interferentes nos criadouros e na população de flebótomos, feitas pelo nosso estudo sofreu limitações, uma vez que, a aferição dos dados não foi feita em loci, mas cerca de 40km a partir do local de estudo.

Da mesma forma, a ausência de replicação para os micro-habitat amostrados foi um impedimento para continuar as análises estatísticas que poderiam levar a uma comparação entre a densidade de flebótomos adultos e eclosão das formas imaturas, como as realizadas nos trabalhos de Casanova (2001) e Freitas (1982).

6. CONCLUSÕES

O presente estudo elucidou vários micros habitats como prováveis criadouros naturais, alguns novos, outros anteriormente descritos pela literatura. A combinação e o aperfeiçoamento das técnicas utilizadas para análise das amostras foi fundamental para alcançar os resultados deste estudo. O trabalho em questão esclareceu algumas relações possíveis entre a densidade do vetor e variáveis climáticas, como a utilização não só da pluviometria, mas também da temperatura como preditores da densidade de flebotomíneos em uma região de clima seco. O melhor entendimento em relação aos efeitos da ação conjunta desses fatores abióticos forneceram informações úteis dos períodos e locais preferenciais para aplicação de inseticidas, e informações relevantes para futuros estudos com outras formas de controle biológico.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALENCAR, R.B., 2007. Emergência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em chão de floresta de terra firme na Amazônia Central do Brasil: Uso de um modelo modificado de armadilha de emergência. *Acta Amazônica* 37, 287-292.

- 2 BAHIA-NASCIMENTO, A.; SECUNDINO, N. F. C. ; MIRANDA, J. C. ; PRATES, D. ; SOUZA, A.; FERNANDES, F. F. ; BARRAL, A. ; PIMENTA, P. F. P. - Ultrastructural comparison of the external morphology of the immature stages of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* and *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Diptera: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis, by scanning electron microscopy. *Journal of Medical Entomology*, 2007 2010.

- 3 BARRETTO, M. - Morfologia dos ovos, larvas e pupas de alguns flebotomos de São Paulo. *Ann. Fac. Méd. Univ. São Paulo*, 17:357-427, 1941 .

- 4 BARRETTO, M.P. - Observações sobre a biologia, em condições naturais, dos flebotomíneos do Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae). São Paulo 1943. (Tese Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

- 5 CASANOVA, C., 2001. A soil emergence trap for collections of phlebotomine sandflies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 237–275.

- 6 COUTINHO, J.O., BARRETTO, M.P., 1941. Dados bionômicos sobre o “*Phlebotomus fischeri*” Pinto, 1926 (Diptera: Psychodidae). *Rev. Bras. Biol.* 1, 423–429.

- 7 DEANE, L., DEANE, M.P. (1957) Observações sobre abrigos e criadouros de flebotomos no Noroeste do Estado do Ceará . *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, 9, 225–246.

- 8 DEANE, L.- Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores no Estado do Ceará. Rio de Janeiro, Serviço Nacional Educação Sanitária, 1956.

- 9 DIAS-LIMA, A.G, CASTÉLLON, E.G., SHERLOCK, I. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma floresta primária de terra firme da estação experimental de silvicultura tropical, estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica* 33, 303-316.

- 10 FAUSTO, A.M.; FELICIANGELI, M.D.; MAROLI, M.; MAZZINI, M. - Morphological study of the larval spiracular system in eight *Lutzomyia* species (Diptera: Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93:71-79, 1998

- 11 FELICIANGELI, M.D.; CASTEJON, O.C.; LIMONGI, J. - Egg surface ultrastructure of eight

new world phlebotominae sand fly species (Díptera: Psychodidae). J. Méd. Entomol., 30:651-656, 1993.

12 FERREIRA, L.C., DEANE, L., MANGABEIRA FILHO, O.,. Sobre a biologia dos flebotomos das zonas de leishmaniose visceral ora em estudo no Pará (1938). O Hospital 14, 1079–1082.

13 FORATTINI, O.P. - Entomologia médica, 4º Volume, Editora Edgard Blucher LTDA, São Paulo, 1973.

14 FORATTINI, O.P. - Algumas observações sobre biologia de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em região da bacia do rio Paraná (Brasil). Arq. Fac. Hig. S.Paulo, 8:15-136, 1954.

15 FORATTINI, O.P. - Nota sobre criadouros naturais de flebotomíneos em dependências peridomiciliares, no Estado de são Paulo. Arq. Fac. Hig. S. Pub. Univ. são Paulo, 7(2), 1953.

16 GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. International Journal for Parasitology, v.35, n.11-12, p.1169-1180, 2005

17 GUITTON, N. & SHERLOCK, I.A. - Descrição das fases imaturas do "*Phlebotomus longipalpis*" Lutz & Neiva, 1912 (Diptera Psychodidae). Rev. Bras. Bio1., 29(3): 383-389, 1969, Rio de Janeiro, G.B.

18 HANSON, J., 1961. - The breending p1aces of Phlebotomus in Panamá (Diptera,Psychodidae). Ann. Ento Soco Amer., 54(3): 317-322 .

19 HINTON, H. E. & M. W. - Service (1969): The surface structure of aedine eggs seen with the scanning electron microscope. Ann. Trop. Med. Parasit. 63, 409-411.

20 KILLICK-KENDRICK, R., KILLICK-KENDRICK, M., QALA, N.A. ET AL. – Preliminary observations on a tetradonematid nematod of phlebotomine sandflies of Afghanistan. Ann. Parasitol. Hum. Comp., v.64, p. 332-339, 1989.

21 KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; LEGER,N.; PESSON, B.;MADULOLEBLOND, M.- Absence of outer caudal setae on all larval instar of *Phlebotomus tobii* from Ionion Greek Island. Med. Vet. Entomol., 3:131-135, 1989.

22 LAINSON, R.- The american leishmaniases : Some observations on theirecology and epidemiology. Trans. Royal. Soe. Trop. Med. Hyg., 77(5): 569-596,1983.

23 LEITE ACR, WILLIAM P 1996. Description of the fourth larva of *Lutzomyia longipalpis*, under scanning electron microcopy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 9: 571-578.

24 LEITE ACR, WILLIAM P 1997. The first instar larva of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotomidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 91: 571-578.

25 Marcondes CB 2001. Entomologia médica e veterinária. 1st ed., Athemueu, São Paulo, XIX + 432pp.

26 MIRANDA JC 1998. Combinação da captura dirigida e PCR na detecção de flebotomíneos naturalmente infectados por *Leishmânia*, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, pp.

27 MIRANDA, J.C. – O desenvolvimento de *Leishmania (Viânia) braziliensis* no flebotomíneo *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* e a influência da alimentação sanguínea em animais domésticos. Tese Doutorado – Instituto Oswaldo Cruz, 78 f. Rio de Janeiro, 2005.

28 NEWSTEAD, R. (1912) The papataci flies (Phlebotomus) of the Maltese Islands. Bulletin of Entomological Research, 2, 47–78.

29 PESSOA SB, MARTINS AV 1978. Parasitologia médica. 10th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 986p.

30 PIFANO, F., 1941. La leishmaniosis tegumentaria em el Estado Yaracuy, Venezuela. Gac. Med. Caracas 48, 292–299.

31 REY, L. Parasitologia. 2. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1991. 731p.

32 ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. PLoS Negl Trop Dis, v. 4, n. 1, p. e584, 2010.

33 SECUNDINO, N.F.C., ARAÚJO, M.S.S., OLIVEIRA, G.H.B., MASSARA, C.L., CARVALHO, O.S., LANFREDI, R.M., PIMENTA, P.F.P. – Preliminary description of a new entomoparasitic nematode infecting *Lutzomyia longipalpis* sand fly, the vector of visceral leishmaniasis in the New World. Journal of Invertebrate Pathology, v. 80, p. 35-40, 2002.

34 SHERLOCK IA, GUITTON N 1969 - Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. IV. Variação horária e estacional de *Phlebotomus longipalpis*. Rev Bras Malac 21: 715-727.

- 35 SHERLOCK, I.A. & MIRANDA, J.C. - Observations on the ecology of visceral leishmaniasis in Jacobina, state of Bahia, Brazil (1982 to 1986). Ottawa International Development Research Centre - MR322 e, June 1992, 54-80.
- 36 TAVARES-NETO, J., BARRAL, A., QUEIROZ-ANDRADE, M., OLIVEIRA, S. – Caracterização sócio-demográfica da população do povoado de Cavunge, Bahia. Revista Baiana de Saúde Pública, 26, 2002.
- 37 WARBURG, A.; FAIMAN, R. Research priorities for the control of phlebotomine sand flies. J Vector Ecol, v. 36 Suppl 1, p. S10-6,
- 38 WERMELINGER, E.D. – Quantificação da Atividade Entomopatogênica de Algumas Espécies de *Bacillus* sobre Larvas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) – Dissertação Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, MG, 89 p.
- 39 WERMELINGER, E.D., ZAHNER, V., CAVADOS, C.F.C. ET AL. – Susceptibilidade das larvas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) ao *Bacillus thuringiensis* sorotipo *israelensis* LFB-FIOCRUZ 710, em laboratório. In: Anais-Águas de Lindóia, SP, CNPDA/EMBRAPA, p.287.
- 40 WORLD HEALTH ORGANIZATION. - Programme for the surveillance and control of leishmaniasis. <http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>, 2001.
- 41 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). Mem. Am. Entomol. Inst., 54:1-81, 1994.

8. ANEXOS

8.1 Artigo Publicado.

Published in; Hindawi Publishing Corporation, Journal of Tropical Medicine. Volume 2012, Article ID 124068, 5 pages doi: 10.1155/2012/124068

Research Article

Natural Breeding Places for Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in a Semiarid Region of Bahia State, Brazil

Bruno Sangiorgi,¹ Daniel Neves Miranda,¹ Diego Ferreira Oliveira,¹ Edivaldo Passos Santos,¹ Fernanda Regis Gomes,¹ Edna Oliveira Santos,¹ Aldina Barral,^{1, 2,3} and José Carlos Miranda¹

¹ *Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, 40295-001, Salvador, BA, Brazil*

² *Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, 40025-010, Salvador, BA, Brazil*

³ *Instituto de Investigação em Imunologia, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, Ciência e Tecnologia (INCT), 05403-900 Cerqueira Cesar, SP, Brazil*

Correspondence should be addressed to Bruno Sangiorgi, brunosangiorgi@gmail.com

Received 21 August 2011; Revised 29 October 2011; Accepted 5 December 2011

Academic Editor: Marcelo Ramalho-Ortigao

Copyright © 2012 Bruno Sangiorgi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Few microhabitats have been previously identified as natural breeding places for phlebotomine sand flies so far, and little is known about the influence of climate variables in their density. The present study was conducted in a dry region with a semiarid climate, where visceral leishmaniasis occurs in humans and dogs. The occurrence of breeding places in specific microhabitats was investigated in soil samples collected from five houses, which were also the location used for sampling of adults. All the microhabitats sampled by our study were identified as natural breeding places due to the occurrence of immature forms of sand flies. On a weekly basis, the number of adult sand flies captured was positively correlated with the mean temperature from preceding weeks. These results, in addition to promoting an advance in the knowledge of sand flies biology, may furnish a tool for optimizing the control of the sand flies, by indicating the most suitable periods and microhabitats for the application of insecticides.

1. Introduction

Despite the medical importance of leishmaniasis, little is known about the natural breeding places of its vectors. Most previous attempts to identify the preferred microhabitats for the oviposition of sand flies in the Neotropical region have produced disappointing yields, resulting in a small number of positive soil samples and immature forms [1–4]. Some recent studies (e.g., Alencar [5] and Singh [6]), however, have successfully obtained high amounts of immature forms due to the sampling of suitable places for larval development.

As observed by Newstead [7], the immature forms of sand flies are more concentrated in microhabitats that exhibited specific conditions, as the presence of organic matter, humidity, and low levels of light. Studies conducted in rain

forests (e.g., Hanson [8], Alencar et al. [5]) corroborate these observations, as shown by the greater numbers of immature forms found in soil with litter, between roots and under fallen trunks. Similar edaphic conditions, although in different

microhabitats such as soil cracks, have also been observed in studies conducted at regions with dry climates (e.g., Deane and M. P. Deane [9], Ferreira et al. [1]), to be more likely to find immature forms of sand flies.

Dry climate regions experience more pronounced climatic variations than regions with humid climates typical of rain forests, so the density of vectors may exhibit different characteristics as well. Studies conducted in rain forest regions (e.g., Hanson [8], Dias-Lima et al. [10]) observed high densities of vectors throughout the entire study period. In contrast, studies from dry climate regions presented controversial results, as the absence of correlation between climate variables and sand flies density [11, 12], or increasing of density soon after rainy periods [13, 14].

The knowledge about natural breeding places for sand flies and vector density may represent useful information for directing efforts at biological control, leading to reduce the density of the vectors and consequently control the incidence of disease [15, 16]. In the present study, we aimed



Figure 1: Location of Cavunge district and positive microhabitats (a) Typical scenario from Cavunge: trees with exposed roots along with exposed rocks (b) soil accumulated between exposed roots of a *Spondias tuberosa* tree (c) a fallen trunk (d) a water tank. (e) location of Cavunge district.

to characterize the natural breeding places for sand flies in a region with a dry climate and a known incidence of visceral leishmaniasis during the past 20 years. Additionally, we investigated the possibility of association between the density of adults or immature sand flies with climate variables, assessing the predictive value of these variables on sand flies density.

2. Methods

2.1. Area of Study. The Cavunge district (12.3°S; 39.3°W) is located in a semiarid region of Bahia state (Figure 1). This district has 63.5 km² of area in which the Caatinga, a type of vegetation characterized by dispersed bushes and deciduous trees, is the major biome. Breeding sites were searched in five residences, as the owners allowed samplings both inside and in places adjacent to their houses.

2.2. Soil Sampling. During the first period of this study, from June 2007 through July 2008, soil samples at low-light places with apparent decomposed organic matter, were collected from areas immediately adjacent to the five residences selected by our study group. These samples were gathered with a regular spoon and stored in cylindrical receptacles with a capacity of 1 L. Microhabitats from which positive samples were collected were then chosen for more intensive sampling during the subsequent study period.

During the second period of our study, from August 2008 through July 2010, approximately 64 soil samples were monthly collected at the same five residences and stored in similar receptacles. According to the results from the first year of study, the soil was sampled in the following microhabitats: cavities in rocks; areas between the roots of a *Spondias tuberosa* tree; areas between the roots of a *Delonix regia* tree; cavities in a fallen tree trunk; cracks around a water

tank; areas covered with chicken feces; low-light places inside a house (e.g: hollows in walls, floor and around clay jugs). All soil samples were sent to an insectarium at the Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), being analyzed with different techniques.

2.3. Processing of Soil Samples. During the entire period of study, three different techniques: direct-observation, flotation-sieving, and flotation technique were utilized to identify the presence of sand flies in the soil samples.

The direct-observation technique was used to examine all soil samples until sixty days after their arrival at the insectarium. This technique consisted by daily observation of the receptacles containing the soil samples in two different ways: by naked eye, so to find adult sand flies through the translucent cover of the 1L receptacles, and with a stereomicroscope, aiming to find immature forms in the soil. To count the number of sand flies in a soil sample, we included immature forms that reached the adult stage, immature forms that did not reach the adult stage but were similar to other larval stages (larvae and pupae) present in our laboratory colony of *L. longipalpis*, and the adults whose previous larval stages had not been detected.

After the period corresponding to the direct observation technique, all soil samples were submitted to the flotation-sieving technique or the flotation technique.

The flotation-sieving technique, as described by Hanson [8], was used only in the soil samples from the first part of the study. According to this technique, each soil sample was removed from the receptacles and disposed in a sieve. The soil was then washed with tap water through the sieve and through another two sieves, consecutively, with smaller pores each. The material that passed through the three sieves was then suspended with a saturated sugar solution, in order that immature forms could be found floating in the high-density solution.

Due to the retention of immature forms on the sieves

study, and consequently loss of information about the real quantity of immature forms in the soil samples, the sieves were replaced by flotation for the second part of the study. With the flotation technique, a saturated salt solution was simply added to the soil samples and allowed the immature forms to float.

Following floatation-sieving and flotation, the immature forms suspended by a high density solution, were collect-

cylindrical receptacles, remaining there for 60 days. These vessels were one-third filled with plaster covered by a ration composed by a mixture of rabbit feces, commercial hamster ration and small quantity of soil from the original substrate. The 2 inch hole in the bottom of these containers allowed keeping the plaster constantly humid due to the directly contact with a moist paper towel.

The adult sand flies gathered from direct observation, flotation-sieving and flotation techniques were stored in covered glass slides with mounting media and identified at species level based on the identification key proposed by Young and Duncan [17].

2.4. Sampling of Adults. During each month of the second part of the study, one day before the soil sampling, two HP light traps, one inside the residence, and another in the adjacencies, were placed in every one of the same five residences used for soil sampling. The light traps were operated from 6 pm to 6 am, period also used by other authors due to the known nocturnal activity of several sand flies species [18, 19]. All captured sand flies were transferred to the sand fly insectarium at CPqGM. At the arrival moment, adults were individually stored in covered glass slides with mounting media, following by identification at species level based on the identification key proposed by Young and Duncan [17].

2.5. Climate Data. Climate data were obtained by the National Institute of Meteorology (INMET) from the Feira de Santana meteorological station, placed at about 40 km of distance from Cavunge district. Daily means from temperature, and relative humidity were provided directly from the INMET, which calculated these data through the arithmetic means from records of maximum and minimum temperature or relative humidity at 9 am, 3 pm and 9 pm, respectively. Otherwise, daily rainfall was measured by a single record of millimeters of rain in a day.

Daily rainfall and daily averages for temperature, and relative humidity were used to obtain the averages of these variables on a weekly basis. Weekly averages of rainfall, temperature and relative humidity were calculated through the arithmetic means of daily rainfall, mean temperature and mean relative humidity, respectively, at one up to three weeks before the soil or adult sampling days. Thus, the density of immature or adult sand flies was correlated by statistical analyses with the preceding weekly averages from the climate variables.

Table 1: Positive microhabitats and sand flies yield.

Microhabitat	Collected samples	Positive samples	Sand flies
Chicken feces	87	1	1
Fallen tree trunk	55	5	14
House interior	105	1	1
Rock cavities	521	21	24
Tree roots	371	9	11
Water tank	384	12	13
Total	1,523	49	64

Table 2: Species of sand flies identified following sampling of adults.

Species	Inside houses		Adjacent to houses		Total
	M	F	M	F	
<i>L. evandroi</i>	2	1	4	2	9
<i>L. fischeri</i>	2	0	0	0	2
<i>L. lenti</i>	16	36	6	24	82
<i>L. longipalpis</i>	181	685	237	804	1,907
<i>L. peresi</i>	2	0	0	0	2
Total	203	722	247	830	2,002

2.6. Statistical Analyses. From Minitab software, multiple linear regression analyzes were performed for the yield of sand flies in the soil or adult sampling in each month and the average of climate variables at one up to three weeks before soil or adult sampling days.

3. Results

During the first period of this study, 234 soil samples were collected from five residences in the Cavunge district. Nine of these samples were identified as positives by direct-observation or flotation-sieving technique in the microhabitats and included rock cavities (2), between the roots of *Spondias tuberosa* (2), between the roots of *Delonix regia* (1), soil cracks around a water tank (2), soil covered with chicken feces (2). Based on these results, these microhabitats were sampled intensively during the second study period, in addition to accumulated soil in cavities from a fallen tree trunk and low light microhabitats from a residence interior.

During the second period of this study, a total of 1,523 soil samples were collected from different microhabitats (Table 1). The direct-observation and flotation techniques yielded a total of 64 sand flies, including 40 emerged adults, 16 larvae and 8 pupae. Of 58 emerged adults or immature forms that reached the adult form, 48 were identified as *L. longipalpis*, whereas 10 were not identified at the species level.

A total of 2,002 sand flies were collected with light traps during the second period of the study. Species in addition to those found in the soil samples were identified as follows: 9 *L. evandroi*, 2 *L. fischeri*, 82 *L. lenti*, 1,907 *L. longipalpis*, and 2 *L. peresi* (Table 2).

Table 3: Multiple-regression analysis among climate variables and sand flies yield from sampling of adults.

Variable	R ²	R ² (adjusted)	P value
Average temperature			
1 week			0.016
2 weeks	43.6%	35.1%	0.134
3 weeks			0.964
Average rainfall (mm)			
1 week			0.216
2 weeks	10.0%	0.0%	0.664
3 weeks			0.747
Average rainfall (days)			
1 week			0.543
2 weeks	14.4%	1.5%	0.470
3 weeks			0.626
Average humidity			
1 week			0.500
2 weeks	16.4%	3.9%	0.652
3 weeks			0.910

Table 4: Multiple-regression analysis among climate variables and sand flies yield from soil sampling.

Variable	R ²	R ² (adjusted)	P value
Average temperature			
1 week			0.740
2 weeks	9.5%	0.0%	0.825
3 weeks			0.895
Average rainfall (mm)			
1 week			0.903
2 weeks	1.4%	0.0%	0.938
3 weeks			0.845
Average rainfall (days)			
1 week	9.7%	0.0%	0.579
2 weeks			0.253
3 weeks			0.640
Average humidity			
1 week	13.5%	0.5%	0.535
2 weeks			0.422
3 weeks			0.626

The yield of adult sand flies captured by HP light traps and the average temperature from the preceding week were associated at a moderated strength of association (Table 3). However, only the average temperature of the preceding week was found to be correlated significantly. All other climate variables in the preceding weeks were not significantly correlated with adult or immature sand flies yield (Table 4).

4. Discussion

Natural breeding places for phlebotomine sand flies, as the most likely places for the development of immature forms, may be represented by different microhabitats in different regions. In our study at Cavunge, a district with semiarid climate and Caatinga vegetation, positive soil samples were collected from a fallen trunk and between trees roots, as found in previous studies conducted at rain forests [5, 8]. Moreover, novel microhabitats, such as accumulated soil in rock cavities and from cracks around water tanks, were identified as positive for natural breeding sites.

Rock cavities in exposed rocks and cracks around a water tank, two of the most positive microhabitats, exhibit characteristics previously identified by Deane and M. P. Deane [9] and Newstead [7] as likely to favor the development of sand flies' immature forms. Rock cavities constitute microhabitats for larval development as they are poorly naturally illuminated. Additionally, water tanks are permanent filled with water, what leads to humidity and the presence of moist cracks in the soil.

As expected in a region affected by visceral leishmaniasis, most of the sand flies from the soil samples or captured by the light traps were identified as *L. longipalpis*. In studies conducted in rain forests [5, 8], several of the vectors of cutaneous leishmaniasis were abundant. However, *L. longipalpis* is often predominant in dry or urban locations in which visceral leishmaniasis occurs [13–20].

Analysis of the relationships between sand fly density and climate variables resulted in moderated strength association between adult sand flies captured and the average temperature from the preceding weeks. Such relationship was not observed by previous studies of associations between sand flies density and climate variables, which identified the absence of climatological influence in sand flies density [11, 12], or a trend for increasing soon after raining seasons [13, 14]. This novel possible relation contributes to the still uncertain framework of possible climate variables that interferes in the sand flies density in a dry climate region.

The analyses among climate data and sand flies density made by our study suffered limitations, because data gathering was not made *in loci*, but at approximately 40 km from the study site. Likewise, the absence of replication for the microhabitats sampled was an impediment to further statistical analyses that could lead to a comparison among adult and immature sand flies density. However, our study has identified several microhabitats as natural breeding sites and elucidated some possible relationships between vector density and climate variables that jointly should provide useful information from preferred periods and sites for application of insecticides.

5. Conclusions

The sand flies natural breeding places, as well as climate variables associated with vectors density, despite their potential to assist the biological control, are poorly understood so far. Our study points to several microhabitats that may serve as natural breeding places for phlebotomine sand flies

in a semiarid region and also elucidate that temperature decreasing may be a predictor for the increasing of vector density in a dry climate region. Altogether, our results may furnish a tool for optimizing the control of the sand flies, and consequently, the anthropic and zoonotic cases of visceral leishmaniasis.

Acknowledgments

The authors are grateful to the fellowships provided from

- [12] M. L. Condino, S. M. Sampaio, L. F. Henriques, E. A. Galati, D. M. Wanderley, and F. M. Corrêa, "American cutaneous leishmaniasis: sandflies from the transmission area in the town of Teodoro Sampaio, the southeastern region of São Paulo state, Brazil," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 31, no. 4, pp. 355–360, 1998.
- [13] E. M. Michalsky, J. C. França-Silva, R. A. Barata et al., "Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 104, no. 1, pp. 56–61, 2009.
- [14] C. M. de Souza, J. E. Pessanha, R. A. Barata, E. M. Monteiro, Fundação de Amparo à

Pesquisa do. This work was supported by grants from CNPq, program PAPES V (FIOCRUZ/ CNPq) and FAPESB. Bruno Sangiorgi was supported by a fellowship from FAPESB. Aldina Barral is a senior investigator from CNPq.

References

- [1] L. C. Ferreira, L. Deane, and O. Mangabeira Filho, "Sobre a biologia dos flebotomos das zonas de leishmaniose visceral ora em estudo no Pará," *O Hospital*, vol. 14, no. 5, pp. 1079–1082, 1938.
- [2] F. Pifano, "La leishmaniosis tegumentaria em el estado yaracuy, Venezuela," *Gaceta Médica de Caracas*, vol. 48, pp. 292–299, 1941.
- [3] J. O. Coutinho and M. P. Barretto, "Dados bionômicos sobre o "Phlebotomus fischeri" pinto, 1926 (Diptera: Psychodidae)," *Revista Brasileira de Biologia*, vol. 1, no. 4, pp. 423–429, 1941.
- [4] C. Casanova, "A soil emergence trap for collections of phlebotomine sand flies," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 96, no. 2, pp. 273–275, 2001.
- [5] R. B. Alencar, R. G. de Queiroz, and T. V. Barrett, "Breeding sites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and efficiency of extraction techniques for immature stages in terra-firme forest in Amazonas State, Brazil," *Acta Tropica*, vol. 118, no. 3, pp. 204–208, 2011.
- [6] R. Singh, S. Lal, and V. Saxena, "Breeding ecology of visceral leishmaniasis vector sandfly in Bihar state of India," *Acta Tropica*, vol. 107, no. 2, pp. 117–120, 2008.
- [7] R. Newstead, "The papataci flies (Phlebotomus) of the maltese islands," *Bulletin of Entomological Research*, vol. 2, no. 1, pp. 47–78, 1912.
- [8] W. J. Hanson, "The breeding places of Phlebotomus in Panama (Diptera: Psychodidae)," *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 54, no. 3, pp. 317–322, 1961.
- [9] L. Deane and M. P. Deane, "Observações sobre abrigos e criadouros de flebotomos no Noroeste do Estado do Ceará," *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, vol. 9, no. 2, pp. 225–246, 1957.
- [10] A. G. Dias-Lima, E. G. Castéllon, and I. Sherlock, "Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma floresta primária de terra firme da estação experimental de silvicultura tropical, estado do Amazonas, Brasil," *Acta Amazônica*, vol. 33, no. 2, pp. 303–316, 2003.
- [11] E. M. Michalsky, C. L. Fortes-Dias, J. C. França-Silva, M. F. Rocha, R. A. Barata, and E. S. Dias, "Association of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) population density with climate variables in Montes Claros, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 104, no. 8, pp. 1191–1193, 2009.
- (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 99, no. 8, pp. 795–803, 2004.
- [15] G. A. S. Romero and M. Boelaert, "Control of visceral leishmaniasis in Latin America—a systematic review," *PloS Neglected Tropical Diseases*, vol. 4, no. 1, article e584, 2010.
- [16] A. Warburg and R. Faiman, "Research priorities for the control of phlebotomine sand flies," *Journal of Vector Ecology*,

- vol. 36, no. 1, supplement 1, pp. S10–S16, 2011.
- [17] D. G. Young and M. A. Duncan, “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*, vol. 54, p. 881, 1994.
- [18] A. R. Fahmy, A. M. Samy, S. A. Doha, and M. G. Shehata, “Preliminary field investigations on Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from a recent cutaneous leishmaniasis focus in Northern-Sinai, Egypt,” *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, vol. 2, no. 1, pp. 9–15, 2009.
- [19] M. M. Afonso, W. A. Costa, A. C. R. Azevedo, S. M. da Costa, M. L. Vilela, and E. F. Rangel, “Data on sand fly fauna (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Itatiaia National Park, Rio de Janeiro State, Brazil,” *Cadernos de Saude Publica*, vol. 23, no. 3, pp. 725–730, 2007.
- [20] E. S. Dias, S. Regina-Silva, J. C. França-Silva et al., “Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil,” *Veterinary Parasitology*, vol. 176, no. 2-3, pp. 101–111, 2011.

8.2 Dados climatológicos

8.2.1 Umidade.

Médias diárias de umidade- 2008							
Dia	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
1							
2							91
3				89		85	89
4				92		81	88
5				82		83	mv
6				92	86	82	92
7			91	90	94	79	91
8			90	87	95	80	96
9			89	81	89	80	97
10			88	87	88	76	92
11			92	86	83	83	94
12			95	88	88	83	89
13			96	mv	90	85	86
14			93	mv	86	86	87
15			95	86	90	85	85
16			88	83	82	82	86
17			90	86	83	83	88
18			88	85	84	86	87
19			93	86	83	81	90
20			95	98	85	88	86
21			90	90	86	91	87
22			90	85	83	86	88
23			89	86	82	87	91
24			86	88	82	86	
25			87		72		
26			90		70		
27			86		83		
28			85				
29							
30							
31							

	Médias semanais (meses de 2008)				
	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
1wk	87,6	88,3	79,7	86,4	88,1
2wk	89,4	87,3	82,2	85,1	88,3
3wk	90,2	87,3	84,7	83,5	89,5

Médias diárias de umidade						
Dia	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN
1						81
2			85			81
3	84		84		92	82
4	85	82	86		89	83
5	98	81	85		90	mv
6	90	81	85	75	90	83
7	88	82	86	68	mv	85
8	84	81	85	69	90	85
9	88	81	85	69	98	97
10	87	83	86	76	91	90
11	90	82	85	81	85	83
12	84	81	85	75	85	83
13	85	81	mv	80	87	98
14	86	81	95	68	87	87
15	83	83	82	76	82	97
16	84	83	83	71	82	97
17	86	91	89	81	92	85
18	mv	90	85	85	96	83
19	79	89	86	80	89	86
20	70	mv	86	81	91	90
21	81	88	70	83	88	86
22	85	mv	62	90	99	91
23	79	mv	66	89	96	
24	81	mv		82	94	
25		mv		80		
26				78		
27				71		
28						
29						
30						
31						

	Médias semanais					
	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN
1wk	79,2	88,5	77,7	81,9	93,3	88,3
2wk	82,5	85,2	81,5	79,6	89,5	89,5
3wk	84,7	83,6	82,8	77,8	90,1	87,6

Médias diárias de umidade						
Dia	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
1			82	78		
2			84	92		
3			84	80		
4			83	76	69	65
5			79	85	85	65
6			45	82	74	66
7				78	73	67
8				72	65	60
9				82	68	63
10	95			76	68	64
11	86			88	71	62
12	85			91	69	66
13	86		80	84	68	65
14	87		86	78	66	64
15	88		84	mv	65	63
16	93	87	78	69	78	80
17	90	91	81	67	70	70
18	85	87	81	72	72	64
19	88	87	70	69	71	67
20	87	82	71	68	71	72
21	86	83	80	71	84	67
22	83	91	80	70	66	73
23	84	86	85	65	78	90
24	90	82	68	mv	74	63
25	88	mv	78		62	66
26	85	80	78			
27	86	86	85			
28	83	78	76			
29	85	80	75			
30	72	86	78			
31	86	90				

Médias semanais						
	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
1wk	83,6	78,1	79,3	69,2	72,3	71,1
2wk	84,9	79,9	79,2	74,3	71,0	69,3
3wk	85,9	82,3	79,0	75,9	71,3	67,5

Médias diárias de umidade - 2010							
Dia	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL
1			68		82	77	
2			69		82	mv	
3					83	83	
4					82	85	
5					mv	84	
6					82	82	
7					76	87	
8					81	86	
9			70		82	84	
10	80	65	78		73	84	88
11	70	mv	66		81	89	89
12	75	mv	63		72		88
13	70	mv	66	85	82		90
14	81	mv	63	90	86		92
15	70	65	70	92	79		89
16	81	62	70	86	87		91
17	79	67	75	83	85		90
18	79	68	81	83	84		91
19	70	68	79	83	70		90
20	69	70	72	83	74		87
21	89	69	75	83	79		80
22	74	69	76	80	90		89
23	73	69	85	72	85		88
24	72	70	65	83	78		88
25	mv	83	85	80	84		86
26	69	70	90	mv	83		87
27	68	71	70	83	82		84
28	68	64	82	80	79		83
29	70		83	80	83		83
30	72		70	81	86		89
31	71				79		mv

Médias semanais (meses de 2010)							
	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL
1wk	69,7	70,7	77,9	81,6	80,0	85,1	85,3
2wk	72,6	69,6	77,7	80,9	81,1	83,8	86,5
3wk	73,5	68,6	74,5	82,7	80,5	83,5	87,7

8.2.2 Temperatura

Médias diárias de temperatura, 2008							
DIAS	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
1	22	22	21	20,5	25	24,5	24,3
2	22,5	21	22,5	21,5	24	25	X
3	21,5	21,5	23	22	25	26	25,5
4	22	21,4	23,5	22	25	26,5	27,5
5	22,5	21,6	232,2	22	X	26,3	X
6	23	21,3	21	21	24,7	26,4	25
7	23	21,2	21,2	22,5	24	26,5	25,8
8	23	20	21,8	23,5	23	26,7	24,6
9	23,5	20,5	21,7	23	22,5	26,6	23,8
10	21,5	21,3	22	22,5	23,4	26,6	24,1
11	21,7	22	21	22	26	26,4	24
12	22,5	21	22	22,2	23,8	26,3	25,5
13	21	20,5	21	X	24	26,3	26,4
14	20,8	21,2	21,5	X	23,3	26,4	25
15	22	20	21,7	22,5	23,4	26,8	25,7
16	22,5	20,5	22	23	24,4	26,5	25,5
17	22,5	20,8	21,3	23	23,4	26,3	25,9
18	21,5	21	21,3	23	25	26,3	25,5
19	21,5	18	21,1	23,4	25	26,4	24,4
20	21,2	21	21	22	24,8	26,3	25,3
21	23,3	20,5	21	X	24,8	25,8	25,3
22	22,5	21	21,4	23,5	25	26,4	25,7
23	23	21,5	21,8	24,5	24,3	26	25,7
24	22,3	20	22,4	25	24,2	26,3	26,5
25	22	20,3	20	25	24,1	25	25,2
26	X	20,8	20,7	22,5	25	25,5	26,1
27	21,3	21,5	20,8	22,6	25	26	26
28	21	20,3	21,3	X	25,3	25,5	25,9
29	21	20,5	22	25	26	25,3	26,2
30	22	21,3	22	26	26,8	25	25,2
31		21	22		26		25,8

Médias semanais (meses de 2008)					
	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
1wk	21,2	23,6	24,6	26,2	25,4
2wk	21,3	23,1	24,4	26,3	25,3
3wk	21,4	22,8	24,2	26,4	25,3

Médias diárias da temperatura, 2009						
DIAS	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN
1	26	27	25	29,5	25	24,1
2	26,7	27,4	25,37	28	2439	25,8
3	27,5	27	25,35	26,4	22	23,8
4	26,8	26,5	X	26,5	23,4	23,9
5	25	26,7	27	26,7	23,6	X
6	26,2	27,5	26,5	26,8	X	23,5
7	25,5	27,9	27,3	27,5	X	22,9
8	26,2	29,8	26,6	27,9	24,4	23,3
9	25	27,3	25,6	28,2	23,3	22
10	25,3	26,9	25,8	27,5	23,5	22,5
11	25,5	26,4	26,6	25,5	24,5	23,5
12	25,7	27	25,9	26,6	24,3	20,7
13	25,7	26,8	X	25,3	24,7	22,3
14	25,6	27,8	26,5	26,6	25	22,4
15	26,4	26,7	27,5	25,2	26	23,5
16	26,5	26,5	27,5	26,6	26	22,2
17	26,6	24	26,6	24,9	25,5	23,5
18	X	24,5	26,5	23,9	22,9	23,7
19	25,5	25,2	27	25	22,3	22,4
20	26,4	X	27,2	25,9	23	22,2
21	27	25,5	27,5	25	22	21,1
22	27,5	X	27,9	24	21,5	21,7
23	27,6	X	27,8	23,9	22,7	24,9
24	27	X	28	25,5	22	23,7
25	27,3	X	27,5	26	22,8	23,8
26	26,8	25,5	28,2	26,5	22,8	22,7
27	26,5	24	27,8	26	23,5	23,6
28	26,1	24,4	27,4	25,7	24,6	23
29	25,3		28,2	23,5	24	22,9
30	X		29	24,3	X	21,9
31	26,4		X		23,8	

	Médias semanais					
	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN
1wk	26,2	25,4	26,9	24,7	24,4	22,6
2wk	25,8	26,5	26,6	25,4	24,3	22,8
3wk	26,0	26,7	26,4	26,0	158,2	23,2

Médias diárias da temperatura, 2009						
DIAS	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
1	22	23	23	24,5	26,5	27,3
2	22,3	22	23	23,5	25,6	27,5
3	23,4	23	23,8	24,6	25,2	27,2
4	23,3	22,5	24,5	24,2	25,5	27,4
5	22,8	22	23,9	24,5	25,9	28
6	X	21	X	25,5	25,8	27,2
7	22,7	22,3	25	26,6	26	27,4
8	22,3	22,9	25	26,3	26,5	27,1
9	22,7	22,4	23,4	26,1	26,5	26,6
10	22,4	21,9	23,6	26,3	27	26,7
11	23	22,4	23,5	24	26,1	27,4
12	22,9	23	22,8	25,2	26,,3	27,1
13	22,7	22,4	23	26	27	27,5
14	22,4	X	23,2	26	25,8	27,7
15	22,5	20	24,2	X	27	27,2
16	22,3	21	24,7	26	26,8	26,2
17	21,4	20,9	24,4	26,2	27,2	27,6
18	21,5	21,5	24	25,3	26,5	28
19	21,8	22,4	24	26	26,6	27,5
20	22,8	23,5	25,7	26,4	26	27,1
21	23,8	24,5	X	27	26,5	27,1
22	23,7	23,9	25,7	26,9	26	26
23	22,3	22,9	24,9	27,8	27,7	27
24	22	23,6	25	X	26,5	27,9
25	22,3	X	24,9	25,8	27,7	28,1
26	22,3	22,9	24,6	25,4	26,7	25,1
27	22,3	22,8	24,7	26,5	27,8	27,2
28	22,3	23,2	24,7	26,4	27,8	29
29	22	22,8	25,7	24	27,8	X
30	24	22,5	25,6	26	28,2	28
31	23	22,6		26,5		27,4

	Médias semanais					
	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
1wk	26,1	26,6	27,1	25,3	22,5	23,1
2wk	26,7	25,8	27,5	25,3	23,4	23,0
3wk	26,5	25,7	27,4	25,9	23,6	22,8

Médias diárias da temperatura - 2010							
DIAS	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL
1	27,6	26,5	28,3	27,5	24,3	25,9	23,5
2	25,6	27,3	X	27,2	24,1	X	23,5
3	2637	25,5	29,5	24,8	23,4	X	22,4
4	2732	27	29	26,6	24	22,5	23,4
5	26	27,6	27,4	2637	X	23,1	24
6	26	27,4	27,3	27,3	25	24,6	23,5
7	25,5	26,7	26,5	29	24,6	24,5	23
8	28	26,2	28,2	25	24,6	23,1	24,2
9	27,4	26,7	28,2	23,3	24,8	23,5	24,8
10	27,5	27,2	28,7	22,6	25,4	23,1	24,3
11	27,4	X	28,6	24	25,1	23,2	24,7
12	26,7	X	28,4	24,7	25,9	22,6	24,3
13	27,2	X	28,1	24,6	26	20,3	24,9
14	27,1	X	28,5	24,7	29,2	20,9	24,6
15	27,8	27,9	28	24,2	25,6	21,5	24,9
16	25,5	28	27,4	24,7	24,3	22	25,4
17	25,4	27,9	27,5	26	24,4	21,8	25,4
18	25	28,5	27,6	X	24,8	22,5	23
19	26	27,5	28,2	25,2	24,6	X	23,4
20	26,5	27,8	27,3	24,9	24	23,5	X
21	26,7	27,6	27,4	25	24,2	24,2	23
22	26,6	26	27,7	26	24,9	23,3	22
23	27	28,1	25,7	25,9	26	23,8	23,4
24	27	27,6	28,6	26,2	24,4	22,6	22,9
25	X	27,2	25,7	25,2	24,9	22,6	23,3
26	26,8	27,5	25	X	24,5	21,6	23,9
27	27,5	28	26,2	25,5	23,5	22,3	23,9
28	27,2	28	25,8	25,7	23,9	22,9	24,5
29	26,9		26	25	X	21,9	24,3
30	26,8		26,9	24,5	24	20,8	23,5
31	27,6		27		26,1		X

Médias semanais							
	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL
1wk	27,1	27,8	26,3	24,6	24,7	23,6	23,9
2wk	26,7	27,7	26,8	25,1	25,2	24,0	23,4
3wk	26,7	27,7	27,3	25,0	25,1	24,2	24,0

8.2.3 Chuva

DIAS	Chuva acumulada em 24h (mm), 2008						
	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
1							
2							2
3				3,9		0	2
4				0		0	13
5				0		0	9,5
6				0	0	0	0
7			2,75	0	0	0	0
8			1,9	0	6,1	0	6
9			0	0	2,6	0	8
10			0	0,25	1,5	0	24
11			0	1,25	0	0	2
12			8,5	0,9	0	0	0,1
13			2	0	4	0	0
14			1,9	0	5,5	0	0
15			2,2	0	3,5	0	0
16			4	0	0	0	0
17			0	0	0	0	0
18			6,2	0	0	0	0
19			1	0	0	0	0
20			6,7	7,1	0	0	0
21			1,3	3,9	0	0,2	0
22			0	0,2	0	0	0,25
23			0	0	0	0	3
24			0,2	0	0	0	
25			3,5		3,5		
26			2		0		
27			0,1		0		
28			0				
29							
30							
31							

	Médias semanais (meses de 2008)				
	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
1wk	0,8	1,6	0,5	0,0	0,5
2wk	1,9	1,0	0,9	0,0	2,1
3wk	2,0	0,6	1,3	0,0	3,2

Chuva acumulada em 24h (mm), 2009						
DIAS	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN
1						0
2			0,6			0
3	0		0		2,5	0
4	0	0	0		7	0
5	15,5	0	0		3	0,5
6	14	0	0	0	1,5	12
7	0	0	0	0	2	0
8	0	0	0	0	1	0
9	0	0	0	0	7	30,5
10	1	0	0	0	9	19
11	2	0	0	0,3	1	1,5
12	4,5	3	0	0	0	0,3
13	0	0	0	0	0	0,1
14	0,1	0	0	0,5	0	0
15	0	0	0	0	2	2
16	0	0	0	0	0	4,5
17	0	5	0	0	0	4,7
18	0	1	2	0,5	55	0
19	0	0	0	2	16	0
20	0	3	1	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0,5
22	0	1	0	23	32	0,5
23	0	72	0	2	12	
24	0	30		5	13	
25		0		0		
26				0		
27				0		
28						
29						
30						
31						

Médias semanais (meses de 2009)						
	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN
1wk	0,0	15,1	0,4	4,3	18,3	1,5
2wk	0,5	8,2	0,2	2,4	9,4	4,5
3wk	1,8	5,5	0,1	1,6	7,7	3,6

Chuva acumulada em 24h (mm), 2009						
DIAS	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
1			1	0		
2			0	1,8		
3			0	0,4		
4			0	0	0	0
5			0,7	0	0,1	0
6			0	0	14,1	0
7				0	0	0
8				0	0	0
9				0	0	0
10	7,9			0	0	0
11	15			19	0	0
12	0			0,1	0	0
13	0		0	0	0	0
14	7,9		0	3,5	0	0
15	1		0	0	0	0
16	4	1,5	0	0	0	4,25
17	4,5	6	0	0	0	0,3
18	0	9,5	0	0	0	0
19	0	0	0	0	1,7	0
20	0	1	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0
23	1	0,7	0	0	0	0
24	0	3	0	0	0	0
25	0	0,1	0		0	0
26	0	0	0			
27	0	0,1	0			
28	0	0	0			
29	0,1	0	0			
30	0,5	0	0			
31	0	3,7				

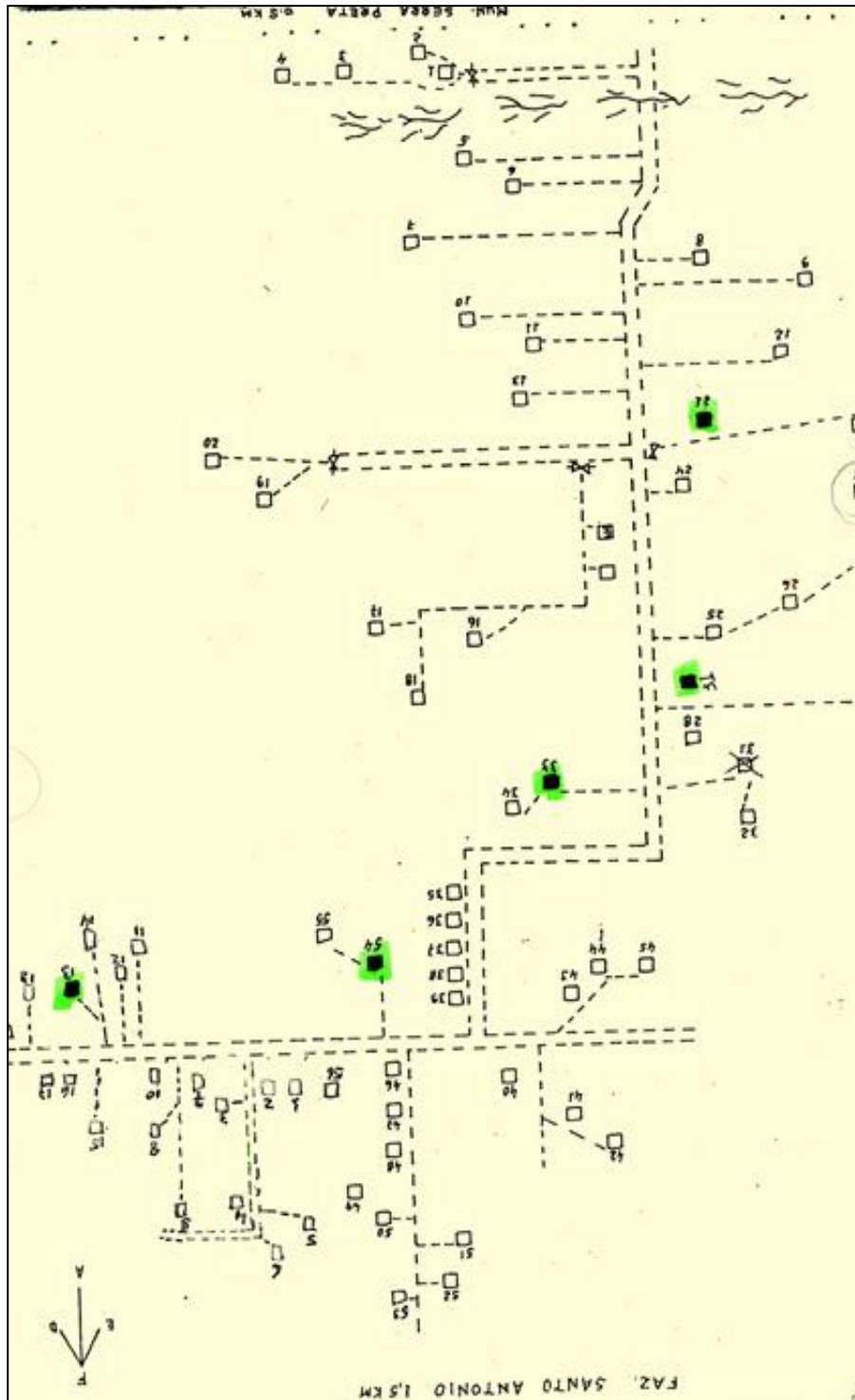
	Médias semanais (meses de 2009)					
	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
1wk	0,1	0,8	0,3	0,0	0,2	0,0
2wk	0,1	0,6	0,2	1,6	0,1	0,3
3wk	1,6	1,2	0,1	1,1	0,8	0,2

Chuva acumulada em 24h (mm), 2010							
DIAS	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL
1			0		0	0	
2			0		0	3,9	
3					14,2	4	
4					1,7	4,9	
5					8,4	0	
6					0,9	0	
7					0	0	
8					0	16	
9			2		0	0	
10	0,2	0	0		0,8	2	0,1
11	0	0	0		0	1	0,5
12	0	1,9	0		0		0
13	4,9	0	0	3	0		3
14	0	0	0	9	6,4		2
15	2	0	0	31	0		6
16	0	0	0	8	13		0
17	7	0	0	1,7	3		8
18	0	0	2	0	0		11
19	0	0	0	1	0		6
20	0	0	0	0	0		7
21	0	0	0	0	0		5
22	18	0	0	0	0		0
23	9	0	6	0	0		3
24	0	0	0,2	0	0		0
25	0	0	0	3	0		6,5
26	0	0,5	5	0	0		2
27	0	0	0	0	0		11
28	0	0	0	0	0		2
29	0		7	0	0		0
30	0		0	0	0		0
31	0				0		0,7

Médias semanais (meses de 2010)							
	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL
1wk	0,0	0,1	1,7	2,0	0,0	2,7	3,2
2wk	1,9	0,0	1,4	1,2	1,6	2,3	3,9
3wk	1,9	0,1	1,0	3,4	1,5	1,5	3,5

9.3 Croqui.

Croqui das cinco residências (em verde no mapa) de Cavunge escolhidas por este estudo para captura entomológica, e amostragens no intradomicílio e peridomicílio.



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

- O48i Oliveira, Diego Ferreira de
Identificação criadouros naturais de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) em área endêmica a leishmaniose visceral, do estado da Bahia, Brasil. [manuscrito]. / Diego Ferreira de Oliveira. - 2013.
62f.; 30 cm
- Datilografado (fotocópia).
- Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, 2013.
Orientador: Prof. Dr. José Carlos Miranda.
1. Flebotomos. 2. Criadouros naturais. 3. Forma imatura. 4. Clima. I. Título.

CDU 595.77:616.993.161