

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Leishmaniose visceral americana: avaliação dos
parâmetros da capacidade vetorial de *Lutzomyia
longipalpis* em área urbana do município de Panorama,
São Paulo, Brasil**

Fredy Galvis Ovallos

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eunice Aparecida
Bianchi Galati

**São Paulo
2016**

**Leishmaniose visceral americana: avaliação dos
parâmetros da capacidade vetorial de *Lutzomyia
longipalpis* em área urbana do município de Panorama,
São Paulo, Brasil**

Fredy Galvis Ovallos

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública para obtenção do
título de douto em Ciências

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eunice Aparecida
Bianchi Galati

**São Paulo
2016**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento da minha bolsa (processo 2011/23541-1) e pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa (processo 2012/03451-4).

À minha orientadora, Dr.^a Eunice Aparecida Bianchi Galati, com quem tive a honra de crescer durante estes seis anos na Pós-Graduação, quem sempre esteve presente nos momentos de angústias e conquistas e foi uma grande motivadora. Toda minha gratidão e apreço.

Ao Dr. Claudio Casanova, pela leitura crítica do documento, pelas discussões acadêmicas e contribuições na minha formação.

Ao Dr. José Eduardo Tolezano, pelas contribuições durante o exame de qualificação, pela leitura atenciosa da tese e grande colaboração.

À Dr.^a Mara Pinto, pelos valiosos comentários e contribuições no documento da tese.

À Dr.^a Maria Anice Mureb Sallum, por permitir o uso do laboratório de Sistemática Molecular para realização de atividades associadas ao projeto, pela valiosa contribuição na minha formação acadêmica, apoio e considerações no documento da tese.

Aos moradores do município de Panorama, aonde foram realizadas as capturas de flebotomíneos, essa participação foi fundamental para a realização da pesquisa.

Aos funcionários da Vigilância Epidemiológica do município de Panorama, Danilo Fernandez, Aurora Felix, Simone Laureano e Andreia Linhares pelo apoio durante o desenvolvimento da pesquisa em campo. Também aos senhores Helio e Gerulino, pela amizade e valiosa ajuda nas atividades de campo.

Aos médicos veterinários Danielly Bortolletto e Juliano Biffe, do município de Panorama, pela valiosa ajuda nas atividades de campo.

Ao médico veterinário José Rodrigues Neto do Centro de controle de Zoonose de Bauru, pela ajuda incondicional e apoio durante a pesquisa.

À Dr.^a Marta Geraldtes Teixeira, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela valiosa ajuda na identificação de amostras no Laboratório de Taxonomia e Filogenia de Tripanossomatídeos.

Às Dras. Luciana Lima e Paola Andrea Ortiz, do Laboratório de Taxonomia e Filogenia de Tripanossomatídeos, pela ajuda nas atividades de identificação de infecção com leishmânia nas amostras de flebotomíneos. Também, aos funcionários e pós-graduandos desse laboratório pela ajuda e companheirismo.

Ao Dr Jêrôme Depaquit, do Laboratoire de Transmission Vectorielle et Épidémiosurveillance de Maladies Parasitaires (VECPAR), da Université de Reims, Champagne Ardens, pela sua orientação durante o estágio em técnicas moleculares, pelas discussões e ensinamentos. Também à bióloga Veronique Lehrter, pela valiosa ajuda nas atividades de laboratório.

À Dras. Claudia Gomes e Marcia Laurenti, do laboratório de Protozoologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela sempre atenta e valiosa ajuda. À Thaíse Tomokane e Carolina Stocco pela amizade e colaboração nas atividades do projeto de pesquisa.

À Tatiana Oliveira, funcionária do Laboratório de Sistemática Molecular da Faculdade de Saúde Pública, pelos seus ensinamentos, paciência, ajuda e amizade.

Aos Drs Delsio Natal, Paulo Roberto Urbinnati e José Maria Soares Barata pelas contribuições na minha formação acadêmica e amizade.

Aos Drs Fernando Ferreira e Rodrigo Soares, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pela valiosa colaboração na execução do projeto.

À Dr.^a Anaiá da Paixão Sevá, companheira da pós-graduação, pelas discussões frequentes, apoio e amizade.

À Dr.^a Marcia Bicudo, do Laboratório de Entomologia em Saúde Pública/Phlebotominae, pela ajuda e amizade, assim como aos meus colegas Priscila Basan Sábio, Cecilila Oliveira, Rodrigo Godoy, Alessandra Ferreira e Everton Falcão pelos momentos compartilhados na aprendizagem do mundo dos flebotomíneos, amizade e companheirismo.

Ao Dr. Andrey Andrade, pela amizade e ensinamentos compartilhados.

Aos Drs Ingrid Menz, André Cútolo, Ana Eugenia de Carvalho Campos pela confiança, amizade e discussões gratificantes.

Ao Dr. Fredi Alexander Diaz-Quijano, pela amizade, companheirismo e valiosos ensinamentos.

Aos funcionários da Faculdade de Saúde Pública, Renilda, Beth, Viviane, Aristides, Rosa, pela ajuda e amizade.

Aos meus amigos da Faculdade de Saúde Pública, Sandra Nagaki, Ivy Sá, Leonardo Sauveges, Bruna Demari, Caio Cesar Moreira, Denise Santana, Cleyton Fiorio, Rosario Avellaneda, Leticia Martins, Fernanda Nascimento e demais companheiros da pós-graduação pelo carinho e amizade e apoio.

Aos meus amigos colombianos estudantes da USP, Diana, José, Samuel, Alexandra, Ximena, Tatiana, Juan David pela amizade e gratos momentos vividos longe de casa.

À minha companheira Francine Leite, sem dúvida meu grande apoio, por compartilhar minhas angústias, meus sonhos e por estar em todas as horas.

À família Galati, um porto seguro longe de casa. Graças a eles minha vida em São Paulo foi muito mais amena, sou muito grato pelo carinho recebido e por terem me acolhido.

À minha família por ser meu apoio na distância, minha fortaleza e meu ponto de referência, o amor recebido e a disciplina foram fundamentais para minha formação.

A todos aqueles que direta o indiretamente contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal.

Epígrafe

'Thinking is to man what flying is to birds. Don't follow the example of the chicken when you could be a lark.'

Albert Einstein

RESUMO

GALVIS OVALLOS, F. Leishmaniose visceral americana: avaliação dos parâmetros da capacidade vetorial de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana do município de Panorama, São Paulo, Brasil. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2016.

Introdução: A leishmaniose visceral (LV) é um importante problema de saúde pública no Brasil, com cerca de 3000 mil casos notificados anualmente. Nos últimos anos, a LV tem ampliado sua distribuição em vários estados do país, associada principalmente aos processos socioambientais, antrópicos e migratórios. A LV é causada pela infecção com *Leishmania infantum chagasi*, transmitida, principalmente, por *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Este flebotomíneo apresenta ampla distribuição nas Américas, todavia, evidências sugerem que se constitui em um complexo de espécies crípticas. A dinâmica de transmissão da LV é modulada por fatores ecológicos locais que influenciam a interação entre populações do patógeno, do vetor e dos hospedeiros vertebrados. Portanto, o estudo das variáveis associadas a esta interação pode contribuir para elucidar aspectos dos elos epidemiológicos e contribuir para a tomada de decisões em saúde pública. **Objetivo:** Avaliar parâmetros relacionados à capacidade vetorial da população de *Lu. longipalpis* presente em área urbana do município de Panorama, estado de São Paulo. **Métodos:** Foram realizadas capturas mensais durante 48 meses para avaliar a distribuição espaço-temporal de *Lu. longipalpis* e investigar a circulação de *Le. i. chagasi*. Também foram realizados os seguintes experimentos com o vetor: captura-marcação-soltura-recaptura para estimar a sobrevivência da população e a duração do seu ciclo gonotrófico, a atratividade dos hospedeiros mais frequentes em áreas urbanas, a proporção de repasto em cão, infecção experimental e competência vetorial. **Resultados:** Observou-se que no município de Panorama, *Lu. longipalpis* apresentou as frequências mais elevadas na estação chuvosa (entre outubro e

março), maior densidade em áreas com presença de vegetação e criação de animais domésticos, locais aonde também foi demonstrada a circulação natural de espécimes de *Lu. longipalpis* infectados com *Le. i. chagasi*. Além disto, foi corroborado que a população de *Lu. longipalpis* apresentou hábito hematofágico eclético, altas taxas de sobrevivência e que foi competente para transmitir o agente da LV. Nos experimentos de laboratório foi evidenciada a heterogeneidade na infecção de fêmeas de *Lu. longipalpis* desafiadas a se alimentarem em cães comprovadamente infectados por *L. i. chagasi* e o rápido desenvolvimento do parasita neste vetor natural. **Conclusões.** As observações do presente estudo corroboram a capacidade vetora de *Lu. longipalpis* para transmitir a *Le. i. chagasi* e ressaltam a importância da espécie na transmissão do agente etiológico da LV. Ações de manejo ambiental, educação e promoção à saúde são recomendadas às autoridades municipais para diminuir o risco potencial de infecção na população humana e canina, considerando-se o elevado potencial vetor de *Lu. longipalpis* e a presença de condições que favorecem a interação dos componentes da tríade epidemiológica da LV.

Palavras chaves: Leishmaniose visceral, *Lutzomyia longipalpis*, capacidade vetorial, competência vetorial, ambiente urbano, Panorama, São Paulo.

ABSTRACT

GALVIS OVALLOS, F. American Visceral Leishmaniasis: Evaluation of parameters related to the vectorial capacity of *Lutzomyia longipalpis* in the urban area of Panorama municipality, São Paulo state, Brasil. [PhD These]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2016.

Introduction: Visceral leishmaniasis (VL) is an important public health problem in Brazil, where annually about 3000 cases are notified. In the later years VL has spread through some states, associated mainly to environmental, anthropic and migratory process. Visceral leishmaniasis is caused by the infection with *Leishmania infantum chagasi* transmitted by the sand fly species *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). This species have a broad distribution in the Americas, however, there are evidences suggesting that it constitutes a cryptic species complex. The VL transmission dynamic is modulated by focal ecological factors that influence the pathogen-vector-host interactions. Thus, the analyses of variables associated to this interaction could contribute to elucidate the epidemiological links and to the public health decision-making. **Objective:** To evaluate parameters related to the vectorial capacity of *Lutzomyia longipalpis* in the Panorama municipality, São Paulo state, Brazil. **Methods:** Monthly captures of sand flies were undertaken during 48 months to evaluate the spatial and temporal distribution of *Lu. longipalpis* and its natural infection with *Le. i. chagasi*. Experiments of capture-mark-release-recapture to estimate the population survival, the gonotrophic cycle duration and the attractiveness of the most frequent host to *Lu. longipalpis* were also performed. Additionally experiments to evaluate the blood feeding rate of *Lu. longipalpis* on dog, experimental infection and the vectorial competence were undertaken. **Results:** In the Panorama municipality, *Lu. longipalpis* presents the highest frequencies during the rainy season (October - March) with high densities in areas with vegetation near to the domiciles and with the animal husbandry. In this areas was also

demonstrated the circulation of sand flies naturally infected with *Le. i. chagasi*. Besides, it was corroborated that *Lu. longipalpis* presents eclectic haematophagic habit, high survival rates and it is competent to transmit *Le. i. chagasi*. It was also observed the heterogeneity of the female infection rates after them take the blood meal on infected dogs and a short time to complete the extrinsic incubation period. **Conclusions:** the observations of this study corroborate the vectorial capacity of *Lu. longipalpis* and reinforce the epidemiological importance of this species in the transmission of *Le. i. chagasi*. Considering the high vectorial efficiency of *Lu. longipalpis* and the presence of conditions favoring the interaction of the VL ecological components (competent vectors, infected hosts and susceptible humans), environmental management as well as educational and health promotion measures are recommended to the municipality authorities to reduce the potential risk of human infections.

Key words: Visceral leishmaniasis, *Lutzomyia longipalpis*, vectorial capacity, vectorial competence, Panorama, São Paulo.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
SUMÁRIO.....	11
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE FIGURAS	16
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES	18
1.2. VETORES	19
1.3. DINÂMICA DE TRANSMISSÃO DAS LEISHMANIAS	21
1.4. EMERGÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DE SÃO PAULO.....	22
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. OBJETIVO GERAL.....	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	26
3.2. AVALIAÇÃO DE FATORES ASSOCIADOS À DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DE <i>Lutzomyia longipalpis</i>	28
3.2.1. Análise dos Fatores Associados à Distribuição Temporal	28
3.2.2. Análise dos Fatores Associados à Distribuição Espacial	29
3.2.3. Análise da Infecção Natural por <i>Leishmania infantum chagasi</i>	30
3.2.4. Análise da Infecção Natural por Exame Parasitológico.....	31
3.2.5. Análise da Infecção Natural por Métodos Moleculares.....	31
3.2.6. Extração do DNA	31
3.2.6.1. Detecção de <i>Leishmania</i> sp nas Amostras de Flebotomíneos	32
3.2.6.2. Eletroforese em Gel de Agarose	33
3.2.6.3. Sequenciamento	33
3.2.6.4. Alinhamento das Sequências	33
3.2.6.5. Estimativa Taxa de Infecção	33
3.3. AVALIAÇÃO DA ATRATIVIDADE DE GALINÁCEOS (<i>Gallus gallus</i>), CÃO (<i>Canis familiaris</i>) E HOMEM PARA A <i>Lu. Longipalpis</i>	34
3.4. ESTIMATIVA DA DENSIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS EM RELAÇÃO AO HOSPEDEIRO (m): CÃO DOMÉSTICO (<i>Canis Familiaris</i>), GALINÁCEOS (<i>Gallus Gallus</i>) e HOMEM.....	35
3.4.1. Captura Manual sobre Iscas	36
3.4.2. Captura com Armadilhas Adesivas.....	38
3.5. ESTIMATIVA DO HÁBITO DE PICADA EM HOSPEDEIRO CANINO (a)	40
3.6.1. Estimativa da Proporção de Repasto em Hospedeiro Canino (AI)	40
3.6. ESTIMATIVA DA PROBABILIDADE DE SOBREVIDA (P) E DURAÇÃO DO CICLO GONOTRÓFICO (GC)	42
3.6.1. Técnica de Marcação	42
3.6.2. Estimativa de Sobrevida	44
3.6.3. Estimativa do Tamanho da População.....	45

3.6.4.	Estimativa da Taxa de Infecção Experimental e Proporção de Fêmeas Potencialmente Infectivas (b)	46
3.7.	DURAÇÃO DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO EXTRÍNSECO (n) E VERIFICAÇÃO DA COMPETÊNCIA VETORIAL DA POPULAÇÃO DE <i>Lutzomyia longipalpis</i>	46
3.7.1.	Isolamento em Cultura.....	47
3.7.2.	Identificação por Método Molecular	47
3.9.	ESTIMATIVA DA CAPACIDADE VETORIAL.....	48
3.10.	ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA	49
3.10.1.	Aspectos Éticos.....	49
3.10.2.	Aspectos de Biossegurança.....	49
4.	RESULTADOS	50
4.1.	DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL	50
4.1.1.	Distribuição Temporal	50
4.1.2.	Distribuição Espacial	54
4.2.	ANÁLISE DA INFECÇÃO NATURAL POR <i>Leishmania infantum chagasi</i>	57
4.3.	AVALIAÇÃO DA ATRATIVIDADE DE GALINÁCEOS (<i>Gallus gallus</i>), CÃO (<i>canis familiaris</i>) E HOMEM PARA a <i>Lu. longipalpis</i>	60
4.4.	ESTIMATIVA DA DENSIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS EM RELAÇÃO AO HOSPEDEIRO (m), PARA O CÃO DOMÉSTICO (<i>Canis familiaris</i>), GALINÁCEOS (<i>Gallus gallus</i>) E HOMEM.....	62
4.4.1.	Capturas com Armadilhas Tipo OBETs	62
4.4.2.	Capturas com Aspiração Direta	62
4.4.3.	Capturas com Armadilhas Adesivas	63
4.5.	ESTIMATIVA DA PROPORÇÃO DE REPASTO EM HOSPEDEIRO CANINO (AI)	64
4.6.	ESTIMATIVA DA PROBABILIDADE DE SOBREVIDA (P) E DURAÇÃO DO CICLO GONOTRÓFICO (GC)	65
4.6.1.	Sucesso da Recaptura	65
4.6.2.	Sobrevida e Tamanho da População.....	73
4.6.3.	Estimativa da Duração do Ciclo Gonotrófico (GC).....	77
4.7.	ESTIMATIVA DA TAXA DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL E DA PROPORÇÃO DE FÊMEAS POTENCIALMENTE INFECTIVAS (b)	77
4.8.	DURAÇÃO DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO EXTRÍNSECO (n) E VERIFICAÇÃO DA COMPETÊNCIA VETORIAL DA POPULAÇÃO DE <i>Lutzomyia longipalpis</i>	80
4.8.1.	Duração do Período de Incubação Extrínseco	80
4.8.2.	Verificação da Competência Vetorial	81
4.9.	ESTIMATIVA DA CAPACIDADE VETORIAL.....	83
5.	DISCUSSÃO.....	85
5.1.	DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DE <i>Lu. longipalpis</i> E A CIRCULAÇÃO DE <i>Leishmania infantum chagasi</i> EM FLEBOTOMÍNEOS EM PANORAMA, SÃO PAULO.....	85
5.2.	OBSERVAÇÕES SOBRE A ATRATIVIDADE DOS HOSPEDEIROS E ESTIMATIVA DENSIDADE EM RELAÇÃO AO HOSPEDEIRO	89
5.3.	ESTIMATIVA DA SOBREVIDA (p) E DURAÇÃO DO CICLO GONOTRÓFICO (GC)	93
5.4.	HÁBITO DE PICAR O CÃO.....	97
5.5.	AVALIAÇÃO DA PROPORÇÃO DE FÊMEAS POTENCIALMENTE INFECTIVAS (b) E DA DURAÇÃO DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO EXTRÍNSECO (n)	100
5.6.	VERIFICAÇÃO DA COMPETÊNCIA VETORIAL	103

5.7. CAPACIDADE VETORIAL DE <i>Lu. longipalpis</i> PARA TRANSMITIR <i>Leishmania infantum chagasi</i> NO MUNICÍPIO DE PANORAMA.....	104
6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	107
REFERÊNCIAS	108
ANEXO 1. CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	119
ANEXO 2. LICENÇA DE CAPTURA DE MATERIAL ZOOLOGICO PELO SISBIO.....	120
ANEXO 3. CURRÍCULO LATTES – FREDY GALVIS OVALLOS	121
ANEXO 4. CURRÍCULO LATTES – EUNICE A. B. GALATI.....	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das características dos cães e dos domicílios nos locais em que foram realizadas as capturas de flebotomíneos com armadilha adesiva instalada próxima dos cães, Panorama - SP.	40
Tabela 2. Resumo das condições de realização dos experimentos de captura-marcação-soltura-recaptura, Panorama - SP.	44
Tabela 3: Frequências das espécies de flebotomíneos, segundo sexo, capturadas com armadilhas automáticas luminosas no município de Panorama (SP), julho de 2012 a junho de 2014.	50
Tabela 4. Valores mensais de machos e de fêmeas de <i>Lu. longipalpis</i> , média mínima e máxima de temperatura e valores totais de precipitação, Panorama - SP, julho 2012 a junho 2014.	51
Tabela 5. Valores de correlação de Spearman entre variáveis as climáticas e a frequência de machos e fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	53
Tabela 6: Número de machos e de fêmeas de <i>Lu. longipalpis</i> e valores médios por domicílio segundo tipo de Paisagem, Panorama - SP, julho de 2013 a maio de 2014.	56
Tabela 7: Número de fêmeas e pools analisados por espécie de flebotomíneo capturadas no município de Panorama, SP, setembro (2013) a junho (2014).	57
Tabela 8: Número de machos e fêmeas de <i>Lu. longipalpis</i> capturados em barracas modificadas segundo local de coleta e hospedeiro, Panorama – SP, agosto de 2012 a maio de 2013.	61
Tabela 9: Número de fêmeas e média de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> por hospedeiro segundo local/isca capturados com aspiração manual no município de Panorama - SP.	62
Tabela 10: Número de machos e fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> coletados, segundo local e data de captura, Panorama - SP.	63
Tabela 11: Número de machos e fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> capturados com armadilhas adesivas em locais de repouso de cães em domicílios do município de Panorama SP.	64
Tabela 12: Número de espécimes de <i>Lu. longipalpis</i> capturados durante o 1º experimento de captura - marcação-soltura - recaptura. Panorama, 18 de fevereiro a 8 de março de 2013.	66
Tabela 13: Número de espécimes de <i>Lu. longipalpis</i> capturados durante o 2º experimento de captura-marcação-soltura-recaptura. Panorama, 22 de abril a 10 de maio de 2013.	67
Tabela 14: Número de espécimes de <i>Lu. longipalpis</i> capturados durante o 3º experimento de captura-marcação-soltura-recaptura. Panorama, 25 de setembro a 05 de outubro de 2013.	69
Tabela 15: Número de espécimes de <i>Lu. longipalpis</i> capturados durante o 4º experimento de captura-marcação-soltura-recaptura. Panorama, 28 de outubro a 07 de novembro de 2013.	70

Tabela 16: Número de espécimes de <i>Lutzomyia longipalpis</i> capturados durante o 5º experimento de captura-marcação-soltura-recaptura. Panorama, 26 de fevereiro a 10 de março de 2014.....	72
Tabela 17: Resumo das estimativas mensais da sobrevida diária de machos e fêmeas de <i>Lu. longipalpis</i> . b = coeficiente de regressão; R ² = coeficiente de determinação; p = grau de significância da reta; s = sobrevivência.	73
Tabela 18: Estimativa do tamanho da população de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> no município de Panorama SP, segundo os meses.	76
Tabela 19: Estimativa do tamanho da população de machos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> no município de Panorama SP, nos meses de fevereiro, março, setembro, outubro de 2013 e fevereiro de 2014.....	76
Tabela 20. Descrição dos experimentos para estimar a proporção de repasto em cães de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> e taxa de infecção experimental por <i>Leishmania infantum chagasi</i> , segundo local data.	79
Tabela 21: Número de fêmeas que fizeram o repasto sanguíneo infectivo sobreviventes, das mortas, dissecadas e infectadas, segundo tempo (horas) após a exposição a cão infectivo em Bauru SP, 2015, de fêmeas desafiadas a segundo repasto sanguíneo em hamster suscetível e destas, as que se alimentaram.	81
Tabela 22. Valores estimados para cada parâmetro utilizado no cálculo da capacidade vetorial.	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Infografia com a representação dos parâmetros da capacidade vetorial e sua interação.....	23
Figura 2. Imagem de satélite mostrando o município de Panorama, Estado de São Paulo, Brasil.	27
Figura 3. Localização dos pontos de coleta segundo paisagem, município de Panorama (SP).	30
Figura 4: Infografia da metodologia de captura com barracas modificadas utilizadas em experimentos de estudo da atratividade de hospedeiros (cão, galinha, humano) para <i>Lu. longipalpis</i> , Panorama agosto 2012-maio 2013	35
Figura 5: Canis onde foram realizadas capturas manuais para estimar a densidade de fêmeas por cão, Panorama - SP, março de 2013.....	37
Figura 6: Localização dos pontos de captura de flebotômíneos no estudo da atratividade de hospedeiros para <i>Lu. longipalpis</i> , Panorama-SP.....	38
Figura 7: Fotografia mostrando a armadilha adesiva "sticky trap" localizada próxima ao local onde dormia um cão, Panorama - SP.	39
Figura 8. Distribuição mensal de machos (A) e fêmeas (B) de <i>Lutzomyia longipalpis</i> e a precipitação acumulada 20 dias antes das capturas, Panorama-SP, julho de 2012 a junho de 2014.....	52
Figura 9. Distribuição de machos (A) e fêmeas (B) de <i>Lutzomyia longipalpis</i> segundo paisagem e estação climática, Panorama, SP.	55
Figura 10: Gel de agarose 2% mostrando a banda esperada de 561 pb nas amostras positivas (134F, 246, 293) e controle positivo (3C) na Nested - PCR. Controle negativo (CC-).....	58
Figura 11: Alinhamento de nucleotídeos baseado na região V7V8 SSUrRNA das amostras positivas caracterizadas neste estudo e diferentes sequências de espécies de <i>Leishmania</i> depositadas no GenBank: <i>L. infantum</i> (XR_001203206); <i>L. chagasi</i> (KJ697713); <i>L. amazonensis</i> (JX030083); <i>L. guyanensis</i> (KF041803); <i>L. braziliensis</i> (JX030135); <i>L. naiffi</i> (KF041807); <i>L. shawi</i> (KF041808); <i>L. lainsoni</i> (KF041805).....	59
Figura 12: Frequência de recaptura de machos e fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> segundo sexo e dia após início das recapturas. Panorama, 18 de fevereiro a 8 de março de 2013.....	67
Figura 13: Frequência de recaptura de machos e fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> segundo sexo e dia após início das recapturas. Panorama, 22 de abril a 10 de maio de 2013.....	68
Figura 14: Frequência de recaptura de machos e fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> segundo sexo e dia após início das recapturas. Panorama, 25 de setembro a 05 de outubro de 2013....	69
Figura 15: Frequência de recaptura espécimes de <i>Lutzomyia longipalpis</i> segundo sexo e dia após início das recapturas. Panorama, 28 de outubro a 07 de novembro de 2013.....	71
Figura 16: Frequência de recaptura de machos e fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> segundo sexo e dia após início das recapturas. Panorama, 26 de fevereiro a 10 de março de 2014.	72

Figura 17: Regressão do número de espécimes machos ($\ln(y+1)$) de <i>Lu. longipalpis</i> , recapturados em armadilhas luminosas e busca ativa, e dos dias após o início da recapturas, no município de Panorama, no período de fevereiro 2013 a fevereiro de 2014.....	74
Figura 18: Regressão do número de espécimes fêmeas ($\ln(y+1)$) de <i>Lu. longipalpis</i> , recapturados em armadilhas luminosas e busca ativa, e dos dias após o início da recapturas, no município de Panorama, no período de fevereiro 2013 a fevereiro de 2014.....	75
Figura 19: Imagens do intestino (100x) e do intestino médio torácico (400x) de espécimes de <i>Lutzomyia longipalpis</i> infectados como flagelados de <i>Leishmania infantum chagasi</i> . A. Infecção 72 horas após repasto infectivo. B. infecção após 96 horas mostrando bloqueio da válvula estomodeal. C. flagelados localizados na região anterior do intestino torácico (400X), após segundo repasto.	78
Figura 20: Flagelados de culturas obtidas de fragmentos de baço de hamster exposto à picada de fêmeas de <i>Lu. longipalpis</i> infectadas com <i>Le. i. chagasi</i>	82
Figura 21: Produtos de amplificação por PCR do fragmento de 520 pares de bases (pb) do SSurDNA em gel de agarose 2%. 1-2. Amplificado do DNA de fígado e baço do hamster 1. 3-4. Amplificado do DNA de fígado e baço do hamster 2. 5. Controle de <i>Le. amazonensis</i> . 6. Controle <i>Le. shawi</i> . 7. controle negativo. PP. padrão de peso molecular 100 pb (Fermentas SM0331).	82

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças causadas pela infecção por protozoários do gênero *Leishmania* transmitidos aos vertebrados por insetos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae). A infecção por estes protozoários manifesta-se em humanos com diferentes sintomas clínicos nas formas visceral, tegumentar e mucocutânea.

Essas parasitoses apresentam ampla distribuição mundial, com registros em 98 países dos cinco continentes, incidência anual entre 690 mil e 1,2 milhões de casos para as formas dermatotrópicas e entre 200 a 400 mil casos para a forma visceral (ALVAR et al., 2012). A sua relevância em saúde pública deriva-se da gravidade de algumas das suas formas, o impacto psico-social na população afetada (DESJEUX, 2004; WHO, 2015) e os anos de vida perdidos por incapacidade na população (WHO, 2002). O Brasil encontra-se entre os sete países do mundo que respondem por 90% dos casos das formas dermatotrópicas e entre os cinco países do mundo onde se registram 90% dos casos da forma visceral (WHO, 2015).

Embora a maior prevalência de leishmaniose visceral (LV) no mundo esteja relacionada à infecção com *Leishmania (L) donovani* em um ciclo de transmissão antroponótico, nas Américas, a LV apresenta um ciclo de transmissão zoonótico cujo agente etiológico principal é a *Leishmania (L) i. chagasi*. Recentemente, alguns autores baseados em evidências moleculares têm sugerido que o agente da LV que ocorre nas Américas é o mesmo que ocorre região do Mediterrâneo e levantam a hipótese de uma introdução recente durante o período da colonização das Américas (MAURICIO et al., 2009; KUHLS et al., 2011). Todavia, outros autores sugerem a possibilidade da validade de uma sub-espécie nas Américas com diferenças bioquímicas e ecológicas entre outras (LAINSON et al., 2005). Portanto, no presente trabalho, a nomenclatura do agente da LVA será referida como *Leishmania (L.) i. chagasi*, baseado nos argumentos apresentados na revisão de SILVEIRA e CORBET (2010). Este agente tem como reservatórios os canídeos silvestres (DEANE & DEANE, 1955; TOLEZANO et al., 1999), didelfídeos (SHERLOCK et al., 1984) e o cão doméstico, sendo este último reconhecido como o principal (LAINSON & SHAW, 2005).

Como agente etiológico das formas da leishmaniose tegumentar americana (LTA) há, pelo menos, 11 espécies de leishmania identificadas (LAINSON & SHAW, 2005). No Brasil,

as três espécies principais responsáveis pela LTA são: *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*. Como hospedeiros e possíveis reservatórios desses agentes têm sido descritas várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (MS, 2006). A LTA em humanos é considerada doença profissional, acometendo principalmente indivíduos do sexo masculino e distribuída entre todas as faixas etárias. No Brasil, a partir da década de 1990, foram notificados, em média, 32 mil casos desta forma da doença, abrangendo todos os estados da Federação (MS, 2006).

Por outro lado, a LVA humana apresenta diferentes perfis epidemiológicos, atingindo principalmente a faixa etária entre 0 e 10 anos de idade, com sua maior incidência em crianças menores de 4 anos (GOMES *et al.* 1996). A infecção pelo parasita é relativamente frequente em habitantes de áreas endêmicas, no entanto, a manifestação clínica ocorre principalmente associada a problemas de desnutrição, em crianças, ou baixa imunidade, em adultos (BADARÓ *et al.* 1986). No Brasil, a autoctonia tem sido registrada em 21 estados da Federação e no Distrito Federal, em mais de 1.600 municípios, incluindo-se capitais de vários estados (RANGEL & VILELA, 2008, MS 2014).

1.2. VETORES

Os vetores dos agentes das leishmanioses são insetos flebotomíneos da família Psychodidae, conhecidos popularmente como asa branca, mosquito palha, birigui, cangalhinha, tatuquira, entre outras denominações. Nas Américas existe uma alta diversidade de espécies de flebotomíneos, com 517 espécies descritas (GALATI, 2015). Todavia, menos de 10% apresentam importância epidemiológica por estarem envolvidas na transmissão de parasitas ao homem e aos animais, principalmente leishmanias (CIPA GROUP, 1999). O ciclo biológico dos flebotomíneos apresenta quatro fases (ovo, larva L1 - L4, pupa, adulto). As formas imaturas desenvolvem-se em ambientes ricos em matéria orgânica, com umidade elevada e protegidos da luz solar direta (FORATTINI, 1973). Estas condições são encontradas em florestas, cavernas e em ambientes antrópicos modificados, inclusive áreas urbanas. A duração do desenvolvimento da fase imatura pode variar em função de fatores como temperatura, umidade relativa e disponibilidade de alimento (RANGEL *et al.*, 1987, OVALLOS, 2011).

Os adultos deslocam-se em voos curtos e também caminham sobre superfícies, se dispersam de modo a não se afastarem muito de seus abrigos, mas, dependendo da disponibilidade das fontes sanguíneas e do vento podem se deslocar a distâncias até de 1 km (FORATINNI, 1973; KILLICK - KENDRICK et al., 1984; ALEXANDER et al., 1992). As fêmeas são hematófagas obrigatórias (precisam da fonte sanguínea para o desenvolvimento dos ovos) e realizam o repasto sanguíneo em um largo espectro de hospedeiros, incluindo animais de sangue frio, aves e mamíferos (YOUNG & DUCAN, 1994). O primeiro repasto sanguíneo ocorre, geralmente, a partir do 2º ou 3º dia após a emergência; a alimentação com açúcares também é importante, pois parece que estimulam o hematofagismo e, em fêmeas infectadas por *Leishmania*, estimula o desenvolvimento das formas infectantes (BARRETTO, 1942, 1943; ALENCAR, 1959; BATES, 2007). Um novo repasto pode ocorrer ainda quando grávidas, antes da postura e, quando sobrevivem à oviposição. Em condições de laboratório observa-se elevada mortalidade das fêmeas durante a oviposição, evento que parece ser bastante traumático (OVALLOS, 2011). O tempo que decorre entre a ingestão sanguínea e a primeira oviposição pode variar de 3-13 dias, mais frequentemente, entre 5-10 dias (BARRETTO, 1942; CASANOVA et al., 2009; OVALLOS, 2011).

A infecção do flebotomíneo por *Leishmania* ocorre quando a fêmea ao se alimentar em um mamífero infectado ingere macrófagos com as formas amastigotas. Estas, no tubo digestivo do flebotomíneo, se adaptadas ao meio, sofrerão a metaciclogênese, passando por várias formas desde procíclicas, com a maioria transformando-se em promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes para os mamíferos. A metaciclogênese (período de incubação extrínseco) pode ocorrer num período entre 2 a 5 dias (KAMHAWI, 2006; BATES, 2007), variando em função de fatores da relação parasita-vetor, da temperatura e do tamanho do inóculo ingerido.

A transmissão das leishmanias acontece quando o inseto infectado regurgita formas metacíclicas juntamente com o sangue ao picar um hospedeiro. O regurgitamento é resultado do bloqueio do canal alimentar formado pelo gel secretado pelas promastigotas e a manipulação da *leishmania*, impedindo a passagem do sangue (KAMHAWI, 2006, BATES, 2007).

1.3. DINÂMICA DE TRANSMISSÃO DAS LEISHMANIAS

A transmissão de um patógeno aos hospedeiros por uma espécie vetora depende de vários fatores ecológicos em uma relação espaço-temporal que afeta a interação patógeno-vetor-hospedeiro (BEGON, 2009). Entre estes fatores, podem ser consideradas variáveis relacionadas ao clima (temperatura, precipitação, umidade relativa), à paisagem (composição da vegetação), aos hospedeiros (densidade, prevalência da infecção), à população do vetor (densidade, sobrevivência, competência vetorial) e aos parasitas (patogenicidade, virulência). Todos estes fatores podem modular o surgimento de novas infecções em uma população de hospedeiros (REISEN, 2010). Baseado em estudos da malária, MACDONALD (1952) agrupou os principais parâmetros associados à transmissão do agente e estruturou um modelo conhecido como a taxa de reprodução básica “ R_0 ” que indica o número de casos secundários gerados com a introdução de um hospedeiro infectado em uma população suscetível. Posteriormente, GARRETT JONES (1964) elencou os parâmetros do R_0 referentes ao vetor e definiu a capacidade vetorial (V) como sendo o número picadas potencialmente infectivas que a população de um vetor pode distribuir por cada dia de exposição de uma fonte de infecção (equação 1).

$$\text{Equação (1): } V = \frac{ma^2bp^n}{-lnp}$$

Os parâmetros componentes da equação acima descrita são:

- Densidade da espécie do vetor em relação ao hospedeiro (**m**): Definido como o número de fêmeas atraídas por hospedeiro competente por dia. Deste parâmetro dependerá a proporção de contatos entre a fonte de infecção e os hospedeiros suscetíveis e é influenciado principalmente por fatores como a atratividade dos hospedeiros à espécie vetora, no caso de humanos, a antropofilia, assim como da proximidade de seus criadouros, sazonalidade entre outros;
- Hábito de picar ao hospedeiro (**a**): é uma medida quantitativa da frequência de contato entre a população do vetor e o hospedeiro, que pode ser estimada indiretamente pelo quociente da fração entre a proporção de fêmeas que se alimentam no hospedeiro e a duração (dias) do ciclo gonotrófico, determinado como o tempo entre um repasto sanguíneo e a oviposição.

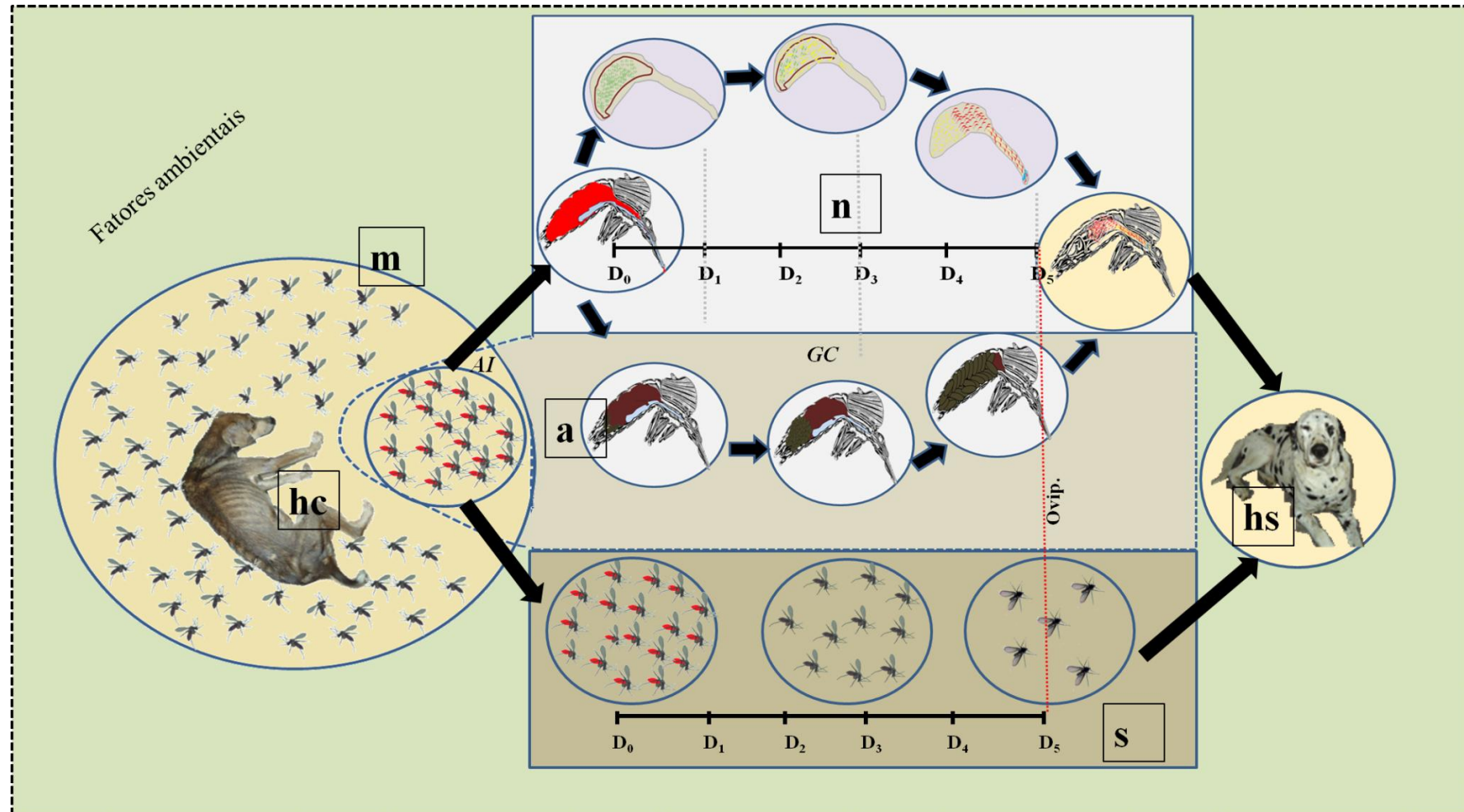
- Proporção infectante da população do vetor (**b**): define o número de espécimes da população do vetor que desenvolve as formas infectivas (promastigotas metacíclicas) do total que picaram uma fonte de infecção.
- Período de incubação extrínseca (**n**): indica a duração (dias) da metaciclogênese do parasita no hospedeiro intermediário (vetor);
- Expectativa média de vida da população do vetor (**p**): definida como o tempo médio de vida da população. O tempo de vida infectiva do vetor dependerá deste parâmetro.

Na figura 1 é apresentada uma infografia com a representação gráfica dos componentes da capacidade vetorial.

A avaliação destes parâmetros da capacidade vetorial de uma espécie contribui com informações de importância epidemiológica para a tomada de decisões e elaboração de medidas de prevenção e controle, permitindo identificar áreas de risco, a previsão de possíveis epidemias e a identificação de possíveis vetores permissíveis. Embora alguns desses parâmetros sejam aplicados de forma geral a diferentes localidades (duração do período de incubação extrínseca e ciclo gonotrófico), a configuração ecológica entre diferentes focos é heterogênea, sendo necessárias avaliações locais para uma melhor compreensão da dinâmica de transmissão.

1.4. EMERGÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DE SÃO PAULO

Por muito tempo a leishmaniose visceral no Brasil esteve restrita, principalmente em áreas urbanas e periurbanas das regiões Norte e Nordeste (ALENCAR, 1959; LAINSON, 2005). Todavia, algumas mudanças populacionais aconteceram após a década de 1960, com migração de pessoas das áreas rurais e concentração em áreas urbanas. Este processo parece ter favorecido a formação de ambientes propícios para o desenvolvimento e adaptação de algumas espécies de flebotomíneos, principalmente a *Lu. longipalpis*. No estado de Mato Grosso, esta espécie têm sido registrada desde antes da separação do estado em 1979. A partir da década de 1990, observou-se a ampliação da sua distribuição geográfica, atingindo o estado de Mato Grosso do Sul e São Paulo. Alguns autores têm sugerido que este processo foi favorecido por ações antrópicas como a expansão de rodovias e de um gasoduto (CORREA-ANTONIALI, 2007, CARDIM et al., 2013), entre outras atividades.



hc: hospedeiro competente; **hs**: hospedeiro susceptível; **m**: densidade do vetor por hospedeiro; **AI**: proporção de fêmeas que realizam o repasto sanguíneo no hospedeiro; **GC**: duração do ciclo gonotrófico; **a**: frequência de contato vetor-hospedeiro; **n**: duração do período de incubação extrínseco (metaciclogênese); **s**: sobrevivência da população do vetor; **ovip.** oviposição.

Figura 1. Infografia com a representação dos parâmetros da capacidade vetorial e sua interação.

No estado de São Paulo, os primeiros registros de *Lu. longipalpis* datam da década de 1970 (FORATTINI et al., 1976) em áreas rurais de alguns municípios do Planalto Paulista e da Grande São Paulo. Posteriormente, no final da década de 1990, registrou-se a presença de uma população de *Lu. longipalpis* em área urbana do município de Araçatuba (COSTA et al., 1997). Atualmente, evidências suportam a hipótese que essas duas populações podem constituir "táxons" diferentes com variações fenotípicas e na capacidade vetorial (CASANOVA et al., 2006).

CASANOVA et al. (2015) corroboraram a presença de populações diferentes (quimiotipos) ocorrendo no estado de São Paulo, sendo a "9 methylgermacrene" a população com maior distribuição geográfica e possivelmente associada à presença de casos autóctones humanos e caninos. Um claro exemplo disto é que após a identificação da presença de *Lu. longipalpis* em Araçatuba em 1997, foi identificado o primeiro caso canino autóctone em 1998 e o primeiro caso humano em 1999 (TOLEZANO et al., 1999). Desde então, casos humanos autóctones têm sido registrados em 75 municípios e atualmente, a presença do vetor *Lu. longipalpis* tem sido registrada em 168 municípios do estado, 25 destes sem transmissão comprovada (RANGEL et al., 2013; CASANOVA et al., 2015).

Em doenças transmitidas por vetores, o conhecimento da bionomia das espécies envolvidas na transmissão dos agentes é um dos principais fundamentos estruturais de um programa de vigilância, prevenção e controle. No caso da LVA, embora aspectos do comportamento de *Lu. longipalpis*, tais como, infecção natural, sazonalidade e atratividade das fontes alimentares venham sendo observados desde os meados do século XX, muitos dos estudos remetem às regiões Norte e Nordeste do país e, em sua maioria, estão relacionados a ambientes rurais (DEANE & DEANE, 1954, DEANE & DEANE, 1956). Nestes ambientes as densidades populacionais do vetor são mais elevadas, possivelmente relacionada à maior facilidade de acesso a fontes sanguíneas e de condições favoráveis para criadouros naturais. Na atualidade, reconhece-se que *Lu. longipalpis* constitui um complexo de espécies crípticas com variações em características moleculares, morfológicas, comportamentais e químicas (LAINSON & RANGEL, 2005; URIBE, 2009; HAMILTON et al., 2005; CASANOVA et al., 2006) e que variações na paisagem podem influenciar a dinâmica de transmissão em diferentes focos. Por isto, a avaliação de aspectos ecológicos da capacidade vetorial da população de *Lu. longipalpis* com maior distribuição no estado de São Paulo torna-se prioritária e poderá contribuir com informações para a tomada de decisões visando a prevenção e controle da LVA.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros relacionados à capacidade vetorial de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana do município de Panorama, estado de São Paulo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os fatores associados à distribuição espaço-temporal de *Lu. longipalpis*;
- Estimar a taxa de infecção natural de *Lu. longipalpis*
- Avaliar a atratividade de galináceos (*Gallus gallus*), cão (*canis familiaris*) e homem para a *Lu. longipalpis*;
- Estimar a densidade de flebotomíneos em relação ao cão doméstico (*canis familiaris*), galináceos (*Gallus gallus*) e homem;
- Estimar a taxa da alimentação em hospedeiro canino e duração do ciclo gonotrófico em laboratório.
- Estimar a probabilidade de sobrevivência diária e a duração do ciclo gonotrófico
- Estimar a duração mediana do período de incubação extrínseco
- Estimar a taxa de infecção experimental
- Verificar a competência vetorial da população de *Lu. longipalpis* para transmitir a *Leishmania (L.) i. chagasi*.
- Estimar a capacidade vetorial de *Lu. longipalpis* para transmitir *Leishmania (L.) i. chagasi*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

Os experimentos em campo foram realizados na área urbana do município de Panorama, estado de São Paulo (Figura 2). Este município está localizado na região noroeste do Estado (latitude de 21° 21'23" sul e longitude 51° 51'35" oeste), na região administrativa de Presidente Prudente. Dista aproximadamente 700 km da capital e apresenta uma população estimada de 14.583 habitantes, 95% habitando na área urbana (IBGE, 2010).

O município de Panorama encontra-se localizado na fronteira entre os estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, às margens do rio Paraná, esta inserido no bioma de Mata Atlântica e de acordo com a classificação de Köppen-Geiger's apresenta clima tropical com inverno seco Aw (PEEL, 2007). A temperatura média anual varia de 12°C a 35°C e a estação chuvosa ocorre entre outubro e março. O município apresenta relevo plano, uma altitude de 254 metros e solo de tipo arenoso.

Entre as atividades econômicas do município destacam-se a produção de produtos de olaria e a pecuária. Todavia, após a implantação da usina hidrelétrica Sergio Motta (Porto Primavera), que resultou em alagamento e formação do lago artificial no rio Paraná, a paisagem do município sofreu impactos, modificando negativamente algumas atividades econômicas como a indústria ceramista e positivamente atividades relacionadas ao turismo e a pesca (DA SILVA, 2013).

A seleção desta localidade foi baseada no fato de que este município é considerado endêmico para a LVA desde o ano 2007 e, ainda, segundo inquérito sorológico canino realizado no ano 2010 pela vigilância epidemiológica do município, observou-se infecção em 41% dos cães da área urbana (BORTOLETTO, 2011). Além disso, segundo o Ministério da Saúde, Panorama encontra-se entre os municípios classificados como prioritários para as ações de vigilância e controle, segundo a média de casos humanos entre 2009 e 2011 (MS, 2012).



Figura 2. Imagem de satélite mostrando o município de Panorama, Estado de São Paulo, Brasil.
Fonte: <http://www.esri.com/software/arcgis/arcgisonlin>. Imagem tomada em 20/11/2015.

3.2. AVALIAÇÃO DE FATORES ASSOCIADOS À DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DE *Lutzomyia longipalpis*

Para avaliar os fatores associados à distribuição espaço-temporal de *Lu. longipalpis* foram realizadas capturas mensais em 8 domicílios distribuídos nos diferentes setores censitários da área urbana (Figura 3). A seleção dos pontos de captura foi realizada pela presença de características ambientais favoráveis para presença de flebotomíneos nos domicílios (existência de galinheiros ou outros animais domésticos e vegetação próxima dos domicílios) e o consentimento verbal dos moradores de permitir a instalação das armadilhas. As capturas foram realizadas entre julho de 2012 e junho de 2014. Em cada local foram instaladas duas armadilhas automáticas luminosas tipo CDC, localizadas na varanda do domicílio e no peridomicílio. As armadilhas operaram entre as 17:00 horas e as 07:00 horas do dia seguinte, durante quatro dias consecutivos nos primeiros 12 meses e por três dias consecutivos no segundo ano de coleta.

Os espécimes machos de *Lu. longipalpis* foram identificados por caracteres morfológicos externos. Os espécimes machos de outras espécies foram clarificados segundo FORATTINI (1973), montados em lâminas e identificados segundo GALATI (2013). A identificação das fêmeas foi realizada usando caracteres da cabeça e genitália e o restante do corpo foi armazenado em álcool isopropílico para análise da infecção natural por métodos moleculares.

3.2.1. Análise dos Fatores Associados à Distribuição Temporal

Para avaliar os fatores associados com a distribuição temporal foram utilizadas as informações obtidas nos 24 meses de captura nos oito domicílios e dados secundários sobre as variáveis climáticas temperatura e precipitação. As informações climatológicas foram obtidas nas bases de dados climáticas do Centro integrado de Informações Agrometeorologias do Estado de São Paulo (CIIAGRO) que contém os registros da estação climatológica do município de Tupi Paulista, localizado a 30 km da área de estudo.

Para avaliar a existência de associação entre as variáveis foi utilizado o teste não paramétrico de correlação de Spearman, sendo consideradas como associadas as variáveis com valores estatisticamente significantes no nível de 95%.

Os valores mensais de densidade de *Lu. longipalpis* foram padronizados como número de espécimes por armadilha por noite, considerando as diferenças no tempo de amostragem entre o primeiro e segundo ano de captura (4 e 3 dias, respectivamente). Para a variável climática precipitação foram utilizados os valores de precipitação total dos 20 dias e 10 dias anteriores às coletas. Para a variável temperatura foram utilizados os valores médios de temperatura máxima e mínima dos 20 dias consecutivos e 10 dias consecutivos antes às coletas. As análises foram realizadas no programa estatístico SPSS V.17.

3.2.2. Análise dos Fatores Associados à Distribuição Espacial

Para analisar a existência de influência da organização ambiental na densidade de *Lu. longipalpis*, as informações de frequência mensal obtidas nos oito pontos de coleta nos primeiros 12 meses foram agrupadas de acordo com as características ambientais dos domicílios, em três categorias de paisagem:

- **Paisagem 1:** formada por três domicílios que apresentavam vegetação composta por menos de 5 árvores, criação de galináceos em seu quintal (mínimo 5), com remoção de fezes dos galinheiros e limpeza do quintal;
- **Paisagem 2:** composta por três domicílios que apresentavam pequenos fragmentos de vegetação perto do domicílio (até 20 metros de distância), criação de galináceos (mínimo 5) sem remoção de fezes dos galinheiros e da matéria orgânica do quintal;
- **Paisagem 3.** Nesta categoria foram amostrados dois domicílios com presença de vegetação próxima ao domicílio, sem criação de galináceos e com ou sem remoção da matéria orgânica do quintal.

A localização dos pontos de captura segundo a classificação da paisagem é apresentada na Figura 3.



Figura 3. Localização dos pontos de coleta segundo paisagem, município de Panorama (SP).
 Fonte: <http://www.esri.com/software/arcgis/arcgisonlin>. Imagem tomada em 20/11/2015.

Para analisar se a configuração ambiental dos domicílios influencia na distribuição espacial de *Lu. longipalpis* foram comparados os valores de densidade padronizados como número de espécimes por armadilha por noite, segundo cada categoria de paisagem, mediante o teste não paramétrico de Mann Whitney. Adicionalmente os valores de densidade foram agrupados segundo estação climática para comparar a frequência segundo cada paisagem.

3.2.3. Análise da Infecção Natural por *Leishmania infantum chagasi*

Para avaliar a circulação de *Le. i. chagasi* nos domicílios amostrados foram analisadas fêmeas de *Lu. longipalpis* por exame parasitológico e por métodos moleculares.

3.2.4. Análise da Infecção Natural por Exame Parasitológico

Para investigar a presença de tripanosomatídeos nas fêmeas, uma amostra de 150 fêmeas foram eutanasiadas com éter etílico e dissecadas para observação da presença de flagelados em exame microscópico. Para isto, cada fêmea foi colocada em uma lâmina contendo uma gota de solução salina, foram retiradas as patas, asas e cabeça com auxílio de dois estiletes. Posteriormente foi retirado o intestino colocando um estilete no tórax e realizando um pequeno corte no sétimo segmento abdominal para extrair o conteúdo intestinal. Posteriormente a amostra foi coberta com uma lamínula e observado em microscópio em aumento de 400x.

3.2.5. Análise da Infecção Natural por Métodos Moleculares

As fêmeas capturadas nas armadilhas luminosas, para analisar a distribuição-espaço temporal, foram anestesiadas no freezer a 4°C e diretamente armazenadas em álcool isopropílico em pools formados por espécimes capturadas no mesmo local e dia de captura. No laboratório (LESP/Phlebotominae) foi retirada a cabeça e genitália para clarificação, montagem e identificação taxonômica. O tórax e abdome de fêmeas da mesma espécie foram agrupados segundo local e data de captura. Em total foram analisadas 652 fêmeas agrupadas em 308 "pools" segundo local, data e ambiente de captura.

3.2.6. Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada usando dois métodos. Para a extração de DNA das 200 primeiras amostras (*pools*) utilizou-se um protocolo modificado de Bruford et al., (1998). Nesse protocolo, o álcool usado para conservação da amostra foi descartado e foram adicionados 200 µl de uma solução de lise chamada Digsol Buffer a cada "pool" de flebotomíneos, junto com 20 µl de Proteinase K (10mg/ml). A amostra foi incubada por 3 horas a 55-60 °C ou por um período de 12 horas a 37 °C. Posteriormente, foram adicionados 400 µl de acetato de amônia (4M) e o conteúdo de cada tubo foi homogeneizado (Vortex) por 15 minutos. Após este passo, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 13000 15000rpm (10 °C) e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo para a precipitação do DNA adicionando 1 ml de etanol 100% e centrifugando por 15 minutos a 15000 rpm. Finalmente,

após lavagem com etanol 70% e secagem, o DNA foi resuspenso em 30-50 µl do tampão TE (Tris-EDTA) ou água destilada ultra-pura (protocolo no anexo x). Para as demais amostras (*pools*) utilizou-se o kit de extração de DNA de tecidos (QIAGEN) segundo as instruções do fabricante.

3.2.6.1. Detecção de *Leishmania* sp nas Amostras de Flebotomíneos

A presença de DNA de *Leishmania* sp foi analisada diretamente utilizando o método de Nested-PCR. Esse método utiliza iniciadores que amplificam uma região variável do gene de SSU rRNA de tripanossomatídeos, gerando fragmentos de 561pb da região V7V8 rRNA (NOYES et al., 1999) Esse método é muito sensível na detecção de tripanossomas em amostras que se apresentam negativas usando outros métodos. O método de Nested-PCR foi utilizado para realizar o “*screening*” da totalidade de amostras (n=308). A reação foi preparada em um volume final de 25 µl contendo 4 µl de MgCl₂ (2 mM), 2,5 µl de tampão taq buffer (NH₄)₂SO₄ (20 mM), 0,5 µl de dNTPs (200 mM), 0,25 µl de Taq polimerase (Biotools), 1 µl de primer TRY927F, 1 µl (20 ng/ µl) de primers TRY927R, 13,75 µl de água ultrapura. A segunda reação foi mantida nas mesmas condições com os iniciadores TRY561F e TRY561R. O tamanho do fragmento esperado foi de 561 pares de bases. A amplificação do DNA por Nested PCR foi realizada sob as seguintes condições: 94°C por 3 minutos, 94°C por 30 segundos, 55°C por um minuto, 72°C por 90 segundo, repetindo por 30 ciclos. A extensão final por 10 minutos a 72°C.

As amostras que foram amplificadas nas reações de PCR foram sequenciadas e alinhadas na ferramenta BLAST (MADEN, 2002), para posteriormente serem comparadas com as depositadas no Genbank.

3.2.6.2. Eletroforese em Gel de Agarose

Os produtos da amplificação do DNA na Nested - PCR foram separados em um gel de agarose 2% em buffer TAE 1X (40mM de Tris- acetato, 2 mM de EDTA, PH 8.0) entre 84-95 V durante 30 minutos. As bandas foram marcadas com GelRed® nucleic acid gel stain e observadas em aparelho UV. Para a observação dos produtos esperados da PCR diagnóstico foi preparado um gel de agarose a uma concentração de 3%.

3.2.6.3. Sequenciamento

Os fragmentos de DNA amplificados pelo Nested PCR foram submetidos a reações de sequenciamento utilizando o KIT big Dye terminator V3.1 cycling sequencing (Perkin Elmer) segundo as condições do fabricante em sequenciador automático 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As reações foram submetidas a 30 ciclos de 15 seg a 96°C, 15 seg a 50°C, 4 min a 60°C com um ciclo inicial de 1 min a 96°C os mesmos oligonucleotídeos da PCR.

3.2.6.4. Alinhamento das Sequências

Os cromatogramas das sequências foram analisados no programa Seqman do pacote do programa DNA star (NICHOLAS et al., 1997). As sequências determinadas e as obtidas no Genbank foram alinhadas e editadas no programa Gendoc v. 2.7. 000 (NICHOLAS et al., 1997).

3.2.6.5. Estimativa Taxa de Infecção

A taxa de infecção natural dos flebotomíneos foi expressa como taxa mínima de infecção (TMI), calculando-se o número de grupos positivos multiplicado por 100e dividindo-o pelo número total de espécimes testados (PAIVA et al., 2006).

3.3. AVALIAÇÃO DA ATRATIVIDADE DE GALINÁCEOS (*Gallus gallus*), CÃO (*Canis familiaris*) E HOMEM PARA A *Lu. Longipalpis*

Para estimar a atratividade de *Lu. longipalpis* em relação às principais fontes alimentares em áreas urbanas (cães, galinhas, humanos) foram realizadas 18 coletas entre agosto de 2012 e maio de 2013. As coletas foram realizadas por um período de duas noites consecutivas por mês, mediante a utilização de barracas modificadas tipo OBETs (odour-baited entry trap) como descrito por PINTO *et al* (2001). Nesta metodologia se usou uma barraca tipo “camping” na qual foi realizado um recorte na parte superior de aproximadamente 10 centímetros de diâmetro, onde foi introduzido um tubo de PVC de 1 metro de comprimento por 75 mm de diâmetro comunicando o interior e o exterior da barraca (Figura 4). Na parte interna do tubo foi acoplado um micro ventilador (“cooler” de computador) que gerava um fluxo de ar que permitia levar os odores do interior da barraca ao exterior. Na parte externa do tubo foi acoplada uma armadilha tipo CDC sem a lâmpada a uma distância aproximada de 4 cm do tubo e a 70 cm de altura para capturar os flebotomíneos atraídos. O micro ventilador e a armadilha automática foram acionadas por uma bateria de 6V.

As capturas foram realizadas entre as 18:00 às 06:00 horas, durante dois dias consecutivos por mês, com exposição simultânea das iscas em dois domicílios (Fig. 6). No ponto de coleta 1 a parte traseira das barracas estava a uma distância de 40 cm da parede frontal da casa e a parte frontal da barraca foi localizada a 5 metros do muro principal de acesso à rua. A única vegetação no local era uma árvore de 2 metros de altura localizada a 60 cm do local onde estavam as barracas. Na moradia habitavam 5 pessoas e toda a casa era construída em alvenaria. Neste local foram instaladas duas barracas, em uma delas foi exposta uma mulher de 60 kg de peso e na outra um cão macho de 15 kg de peso.

No ponto de coleta 2 as barracas foram posicionadas no peridomicílio, a parte traseira das barracas foi posicionada frente a uma parede de um pequeno galinheiro e a parte frontal foi posicionada frente a um chiqueiro (com três porcos) posicionado a 10 metros de distância. A vegetação do local era composta por pasto nas imediações e árvores de grande porte (acima de 10 metros) utilizadas como poleiros pelas galinhas. No local havia um galinheiro localizado a 10 metros de onde as barracas foram posicionadas e um estábulo com aproximadamente 5 bovinos localizado a 20 metros. A casa principal era construída em alvenaria, habitada por duas pessoas e havia ainda uma pequena casa anexa construída em

madeira onde morava uma pessoa. No local foram instaladas três barracas, uma contendo um humano do sexo masculino, com 78 kg de peso e na segunda, um cão fêmea de 12 kg de peso contida em uma gaiola, e, na terceira foram colocadas 5 galinhas presas em uma gaiola.

Nos dois de captura as barracas foram instaladas a uma distância de 40 cm entre cada barraca.

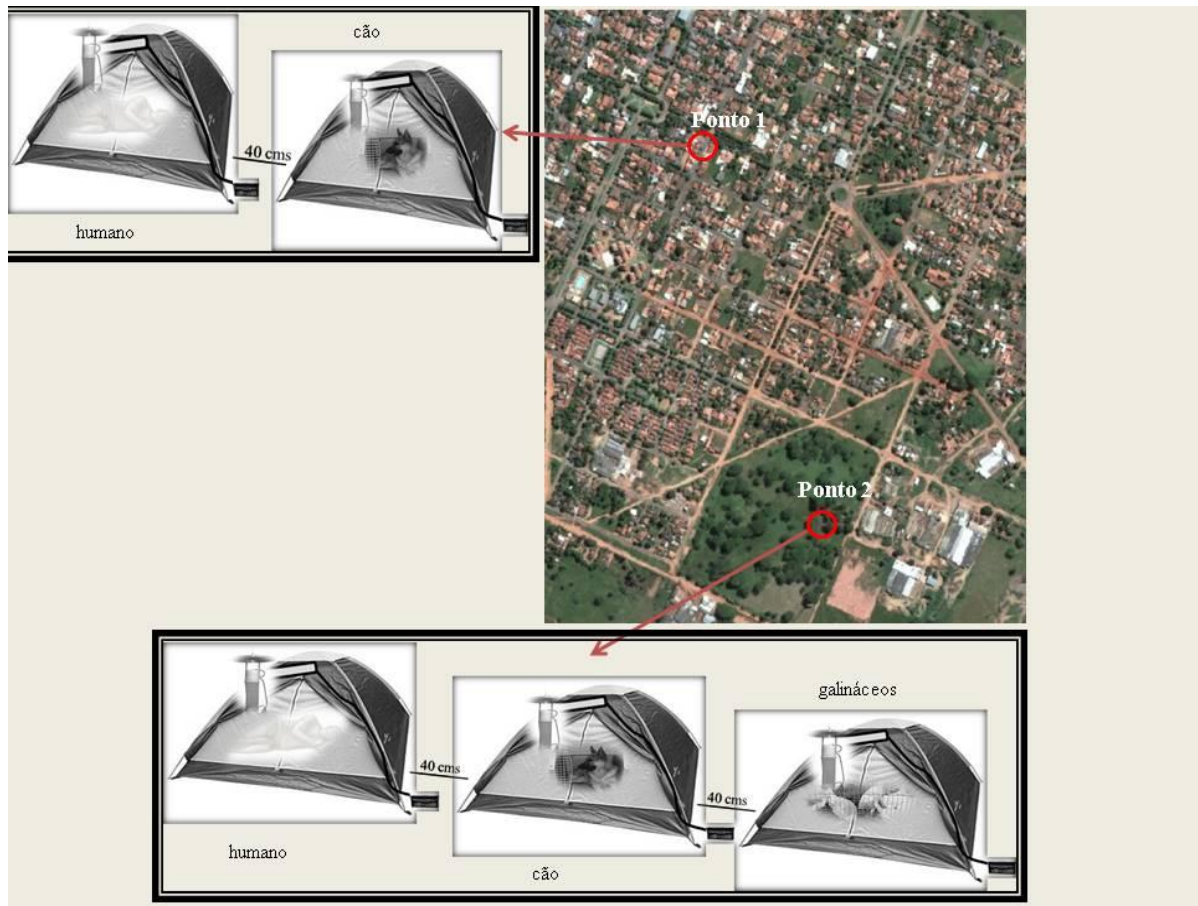


Figura 4: Infografia da metodologia de captura com barracas modificadas utilizadas em experimentos de estudo da atratividade de hospedeiros (cão, galinha, humano) para *Lu. longipalpis*, Panorama agosto 2012 - maio 2013.

3.4. ESTIMATIVA DA DENSIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS EM RELAÇÃO AO HOSPEDEIRO (m): CÃO DOMÉSTICO (*Canis Familiaris*), GALINÁCEOS (*Gallus Gallus*) e HOMEM

Inicialmente foi proposto estimar a densidade por hospedeiro do número de espécimes capturados nos experimentos de atratividade como armadilhas tipo OBETs. Todavia, após a constatação do hábito eclético oportunista de *Lu. longipalpis* nos experimentos com

armadilhas tipo OBETs, foram realizadas algumas tentativas para estimar este parâmetro, considerando-se a sua importância para calcular a capacidade vetorial. Para isto foram usadas duas metodologias, captura manual sobre iscas e captura com armadilhas adesivas (Sticky trap).

3.4.1. Captura Manual sobre Iscas

Em total foram realizadas nove capturas (duração 3 horas cada) com aspiração direta, sendo cinco em galinheiros, duas em canil e duas com isca humana protegida com roupas cumpridas e exposição somente dos braços e rosto (pesquisador). Estas capturas foram realizadas com aspirador de Castro e não foram simultâneas devido a dificuldades técnicas. Os flebotomíneos foram capturados quando pousados sobre os galináceos, cães ou canil ou humano. As capturas sobre cães ou nas paredes dos canis foram realizadas em duas noites diferentes, no mês de março de 2013 com dois cães expostos em um domicílio localizado no Bairro Nosso Teto. Nesse local havia três cães que dormiam em pequenos canis confeccionados em madeira localizados junto à parede frontal da moradia (Figura 5).



Figura 5: Canis onde foram realizadas capturas manuais para estimar a densidade de fêmeas por cão, Panorama - SP, março de 2013.

As capturas em galinheiro foram realizadas entre fevereiro e junho de 2013 em duas moradias. Uma delas localizada no Bairro Casa Branca, tendo um galinheiro com aproximadamente 30 aves e um pequeno chiqueiro desativado construído em alvenaria aonde pousavam cinco galinhas. Nesse último local foram realizadas as capturas. A outra moradia localizada no bairro Bela Vista II, é uma pequena chácara com aproximadamente 40 aves que permaneciam soltas. Algumas dormiam em poleiros (árvores) e outras em um anexo domiciliar; local este em que as capturas foram realizadas. Finalmente, as coletas em isca humana protegida foram realizadas no Balneário municipal, localizado entre os bairros Porto e Paranoá. Nesse local não há presença de animais domésticos como cães e gatos. Em duas ocasiões em 26/04/2013 e 08/05/2013 se constatou a presença de flebotomíneos no local, quando foram capturados por um período de até 3 horas.

Considerando a dificuldade de realizar capturas durante 12 horas consecutivas, para efeitos do cálculo da capacidade vetorial foi utilizado o número de fêmeas capturadas no período entre as 18:00 horas e 21:00 horas.



Figura 6: Localização dos pontos de captura de flebotomíneos no estudo da atratividade de hospedeiros para *Lu. longipalpis*, Panorama-SP.

3.4.2. Captura com Armadilhas Adesivas

Para estimar o número de fêmeas atraídas por cão por noite foi realizado um experimento no mês de maio de 2015 por de três dias consecutivos, em 7 domicílios localizados nos Bairros Nosso Teto (3), Aeroporto (3) e Ginásio (1). As armadilhas foram fabricadas com papel "contact" branco (45 cm de altura x 1 m de comprimento) colado em uma parede lateral ao local em que um cão dormia (Figura 7). O papel foi impregnado com óleo mineral para a coleta dos insetos em pouso antes ou após o contato com o cão. Os insetos que ficaram aderidos foram retirados com auxílio de um estilete entomológico e mergulhados em uma solução com detergente e transferidos para um tubo tipo Eppendorf com álcool 70%. No primeiro dia as armadilhas foram instaladas em 6 domicílios, totalizando 9 cães que serviram de atração, e no segundo e terceiro dias foram instaladas 7 armadilhas em igual número de domicílios, totalizando 11 cães servindo de fonte de atração.



Figura 7: Fotografia mostrando a armadilha adesiva "sticky trap" localizada próxima ao local onde dormia um cão, Panorama - SP.

As características dos domicílios e dos animais que serviram de atração no experimento estão detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição das características dos cães e dos domicílios nos locais em que foram realizadas as capturas de flebotomíneos com armadilha adesiva instalada próxima dos cães, Panorama - SP.

Bairro	Nº do Domicílios	cães expostos	Cor do pelo	Peso (kg)	Características ambientais do domicílio
Nosso Teto	1	2	Preto Cinza	10 10	Casa com quintal de 20 x 10 metros, sem vegetação.
Nosso Teto	2	1	Preto	10	Casa com quintal grande (20 x 10 m), sem vegetação.
Nosso Teto	3	1	Preto Preto	12 12	Chácara com criação de galinhas e porcos (<i>ca.</i> 5 alq.).
Ginásio	4	2	Marrom	10	Casa sem vegetação no quintal, ao lado de uma casa abandonada e com quintal.
Aeroporto	5	2	Preto Marrom	8 8	Casa com quintal (50 x 20 m), com criação de galinhas.
Aeroporto	6	2	Marrom	12 10	Casa com quintal (20 x 10 m) e vegetação próxima, criação de galinhas.
Aeroporto	7	1	Marrom	10	Casa sem quintal cão dormindo do lado do portão principal.

3.5. ESTIMATIVA DO HÁBITO DE PICADA EM HOSPEDEIRO CANINO (a)

A estimativa do hábito de picada foi realizada de forma indireta como descrito por OVALLOS (2011) da divisão da proporção do repasto em hospedeiro canino (**AI**) em cão e a duração do ciclo gonotrófico (**GC**).

3.6.1. Estimativa da Proporção de Repasto em Hospedeiro Canino (AI)

Para estimar a proporção de fêmeas que realizam o repasto sanguíneo em hospedeiro canino foram realizados experimentos em condições de laboratório. Estes foram realizados em uma dependência da Vigilância Epidemiológica do município de Panorama e no Centro de Controle de Zoonose do município de Bauru. Os espécimes machos e fêmeas de *Lu. longipalpis* utilizados nos experimentos foram obtidos em laboratório a partir de parentais silvestres capturados no município de Panorama – SP. As fêmeas parentais foram capturadas ingurgitadas em galinheiro por busca ativa com aspirador manual e foram acondicionadas em um tubo de acrílico J15 com gesso no fundo e oferecida solução açucarada. Os tubos foram

acondicionados em uma caixa de isopor, esta foi lacrada completamente e transportada até o laboratório LESP/Phlebotominae da FSP/USP. No laboratório, as fêmeas foram mantidas individualizadas em tubos de oviposição. Após a oviposição, as fêmeas foram clarificadas, montadas e identificadas segundo GALATI (2013). Os ovos foram agrupados em placas para o seguimento diário das formas imaturas. O seguimento dos imaturos foi realizado como descrito em OVALLOS (2011).

Após a emergência dos adultos, os espécimes foram transportados aos locais onde os experimentos foram realizados. Nos experimentos foram utilizados espécimes entre 2-3 dias na fase adulta.

3.5.1.1. Metodologia de Exposição dos Cães

Os cães utilizados nos experimentos eram comprovadamente infectados por *L. i. chagasi*, recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonose ou pela Vigilância Epidemiológica para realizar a eutanásia. A exposição dos cães foi realizada entre as 18:00 e 20:00 horas em uma gaiola de nylon de 2 m de profundidade por 1,8 m de altura, tendo dois compartimentos: o posterior onde o xenodiagnóstico era realizado e o anterior servindo de câmara de segurança no caso de escape dos insetos. Para avaliar a existência de diferenças na proporção de repasto segundo o estado clínico foram utilizados cães infectados assintomáticos e sintomáticos.

Para o desenvolvimento dos experimentos, os cães foram anestesiados por um médico veterinário. A anestesia foi realizada usando uma associação de Quetamina (15 mg/Kg) e Xilazina (1 mg/Kg). Após sedados, os cães foram introduzidos na gaiola onde os flebotomíneos (machos e fêmeas) tinham sido liberados previamente. Os cães foram expostos aos flebotomíneos por um período de 50 minutos. Depois de retirar os cães da gaiola, os insetos foram capturados com auxílio de um capturador de Castro e transferidos para uma gaiola de nylon de 30 cm de profundidade, 30 cm de altura e 30 cm de largura. Esta gaiola foi acondicionada em uma caixa térmica e completamente lacrada. Posteriormente, os insetos foram transportados para o laboratório de Entomologia em Saúde Pública da FSP/USP. No dia seguinte, as fêmeas não ingurgitadas e os espécimes mortos foram retirados da gaiola. A fêmeas ingurgitadas e machos vivos foram mantidos em temperaturas de 28°C ($\pm 1,0$ °C). A proporção de repasto foi calculada dividindo o número de fêmeas ingurgitadas entre o número de fêmeas expostas, vezes 100.

3.6. ESTIMATIVA DA PROBABILIDADE DE SOBREVIVÊNCIA (P) E DURAÇÃO DO CICLO GONOTRÓFICO (GC)

Os experimentos para estimar a sobrevivência e a duração do ciclo gonotrófico foram realizados em condições naturais, em dois domicílios localizados nos bairros Bela Vista II e Areia Branca com o uso da técnica de marcação-soltura-recaptura. Estes domicílios foram selecionados por terem apresentado as maiores frequências de *Lu. longipalpis* no estudo de distribuição mensal dessa espécie. Os locais de realização dos experimentos apresentavam condições favoráveis para o desenvolvimento dos flebotomíneos com presença de vegetação próxima, criação de galinhas e outros animais domésticos.

No total foram realizados cinco experimentos, sendo os dois primeiros realizados em uma chácara localizada no bairro Bela Vista II e os três últimos no bairro Casa Branca. Essa alteração de local ocorreu devido à diminuição de frequência de espécimes na chácara do bairro Bela Vista II. Este último apresentava características similares e distava a 1,5 km do primeiro local.

3.6.1. Técnica de Marcação

Os espécimes utilizados nos experimentos foram coletados com aspirador de Castro em galinheiro ou chiqueiros no período entre as 18:00 e 22:00 horas. Após a captura, os espécimes foram levados ao laboratório de campo em pequenas gaiolas de Nylon 20x25 cm, posteriormente foram contados segundo sexo e para as fêmeas segundo estado de alimentação (ingurgitadas x não ingurgitadas) e a seguir colocados em uma caixa de isopor forrada com gesso, como descrito por CASANOVA et al. (2009). Após esse procedimento, foram marcados por borrifação com pó fluorescente (BioQuip®). No crepúsculo vespertino do dia seguinte foram liberados, abrindo levemente a tampa para permitir seu voo natural ao ambiente.

A tentativa de captura e marcação de fêmeas ingurgitadas foi realizada com o intuito de realizar estimativa da duração do ciclo gonotrófico em condições naturais. Para isto, o tempo de início das recapturas variou entre 24 e 72 horas após a liberação dos espécimes marcados. Um resumo detalhado dos cinco experimentos de CMSR é apresentado na tabela 2. Após cada tentativa de recaptura, os espécimes capturados foram anestesiados com éter etílico

e observados sob luz ultravioleta (UV) em estéreo-microscópio. Os machos de *Lu. longipalpis* foram identificados por características morfológicas externas, enquanto que a identificação das fêmeas foi confirmada após clarificação e observação microscópica.

O primeiro experimento foi realizado entre 18 de fevereiro e 8 de março de 2013. Neste experimento a soltura dos espécimes foi realizada a 60 m do ponto de captura e as recapturas começaram 72 horas após a soltura. As tentativas de recaptura foram realizadas durante cinco dias consecutivos por busca ativa com aspirador de Castro no chiqueiro, galinheiro e peridomicílio. No esforço de recaptura também foram utilizadas 13 armadilhas tipo CDC distribuídas em 13 pontos em um raio de 250 m a partir do ponto de soltura durante 14 dias.

O segundo experimento foi realizado entre 22 de abril e 10 de maio de 2013. A soltura dos espécimes foi realizada a 20 m do ponto de captura e as tentativas de recaptura iniciaram após 48 horas. Considerando que no primeiro experimento observou-se que a maioria dos espécimes recapturados eram coletados nos abrigos dos animais, com baixo rendimento de captura nas armadilhas luminosas, foram utilizadas apenas 10 armadilhas em um raio de 150 metros. As coletas com busca ativa com aspirador manual foram mantidas por cinco dias.

O terceiro experimento foi realizado no período entre 25 de setembro e 05 de outubro de 2013 e o quarto entre 28 de outubro e 07 de novembro de 2013. Nos dois experimentos os espécimes marcados foram liberados no ponto de captura e as recapturas iniciaram 72 horas depois da soltura, estendendo-se por um período de 10 dias consecutivos. As recapturas foram realizadas com aspiração manual no galinheiro e com oito armadilhas de CDC num raio de 150 metros.

O quinto experimento foi realizado entre 26 de fevereiro e 10 de março de 2014. Neste experimento as recapturas iniciaram 48 horas após a soltura dos espécimes e se estenderam por 10 dias. A soltura dos espécimes foi realizada no mesmo ponto de captura.

Tabela 2. Resumo das condições de realização dos experimentos de captura-marcação-soltura-recaptura, Panorama - SP.

Experimento	Distância entre ponto de captura e de soltura (m)	Número de pontos de recaptura	Técnicas de recaptura	Tempo (dias) para início das recapturas	Esforço de recaptura (dias)
1	60	13	Aspirador manual, CDC	72 horas	14
2	20	10	Aspirador manual, CDC	24 horas	14
3	0	6	Aspirador manual, CDC	72 horas	10
4	0	6	Aspirador manual, CDC	48 horas	10
5	0	8	Aspirador manual, CDC	48 horas	10

3.6.2. Estimativa de Sobrevida

A sobrevida diária dos machos e fêmeas foi considerada constante no tempo após a soltura e calculada do decréscimo no número de recapturas transformado pela regressão do $\ln(y+1)$ como uma função do tempo (dias) após a soltura (MILBY e REISEN, 1989). Esta função pode se expressar como:

$$\ln m_t = \ln[(M)_0 r^t] + t \ln s$$

Onde:

m_t = número de espécimes recapturados a cada dia;

M_0 = número de espécimes marcados e liberados;

r = taxa de recaptura;

s = taxa de sobrevida diária;

t = tempo após a soltura.

O antilog do declive da linha de regressão estimada foi usada para calcular a sobrevida diária. A significância dos coeficientes de regressão foram testados por teste de variância, sendo a qualidade dos ajustes expressados pelo coeficiente de determinação R^2 , e a comparação entre o coeficiente de regressão e as médias ajustadas foi realizada por uma análise de covariância (CASANOVA et al., 2009).

A taxa de sobrevida foi estimada pela expressão:

$s = e^b$, onde:

e = base logaritmo natural;

b = coeficiente de regressão (NELSON et al., 1978, CASANOVA et al., 2009, GALATI et al., 2009).

Os cálculos foram realizados usando o programa SPSS versão 17.

3.6.3. Estimativa do Tamanho da População

O tamanho populacional (TP) foi estimado com índice de Lincoln, corrigido por BAILEY (1952) para amostras de pequeno tamanho ($r < 20$). Este método é um modelo determinístico, sendo que o tamanho da população é estimado através de um único evento de marcação (SANTOS e FORATINNI, 1999, CONSTANTINI et al., 1996).

O tamanho da população pode ser estimado com a equação:

$$TP = \frac{a(n + 1)}{r + 1}$$

Onde:

a = número de espécimes marcados e liberados;

n = número de espécimes capturados nas tentativas de recaptura;

r = número de espécimes marcados recapturados.

A variância foi estimada com a equação:

$$SD = \frac{\sqrt{([a])^2(n + 1)(n - r)}}{([r + 1])^2(r + 2)}$$

O intervalo de confiança foi estimado considerando-se dois desvios-padrão ($\pm 1,96$).

3.6.4. Estimativa da Taxa de Infecção Experimental e Proporção de Fêmeas Potencialmente Infectivas (b)

Para analisar a taxa de infecção experimental e a duração do período de incubação extrínseco foram acompanhadas as fêmeas ingurgitadas nos experimentos de alimentação em hospedeiro canino. As fêmeas foram mantidas em laboratório a temperaturas de 28°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), em uma gaiola contendo em seu interior placas acrílicas (15 cmx10cmx5cm) com gesso em seu fundo e matéria orgânica para oviposição além de um chumaço de algodão com solução açucarada a 20%. Diariamente, em dois períodos (08.00 h e 18:00 h) foi verificada a presença de fêmeas mortas na gaiola. conforme ocorriam os óbitos, as fêmeas e foram dissecadas para observação microscópica do conteúdo intestinal e investigação do período de incubação extrínseco. A partir do quarto dia (18/04/2015), as placas de oviposição começaram a ser investigadas para a presença de ovos, mediante observação delas em estereomicroscópio.

As fêmeas foram dissecadas em uma lâmina contendo 200 μl de solução fisiológica. A dissecação foi realizada com auxílio de dois estiletes entomológicos, retirando inicialmente a cabeça e depois realizando um pequeno corte no VIII segmento abdominal para extrair o intestino. Após isto, o conteúdo foi coberto com uma lamínula e observado em microscópio com aumento de 400x.

3.7. DURAÇÃO DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO EXTRÍNSECO (n) E VERIFICAÇÃO DA COMPETÊNCIA VETORIAL DA POPULAÇÃO DE *Lutzomyia longipalpis*

A duração do período de incubação extrínseco foi determinado como dia mediano em que as fêmeas apresentaram formas flageladas metacíclicas no intestino torácico, próximas à válvula estomodeal.

Para verificar a competência vetorial da população de *Lu. longipalpis*, em um dos experimentos de infecção em cão, hamsters limpos foram ofertados no quarto (1 hamster) e no quinto dia (1 hamster) após o repasto das fêmeas. Estes animais foram acompanhados por um período de 110 dias. Após esse período foram eutanasiados em câmara de CO₂ e então se coletaram fragmentos de fígado e baço para verificação da infecção por isolamento em cultura por método molecular (PCR).

3.7.1. Isolamento em Cultura

Após a eutanásia dos hamsters foi realizada a assepsia dos animais com álcool 70% e retirados fragmentos do fígado e do baço. Os fragmentos foram macerados em ambiente estéril e colocados em meio de cultura Schneider com 10% de soro fetal bovino. As culturas foram incubadas por um período de 10 dias, sendo observadas diariamente em microscópio invertido para observação do crescimento de flagelados.

3.7.2. Identificação por Método Molecular

3.7.2.1. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada como descrito em Stocco (2010). Os fragmentos de fígado e baço obtidos dos hamsters foram colocados em tubos tipo “ependorfs, adicionado 0,5 V de solução estoque DP (1M Tris – HCl pH 8,0; 0,5 M EDTA pH 8,0; Tween 20) e 2 unidades de proteinase K, em incubação por aproximadamente 18 horas. Em seguida, realizou-se extração orgânica, acrescentando-se 0,25 V de clorofórmio, álcool isoamílico (24:1) e 0,25 V de fenol. Os tubos foram levados ao vórtex e depois centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa, contendo os ácidos nucleicos foi transferida para outro tubo e 0,5 V de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) foi adicionado. A centrifugação foi repetida e a fase aquosa recuperada. O DNA foi precipitado pela adição de 0,1 V de 3M acetato de sódio e 2 V de etanol absoluto gelado e incubação a – 20°C por 1 hora, seguido de centrifugação a 13.000 ×g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado lavado em 70% etanol a 13.000 ×g por 10 minutos. Após o descarte do álcool, os tubos foram secos a temperatura ambiente (evaporação do álcool). Os “pellets” foram ressuspenso em 50 µL tampão Tris-EDTA (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) e mantidos a 4°C.

3.8.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações foram preparadas em um volume final de 50 µL, utilizando 100 nanomolar (nM) de cada oligonucleotídeo (S4 5' - GATCCAGCTGCAGGTTCA CC - 3'

Anti - sense, S12 5' - GGT TGA TTC CGT CAA CGG AC - 3' Sense), 0,2 milimolar (mM) de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato (dNTPs), 2mM cloreto de magnésio, tampão de enzima, 2 unidades de Taq DNA polimerase (Fermentas). Foram adicionados de 25 a 50 ng de DNA das amostras e 100 ng de DNA controle. As condições da PCR foram mantidas como descrito em Stocco (2010). Os "primers" usados permitem amplificar um fragmento de 520 pares de bases que é empregado para a identificação molecular de tripanosomatídeos.

3.8.2.3. Eletroforese

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% preparada com tampão TAE 1X (10mM Tris-Acetato, 1mM EDTA) corados com 0,25 % brometo de etídio (400 µg/mL). As corridas foram feitas a 6,66 volts/cm (Gibco BRL Electrophoresis Power Supply- model 250) em tampão 1X TAE, até o corante de amostra azul de bromofenol percorrer 2/3 do comprimento do gel. A visualização dos géis foi realizada em um transluminador (Gibco) e as imagens foram adquiridas com uma máquina KODAK Easy Share C743 com o filtro laranja.

3.9. ESTIMATIVA DA CAPACIDADE VETORIAL

Para estimar a capacidade vetorial foram utilizadas as informações obtidas nos diferentes experimentos e foi aplicada a formula descrita por Garrett-Jones (1964).

$$\text{Equação (1): } V = \frac{ma^2bp^n}{-lnp}$$

3.10. ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

3.10.1. Aspectos Éticos

Os experimentos envolvendo uso de animais no projeto foram analisados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de USP, sendo aprovado sob protocolo 2988/2013, em 23 abril de 2014 (Anexo 1).

As coletas para captura de flebotomíneos do presente projeto foram aprovadas pelo SISBIO, sob licença permanente para coleta de material zoológico número 25596-1 de 28 de setembro de 2010 (Anexo 2).

3.10.2. Aspectos de Biossegurança

Os experimentos de laboratório foram realizados no insetário do laboratório de Entomologia em Saúde Pública/Phlebotominae da Faculdade de Saúde Pública da USP. O local conta com vedação para impedir a saída de flebotomíneos e uma cortina de ar como medida de biossegurança. Os flebotomíneos foram mantidos em gaiolas de Nylon em caixas vedadas durante a execução dos experimentos.

4. RESULTADOS

4.1. DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL

4.1.1. Distribuição Temporal

Nos 48 meses de coleta foram coletados 4.430 espécimes de seis espécies, sendo *Lu. longipalpis* a predominante (97,2%). Outras espécies dos gêneros *Nyssomyia*, *Evandromyia* e *Brumptomyia* também foram capturadas e identificadas (Tabela 3).

Tabela 3: Frequências das espécies de flebotomíneos, segundo sexo, capturadas com armadilhas automáticas luminosas no município de Panorama (SP), julho de 2012 a junho de 2014.

Espécies	Fêmeas	%	Machos	%	Total	%
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	1087	25,2	3220	74,8	4307	97,22
<i>Nyssomyia neivai</i>	35	56,5	27	43,5	62	1,40
<i>Evandromyia lenti</i>	19	38,8	30	61,2	49	1,11
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	2	28,6	5	71,4	7	0,16
<i>Evandromyia cortelezzii</i>	3	100,0	0	0,0	3	0,07
<i>Brumptomyia brumpti</i>	1	50,0	1	50,0	2	0,05
Total	1147	25,9	3283	74,1	4430	100

Na distribuição dos espécimes segundo sexo, para *Lu. longipalpis* foi observada uma razão macho/fêmea de 3:1. O número de machos e fêmeas por armadilha por noite segundo mês de captura, assim como os valores médios de temperatura mínima, máxima e de precipitação dos 20 dias consecutivos antes das capturas são apresentados na Tabela 4.

As maiores frequências por noite de espécimes de *Lu. longipalpis* coletados em armadilhas foram observadas no período de maior precipitação (outubro a março), com a maior frequência absoluta em março de 2014. A tendência da distribuição de espécimes capturados foi similar nos dois anos amostrados (Figura 8).

Durante o primeiro ano de coleta, os maiores valores foram observados entre janeiro e maio de 2013 e, no segundo ano, entre janeiro e março de 2014 (Figura 8A). Para os machos, durante o primeiro ano, observou-se um aumento das frequências desde setembro, diminuindo nos meses de novembro e dezembro, quando altos índices de precipitação ocorreram. No período de janeiro a março dos dois anos de coleta observou-se aumento da frequência e notável redução desta durante a estação seca (abril-agosto) (Figura 8B).

Tabela 4. Valores mensais de machos e de fêmeas de *Lu. longipalpis*, média mínima e máxima de temperatura (°C) e valores totais de precipitação (mm), Panorama - SP, julho 2012 a junho 2014.

Mês	Média Temp. máx. 20 dias antes	Média Temp. min 20 dias antes	Prec. total 20 dias antes	Total flebotomíneos		Número de espécimes/armadilha /noite	
				fêmeas	machos	fêmeas	machos
jul/12	27,1	14,5	106,7	53	115	0,83	1,8
ago/12	30,5	15,9	0	55	153	0,86	2,39
set/12	32,2	15,7	0	35	131	0,73	2,73
out/12	31,3	17,7	48	71	253	1,11	3,95
nov/12	33,9	20,9	44,7	59	191	0,92	2,98
dez/12	34,7	21,8	54,4	28	134	0,44	2,09
jan/13	32,7	21,3	110,4	49	227	1,02	4,73
fev/13	32,2	20,8	219,5	120	192	1,88	3,0
mar/13	32,5	20,8	134,7	124	364	1,94	5,69
abr/13	29,1	17,8	65,5	78	229	1,22	3,58
mai/13	30,0	14,6	1,3	69	180	1,08	2,81
jun/13	28,7	15,9	52,7	15	53	0,23	0,83
jul/13	28,6	14,7	42,2	0	0	0,0	0,0
ago/13	30,2	11,9	0	0	0	0,0	0,0
set/13	33,3	17,1	42,1	8	20	0,19	0,48
out/13	32,8	19,2	34,8	15	29	0,36	0,69
nov/13	33,6	19,9	36,2	24	54	0,57	1,29
dez/13	35,3	21,1	52,2	30	112	0,71	2,67
jan/14	33,5	20,4	83,7	57	250	1,36	5,95
fev/14	35,5	20,7	83,9	37	49	0,88	1,17
mar/14	33,3	20,2	77,8	104	348	2,49	8,29
abr/14	30,3	18,7	59,1	31	127	0,74	3,02
mai/14	31,6	16,2	25,1	0	4	0,0	0,14
jun/14	30,2	14,8	0	10	20	0,74	0,48

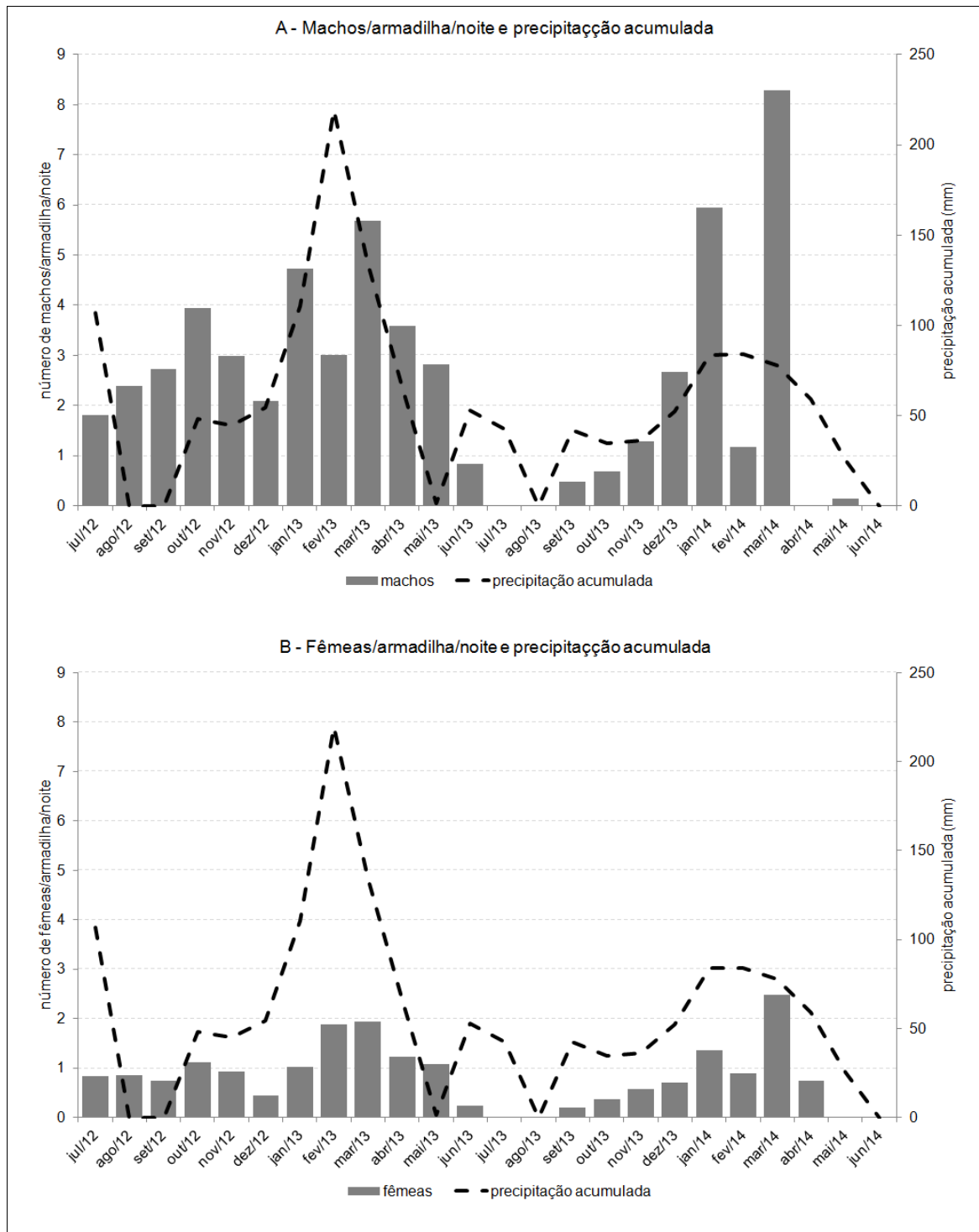


Figura 8. Distribuição mensal de machos (A) e fêmeas (B) de *Lutzomyia longipalpis* e a precipitação acumulada 20 dias antes das capturas, Panorama-SP, julho de 2012 a junho de 2014.

Quando analisada a associação entre as frequências mensais de machos e de fêmeas (número de espécimes/armadilha/noite) com as variáveis climatológicas, só se detectou associação com os valores de temperatura mínima 10 dias antes da captura e a frequência de machos. Todavia, quando analisados os valores acumulados de precipitação e de temperatura média mínima nos 20 dias antes da captura constatou-se uma associação positiva e significativa com a frequência de machos e fêmeas *Lu. longipalpis* (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de correlação de Spearman entre variáveis as climáticas e a frequência de machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*.

Variável	Número de machos/armadilha/noite		Número de fêmeas/armadilha/noite	
	Coefficientes de correlação de Spearman	Nível de significância (95%)	Coefficientes de correlação de Spearman	Nível de significância (95%)
PT10D	0,21	0,32	0,30	0,14
TMX10D	0,26	0,20	0,03	0,90
TMN10D	0,47	0,21	0,39	0,05
PT20D	0,52	0,01	0,63	0,00
TMX20D	0,27	0,19	0,18	0,38
TMN20D	0,50	0,01	0,44	0,03

PT10D: Precipitação total 10 dias antes; TMX10D Temperatura máxima média 10 dias antes; TMN10D Temperatura máxima média 10 dias antes; PT20D: Precipitação total 20 dias antes; TMX20D Temperatura máxima média 20 dias antes; TMN20D Temperatura máxima média 20 dias antes.

4.1.2. Distribuição Espacial

Na Tabela 6 são apresentadas as frequências de espécimes de *Lu. longipalpis* capturados, segundo data e tipo de paisagem, assim como os valores médios mensais por domicílio por dia. Durante os 12 meses de capturas, as maiores frequências foram obtidas em domicílios que apresentavam criação de galináceos com vegetação próxima ao domicílio e nenhuma atividade de remoção da matéria orgânica produzida por estes hospedeiros (Paisagem 2). Quando analisada a densidade média mensal de machos foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os valores obtidos nas paisagens 1 e 2 ($U=0$, $p=0,00$; Mann-Whitney) e 2 e 3 ($U=11$, $p=0,00$; Mann-Whitney) e não foram detectadas diferenças entre as paisagens 1 e 3 ($U=78$, $p=0,12$; Mann-Whitney). Para as fêmeas, foram observadas diferenças estatisticamente significantes na densidade entre a paisagem 1 e 2 ($U=2$, $p=0,00$; Mann-Whitney), assim como entre 2 e 3 ($U=13$, $p=0,001$; Mann-Whitney). Não foram observadas diferenças entre as densidades de fêmeas e das paisagens 1 e 3 ($U=62$, $p=0,06$; Mann-Whitney).

Quando analisadas as frequências de machos e fêmeas agrupadas por estação climática, observou-se que em todas as estações, os domicílios com manutenção de galináceos, com vegetação próxima ao domicílio e sem remoção de matéria orgânica do quintal apresentaram as maiores frequências, com aumento significativo na primavera e atingindo os maiores valores no verão (Figura 9).

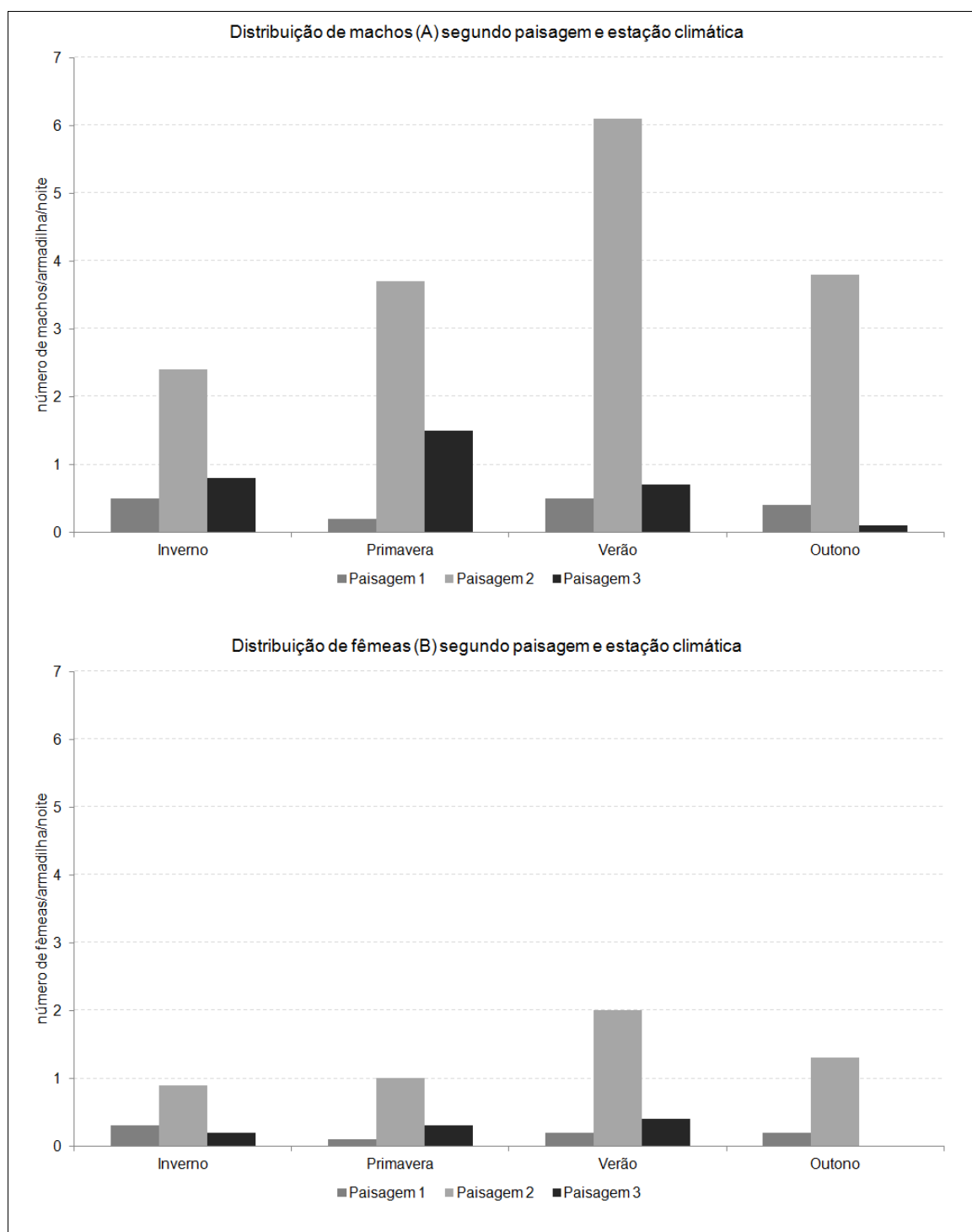


Figura 9. Distribuição de machos (A) e fêmeas (B) de *Lutzomyia longipalpis* segundo paisagem e estação climática, Panorama, SP.

Tabela 6: Número de machos e de fêmeas de *Lu. longipalpis* e valores médios por domicílio segundo tipo de Paisagem, Panorama - SP, julho de 2013 a maio de 2014.

Ecótopo	Paisagem 1				Paisagem 2				Paisagem 3			
	Machos	Média	Fêmeas	Média	Machos	Média	Fêmeas	Média	Machos	Média	Fêmeas	Média
Julho	10	0,8	9	0,8	99	8,3	39	3,3	6	0,8	5	0,6
Agosto	39	3,3	17	1,4	83	6,9	32	2,7	36	4,5	6	0,8
Setembro	9	0,8	2	0,2	78	6,5	23	1,9	44	5,5	10	1,3
Outubro	1	0,1	9	0,8	145	12,1	32	2,7	107	13,4	30	3,8
Novembro	9	0,8	4	0,3	166	13,8	54	4,5	16	2,0	1	0,1
Dezembro	12	1,0	3	0,3	88	7,3	20	1,7	34	4,3	5	0,6
Janeiro	6	0,5	0	0	176	14,7	35	2,9	45	5,6	14	1,8
Fevereiro	11	0,9	7	0,6	157	13,1	95	7,9	24	3,0	18	2,3
Março	38	3,2	13	1,1	329	27,4	91	7,6	7	0,9	10	1,3
Abril	33	2,8	19	1,6	193	16,1	58	4,8	3	0,4	1	0,1
Mai	8	0,7	7	0,6	169	14,1	62	5,2	3	0,4	0	0
Junho	3	0,3	0	0	47	3,9	15	1,3	4	0,5	0	0
Total	179		90		1.730		556		329		100	

4.2. ANÁLISE DA INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania infantum chagasi*

Na amostra de fêmeas de *Lu. longipalpis* dissecadas para exame parasitológico (n=150) não foi detectada infecção por flagelados.

Quanto às amostras separadas para exame molecular, 652 fêmeas capturadas nas armadilhas automáticas luminosas foram agrupadas em 308 "pools". Cada "pool" foi composto por fêmeas capturadas em um mesmo local, data e ambiente (intra ou peridomicílio). O número de fêmeas por "pool" variou de 1 a 15 espécimes. Na Tabela 7 são apresentadas as espécies capturadas, o número de pools e de fêmeas analisadas.

Tabela 7: Número de fêmeas e pools analisados por espécie de flebotomíneo capturadas no município de Panorama, SP, setembro (2013) a junho (2014).

Espécie	Número de <i>pools</i>	<i>Pools</i> positivos (TMI)	Total de fêmeas	%
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	251	3 (1,2)	599	91,9
<i>Nyssomyia neivai</i>	25	0 (0)	30	4,6
<i>Evandromyia lenti</i>	18	0 (0)	18	2,8
<i>Evandromyia cortelezzii</i>	12	0 (0)	3	0,5
<i>Brumptomyia sp</i>	2	0 (0)	2	0,3
Total	308	1,2	652	100

O maior número de espécimes analisados foi de *Lu. longipalpis* (91,9%). O maior número de espécimes foi obtido nos Bairros Areia Branca e Bela Vista II. Entre as espécies analisadas, foi detectada infecção em três pools de *Lu. longipalpis*.

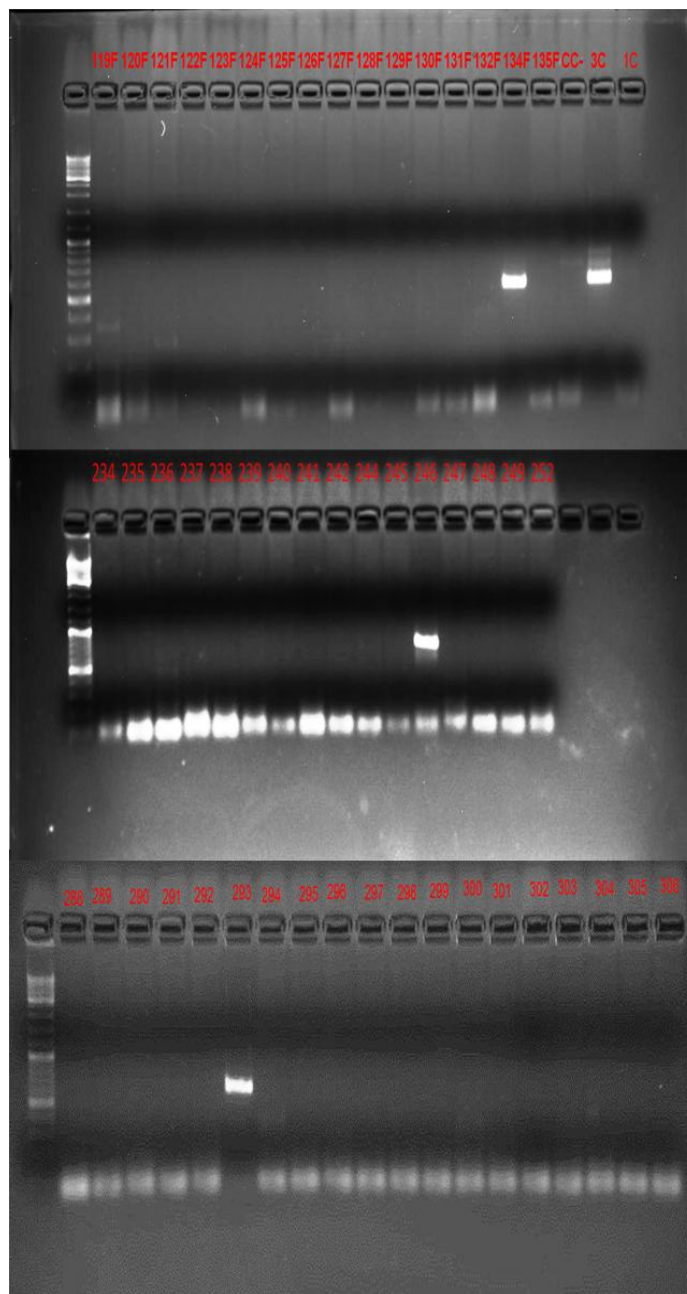


Figura 10: Gel de agarose 2% mostrando a banda esperada de 561 pb nas amostras positivas (134F, 246, 293) e controle positivo (3C) na Nested - PCR. Controle negativo (CC-).

Entre os *pools* positivos (Fig. 10), em dois deles (134 e 293) as fêmeas foram capturadas no mesmo domicílio. O primeiro tinha 13 fêmeas, capturadas em março de 2013 e o segundo, seis fêmeas capturadas em julho de 2014, ambas na varanda do domicílio. Em cada pool havia uma fêmea com restos de ovos no abdome. A amostra 246 com uma única fêmea, sem restos de ovos no abdome, foi capturada em janeiro de 2014 no peridomicílio.

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *
amostra134 : TGGGATAACAAAGGAGCAGCCTCTAGGCTACCGTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAAAGGTCTATTGGAGATTATGGAGCTGTGCGACAAGTG : 91
amostra293 : ..... : 91
L. infantum : ..... : 91
L. chagasi : ..... : 91
L. amazonensis : ..... : 91
L. guyanensis : ..... : 91
L. braziliensis : ..... : 91
L. naiffi : ..... : 91
L. shawi : ..... : 91
L. lainsoni : ..... : 91

      100      *      120      *      140      *      160      *      180
amostra134 : CTTTCCCATCGCAACCTCGGTTTCGGTGTGTGGCCCTTTG-AGGGGTTTAGTGCCTCCGGTACGAGCTCCGGTTCGTCCGGCCGTAAACGCC : 181
amostra293 : ..... : 181
L. infantum : ..... : 181
L. chagasi : ..... : 181
L. amazonensis : ..... : 182
L. guyanensis : ..... : 182
L. braziliensis : ..... : 182
L. naiffi : ..... : 182
L. shawi : ..... : 182
L. lainsoni : ..... : 182

      *      200      *      220      *      240      *      260      *
amostra134 : TTTTCAACTCACGGCTCTAGGAATGAAGGAGGTAGTTCGGGGGAGAACCTACTGGGGCGTCAGAGGTGAAATTCCTAGACCCACCAAG : 272
amostra293 : ..... : 272
L. infantum : ..... : 272
L. chagasi : ..... : 272
L. amazonensis : ..... : 273
L. guyanensis : ..... : 273
L. braziliensis : ..... : 273
L. naiffi : ..... : 273
L. shawi : ..... : 273
L. lainsoni : ..... : 273

      280      *      300      *      320      *      340      *      360
amostra134 : ACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCCCAATCAAGAACCAAGTGTGGAGATCGAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTC : 363
amostra293 : ..... : 363
L. infantum : ..... : 363
L. chagasi : ..... : 363
L. amazonensis : ..... : 364
L. guyanensis : ..... : 364
L. braziliensis : ..... : 364
L. naiffi : ..... : 364
L. shawi : ..... : 364
L. lainsoni : ..... : 364

      *      380      *      400      *      420      *      440      *
amostra134 : CACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGATCTTATGGCCGGCCTGCGGCAGGGTTTACCCTGTGTGTCAGCACCGCGCCCGCTTTTA : 454
amostra293 : ..... : 454
L. infantum : ..... : 454
L. chagasi : ..... : 454
L. amazonensis : ..... : 455
L. guyanensis : ..... : 455
L. braziliensis : ..... : 455
L. naiffi : ..... : 455
L. shawi : ..... : 455
L. lainsoni : ..... : 455

      460      *      480      *      500      *
amostra134 : CCACCTTACGTATCTTTTCTATTTCGGCCTTTACCGGCCACCCACGGGAATATCCT : 509
amostra293 : ..... : 509
L. infantum : ..... : 509
L. chagasi : ..... : 509
L. amazonensis : ..... : 510
L. guyanensis : ..... : 510
L. braziliensis : ..... : 510
L. naiffi : ..... : 510
L. shawi : ..... : 510
L. lainsoni : ..... : 510

```

Figura 11: Alinhamento de nucleotídeos baseado na região V7V8 SSUrRNA das amostras positivas caracterizadas neste estudo e diferentes sequências de espécies de *Leishmania* depositadas no Genbank: *L. infantum* (XR_001203206); *L. chagasi* (KJ697713); *L. amazonensis* (JX030083); *L. guyanensis* (KF041803); *L. braziliensis* (JX030135); *L. naiffi* (KF041807); *L. shawi* (KF041808); *L. lainsoni* (KF041805).

Dos produtos de PCR das amostras positivas obtidas na Nested-PCR sequenciadas, foram obtidas as sequências das amostras 134 e 293. Na amostra 246 não foi possível obter a sequência. O alinhamento das sequências mostrou similaridade com as sequências de *Leishmania infantum* e *Le. (L.) i. chagasi* depositadas no Genbank,

diferindo das sequências de outras espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* (Figura 11). Portanto, confirma-se assim a identificação da *Le. i. chagasi* nas amostras positivas capturadas no município de Panorama. Embora não tenha sido possível obter a sequência da amostra 246, a similaridade no padrão de bandas com as amostras 134 e 293, assim como a prevalência da infecção canina por *Le. i. chagasi* na área de estudo, sugere que esta amostra positiva também apresenta DNA desta leishmania. Assim, estimou-se uma taxa mínima de infecção de 1,2% para *Lu. longipalpis*.

4.3. AVALIAÇÃO DA ATRATIVIDADE DE GALINÁCEOS (*Gallus gallus*), CÃO (*canis familiaris*) E HOMEM PARA a *Lu. longipalpis*

Na avaliação da atratividade de hospedeiros para *Lu. longipalpis* um pequeno número de espécimes foram capturados. Nas 36 coletas realizadas com barracas tipo OBETs, 85 espécimes foram coletados, sendo 60 machos e 25 fêmeas. Entre esses, 20 foram coletados no ponto de coleta um (região central) e 65 no ponto dois (moradia da região periférica). Em relação aos hospedeiros, o maior número de espécimes foram capturados na barraca aonde o cão foi exposto (45 machos e 11 fêmeas), seguido pelo o humano (8 machos e 9 fêmeas) e as galinhas com 7 machos e 5 fêmeas (Tabela 8).

Embora em nossos resultados tenham sido observado um maior número de espécimes na barraca aonde foram expostos cães, o baixo número de espécimes capturados não permite inferir maior atratividade destes hospedeiros, principalmente porque este resultado foi influenciado principalmente pelo resultado em uma captura na moradia localizada na região periférica (15/08/2012).

Tabela 8: Número de machos e fêmeas de *Lu. longipalpis* capturados em barracas modificadas segundo local de coleta e hospedeiro, Panorama – SP, agosto de 2012 a maio de 2013.

Data	Moradia na região central				Moradia na região periférica					
	Cão		Humano		Cão		Humano		Galinha	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
14/08/2012	2	0	0	0	8	2	0	0	0	0
15/08/2012	2	1	0	0	14	4	2	1	0	1
10/09/2012	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
11/09/2012	1	1	0	1	0	0	0	0	0	2
17/10/2012	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0
18/10/2012	0	1	1	0	2	0	0	1	0	0
20/11/2012	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
21/11/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11/12/2012	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0
12/12/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
20/02/2013	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0
21/02/2013	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
20/03/2013	2	0	0	0	0	0	0	2	1	0
21/03/2013	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
24/04/2013	2	0	1	0	1	0	1	0	0	1
25/04/2013	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
21/05/2013	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
22/05/2013	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0
Total	12	4	3	1	33	7	5	8	7	5

4.4. ESTIMATIVA DA DENSIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS EM RELAÇÃO AO HOSPEDEIRO (m), PARA O CÃO DOMÉSTICO (*Canis familiaris*), GALINÁCEOS (*Gallus gallus*) E HOMEM

4.4.1. Capturas com Armadilhas Tipo OBETs

Nas capturas com armadilhas tipo OBETs foram capturadas um baixo número de fêmeas. Dessa maneira, os valores estimados do número de fêmeas por hospedeiro, por noite, foi inferior a 1 (Tabela 9).

Tabela 9: Número de fêmeas e média de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* por hospedeiro segundo local/isca capturados com aspiração manual no município de Panorama - SP.

Hospedeiro	Número de fêmeas	Número de iscas	Número de noites exposição	Número de fêmeas /hospedeiro/noite
Cão	11	2	18	0,31
Galinha	9	5	18	0,10
Humano	5	2	18	0,14

4.4.2. Capturas com Aspiração Direta

Os resultados obtidos nas capturas realizadas com aspirador manual são apresentados na tabela 10. O número de fêmeas coletadas com a técnica de captura direta foi diferente para cada isca animal: 296 fêmeas (5 coletas) em galináceos; 71 fêmeas (2 coletas) em humano e 55 fêmeas (2 coletas) em cão, respectivamente.

Tabela 10: Número de machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* coletados, segundo local e data de captura, Panorama - SP.

Local	Data	Horas de coleta por dia	método	Número iscas	Machos	Fêmeas	Média por hospedeiro/noite
Galinheiro 1	18/02/2013	3	ASP	6	274	130	21,7
Galinheiro 2	24/02/2013	3	ASP	1	41	20	20,0
Galinheiro 2	25/02/2013	3	ASP	1	30	14	14,0
Galinheiro 1	07/03/2013	3	ASP	4	198	91	22,8
Galinheiro 1	27/06/2013	3	ASP	2	120	41	20,5
Total		15		14	662	296	4,2
Canil 1	01/03/2013	3	ASP	2	23	15	7,5
Canil 1	05/03/2013	3	ASP	2	54	40	20,0
Total		6		4	77	55	13,5
Homem	26/04/2013	3	IHP	1	156	28	28,0
Homem	08/05/2013	3	IHP	1	110	43	43,0
Total		6		2	266	71	17,7

ASP: aspiração; IHP: Isca humana protegida.

4.4.3. Capturas com Armadilhas Adesivas

Nas capturas com armadilhas adesivas foram capturados um total de 532 espécimes de *Lu. longipalpis*, sendo 451 machos e 81 fêmeas. Nos três dias de coleta foram expostos 31 cães e capturadas 81 fêmeas, com uma média de 2,6 fêmeas por cão por noite (Tabela 11).

Em relação aos valores obtidos por domicílio, os resultados foram heterogêneos,. Um entre os sete domicílios amostrados apresentou a maior média de fêmeas por cão por noite (22,33) e nesse local foram capturados 83,1% do total dos espécimes. Em um domicílio nenhuma fêmea foi capturada. A média de fêmeas por cão por noite foi estimada em 2,6.

Tabela 11: Número de machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* capturados com armadilhas adesivas em locais de repouso de cães em domicílios do município de Panorama SP.

Domicílio	cães expostos	Dia 1			Dia 2			Dia 3			Total		fêmeas/cão/ dia
		♂	♀	Média	♂	♀	Média	♂	♀	Média	♂	♀	
1	2	2	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	2	0	0,00
2	1	0*	0*	0,0	4	2	2,0	5	0	0,0	9	2	0,70
3	2	1	1	0,5	0	1	0,5	0	0	0,0	1	2	0,35
4	1	171	32	32	181	26	26,0	23	9	9,0	375	67	22,33
5	2	13	4	2	0	1	0,5	1	0	0,0	14	5	0,85
6	2	0	0	0,0	12	2	1,0	38	1	0,5	50	3	0,50
7	1	0*	0*	0,0	0	2	2,0	0	0	0,0	0	2	0,70
Total	11	187	37	4,1	197	34	3,1	67	10	0,91	451	81	2,6

*Sem exposição do cão na noite. ♂=número de machos, ♀=número de fêmeas, média=média de fêmeas por cão.

4.5. ESTIMATIVA DA PROPORÇÃO DE REPASTO EM HOSPEDEIRO CANINO (AI)

O número de machos e de fêmeas, segundo a condição do cão exposto (sintomático ou assintomático) e local do experimento é apresentado na tabela 20. No total, foram expostos 7 cães (4 machos e 3 fêmeas) em quatro experimentos.

O número de fêmeas expostas por cão variou entre 32 e 191. Ao todo, foram expostas 491 fêmeas e 670 machos. A proporção de repasto por cão variou entre 9,1% e 91,4%, com média de 68,1%. Não foram observadas diferenças significativas entre o número de fêmeas alimentadas em cães sintomáticos e assintomáticos para a infecção com *Le. i. chagasi*.

4.6. ESTIMATIVA DA PROBABILIDADE DE SOBREVIVÊNCIA (P) E DURAÇÃO DO CICLO GONOTRÓFICO (GC)

4.6.1. Sucesso da Recaptura

Os resultados obtidos nos experimentos de marcação–soltura–recaptura são apresentados nas tabelas de 9 a 13. Entre todos os experimentos, o maior sucesso de recaptura foi obtido nas coletas realizadas com aspirador manual nos abrigos dos animais no peridomicílio. As capturas com armadilhas luminosas apresentaram baixa eficiência nas recapturas.

Durante o experimento realizado em fevereiro (2013) foram marcados e liberados 390 machos e 174 fêmeas. Durante as tentativas de recaptura foram capturados 267 fêmeas e 703 machos (Tabela 12). O galinheiro foi o local onde foram recapturadas as maiores quantidades de espécimes (84,2% das fêmeas, 63,4% dos machos). O tempo máximo de recaptura foi de 13 dias após a soltura (1 macho), ou seja, no 10º dia de recaptura (Figura 12). A taxa de recaptura foi de 10,9% para as fêmeas e 7,7% para machos.

No experimento realizado em abril (2013) foram liberados 310 machos e 70 fêmeas. Similarmente ao observado no primeiro experimento, a maioria dos espécimes ($\pm 90\%$ de ambos os sexos) recapturados foi obtida nas capturas manuais no galinheiro (Tabela 13). O tempo máximo de recaptura foi no 13º dia após na soltura (1 macho) e 10º dia de recaptura. A proporção de recaptura foi 12,8% para as fêmeas e 20,0% para os machos. A distribuição dos espécimes recapturados segundo sexo e dia é apresentada na Figura 13.

Tabela 12: Número de espécimes de *Lu. longipalpis* capturados durante o 1º experimento de captura - marcação-soltura - recaptura. Panorama, 18 de fevereiro a 8 de março de 2013.

Ponto de recaptura	Método	Horas de coleta	Fêmeas capturadas	Fêmeas	Machos	Machos
				recapturadas n (%)	capturados	recapturados n (%)
Abrigos animais						
chiqueiro, Galinheiro (50 metros)	Aspiração	12 horas	113	11 (57,9)	123	8 (26,7)
PS (0 metros)/ Árvore	CDC	156	3	0 (0,0)	10	0 (0,0)
P1 (60 metros)/ Domicílio	CDC	156	58	2 (10,5)	228	2 (6,7)
P2 (50 metros)/ Galinheiro	CDC	156	50	5 (26,3)	199	11 (36,7)
P3 (50 metros)/ Chiqueiro	CDC	156	30	1 (5,3)	90	7 (23,3)
P4 (30 metros)/ Pasto	CDC	156	0	0 (0,0)	9	1 (3,3)
P5 (50 metros)/Pasto	CDC	156	2	0 (0,0)	8	0 (0,0)
P6 (120 metros)/ Pasto	CDC	156	2	0 (0,0)	1	0 (0,0)
P7 (100 metros)/Pasto	CDC	156	2	0 (0,0)	14	0 (0,0)
P8 (100 metros)/Pasto	CDC	156	1	0 (0,0)	6	0 (0,0)
P9 (150 metros)/Pasto	CDC	156	2	0 (0,0)	7	1 (3,3)
P10 (200 metros)/Pasto	CDC	156	1	0 (0,0)	3	0 (0,0)
P11 (150 metros)/Pasto	CDC	156	1	0 (0,0)	2	0 (0,0)
P12 (80 metros)/ Estábulo	CDC	156	2	0 (0,0)	3	0 (0,0)
Total			267	19 (100)	703	30 (100)

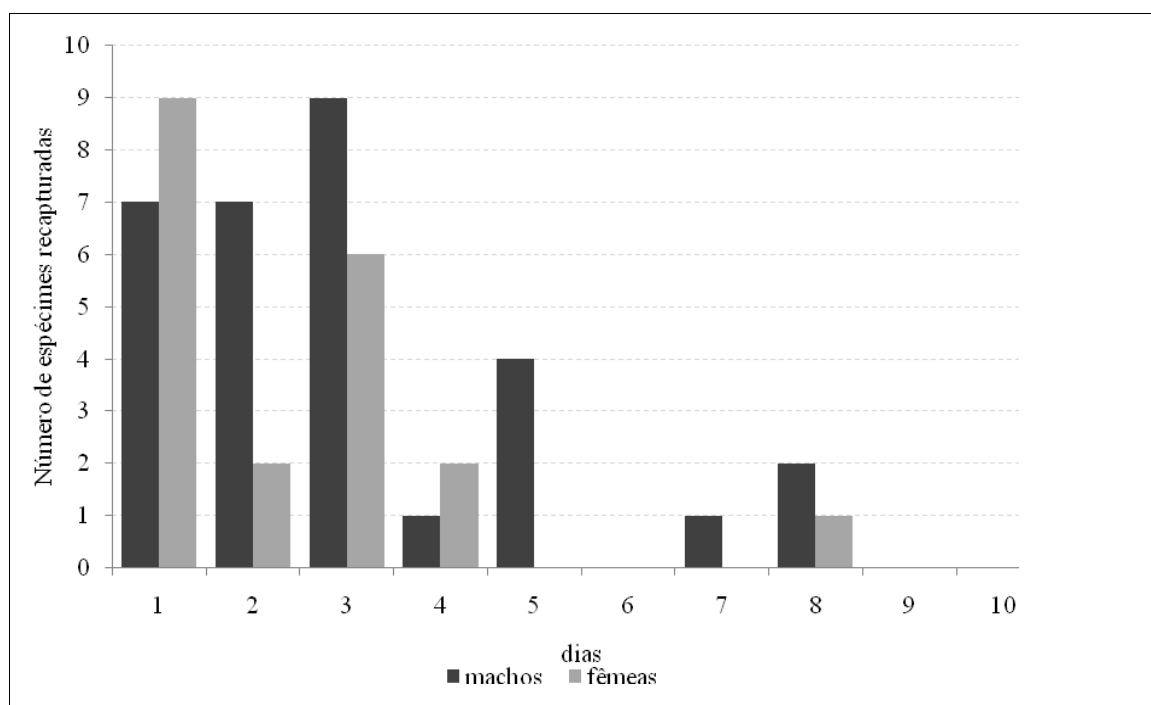


Figura 12: Frequência de recaptura de machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* segundo sexo e dia após início das recapturas. Panorama, 18 de fevereiro a 8 de março de 2013.

Tabela 13: Número de espécimes de *Lu. longipalpis* capturados durante o 2º experimento de captura-marcação-soltura-recaptura. Panorama, 22 de abril a 10 de maio de 2013.

Ponto de recaptura	Método	Horas de coleta	Fêmeas	Fêmeas	Machos	Machos	Total
			capturada s	recapturada s	capturado s	recapturado s	
Aspiração (3horas/dia)							
Abrigos animais (50 m)	o)	189	8(88,8)	891	56 (90,0)	1080
PS (0 m)/ árvore	CDC	168	5	0(0,0)	4	0 (0,0)	9
P1 (50 m)/ domicílio	CDC	168	30	0(0,0)	64	2(3,2)	94
P2 (50 m)/ galinheiro	CDC	168	55	0(0,0)	225	1(1,6)	280
P3 (20 m)/chiqueiro	CDC	168	75	0(0,0)	284	2(3,2)	359
P4 (100 m)/ curral	CDC	168	19	0(0,0)	94	0(0,0)	113
P5 (50 m)/ árvore	CDC	168	0	0(0,0)	2	0(0,0)	2
P6 (50 m)/ árvore	CDC	168	2	1(11,2)	0	0(0,0)	2
P7 (150 m)/ pasto	CDC	168	0	(0,0)	4	1(1,6)	4
P8 (120 m)/ pasto	CDC	168	5	0((0,0)	7	0(0,0)	12
P9 (30 m)/ chiqueiro	CDC	168	15	0(0,0)	41	0(0,0)	56
Total			395	9 (100)	1616	62 (100)	2011

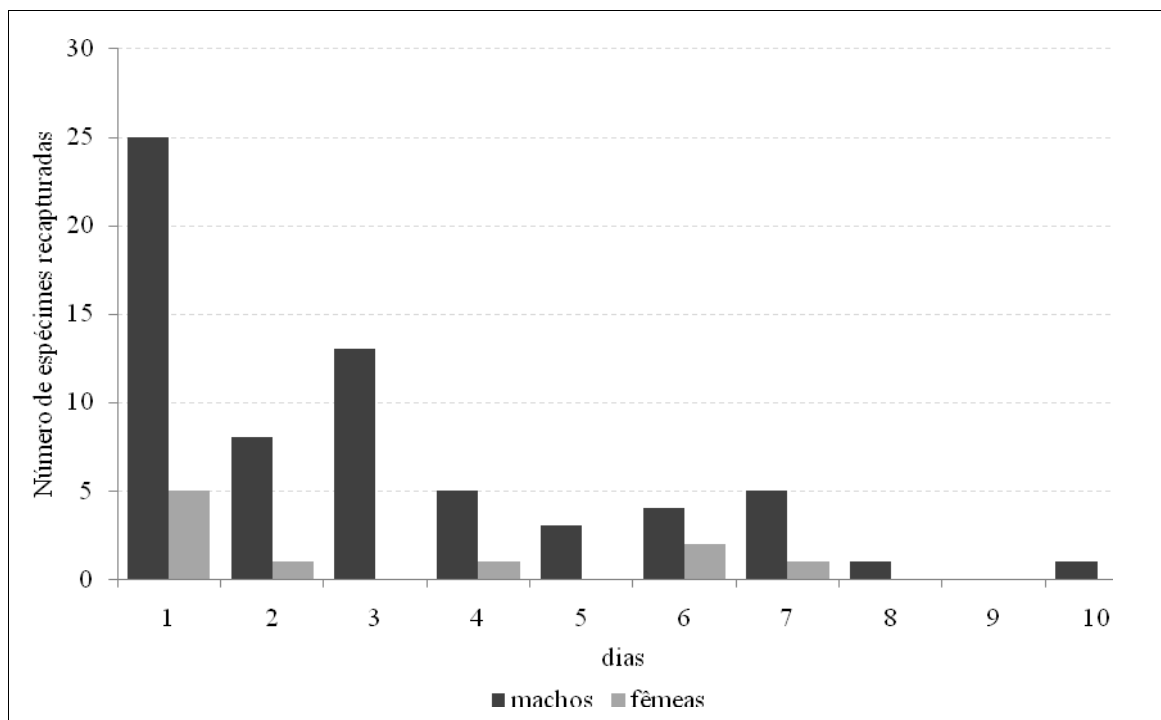


Figura 13: Frequência de recaptura de machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* segundo sexo e dia após início das recapturas. Panorama, 22 de abril a 10 de maio de 2013.

Nos experimentos realizados nos períodos de setembro e outubro de 2013, respectivamente, um pequeno número de fêmeas foram capturadas, portanto para esses períodos não foi possível realizar a estimativa de sobrevivência para este sexo.

No experimento realizado em setembro foram liberados 332 machos e 29 fêmeas. Os resultados obtidos nesse experimento são apresentados na tabela 14. A taxa de recaptura para machos foi de 20,7% (69/332) e para fêmeas de 10,3% (3/29). O tempo máximo de recaptura foi 10 dias após de soltura, no 7º dia de recaptura (Figura 14).

Tabela 14: Número de espécimes de *Lu. longipalpis* capturados durante o 3º experimento de captura-marcação-soltura-recaptura. Panorama, 25 de setembro a 05 de outubro de 2013.

Ponto de recaptura	Método	Horas		Número fêmeas	Fêmeas recapturadas	Número machos	Machos recapturados	Total
		de	coleta					
Galinheiro (50m)	Aspiração	12	horas	54	3 (100)	366	67 (97,1)	490
CDC 1 ponto soltura	CDC	168		11	0(0,0)	35	1(1,4)	47
CDC 2 chiqueiro (10 m)	CDC	168		8	0(0,0)	25	1(1,4)	34
CDC 3 árvore (25 m)	CDC	168		11	0(0,0)	20	0(0,0)	31
CDC 4 domicílio (20 m)	CDC	168		0	0(0,0)	1	0(0,0)	1
CDC 5 vegetação (40 m)	CDC	168		0	0(0,0)	2	0(0,0)	2
CDC 6 árvore (50 m)	CDC	168		2	0(0,0)	3	0(0,0)	5
Total				86	3(100)	452	69(100)	610

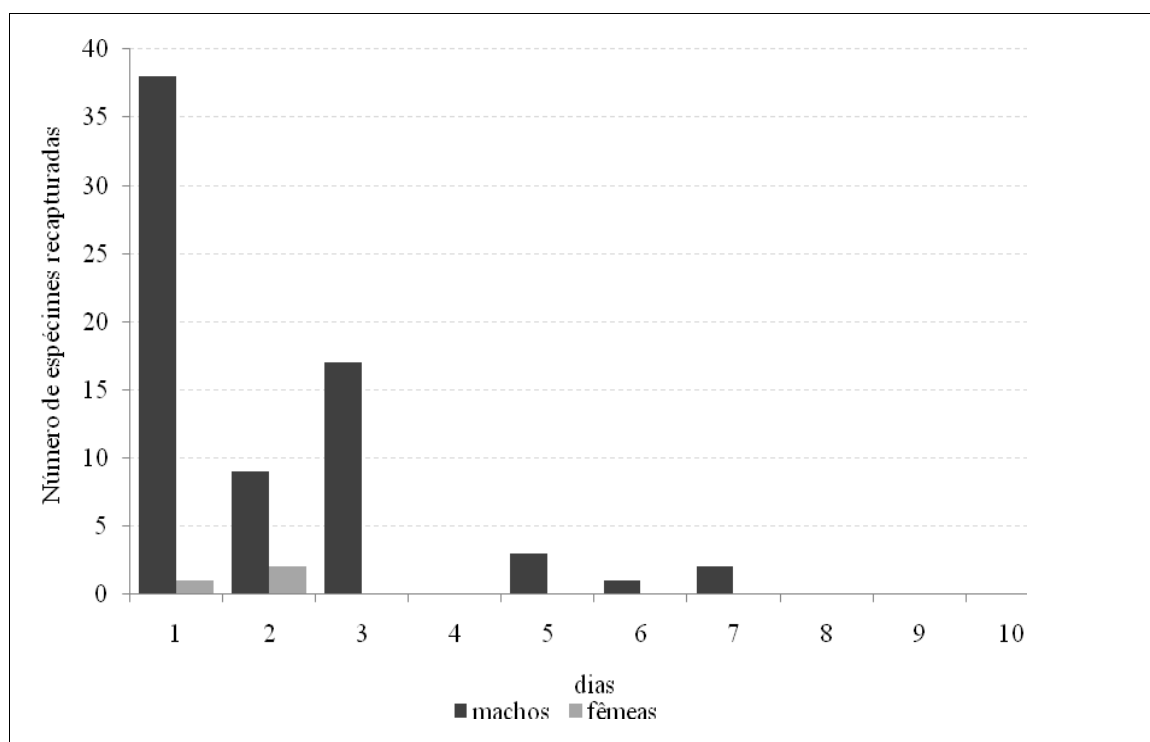


Figura 14: Frequência de recaptura de machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* segundo sexo e dia após início das recapturas. Panorama, 25 de setembro a 05 de outubro de 2013.

No experimento realizado em outubro foram liberados 200 machos e 45 fêmeas, sendo recapturados 20 machos e uma fêmea. No esforço de recaptura foram coletados 99 fêmeas e 528 machos (Tabela 15). Não foram recapturados espécimes nas armadilhas luminosas. O tempo máximo de recaptura foi 9 dias dia após a soltura, sendo o maior número de espécimes recapturados no primeiro dia de coleta (Figura 15). A taxa de recaptura foi de 10% para machos e para fêmeas de 2,2%.

Tabela 15: Número de espécimes de *Lu. longipalpis* capturados durante o 4º experimento de captura-marcação-soltura-recaptura. Panorama, 28 de outubro a 07 de novembro de 2013.

Ponto de recaptura	Método	Horas de coleta	Numero fêmeas	Fêmeas recapturadas	Numero machos	Machos recapturados	Total
Galinheiro (50m)	Busca ativa	18 horas	84	1(100)	486	20(100)	591
CDC 1 ponto soltura	CDC	120	8	0(0,0)	7	0(0,0)	15
CDC 2 chiqueiro	CDC	120	3	0(0,0)	23	0(0,0)	26
CDC 3 árvore (25 m)	CDC	120	3	0(0,0)	5	0(0,0)	8
CDC 4 domicílio	CDC	120	1	0(0,0)	0	0(0,0)	1
CDC 5 vegetação (40 m)	CDC	120	0	0(0,0)	7	0(0,0)	7
CDC 6 árvore (50 m)	CDC	120	0	0(0,0)	0	0(0,0)	0
Total			99	1(100)	528	20 100)	648

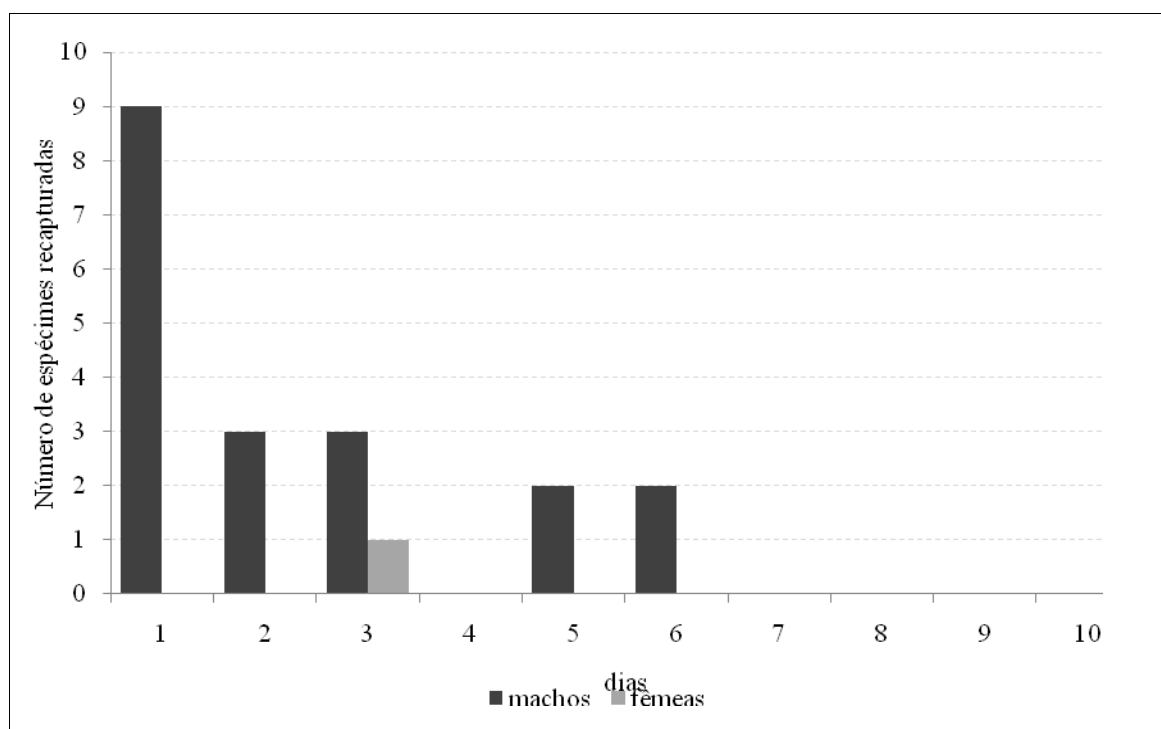


Figura 15: Frequência de recaptura espécimes de *Lutzomyia longipalpis* segundo sexo e dia após início das recapturas. Panorama, 28 de outubro a 07 de novembro de 2013.

No experimento realizado em fevereiro (2014) foram marcadas e liberadas 83 fêmeas ingurgitadas e 315 machos. Durante o período de recaptura foram coletados 229 fêmeas e 1434 machos (Tabela 16). Entre os espécimes coletados foram recapturados 4 fêmeas e 60 machos, significando uma taxa de recaptura para machos de 19,0% e 4,8 para as fêmeas. O tempo máximo de recaptura para os machos foi no 12º dia após a soltura (10º dia de recaptura) e no 7º após a soltura (5º dia de recaptura). Os resultados são apresentados na Figura 16.

Tabela 16: Número de espécimes de *Lutzomyia longipalpis* capturados durante o 5º experimento de captura-marcação-soltura-recaptura. Panorama, 26 de fevereiro a 10 de março de 2014.

Ponto de recaptura	Método	Horas de coleta	Fêmeas capturadas	Fêmeas recapturadas	Machos capturados	Machos recapturados	Total
Galinheiro (20 m)	Aspiração	(3horas/dia)	90	1 (25,0)	891	39(65,0)	981
Ponto de soltura	CDC	168	26	2(50,0)	113	1(1,7)	139
P1 (50 m)/ domicílio	CDC	168	4	0(0,0)	12	1(1,7)	16
P2 (50 m)/ galinheiro	CDC	168	20	0(0,0)	54	1(1,7)	74
P3 (20 m)/chiqueiro	CDC	168	78	1(25,0)	326	17(28,2)	404
P4 (50 m)/ galinheiro	CDC	168	10	0(0,0)	35	1(1,7)	45
P5 (150 m)/árvore	CDC	168	0	0(0,0)	2	0(0,0)	2
P6 (100 m)/ árvore	CDC	168	1	0(0,0)	1	0(0,0)	2
Total			229	4(100)	1434	60 (100)	1663

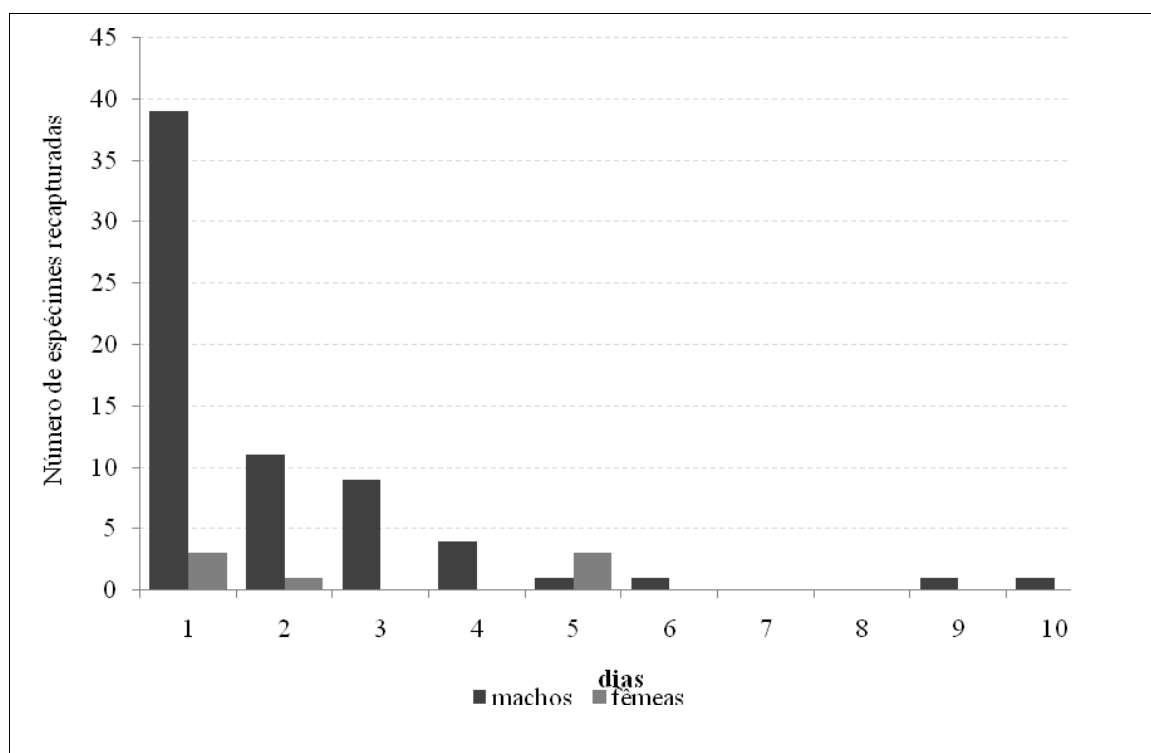


Figura 16: Frequência de recaptura de machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* segundo sexo e dia após início das recapturas. Panorama, 26 de fevereiro a 10 de março de 2014.

4.6.2. Sobrevida e Tamanho da População

As estimativas de sobrevida para machos e fêmeas de *Lu. longipalpis* para cada experimento são apresentados na Tabela 17. As maiores taxas de sobrevida foram observadas para os machos nos períodos de fevereiro a março (2013) e entre outubro e novembro (2013). Para as fêmeas, a maior taxa de sobrevida observou-se no período de março-abril de 2013. As figuras 18 e 19 apresentam as curvas de sobrevivência obtidas na análise de regressão, para fêmeas e machos, respectivamente.

Tabela 17: Resumo das estimativas mensais da sobrevida diária de machos e fêmeas de *Lu. longipalpis*. b = coeficiente de regressão; R^2 = coeficiente de determinação; p = grau de significância da reta; s = sobrevivência.

Período	Fêmeas				Machos			
	b	R^2	P	S	b	R^2	p	s
Fevereiro/13	-0,230	0,630	0,006	0,79	-0,290	0,670	0,00	0,74
Março/13	-0,120	0,350	0,012	0,88	-0,290	0,810	0,00	0,74
Setembro/13	-	-	-	-	-0,369	0,694	0,003	0,69
Outubro/13	-	-	-	-	-0,236	0,356	0,03	0,79
Fevereiro/14	-0,11	0,33	0,077	0,89	-0,34	0,72	0,001	0,71

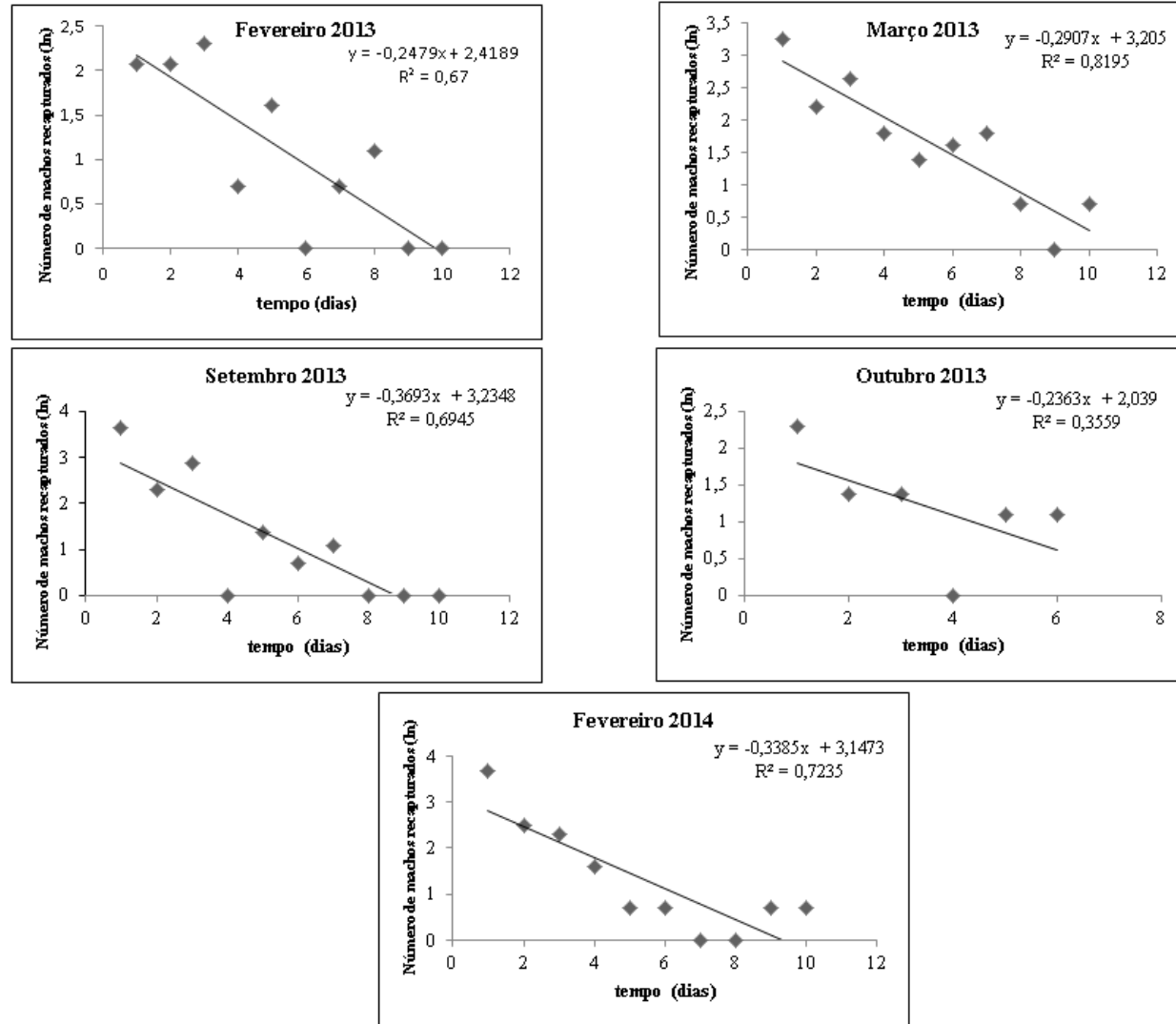


Figura 17: Regressão do número de espécimes machos ($\ln(y+1)$) de *Lu. longipalpis*, recapturados em armadilhas luminosas e busca ativa, e dos dias após o início da recapturas, no município de Panorama, no período de fevereiro 2013 a fevereiro de 2014.

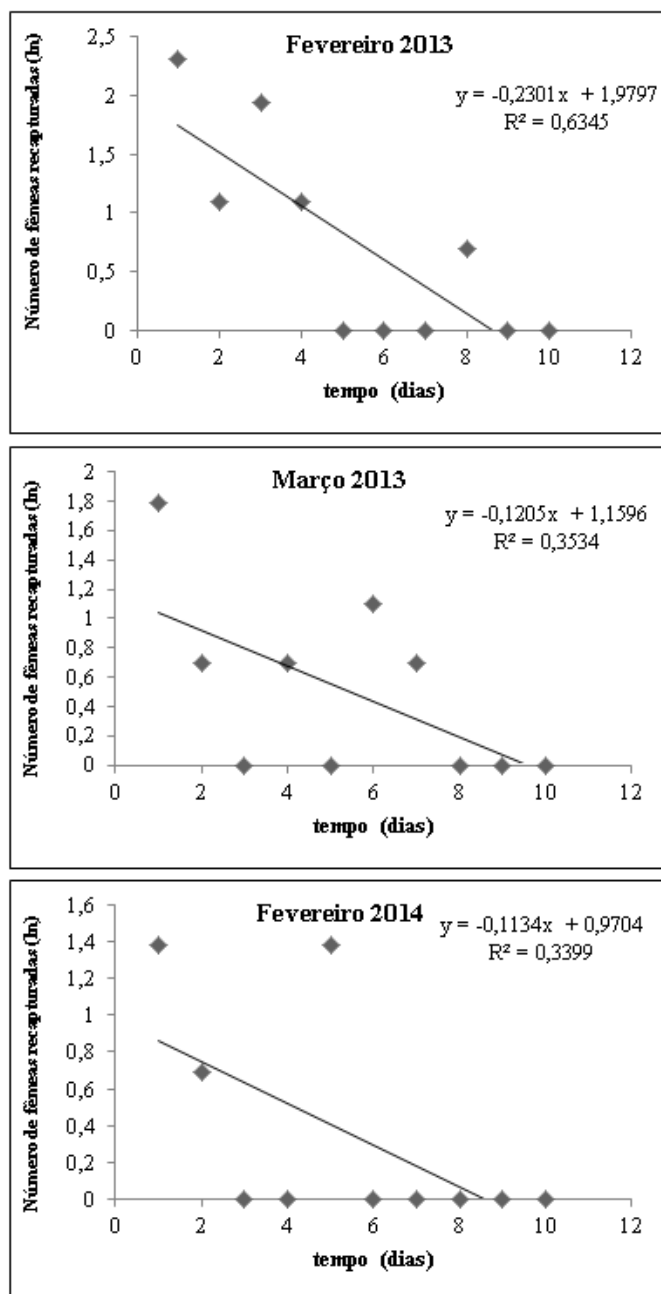


Figura 18: Regressão do número de espécimes fêmeas ($\ln(y+1)$) de *Lu. longipalpis*, recapturados em armadilhas luminosas e busca ativa, e dos dias após o início da recapturas, no município de Panorama, no período de fevereiro 2013 a fevereiro de 2014.

O tamanho da população de fêmeas variou entre 667 e 3884 (Tabela 18), sendo o maior valor estimado para o mês de fevereiro de 2014. Para os machos o tamanho populacional variou de 2882 a 9543, com o maior valor em fevereiro de 2013 (Tabela 19).

Tabela 18: Estimativa do tamanho da população de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* no município de Panorama SP, segundo os meses.

Fêmeas						
Mês/ano	a	r	n	TP	(SD)	IC
Fevereiro/13	174	19	286	2496,9	(525,5)	1466,92 - 3526,88
Março/13	70	9	404	2835	(843,1)	1180,43 - 4489,56
Setembro/13	29	3	91	667	(294,9)	88,84 - 1245,15
Outubro /13	45	1	100	2272,5	(1298,9)	-273,4 - 4818,48
Fevereiro/14	83	4	233	3884,4	(4096,3)	-4144,36 - 11913,16

a: número de espécimes marcados e liberados; **r:** número de espécimes recapturados; **n:** total de espécimes capturados nas tentativas de recaptura; **TP:** tamanho populacional estimado; **SD:** desvio padrão, **IC:** intervalo de confiança.

Tabela 19: Estimativa do tamanho da população de machos de *Lutzomyia longipalpis* no município de Panorama SP, nos meses de fevereiro, março, setembro, outubro de 2013 e fevereiro de 2014.

Machos						
Mês	a	r	n	TP	(SD)	IC
Fevereiro/13	390	30	733	9,234,2	8890,3	7882,0 - 26968,0
Março /13	310	62	1678	8261,7	8040,7	7363,7-24155,8
Setembro/13	332	59	511	2833,1	2639,6	2291,5-8055,7
Outubro/13	200	20	548	5228,6	5004,3	4317,4-15299,4
Fevereiro/14	315	60	1494	7714,9	7498,7	6847,7-22547,3

a: número de espécimes marcados e liberados; **r:** número de espécimes recapturados; **n:** total de espécimes capturados nas tentativas de recaptura; **TP:** tamanho populacional estimado; **SD:** desvio padrão, **IC:** intervalo de confiança.

4.6.3. Estimativa da Duração do Ciclo Gonotrófico (GC)

Nos dois primeiros experimentos de MSR realizado no verão entre fevereiro e março de 2013, foram recapturadas duas fêmeas sem ovos e sem sangue no abdome no 5º dia após a soltura. Portanto, a duração do ciclo gonotrófico foi estimado entre 4-5 dias. O terceiro experimento realizado no final do inverno (setembro/2013), uma fêmea foi recapturada no quarto dia após soltura, abrigada no chiqueiro. Esta fêmea apresentava ovos no seu abdome, foi mantida individualizada e realizou a postura no 7º dia após a soltura. No quarto experimento (início da primavera), uma fêmea foi capturada três dias após a soltura apresentando ovos no IV estágio de desenvolvimento do ciclo gonotrófico (ABONNENC, 1972). Portanto, estimou-se que esta fêmea completasse o ciclo gonotrófico entre o 5º e 6º dia. No quinto experimento realizado no verão (fevereiro/2014), duas fêmeas realizaram a oviposição no quinto dia após a soltura e outras duas fêmeas ovipuseram no 8º dia após a soltura. Uma fêmea recapturada no segundo dia de recaptura realizou a oviposição no 8º dia após a soltura. Portanto, estima-se que o ciclo gonotrófico no mês de fevereiro variou entre 5 e 8 dias. Assim observa-se que a duração do ciclo gonotrófico de *Lu. longipalpis* pode variar, entre 4-8 dias, mesmo quando estimado na mesma estação, que no caso foi o verão.

4.7. ESTIMATIVA DA TAXA DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL E DA PROPORÇÃO DE FÊMEAS POTENCIALMENTE INFECTIVAS (b)

Para estimar a taxa de infecção experimental foram utilizadas as informações obtidas dos experimentos realizados no município de Bauru, isto pela elevada mortalidade das fêmeas durante o transporte dos espécimes ao laboratório no experimento realizado em Panorama (SP). Nos cinco cães expostos nos experimentos dois, três e quatro (Tabela 20) foram acompanhadas 288 fêmeas das quais 225 foram dissecadas para observação da presença de flagelados. Nenhuma das fêmeas ingurgitadas no segundo e terceiro experimento apresentou desenvolvimento do parasita. No quinto experimento, em que um único cão foi exposto, 101 (97,1%) das 104 fêmeas dissecadas apresentaram infecção maciça por flagelados (Tabela 20) e as mesmas apresentaram desenvolvimento de formas flageladas potencialmente infectivas. Portanto, estimou-se uma taxa de infecção experimental de 44,9%, com a mesma proporção de fêmeas apresentando formas potencialmente infectivas.

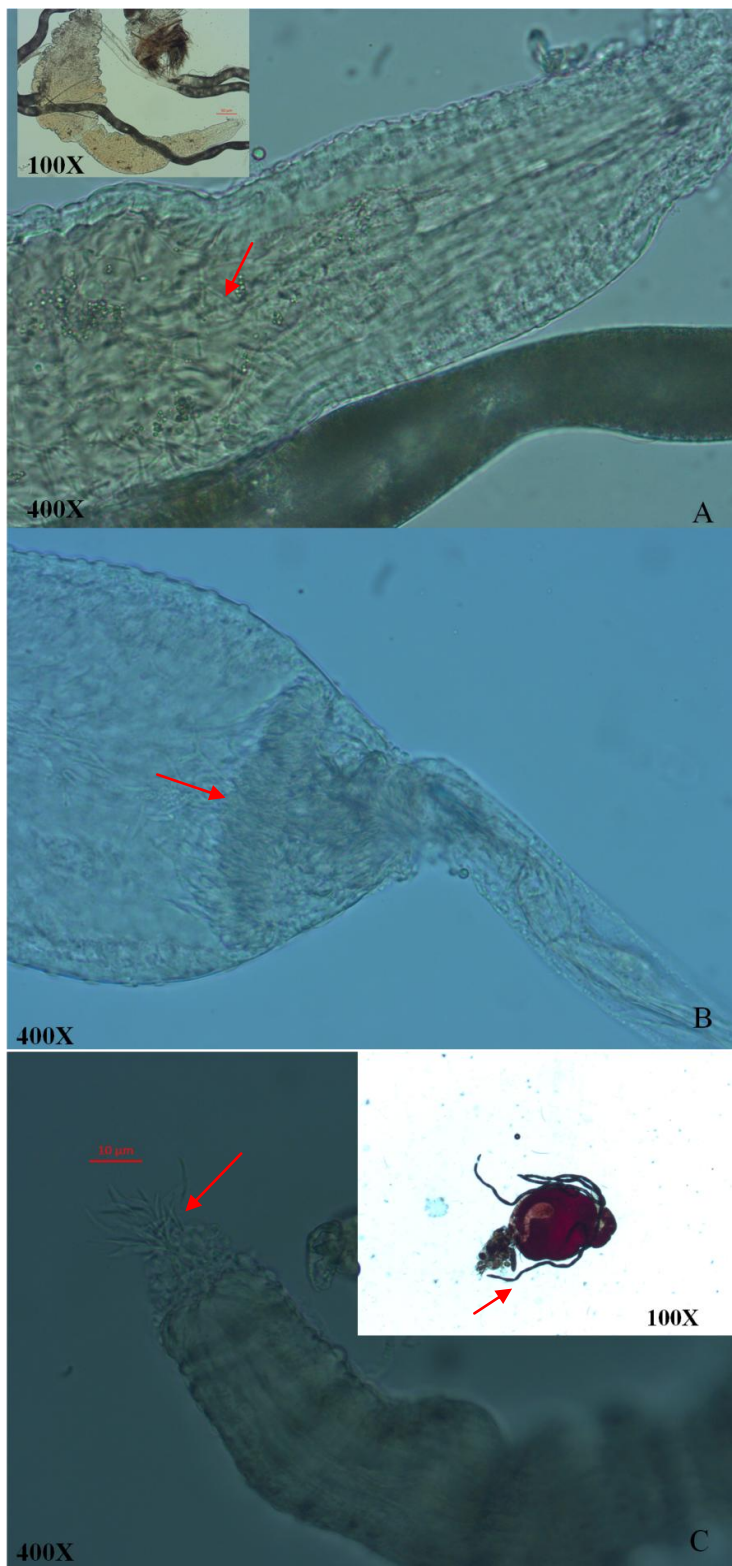


Figura 19: Imagens do intestino (100x) e do intestino médio torácico (400x) de espécimes de *Lutzomyia longipalpis* infectados como flagelados de *Leishmania infantum chagasi*. A. Infecção 72 horas após repasto infectivo. B. infecção após 96 horas mostrando bloqueio da válvula estomodeal. C. flagelados localizados na região anterior do intestino torácico (400X), após segundo repasto.

Tabela 20. Descrição dos experimentos para estimar a proporção de repasto em cães de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* e taxa de infecção experimental por *Leishmania infantum chagasi*, segundo local data.

Experimento, local e data	Número de cães	Estado clínico	Características do animal	Fêmeas expostas	Machos expostos	Fêmeas ingurgitadas	Fêmeas mortas	Proporção de alimentação	Fêmeas dissecadas	Fêmeas infectadas (%)	Fêmeas potencialmente infectivas (%)
1, Panorama, 10 de maio 2013	2	Sintomático ¹	Macho, pêlos curtos, cor castanha. Peso 8 kg.	64	200	44	9	68,8	0	0 (0)	0 (0)
		Assintomático ²	Fêmea, pêlos longos, cor branca. Peso 7 kg	50	110	34	3	68	0	0 (0)	0 (0)
2, Bauru, 10 de abril de 2014.	2	Assintomático ³	Macho, pêlos curtos, cor preta e cinza. Peso 5 kg.	35	32	32	0	91,4	28	0 (0)	0 (0)
		Assintomático ⁴	Macho, pelos longos cor preta, 7 kg	32	44	3	0	9,4	3	0 (0)	0 (0)
3, Bauru, 10 de Junho de 2014	2	Sintomático ⁵	Fêmea, pêlos curtos, cor preta. 6 kg	69	36	63	0	91,3	55	0 (0)	0 (0)
		Assintomático ⁶	Fêmea, pêlos curtos, cor caramelo, 8 kg	50	35	40	1	80	35	0 (0)	0 (0)
4, Bauru, 14 de abril de 2015.	1	Sintomático ⁷	Macho, pêlos curtos, cor branca e preta, 7 kg	191	213	150	8	78,5	104	101 (97,1)	101 (97,1)
Total	7			491	670	366	21	68,1*	225	101 (44,9)	101 (44,9)

* proporção média

¹:Testes confirmatórios da infecção: 1 - 2: TR DPP, ELISA +; 3 - 4: TR DPP, RIFI, ELISA; 5 - 6: TR DPP, ELISA; 7: TR DPP, Clínica

4.8. DURAÇÃO DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO EXTRÍNSECO (n) E VERIFICAÇÃO DA COMPETÊNCIA VETORIAL DA POPULAÇÃO DE *Lutzomyia longipalpis*

4.8.1. Duração do Período de Incubação Extrínseco

Para estimar a duração do período de incubação extrínseco foram utilizadas as informações obtidas da dissecação das fêmeas ingurgitadas no quinto experimento de repasto em cães. As formas flageladas no intestino torácico (Tabela 21, Fig. 17A) foram detectadas depois de 72 horas do repasto infectivo em cão. A completa digestão sanguínea e presença de formas potencialmente infectivas foi observada no quarto dia após o repasto, com formas flageladas localizadas na região anterior do intestino e na válvula estomodeal (Fig. 17B). No quarto dia após o repasto, 123 fêmeas permaneciam vivas e 14 delas realizaram o segundo repasto sanguíneo em hamster limpo. No quinto dia houve uma alta mortalidade de fêmeas associado principalmente à oviposição, todavia, das 108 fêmeas vivas, 20 realizaram o segundo repasto sanguíneo em hamster sadio. A figura 17C ilustra microfotografias de formas flageladas localizadas na válvula estomodeal e no intestino das fêmeas com sangue após o repasto sanguíneo, apresentando resto de ovos na região posterior.

O crescimento em cultura de flagelados foi observado apenas a partir de fragmentos de baço e fígado de hamsters expostos à picada de fêmeas de *Lu. longipalpis* cinco dias após o repasto infectivo. Todavia, a identificação de DNA de tripanosomatídeos nas amostras de fígado e baço de um hamsters que foi exposto a fêmeas potencialmente infectivas quatro dias após o repasto infectivo, indica que as promastigotas de *Le. i. chagasi* ultrapassaram o período de incubação extrínseca e podem ser transmitidas em suas formas infectantes por *Lu. longipalpis* desde que mantidas nas condições de temperatura na qual os experimentos foram desenvolvidos, ou seja $28^{\circ}\text{C}\pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

Tabela 21: Número de fêmeas que fizeram o repasto sanguíneo infectivo sobreviventes, das mortas, dissecadas e infectadas, segundo tempo (horas) após a exposição a cão infectivo em Bauru SP, 2015, de fêmeas desafiadas a segundo repasto sanguíneo em hamster suscetível e destas, as que se alimentaram.

Tempo (horas)	Fêmeas vivas	Fêmeas mortas	Fêmeas dissecadas	Fêmeas infectadas
0 - 24	150	11	0	0
24- 48	139	0	0	0
48- 72	139	16	10	9
72 - 96	123*	15	10	10
96- 120	108**	45	45	45
120- 144	64	14	10	10
144- 168	50	25	10	10
168- 192	25	13	9	7
192- 216	12	7	5	5
216- 240	5	5	5	5
Total	150	150	104	101

*exposição ao 1º hamster, 14 fêmeas (11,3%) fizeram o segundo repasto.

**Exposição do 2º hamster, 20 fêmeas (18,5%) fizeram o segundo repasto.

4.8.2. Verificação da Competência Vetorial

O crescimento maciço de flagelados nas culturas realizadas a partir de fragmentos de baço dos dois hamsters picados por fêmeas potencialmente infectivas somente foi observado no animal exposto no 5º dia (Figura 20). A cultura do hamster exposto no 4º dia foi inconclusiva, sem possibilidade de observar a presença de flagelados.

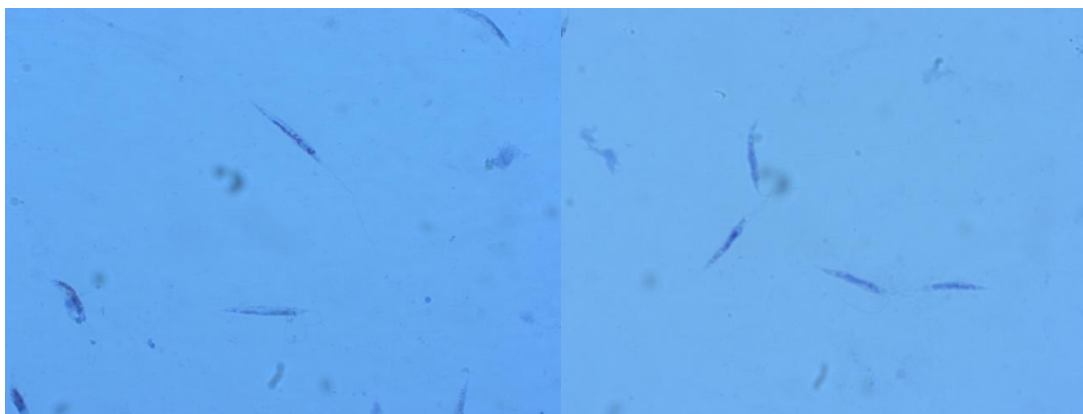


Figura 20: Flagelados de culturas obtidas de fragmentos de baço de hamster exposto à picada de fêmeas de *Lu. longipalpis* infectadas com *Le. i. chagasi*.

No exame molecular para detecção de DNA de tripanosomatídeos foram obtidos de produtos de PCR com fragmentos de 520 pb nas amostras de fígado e baço dos dois hamsters expostos à picada das fêmeas de *Lu. longipalpis* (Figura. 19), corroborando a transmissão da *Le. (i) chagasi* a hamsters limpos, via picada deste flebotomíneo no quarto e quinto dia após o repasto infectivo no cão.

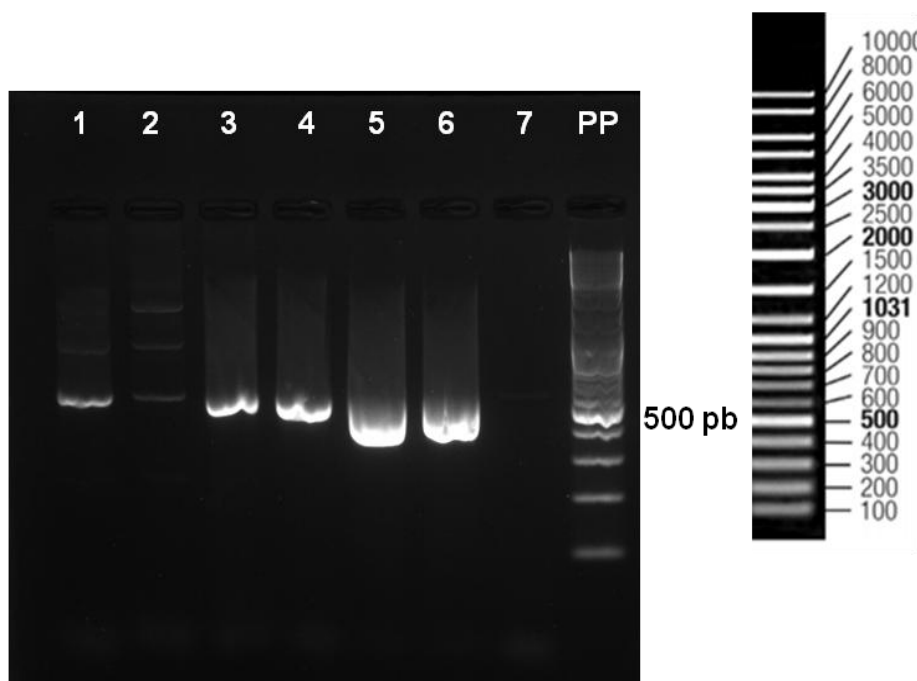


Figura 21: Produtos de amplificação por PCR do fragmento de 520 pares de bases (pb) do SSUrDNA em gel de agarose 2%. 1-2. Amplificado do DNA de fígado e baço do hamster 1. 3-4. Amplificado do DNA de fígado e baço do hamster 2. 5. Controle de *Le. amazonensis*. 6. Controle *Le. shawi*. 7. controle negativo. PP. padrão de peso molecular 100 pb (Fermentas SM0331).

4.9. ESTIMATIVA DA CAPACIDADE VETORIAL

Para efeitos de estimar a capacidade vetorial da população de *Lu. longipalpis* no município de Panorama - SP, foram utilizadas as informações apresentadas na tabela (22).

Tabela 22. Valores estimados para cada parâmetro utilizado no cálculo da capacidade vetorial.

Densidade em relação ao hospedeiro (m)		Hábito de picada (a)	Sobrevida (p)	Duração do período de incubação extrínseco (n)	sobrevida infectiva (1/-lnp)	Proporção de fêmeas potencialmente infectivas (b)	Capacidade vetorial (V)
Método utilizado	Valor						
OBETs	0,31	(0,17) ²	0,79	4	4,24	0,45	0,0
Aspiração direta	13,5	(0,17) ²	0,79	4	4,24	0,45	0,7
Armadilhas adesivas	2,6	(0,17) ²	0,79	4	4,24	0,45	0,1
Armadilhas adesivas	22,3	(0,17) ²	0,79	4	4,24	0,45	1,2
OBETs	0,31	(0,17) ²	0,79	4	4,24	0,97	0,0
Aspiração direta	13,5	(0,17) ²	0,79	4	4,24	0,97	1,6
Armadilhas adesivas	2,6	(0,17) ²	0,79	4	4,24	0,97	0,3
Armadilhas adesivas	22,3	(0,17) ²	0,79	4	4,24	0,97	2,7

Para efeitos de estimar a capacidade vetorial da população de *Lu. longipalpis* no município de Panorama - SP, foram utilizadas as informações apresentadas na tabela (22).

Quanto à densidade em relação ao hospedeiro canino, observa-se que este parâmetro apresentou variabilidade segundo o método utilizado para sua estimativa. Portanto, para efeitos da análise da capacidade vetorial, serão considerados os valores obtidos nas três metodologias. Além disso, nas capturas com armadilhas adesivas observou-se que um dos domicílios respondeu por 83% das fêmeas capturadas com este método. Por este motivo foi estimada a capacidade vetorial para este local.

O hábito de picar ao cão (**a**) foi estimado em 0,17 (0,68/4), assumindo-se que, em média, 68% das fêmeas realizam o repasto sanguíneo em cão e que a duração média do ciclo gonotrófico é de quatro dias. Este resultado significa que as fêmeas da população poderão ter contato com o hospedeiro canino em média a cada 5,8 dias (1/0,17).

A probabilidade de sobrevivência diária (p) foi estimada em condições naturais em 79% (0,79). Este valor foi usado para apresentar o maior coeficiente de determinação. Portanto, sendo a expectativa de vida em dias calculada com a expressão $1/(-\ln p)$, então a sobrevivência foi estimada como $1/(-\ln(0,79)) = 1/0,23 = 4,24$ dias.

A duração do período de incubação extrínseco (n): estimado através da dissecação de fêmeas alimentadas em hospedeiro canino comprovadamente infectado com *Le. i. chagasi*, foi estimado em quatro (4) dias. Assim, sendo a sobrevivência infectiva calculada com a expressão $p^n/(-\ln p)$, então teremos uma sobrevivência infectiva estimada de $(0,79)^4/(-\ln(0,79)) = 1,65$ dias.

Em relação à proporção de fêmeas potencialmente infectivas (b), considerando a elevada competência vetorial da população, assume-se que todas as fêmeas infectadas têm o potencial de se tornarem infectantes. Como foi observada heterogeneidade na infecção de fêmeas alimentadas nos cães, foi utilizado o valor da proporção média de infecção (0,45) e para avaliar o impacto de cães altamente infectivos, foi utilizado o valor obtido no quinto experimento (0,97).

Quanto aos valores estimados de capacidade vetorial, mantendo constante o valor dos parâmetros de hábito de picada, sobrevivência e duração do período de incubação extrínseco, e variando a densidade de fêmeas por hospedeiro canino por dia (m) e da proporção de fêmeas potencialmente infectivas (b), observou-se que um único domicílio pode representar maior risco para a transmissão do agente, com valores de capacidade vetorial superiores à unidade, isto potencializado pela elevada taxa de sobrevivência, alta grau de cinofilia e elevada competência vetorial de *Lu. longipalpis*.

5. DISCUSSÃO

5.1. DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DE *Lu. longipalpis* E A CIRCULAÇÃO DE *Leishmania infantum chagasi* EM FLEBOTOMÍNEOS EM PANORAMA, SÃO PAULO.

A frequência com que uma espécie vetora é encontrada em determinado foco determina diretamente seu potencial de transmitir o agente, pois afeta parâmetros da capacidade vetorial como a densidade em relação ao hospedeiro (**m**) e a taxa de contato (**a**). Esta frequência está influenciada por variáveis que modulam sua distribuição espaço-temporal, entre estas, fatores ecológicos relacionados ao clima, que podem produzir padrões sazonais de distribuição (LAFFERTY, 2009); assim como por fatores relacionados à cobertura vegetal e a densidade e diversidade de hospedeiros (REISEN, 2010), que podem aumentar o tamanho da população do vetor por uma maior oferta de fontes alimentares e locais de abrigo. Desta maneira, a interação espacial de populações de vetores, parasitas, e hospedeiros sob influência dessas variáveis modulam a dinâmica de transmissão e perfil epidemiológico de zoonoses como as leishmanioses. Portanto, a avaliação da distribuição espaço-temporal é uma das ferramentas da vigilância entomológica que podem contribuir para a elaboração de medidas de prevenção e controle (GOMES, 2002), identificando períodos e áreas com maior risco potencial de transmissão.

Após a detecção da presença de *Lu. longipalpis* no município de Panorama no ano 2005 (JIMENEZ, 2015), no período de 2007 a 2012 foram notificados 52 casos humanos, (BRASIL, 2012), confirmando a intensidade da transmissão da *Le. i. chagasi* nesta área e a necessidade de estudos que contribuam ao conhecimento da bionomia desta espécie e para a elaboração de medidas visando diminuir a transmissão. No presente trabalho, durante os 48 meses de coletas foi observado que *Lu. longipalpis* esteve presente em todos os meses e em todos os pontos de captura, com a maior frequência dessa espécie durante a estação chuvosa, sobretudo, de outubro a março. Estas observações também são corroboradas pela observação da associação estatisticamente significativa entre a frequência mensal de *Lu. longipalpis* e os valores de precipitação total 20 dias antes da captura, assim como com os valores médios de temperatura mínima.

Nossos resultados são consistentes com os obtidos em outros focos de LVA no Brasil aonde *Lu. longipalpis* predomina (RÊBELO, 2001; RESENDE et al., 2006; SILVA et al., 2007). No município de Dracena (SP), localizado a 30 km da área de estudo, HOLCMAN et al. (2013) observaram o mesmo padrão de distribuição de *Lu. longipalpis* em um estudo realizado com capturas com armadilhas automáticas luminosas por um período de oito anos. Este padrão de distribuição temporal poderia ser explicado pela modificação das condições do solo no período de chuvas, que favorece o desenvolvimento das formas imaturas (CHANIOTIS, 1982). Estas observações podem contribuir ao desenvolvimento de campanhas de prevenção e controle nos períodos que antecedem os picos de frequência do vetor.

Quanto à distribuição espacial, as maiores frequências foram observadas em domicílios com criação de galináceos e sem remanejamento da matéria orgânica no quintal, assim como com presença de vegetação próxima ao domicílio. Estes resultados chamam a atenção para a importância de condições ambientais como a presença de galinheiros na manutenção de *Lu. longipalpis*. Resultados similares foram descritos por BARROS (2006), que observou em um foco de LVA no estado do Maranhão uma frequência de *Lu. longipalpis* quatro vezes maior em domicílios com galinheiros quando comparada a domicílios sem estes. Similarmente, ALEXANDER et al. (2002) sugerem que a presença de galinheiros pode influenciar tanto positiva quanto negativamente alguns parâmetros da capacidade vetorial. Por um lado, a presença de *Gallus gallus* pode aumentar a densidade do vetor (**m**) pela atração dos flebotomíneos a um determinado local e a manutenção de uma maior densidade populacional. Porém, também poderia diminuir o contato vetor-homem pela presença de fontes sanguíneas alternativas e mais acessíveis. Nossos resultados suportam a primeira hipótese, pela maior frequência de flebotomíneos nos locais com galinheiros, assim como pela captura nesses locais de espécimes em períodos pouco favoráveis aos flebotomíneos (estação seca).

Além disso, outras características do município também devem ser consideradas. De forma geral, no município de Panorama, os domicílios apresentam homogeneidade em relação às suas características, tais como grandes quintais com presença de animais domésticos e árvores frutíferas. Estas características de paisagem propiciam condições para o desenvolvimento do vetor por aumento na disponibilidade de matéria orgânica e na oferta de fontes sanguíneas, atraindo animais sinantrópicos ao peridomicílio

(FERNANDEZ et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012). Chama atenção o fato de que, mesmo com estas condições, em alguns domicílios não são capturados espécimes de *Lu. longipalpis*, pelos hábitos dos moradores de retirar a matéria orgânica do quintal.

Desta maneira, nossos resultados sugerem que os galinheiros contribuem para o aumento da frequência de *Lu. longipalpis*, no entanto, atividades de manejo ambiental (retirada de matéria orgânica) poderiam contribuir à sua diminuição. A menor frequência em domicílios com retirada de matéria orgânica do quintal pode estar relacionada à diminuição de criadouros, pois, segundo CASANOVA et al. (2013), peridomicílios com presença de matéria orgânica, sobretudo com fezes de galináceos são, importantes locais para o desenvolvimento dos imaturos. Resultados similares têm sido descritos em focos de LTA no estado do Paraná. TEODORO et al. (2003) observaram a diminuição da frequência de *Ny. neivai* associada a intervenções no ambiente peridomiciliar (modificação ambiental e disinsetização).

Considerando que a manutenção de galináceos (*Gallus gallus*) nos domicílios de áreas urbanas está associada a fatores como nível socioeconômico da população e culturais, entre outros, sua eliminação constitui um importante desafio para a gestão pública. Medidas como o tratamento destes abrigos animais com inseticidas residuais poderiam ter um impacto menor ou ineficiente (CASANOVA et al., 2013) pois em presença de vegetação próxima os flebotomíneos podem encontrar abrigos temporários (SALOMON et al., 2015), assim como demandariam maior custo tanto de materiais quanto de pessoal treinado (ALEXANDER et al., 2002).

Considera-se, portanto, que a identificação de domicílios com estas características poderia ser utilizada para o mapeamento de pontos estratégicos para realização atividades de controle vetorial.

Outro aspecto a ser analisado na vigilância entomológica é infecção natural do vetor com o patógeno (GOMES, 2002), pois esta permite realizar inferências epidemiológicas do contato de vetores com hospedeiros competentes no foco e avaliar a intensidade da transmissão. No presente estudo, espécimes pertencentes a cinco espécies de flebotomíneos capturados (91,9% correspondente a *Lu. longipalpis*) foram analisados mediante exame parasitológico e molecular para detectar a infecção natural com *Le. i. chagasi*. No exame parasitológico não foi detectada infecção por flagelados no intestino das fêmeas dissecadas. Este fato pode estar relacionado ao método de captura

utilizado (CDC), que atrai principalmente fêmeas nulíparas, assim como às dificuldades de capturar fêmeas em seus abrigos naturais. Por meio do método de dissecação e observação microscópica de flagelados, têm sido descritas taxas de infecção natural variando entre 0,2-7,14% (LAINSON e SHAW, 1985; SHERLOCK et al. 1996).

Como método alternativo à dissecação, foi utilizado a identificação molecular por sequências de DNA de leishmania. Nos últimos anos esta técnica tem auxiliado as atividades de vigilância entomológica, considerando sua alta sensibilidade, a possibilidade de examinar número elevado de amostras e principalmente pela especificidade na identificação dos parasitas (SAVANI et al., 2009). No presente estudo foi estimada uma taxa mínima de infecção com *Le. infantum chagasi* de 1,2%, mediante uso da técnica de Nested PCR e sequenciamento dos produtos obtidos na amplificação por de PCR. O resultado obtido demonstra que o contato entre a população vetora com os hospedeiros competentes no foco de transmissão, contribuem com a circulação natural do agente da LVA. A taxa de infecção aqui descrita foi similar às taxas descritas para outros focos de LV no Brasil, variando entre 0,25-3,9% (PAIVA et al., 2006, SAVANI et al., 2009, SOARES et al., 2010; MICHALSKY et al., 2011). Observa-se assim, uma variabilidade nas taxas de infecção de *Lu. longipalpis* em diferentes focos de LV, que pode estar relacionada às diferenças na sensibilidade e especificidade dos métodos de identificação do parasita. Além disso, outros fatores como o método de captura dos espécimes e a proximidade de hospedeiros infectados dos pontos de captura, assim como a prevalência do agente nos hospedeiros no foco, podem afetar a taxa de infecção natural observada em uma determinada área.

A baixa taxa de infecção natural detectada em *Lu. longipalpis* no presente estudo é contrastante com a alta prevalência canina observada no município de Panorama nos últimos anos (D'ANDREA, 2008, BORTOLLETO, 2010). Embora as capturas tenham sido periódicas durante um longo período de tempo (24 meses) e tenham sido realizadas em domicílios localizados nos diferentes bairros, abrangendo vários pontos do município, espécimes infectados, só foram detectados em dois domicílios caracterizados pela elevada densidade do vetor e presença abundante de fontes sanguíneas (galináceos e bovinos), fatores que favorecem a manutenção do vetor.

Entre os “pools” de insetos identificados com *L. i. chagasi*, dois foram capturados na varanda do domicílio e um no peridomicílio sugerindo a circulação do

agente no ambiente próximo aos domicílios com risco potencial de transmissão para a população humana.

5.2. OBSERVAÇÕES SOBRE A ATRATIVIDADE DOS HOSPEDEIROS E ESTIMATIVA DENSIDADE EM RELAÇÃO AO HOSPEDEIRO

Além da frequência da população do vetor no foco, outras características intrínsecas da espécie vetora, embora não consideradas na equação da capacidade vetorial, podem potencializar o seu papel na transmissão de patógenos, entre estes a atratividade do hospedeiro. A maioria dos estudos que avaliaram fatores relacionados à atratividade de insetos vetores foram realizados com mosquitos (Diptera: Culicidae), considerando a importância de espécies dessa família na transmissão de agentes que causam doenças em humanos. Todavia, existem publicações que reportam os resultados de pesquisas conduzidas com o objetivo de avaliar este parâmetro em populações de flebotomíneos em condições naturais (PINTO et al., 2001; OLIVEIRA, 2015). Mesmo assim, são necessários novos estudos o comportamento e aspectos da ecologia dos flebotomíneos vetores referentes à transmissão de leishmanias. No presente estudo, foram realizadas capturas com barracas modificadas tipo OBETS e obtidas baixas frequências de flebotomíneos. Nas 18 coletas, nos dois pontos (5 barracas) foram capturadas 25 fêmeas, com maior frequência em cães (n=11), quando comparado com galináceos (n=6) e humanos (n=5). Embora diferenças estatisticamente significantes tenham sido observadas entre cães e humanos e cães e galinhas, o pequeno número de espécimes coletados não permitem demonstrar uma preferência marcada de atratividade exercida pelos cães para *Lu. longipalpis*. O fato de os dos hospedeiros terem sido expostos dentro das barracas, que constituem uma barreira física para os flebotomíneos, pode ter afetado a atratividade (TAKKEN e VERHULST, 2012). Adicionalmente, a presença de outros hospedeiros em maior densidade (galináceos, porcos, gado) nos locais de captura (principalmente no ponto 2) pode também ter influenciado os resultados, por uma maior procura e alimentação da população de *Lu. longipalpis* em hospedeiros mais acessíveis, sugerindo um comportamento oportunista da população dessa espécie, como observado em outros focos de LVA (DYE et al., 1991).

Outros fatores externos também podem ter influenciado nos resultados das coletas. Entre eles podem ser considerados a presença de estímulos externos (odores de outros hospedeiros, velocidade do vento, a presença de estímulos luminosos), o estado

fisiológico das fêmeas (estado gonotrófico, idade da população), e o genótipo da população (CONSTANTINI et al., 1998, TAKKEN e VERHULST, 2012). Este último fator considerando que tem sido descritas diferenças na antropofilia de populações de *Lu. longipalpis* como descrito por HAMILTON e RAMSOONDAR (1994). Este autores observaram em condições de laboratório diferenças na atratividade de odores humanos às populações de *Lu. longipalpis* da Lapinha (MG) e Jacobina (BA), sendo que esta última população apresentou maior resposta de atratividade quando exposta às placas de Petri manipuladas por humanos.

Outra explicação possível está relacionada ao uso da armadilha tipo CDC sem luz, que pode ter afetado a eficiência da captura principalmente por duas razões. A primeira está relacionada ao fato de a ventoinha da CDC, que tem a função de aspirar os insetos, afetar a circulação de odores emitidos do bulbo da barraca, e também pela proximidade entre as barracas e os odores que poderiam ter se misturado como sugerido por PINTO et al. (2001). A segunda explicação está relacionada ao comportamento de agregação dos machos de *Lu. longipalpis*. Este comportamento favorece a atratividade a outros machos e fêmeas ao local do hospedeiro (DYE et al., 1991, KELLY e DYE, 1997). O fato de os machos não terem contato com o hospedeiro, assim como estarem expostos à corrente de ar de sucção da armadilha pode ter dispersado os feromônios liberados, impedindo a formação dos agregados.

Adicionalmente, deve se considerar o fato de algumas espécies de flebotomíneos apresentarem certo grau de "aprendizagem" dos locais frequentados (CAMPBELL-LENDRUM et al., 1999; de FREITAS et al., 2009) e que *Lu. longipalpis* apresenta um comportamento de nidalidade (fidelidade), retornando aos locais frequentados em noites anteriores, possivelmente pela presença de sinais químicos (DYE et al., 1991; KELLY e DYE, 1997). Portanto, a presença dos hospedeiros nas barracas de forma ocasional poderia não permitir a atração dos hospedeiros a esta espécie.

O habito oportunista da população de *Lu. longipalpis* observado no município de Panorama, constituiu o principal desafio para estimar o parâmetro densidade em relação ao hospedeiro (m), considerando que múltiplas variáveis podem influenciar o número de espécimes atraídos e que para espécies de insetos hematófagos oportunistas as estimativas realizadas com capturas sob o hospedeiro podem superestimar o número de insetos que realmente conseguiriam picar, além das variações na sua distribuição temporal e espacial. Em estudos de atratividade e estimativas da taxa de picada em

humanos realizados com mosquitos (Díptera: Culicidae), as capturas diretas na isca são consideradas o método direto mais real e favorável para estimar frequência de contato vetor-hospedeiro. Porém, este método tem como inconveniente a necessidade de um coletor com experiência e a influência das diferenças na atratividade de cada hospedeiro, além do risco para o coletor (DIA et al, 2005).

Sendo a estimativa do número de fêmeas por hospedeiro imprescindível para estimar a capacidade vetorial, e considerando que o número de fêmeas por hospedeiro obtido nas capturas com armadilhas tipo OBETs não sustentam a transmissão de *Le. i. chagasi* na área de estudo, foram realizadas outras coletas para estimar este parâmetro. O número de fêmeas que picam um cão em uma noite, utilizado para o cálculo da capacidade vetorial, foi estimado através de capturas realizadas em duas noites com aspiração direta no hospedeiro e em três noites consecutivas com armadilhas adesivas *sticky trap*.

Nas capturas realizadas com aspiração direta, a média de fêmeas por cão por noite foi 13,5 fêmeas. Essas capturas foram realizadas no mês mais favorável à presença de *Lu. longipalpis* (março), em um local onde os cães ficavam abrigados em pequenas casas de madeira, facilitando a captura dos insetos. Com este método, Ovallos et al. (2011) estimaram uma média de 67,3 fêmeas por cão, em cinco capturas também realizadas em canil, no município de Campo Grande (MS) (dados não publicados). Estes resultados demonstram uma elevada quantidade de fêmeas são atraídas por cão quando a amostragem é feita utilizando-se atração e aspiração manual dos insetos.. Todavia, os resultados devem ser analisados com cautela para efeitos do cálculo da capacidade vetorial, considerando as diferenças temporais e espaciais e o pouco tempo amostral. Além disto, no caso de *Lu. longipalpis* em que os machos são inicialmente atraídos ao hospedeiro e atuam formando agregados e liberando feromônios para atrair outros co-específicos pode significar uma dificuldade maior. Esse fato decorre do método de coleta empregado, no caso, eles são capturados quando pousados nos hospedeiros (aspiração direta) ou antes de pousar no hospedeiros (armadilhas atrativas) poderia implicar em um erro que causaria a diminuição do estímulo levando à subestimação da informação.

Quanto às capturas com armadilhas adesivas, em três dias consecutivos de trabalhos de campo, foi estimada uma densidade média de 3,1 fêmeas por cão por noite. Os valores obtidos com este método mostraram variabilidade entre o número de fêmeas

atraídas pelos cães de acordo com o local de captura (Tabela 11). Estes resultados indicam que esta metodologia é mais favorável para o estudo da densidade do vetor em relação ao hospedeiro, considerando a não interferência do humano (odores, eficiência do coletor), a possibilidade de capturas simultâneas em uma maior área amostral (número de domicílios) e aceitabilidade por parte dos moradores. Todavia, não se pode deixar de considerar que nem todas as fêmeas atraídas pelo cão permanecem aderidas, pois é possível que algumas fêmeas pousem diretamente no animal, alimentam-se e depois voem em direção oposta à parede.

As principais limitações do cálculo da densidade de *Lu. longipalpis* por hospedeiro canino no presente estudo foram o baixo esforço amostral nas capturas com armadilhas adesivas e nas capturas diretas, assim como o fato de terem sido realizadas em um único período do ano. Todavia, estas observações permitiram avaliar um método (armadilhas adesivas) que poderia ser utilizado em futuros estudos para avaliar a densidade por hospedeiro.

De forma geral, os resultados dos experimentos de atratividade de *Lu. longipalpis* estão de acordo com outros estudos que têm sugerido um hábito alimentar eclético desta espécie (KELLY e DYE, 1997, OLIVEIRA et al., 2006). Segundo TAKKEN e VERHULST (2012) com algumas exceções, muitas espécies de mosquitos hematófagos não apresentam uma preferência alimentar evidente e que, portanto, a fonte e qualidade do sangue são irrelevantes para o *fitness*. O grau de oportunismo na preferência pelo hospedeiro de *Lu. longipalpis* sugere uma plasticidade dessa espécie favorecendo a alimentação das espécies de hospedeiros mais abundantes (QUINNELL et al., 1992) de acordo com as condições ecológicas locais ou pela sua acessibilidade (QUINNELL e DYE., 1994). Desta maneira, a captura de espécimes fêmeas de *Lu. longipalpis* nas armadilhas OBETs, embora em baixo número, pode indicar de que esta espécie é atraída pelo hospedeiro humano e que as barreiras físicas (condição da moradia) podem diminuir a frequência de contato vetor-homem.

Em um estudo de caso-controle sobre fatores associados à ocorrência de LVC no município de Panorama (SP), JIMENEZ (2015) observou que a condição da moradia (tipo de janelas, teto de madeira, entre outros) constitui um fator de risco para a presença de casos de LVC. Por sua vez, a presença de outros hospedeiros como galináceos, gatos, bovinos, porcos etc., com comportamentos menos defensivos no período noturno como as galinhas (ALEXANDER et al., 2002) ou maior exposição

ambiental na área de estudo, permitem que esta espécie, altamente oportunista se mantenha em densidades importantes no foco, sendo o risco para a população humana assim modulada pela frequência espaço-temporal do vetor e das fontes sanguíneas potenciais. Além disso, considerando que a LVA envolve vários hospedeiros vertebrados no seu ciclo de transmissão (homens, cães, gambá e possivelmente roedores) o comportamento hematofágico oportunista desta espécie pode potencializar a capacidade vetorial para transmitir a *Le. i. chagasi*.

5.3. ESTIMATIVA DA SOBREVIVÊNCIA (p) E DURAÇÃO DO CICLO GONOTRÓFICO (GC)

Da sobrevivência da população do vetor dependem outras características relacionadas à capacidade vetorial, como o tamanho da população e a duração média da vida infectiva (GARRETT- JONES e SHIDRAWI, 1969; MILBY e REISEN, 1989). O método de captura-marcação-soltura-recaptura, constitui a principal ferramenta para avaliar este parâmetro. Estudos prévios realizados com populações de flebotomíneos têm mostrado que o pó fluorescente, comumente usado na marcação destes insetos, pode cobrir até 60% da superfície corporal e não causa mortalidade, não afeta a longevidade, não é tóxico ao homem e não afeta a atratividade aos hospedeiros (CHANNIOTIS et al., 1974, PARDO et al., 1996; CASANOVA et al., 2005, VERHULST et al. 2013).

Com esta metodologia, no presente estudo estimou-se uma taxa de recaptura para fêmeas entre 2,2% e 12,8%, enquanto que para os machos variou entre 7,7% e 20,7%. Resultados similares na proporção de recaptura para machos desta espécie têm sido descritos na literatura. MORRISON et al. (1993) observaram uma taxa de recaptura entre 2,2% e 20,6% em um foco de LVA na Colômbia. Similarmente, DYE et al. (1991) observaram uma taxa de recaptura de 15,6% em um foco de LVA na Ilha de Marajó (PA). OLIVEIRA et al (2013) em estudo de MSR de *Lu. longipalpis* em Campo Grande (MS) obtiveram taxas de recaptura menores (4,3%), todavia, estes autores realizaram as tentativas de recapturas em intervalos de 7 dias, fato que pode ter produzido diferenças considerando o amplo intervalo de tempo entre as tentativas de recaptura.

Quanto ao local de recaptura dos espécimes, observou-se que a maioria deles foi recapturada no local de soltura ou até 50 metros de distância deste. Este resultado difere

das observações de MORRISON et al., (1993), que descreveram pequeno número de espécimes recapturados próximos ao local de soltura. Isto pode estar relacionado às diferenças no ambiente, pois enquanto nosso estudo foi realizado em uma área peri-urbana, o estudo de MORRISON et al. (1993) foi realizado em uma área rural. Nesse último há uma maior oferta de hospedeiros que podem servir de fonte sanguínea assim como de vegetação onde os flebotomíneos podem se abrigar. Todavia, a baixa dispersão de *Lu. longipalpis* tem sido descrita em outros estudos realizados no Brasil (DYE et al., 1991, OLIVEIRA et al., 2013), assim como para outras espécies de flebotomíneos (CHANNIOTIS et al., 1974; ALEXANDER et al., 1992, CASANOVA et al., 2005, 2009, GALATI et al., 2009, FREITAS et al., 2009).

As altas taxas de recaptura de machos nos experimentos podem ser explicadas pelo comportamento da espécie, que forma agregados (Leks) nos hospedeiros para atrair outros machos e fêmeas (DYE et al., 1991). Adicionalmente, isso pode estar relacionado ao fato de que a população de *Lu. longipalpis* encontra no peridomicílio as condições necessárias para o desenvolvimento dos imaturos (solo com matéria orgânica, umidade adequada e ao abrigo da luz solar direta, etc.), assim como locais de repouso e fontes alimentares, como apontado para outras espécies de flebotomíneos americanos (CHANNIOTIS et al., 1974; ALEXANDER e YOUNG 1992, CASANOVA et al., 2005; GALATI et al., 2009). Além da ampla oferta de fontes sanguíneas e locais de abrigos, a pequena dispersão da população de *Lu. longipalpis* na área de estudo também pode estar associada às características ambientais, tais como topografia, cobertura vegetal e nível de urbanização, uma vez que em outros estudos foi observado que alguns espécimes se deslocaram por distâncias de até 960 metros em dois dias (MORRISON et al., 1993). Similarmente, em áreas abertas do Velho Mundo, têm se observado que os espécimes de *Phlebotomus ariasi* podem se deslocar por distâncias de até 2,2 km (KILLICK-KENDRICK et al., 2002). Durante o primeiro experimento, os espécimes marcados foram liberados a uma distância de aproximadamente 60 metros dos locais de onde foram capturados. Nas atividades de recaptura, observou-se que estes retornaram aos mesmos locais onde foram capturados previamente, sugerindo um comportamento focal e de fidelidade aos hospedeiros ou aos locais de captura. Esses resultados corroboram com as observações de KELLY e DYE (1997) em estudos realizados com *Lu. longipalpis* na Ilha de Marajó (PA) nos quais os machos retornaram ao local de atividade das noites anteriores, sugerindo que poderiam memorizar a área de atividade.

Observações similares foram realizadas em outras espécies de flebotomíneos. CAMPBELL-LENDRUM et al. (1999) observaram em um estudo de MSR que espécimes de *Ny. whitmani* capturados em um estábulo e liberados a 70 metros do local de distancia foram recapturados com maior frequência (70%) no mesmo estábulo. Similarmente, FREITAS et al. (2009), em estudo de MSR com *Nyssomyia neivai*, observaram que espécimes capturados em dois galinheiros distantes entre si por 90 metros, marcados e liberados a uma meia distância entre eles, retornaram aos locais aonde tinham sido previamente capturados. Esse comportamento sugere a presença de memória olfativa nesses insetos ou o comportamento de fidelidade aos hospedeiros, mediado pelos cairomônios liberados pelos animais.

A sobrevida das fêmeas estimada pelo método de MSR variou de 0,56 a 0,92 e para os machos, de 0,69 a 0,74. Estas estimativas podem estar subestimadas devido a efeitos de fatores não controlados, como emigração, mortes dos espécimes e eficiência das recapturas (MILBY e REISEN, 1989; CASANOVA et al., 2009). No entanto, esses resultados concordam com os descritos por OLIVEIRA et al. (2013), que utilizando o mesmo método, na cidade de Campo Grande (MS), estimaram uma sobrevida diária para machos de *Lu. longipalpis* de 0,89. Os valores obtidos no presente estudo também são próximos aos de CASANOVA et al. (2009) que estimaram valores de sobrevida diária para machos de *Ny. neivai* variando entre 0,53 e 0,74, e para as fêmeas entre 0,59 a 0,73. Para esta espécie, GALATI et al. (2009) estimaram para uma sobrevida diária para machos variando entre 0,64 e 0,97 e para fêmeas entre 0,64 e 1.

A baixa taxa de recaptura de fêmeas no presente estudo pode estar relacionada ao fato delas terem sido liberadas ingurgitadas, o que pode ter levado a permanecerem abrigadas até a postura. Portanto, dificultando as recapturas.

Durante o primeiro experimento, no 13º dia após a soltura, foi capturado um macho e no 11º dia, uma fêmea, sendo estes os valores máximos de sobrevida detectados, respectivamente, para cada um dos sexos. Esses valores estão dentro dos observados para *Lu. longipalpis*, que apresentam longevidade variando entre 8 dias (MORRISON et al., 1993) e 29 dias (OLIVEIRA et al., 2013). Todavia essas informações devem ser analisadas cuidadosamente, considerando as diferenças na periodicidade das tentativas de recaptura entre esses estudos.

O tamanho da população estimada apresentou o menor valor em setembro/2013, com 3.549 espécimes de ambos os sexos, sendo 2.883 machos e 667 fêmeas, e os valores máximos no mês de fevereiro de 2013 e 2014 com uma população de ambos os sexos de cerca de 12.040 e 11.734, respectivamente. Em 2013 com valor de 9.234 machos e 2497 fêmeas e em 2014, 7714 machos e 3884 fêmeas. Estes resultados sugerem a presença de um número elevado de fêmeas no local, o que representa um alto risco para a população humana e canina.

A maior população de machos estimada corrobora com as observações do estudo da distribuição espaço-temporal, sugerindo uma maior atividade dos machos nos abrigos. A menor população estimada das fêmeas poderia estar relacionada ao fato que estas poderiam não ter sido capturadas por estarem abrigadas após repasto sanguíneo, buscando fontes de alimentação, ou, serem menos atraídas por luz.

Por outro lado, o método de MSR também permitiu realizar observações sobre a duração do ciclo gonotrófico em condições naturais. No presente estudo foi observado que o ciclo gonotrófico pode variar entre 4 e 8 dias, inclusive numa mesma estação do ano, podendo estar relacionada esta diferença com as variações de temperatura máxima e mínima, assim como as diferenças na idade fisiológicas das fêmeas. Em condições de laboratório foi observado que o ciclo gonotrófico apresentou uma duração mediana de 4 dias. A forma ideal para estimar a duração média deste parâmetro seria a soltura de fêmeas ingurgitadas obtidas em laboratório e posterior recaptura como realizado em alguns estudos (MORRISON et al., 1993). Todavia esta prática é impossível de ser realizada em áreas urbanas pelas implicações éticas da sua realização. Uma forma alternativa tem sido a captura de fêmeas ingurgitadas naturalmente ou de fêmeas não ingurgitadas às quais é oferecido um repasto sanguíneo antes da soltura. Com esta metodologia, DYE et al. (1991) recapturaram fêmeas que tinham sido liberadas ingurgitadas três dias depois da soltura, e considerando que as fêmeas não apresentaram nem ovos, nem sangue no abdome, os autores sugerem que o intervalo mínimo entre repastos sanguíneos (ou oviposição) é de 3 dias. A duração do ciclo gonotrófico também tem sido estimada por este método em outras espécies de flebotomíneos. KILLICK-KENDRICK e RIOUX,(2002) estimaram que as fêmeas de *Phlebotomus papatasi* realizaram um repasto sanguíneo a cada seis dias e observaram que esta espécie apresenta concordância gonotrófica. No Brasil, em condições similares,

CASANOVA et al. (2009) estimaram que *Ny. neivai* apresenta uma duração do ciclo gonotrófico de 4 dias.

5.4. HÁBITO DE PICAR O CÃO

Embora a capacidade vetorial seja dependente da densidade por hospedeiro, o parâmetro hábito de picada (**a**) influencia notavelmente sua estimativa. Este parâmetro é uma medida da frequência relativa de contato entre o vetor com um determinado hospedeiro, refletindo assim, um aspecto do padrão de alimentação da população do vetor. Uma estimativa direta implicaria na captura de espécimes vistos picando os diferentes hospedeiros disponíveis e realizando posteriormente uma correção com a abundância de cada hospedeiro (GARRET JONES & SHIDRAWI, 1969). Não sendo possível realizar esta observação em condições naturais, uma forma indireta de se calcular foi proposta por GARRETT JONES (1964), mediante a captura, em ambiente intradomiciliar, de fêmeas ingurgitadas, identificando o sangue ingerido e assim calculando o quociente da proporção de fêmeas capturadas com sangue e a duração do ciclo gonotrófico (GARRETT-JONES, 1969; REISEN, 1989). O valor obtido dessa equação indica a proporção de repasto sanguíneo que a população de um vetor obtém de um hospedeiro por dia. Porém, este método implica o conhecimento do comportamento intra e perodomiciliar das espécies vetoras, sendo pouco prático para espécies de flebotomíneos com hábito endofílico e endofágico desconhecidos (OVALLOS, 2011).

O valor estimado do hábito de picada é um número absoluto que pode variar entre zero (0) e um (1), indicando seu valor máximo quando todos os indivíduos da população vetora realizam o repasto sanguíneo em determinado hospedeiro. A frequência de contato variará com a duração do ciclo gonotrófico quando houver concordância gonotrófica. No presente trabalho foi utilizado um método experimental para estimar indiretamente a proporção de fêmeas que realizam o repasto sanguíneo em hospedeiro canino. Os resultados obtidos demonstram um alto grau de cinofilia da população de *Lu. longipalpis*. A proporção média de repasto em cão foi de 68%, resultado similar ao descrito por OVALLOS (2011) que estimou experimentalmente uma proporção de repasto de 70,1%. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na proporção de alimentação dependendo do estado clínico do cão (sintomático ou assintomático). Este resultado sugere que a condição de infecção não

influencia a atratividade aos flebotomíneos e existe um hábito oportunista da população, alimentando-se avidamente do hospedeiro disponível.

Embora esta metodologia tenha várias desvantagens, como a presença de um único hospedeiro exposto, fato que favorece a alimentação, assim como a limitada resposta do hospedeiro às picadas do flebotomíneo (anestesia) e a influência do jejum das fêmeas desafiadas a se alimentarem, os resultados obtidos permitem realizar inferências da frequência de contato da população de *Lu. longipalpis* em ambientes urbanos, onde a população canina pode ser considerada a principal fonte sanguínea. Esta afirmação pode ser fundamentada em algumas observações ecológicas. Estudos têm sugerido que as fêmeas de *Lu. longipalpis* discriminam entre hospedeiros só pelo tamanho e que as diferenças em abundância das fêmeas entre abrigos animais e intradomicílio está relacionada à acessibilidade dos hospedeiros (QUINNEL et al., 1992; QUINNEL e DYE, 1994). Portanto, sendo *Lu. longipalpis* uma espécie de hábito hematófago oportunista e os humanos, os cães e os galináceos (considerando tamanho do hospedeiro, distribuição espacial e exposição) as fontes sanguíneas mais comuns em área urbana, , alguns fatores favorecem um maior contato vetor-cão. Por exemplo, quando comparada com a população de galináceos, a canina apresenta uma distribuição espacial mais homogênea, enquanto que, quando comparada à população humana, os cães têm maior exposição em ambiente peridomiciliar. Além desses fatores, devem ser considerados à estreita associação cão-humano, que favorece a sua distribuição concomitante em área urbana.

No município de Panorama, JIMENEZ (2015) observou que entre 221 domicílios com cães, uma proporção de 90% dos cães dormiam no peridomicílio, portanto, poderia ser esperado uma maior taxa de picada em cães. Se assumirmos que 68% das fêmeas da população de *Lu. longipalpis* conseguem o repasto sanguíneo em hospedeiro canino e que a duração mínima do ciclo gonotrófico é de 4 dias, o hábito de picada será de 0,17 (0,68/4). Seguindo a inferência proposta por GARRETT JONES e SHADRAWI (1969), este resultado significa que uma fêmea da população realizará o repasto sanguíneo em cão a cada 5,8 dias, em média. Diferentemente, se assumirmos que a população se alimenta preferencialmente de galináceos em uma proporção próxima a 50% e que só 30% das fêmeas se alimentam em cães (20% nas demais fontes), o hábito de picada seria de 0,075 (0,30/4), que significa que uma fêmea da população do vetor terá um segundo contato com o hospedeiro canino a cada 13,3 dias

(1/0,075). Com esses valores, seria pouco provável a manutenção da transmissão de *Le. i. chagasi*, assim como a alta prevalência de infecção canina observada no local de estudo. Por estas razões, poderia ser esperado que a frequência de picada por hospedeiro de *Lu. longipalpis* varie pouco, sendo modulada basicamente pela distribuição espaço-temporal e disposição das fontes alimentares nos focos e seja menos variável do que a sobrevivência ou a densidade do vetor por hospedeiro, como apontado por GARRET JONES & SHIDRAWI (1969).

Outra forma de estimar indiretamente o hábito de picada é a investigação do sangue ingerido de espécimes capturados através de métodos bioquímicos e moleculares (TAKKEN e VERHULST, 2013). Com esta metodologia, em uma área endêmica de Minas Gerais, BARATA et al. (2005) analisaram, mediante análises com técnica de precipitina, o conteúdo sanguíneo de 38 fêmeas capturadas e observaram maior proporção de alimentação em galinhas (26,3%) e cavalos (26,3%). Por outro lado, em área urbana do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, OLIVEIRA et al. (2008), utilizando a técnica de ELISA-sanduíche, analisaram 355 fêmeas e observaram uma maior proporção de fêmeas alimentadas em ave e humano (43,4%), com baixos níveis de sangue de cão detectado e descrevem uma baixa atratividade dos cães para esta espécie. Contrariamente, em Araçatuba (SP), foi observado mediante análises de imunoprecipitinas de 699 fêmeas capturadas ingurgitadas que 84,7% das fêmeas tinham se alimentado em cão, 8% em humano e só 7% em ave (CAMARGO-NEVES et al., 2007). Em Várzea Grande (MT) MISSAWA et al. (2010) observaram uma maior proporção de alimentação em ave (30,8%), roedor (21,2%) e humano (15,3%) entre um total de 104 fêmeas capturadas.

Em todos esses estudos as amostras foram obtidas em capturas com armadilhas luminosas, fato que pode influenciar os resultados, pois nas capturas no intradomicílio são mais prováveis de serem obtidos resultados positivos para sangue humano, enquanto que amostras em ambientes peridomiciliares (abrigos animais) são mais prováveis de serem positivos para animais domésticos próximos (TAKKEN e VERHULST, 2013). Além disso, outros fatores como a abundância e disponibilidade dos hospedeiros podem afetar a representatividade dessas amostras (GARRETT-JONES, 1964; CONSTANTINI et al., 1998).

Embora, o comportamento oportunista das populações de *Lu. longipalpis* seja amplamente descrito na literatura (KELLY et al., 1996; DYE et al., 1991; QUINNEL et

al., 1992; AFONSO et al., 2012), informações sobre os padrões de alimentação dos flebotomíneos são necessárias para identificar o potencial de transmissão em diferentes dinâmicas de transmissão. Todavia, observa-se a necessidade do aprimoramento dos métodos utilizados para avaliar este parâmetro. Ressalta-se a necessidade de desenhar metodologias que permitam avaliar de uma forma mais adequada o hábito alimentar de vetores comprovados ou suspeitos nos focos de leishmaniose visceral. A captura de fêmeas utilizando uma combinação de métodos (armadilhas luminosas, armadilhas adesivas, busca ativa com aspiração), em diferentes locais utilizados como abrigos e em vários períodos de tempo poderia contribuir com informações precisas sobre o padrão de alimentação deste grupo de insetos hematófagos.

5.5. AVALIAÇÃO DA PROPORÇÃO DE FÊMEAS POTENCIALMENTE INFECTIVAS (b) E DA DURAÇÃO DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO EXTRÍNSECO (n)

A proporção de fêmeas que se tornam infectivas e a duração do período de incubação extrínseco são dois componentes da relação parasita-vetor considerados para estimar a capacidade vetorial. O primeiro destes, não depende só de características intrínsecas do vetor, mas também da competência do hospedeiro vertebrado (infectividade). No presente estudo, a taxa de infecção experimental de *Lu. longipalpis* após se alimentarem em cães comprovadamente infectados com *Le. i. chagasi* variou entre 0% e 97,1%. Este resultado está em concordância com observações sobre diferenças na competência de cães para infectar esta espécie. Entre cinco cães expostos à picada das fêmeas, somente um deles gerou uma infecção maciça de flagelados. Resultados similares foram descritos por TRAVI et al., (2001), que em um estudo realizado na Colômbia observaram que entre 20 cães em diferentes condições clínicas (assintomático, oligogossintomático e polisintomáticos) expostos a fêmeas de *Lu. longipalpis*, apenas seis foram infectivos para as fêmeas, com uma taxa de infecção variando entre 1,7% e 22,5%. Similarmente, em um estudo realizado no Brasil, COURTENEY et al. (2002) observaram variação na infectividade de cães. Estes autores observaram que entre 43 cães naturalmente infectados com *Le. i. chagasi*, 24 deles não foram infectivos para as fêmeas de flebotomíneos e 11 produziram taxas de infecção

que variou de 0,01 a 10%; seis entre 10,1 e 50% e um único cão apresentou infectividade entre 90%-100%. MICHALSKY et al. (2007) observaram que as taxas de infecção de *Lu. longipalpis* alimentadas em cães sintomáticos (28,4%) foram maiores do que quando alimentadas em cães assintomáticos (5,4%) e oligossintomáticos (5,1%). Similarmente, VERÇOSA et al. (2008) observaram que entre 9 cães sintomáticos, seis foram competentes para infectar *Lu. longipalpis*, enquanto que nenhum dos assintomáticos geraram infecção nos flebotomíneos. CUTOLO et al. (2014) observaram que entre 36 cães comprovadamente infectados, só 19 foram infectivos aos flebotomíneos, com uma taxa de infecção de 12,3% (99/805). Neste estudo, a taxa de infecção nos flebotomíneos por cão variou de 4% a 95%, sendo que em 73% (14/19) dos cães que infectaram os flebotomíneos a taxa de infecção variou entre 4-20% e nos outros cinco as taxas de infecção variaram entre 60-95%. Por outro lado, LAURENTI et al (2013) observaram uma maior infectividade de cães assintomáticos. Entre 24 cães sintomáticos, 16 geraram infecção aos flebotomíneos (67 %), enquanto que no grupo assintomático 13 de 14 cães (93 %) geraram infecção aos flebotomíneos. Esta heterogeneidade na infectividade dos cães aos flebotomíneos pode ser corroborada em outros estudos com espécies permissíveis. OLIVEIRA (2015) em experimentos de xenodiagnóstico em seis cães com fêmeas de *Lu. cruzi* observou taxa de infecção de 7,4%. MONTOYA-LERMA et al. (2003) descreverem uma taxa de infecção de 4,4% para *Pintomyia evansi*. Resultados similares foram observados para *Pi. fischeri*, sendo observada uma taxa de infecção experimental de 4,8% (OVALLOS, 2011).

Ainda que a observação da infecção nas fêmeas seja indicativa do potencial para desenvolver o parasita, para o cálculo da capacidade vetorial considera-se apenas a proporção de fêmeas infectadas portando formas promastigotas metacíclicas (potencialmente infectivas). No presente estudo, observou-se que 100% das fêmeas expostas ao hospedeiro infectado apresentaram formas promastigotas metacíclicas na região anterior do intestino médio. Este resultado pode ser explicado pela elevada competência vetorial de *Lu. longipalpis* e a estreita relação parasita-vetor que favorece a metaciclogênese de *Le. i. chagasi*. Adicionalmente, pode estar relacionada a uma elevada carga parasitaria na pele do cão favorecendo a ingestão pela fêmea de número elevado de formas amastigotas e, portanto, o desenvolvimento de infecção maciça. Nossos resultados sugerem que uma vez estabelecida a infecção em *Lu. longipalpis*, todas as fêmeas infectadas podem entre um período de até três dias desenvolver formas

infectivas, sendo a proporção de fêmeas que podem transmitir o agente modulado pela sobrevida da espécie.

Quanto à competência do hospedeiro, embora a infectividade dos cães possa variar no tempo, dependendo de variáveis como o estado da infecção, a frequência de contato com o vetor, entre outros, nossos resultados e as evidências descritas na literatura demonstram a existência de hospedeiros com maior competência para infectar os flebotomíneos. Este fato constitui um desafio para a execução de medidas do programa de controle da LVA focadas no cão, como a eutanásia. Considerando que uma pequena parcela da população canina seria a responsável pela maior infectividade dos flebotomíneos, observa-se a necessidade do desenvolvimento de metodologias que permitam identificar estes hospedeiros. Outros aspectos operacionais do programa de controle, como a demora na remoção dos cães infectados (tempo entre o diagnóstico e a eutanásia) permite um maior tempo de exposição desses hospedeiros vertebrados aos insetos vetores. Este fato, pode, sem dúvida, contribuir para a manutenção dos ciclos enzoóticos (COURTENAY et al., 2002).

O período de incubação extrínseco (PEI) observado no presente estudo, embora formas flageladas ocupando o intestino médio torácico tenham sido observadas em fêmeas que morreram no intervalo entre 48-72 horas, evidenciou-se que em quatro dias à temperatura de 28°C ($\pm 1,0$ °C) os flagelados já tinham completado o período de incubação extrínseco, sendo coincidente com a duração do ciclo gonotrófico. Portanto, estas evidências sugerem que a população de *Lu. longipalpis* estudada pode transmitir a *Le. i. chagasi* no repasto subsequente ao repasto infectivo. Todavia, ressalta-se que o período de incubação da leishmania pode variar em função de fatores como a temperatura (REISEN, 2010) que atua acelerando a digestão sanguínea (SACKS e KAMHAWI, 2001; KAMHAWI, 2006; BATES, 2007), assim como pelo tamanho do inóculo ingerido durante o repasto infectivo e a carga parasitária na pele do hospedeiro (BATES, 2007). Isto implica que o PIE pode variar nas diferentes épocas do ano, afetando, indiretamente, a capacidade vetorial. Assumindo-se que estas condições observadas em laboratório refletem o que acontece em condições naturais, para o município de Panorama, que apresenta média de temperatura máxima acima de 28°C, isto implicaria em um maior potencial de transmissão de *Le. i. chagasi*, principalmente nos períodos mais quentes (primavera e verão). Esta informação, junto a elevada

sobrevida nestes períodos ($p=0,79$) e maior abundância aumentam o risco para a população humana e canina.

A duração do período de incubação extrínseco foi similar à observada para outras espécies de flebotomíneos. DINIZ et al. (2014) observaram formas flageladas potencialmente infectivas de *Leishmania braziliensis* e estimaram um PEI de quatro dias em *Nyssomyia whitmani*, *Ny. neivai*, *Ny. intermedia*, *Expapillata firmatoi* e *Pintomyia fischeri*. Para *Leishmania amazonensis*, OLIVEIRA (2015) observou um PEI de três dias em *Lutzomyia cruzi*, com transmissão para hamster a partir do quarto dia. Dados estes semelhantes ao observados em nossos estudos para *L. longipalpis* e *Le. i. chagasi*.

5.6. VERIFICAÇÃO DA COMPETÊNCIA VETORIAL

A competência vetorial constitui o parâmetro chave na dinâmica de transmissão de um patógeno e está associada às características intrínsecas do vetor e da relação parasita-vetor. Todavia, mais do que uma simples característica intrínseca da espécie vetora, a competência vetorial constitui um fenômeno dinâmico (MEYER, 1989) influenciado por fatores endógenos (adaptação bioquímica do parasita ao intestino do inseto, densidade parasitária, duração da metaciclogênese, genótipo e dieta do flebotomíneo, componentes da saliva) e exógenos (temperatura, resposta imunológica do hospedeiro desafiado, entre outros) (RIBEIRO et al., 1986; KAMHAWI, 2001, BATES, 2007).

Considerando-se que diferenças associadas ao genótipo podem afetar a competência vetorial, é importante ressaltar que evidências sugerem que *Lu. longipalpis* constitua um complexo de espécies crípticas (WARD ET AL, 1983, MAINGON et al., 2007) com diferenças comportamentais em cópula, quemotipos e distribuição geográfica. Portanto, embora a "*Lu. longipalpis*" seja a espécie de flebotomíneos neotropical mais amplamente estudada, essa nova visão ressalta a importância da avaliação da competência vetorial das populações desse complexo. A primeira demonstração do papel de *Lu. longipalpis* como vetor do agente da LVA data do final da década de 1970. Em estudos experimentais, LAINSON et al. (1979) observaram a transmissão de *Le. i. chagasi* por uma população de *Lu. longipalpis*, demonstrando pela primeira vez a competência vetorial dessa espécie. Nesses experimentos foram

utilizados espécimes da 33^a geração de uma colônia estabelecida de parentais capturados no Estado de Ceará. Esses espécimes foram alimentados usando sangue desfibrinado de coelhos contendo formas amastigotas de *Le. i. chagasi*. A alimentação foi oferecida aos insetos através de uma membrana artificial e a transmissão do parasita foi constatada sete dias após o repasto infectivo (primeira exposição do hamster).

SECUNDINO et al. (2012) observaram a transmissão de *Le. i. chagasi* a Balb/C e hamster via picada de fêmeas infectadas por alimentação em membrana contendo sangue de coelho e formas promastigotas de leishmania. Esses autores utilizaram espécimes de *Lu. longipalpis* de colônia estabelecida de parentais capturados na caverna "Lapinha" em Lagoa Santa (MG) e detectaram a transmissão do parasita a hospedeiros expostos à picada 14 dias após o repasto infectivo das fêmeas pela técnica molecular denominada PCR em tempo real.

No presente estudo foi observado que a população de *Lu. longipalpis* do município de Panorama, possivelmente do quemotipo 9-metil-germacreme (Casanova et al., 2015) do município de Panorama (SP), é competente para transmitir *Le. (i) chagasi*, pois 97% das fêmeas alimentadas em cão infectado desenvolveram infecção com flagelados, e a partir do quarto dia após o repasto infectivo, transmitiram os flagelados a hamsters. Embora, a competência vetorial para a população de *Lu. longipalpis* Panorama tenha sido demonstrada, a capacidade vetorial das populações do complexo desta espécie distribuídas no estado de São Paulo pode apresentar diferenças, como apontado por CASANOVA et al. (2006, 2015).

5.7. CAPACIDADE VETORIAL DE *Lu. longipalpis* PARA TRANSMITIR *Leishmania infantum chagasi* NO MUNICÍPIO DE PANORAMA

A análise da capacidade vetorial de vetores das leishmanias constitui uma importante ferramenta da vigilância entomológica que pode contribuir para o conhecimento da dinâmica de transmissão das leishmanioses em uma determinada área. Os valores estimados de capacidade vetorial variam no tempo e no espaço pela influência de múltiplas variáveis bióticas e abióticas. Em termos epidemiológicos, para que a transmissão de um agente se mantenha em uma área, o número de picadas potencialmente infectivas por dia (CV) deve ser superior a 1, sendo valores inferiores à unidade indicativos da interrupção da transmissão. A capacidade vetorial é dependente

do parâmetro densidade em relação ao hospedeiro (m), um parâmetro de difícil estimativa, principalmente pela sua variabilidade espaço-temporal e a influência de fatores tais como temperatura, local e método de captura, entre outros.

No presente trabalho, a estimativa da densidade de fêmeas por hospedeiro nas capturas com armadilhas tipo OBETs produziu valores de capacidade vetorial menores do que 1, como também observado quando usado o o número médio de fêmeas por hospedeiro observado nas capturas com armadilhas adesivas. Isto significa que a transmissão do parasita não poderia se manter no local. Todavia, quando analisados os valores obtidos por domicílio foi observado que um único domicílio poderia gerar entre 1,2 e 2,7 picadas potencialmente infectivas por dia, se a população de fêmeas desse local tivesse contato com um cão altamente infectivo.

Esta observação junto com as informações obtidas no estudo da distribuição espacial de *Lu. longipalpis* em Panorama, reforça a necessidade de e identificar domicílios com condições microambientais favoráveis para a manutenção da transmissão e identificação de pontos estratégicos que permitam a elaboração de medidas de controle. A captura de fêmeas com aspiração direta sobre as iscas representadas por animais vertebrados, ainda que tenha produzido um valor de capacidade vetorial de 1,5 picadas potencialmente infectivas por dia, apresenta alguns inconvenientes metodológicos que pode levar a superestimar ou subestimar este valor. Esse fato decorre de fatores humanos envolvidos na amostragem, por exemplo a experiência do coletor. Acresce considerar a presença de alguns inconvenientes metodológicos que podem dificultar a sua aplicação na prática, dentre estes, podemos citar o comportamento do animal que pode ser agressivo, impedindo a aproximação do capturador e das fêmeas de flebotomíneos durante a captura, ou mesmo quando é dócil e tenta brincar com o coletor. Esses dois comportamentos podem representar defesas do hospedeiro que afastam os insetos, impedindo as picadas. Além disto, não se pode deixar de considerar aceitabilidade do morador em relação ao estudo em sua residência.

Mais do que o valor quantitativo estimado da capacidade vetorial, os resultados do presente estudo demonstram que a população de *Lu. longipalpis* do município de Panorama apresenta características que lhe conferem um alto potencial para transmitir *Le. i. chagasi*, entre estas, alto grau de cinofilia, concordância gonotrófica, período de incubação extrínseco menor o igual que o do ciclo gonotrófico e taxas elevadas de sobrevivência. Adicionalmente, as características espaciais do município de Panorama

favorecem o desenvolvimento dessa espécie pela presença de domicílios com vegetação nos quintais e manutenção de animais domésticos que podem amplificar a densidade do vetor, aumentando o risco de infecção para a população humana. A capacidade vetorial da espécie no município pode variar, atingindo os maiores valores nos períodos chuvosos e mais quentes, quando ocorre aumento da densidade do vetor, diminuição do período de incubação extrínseco e o do ciclo gonotrófico.

A alta prevalência de infecção canina no município de Panorama potencializa o risco de transmissão da LIC à população humana. Considerando as dificuldades de medidas como a prática da eutanásia canina, medidas de proteção individual para os cães que diminuam a frequência de contato com o vetor (uso de inseticidas tópicos ou de coleiras) e de controle vetorial que diminuam a sobrevivência da população (inseticidas de ação residual) poderiam contribuir para a redução da incidência da infecção natural nos flebotomíneos, afetando a dinâmica de transmissão da LVA. Ressalta-se ainda, que sendo a LVA uma doença que envolve outros fatores determinantes, o controle deve ter um foco integral, envolvendo medidas educativas e socioambientais, de controle vetorial e dos hospedeiros.

6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

- No município de Panorama- estado de São Paulo, *Lu. longipalpis* apresenta um comportamento sazonal com os períodos de maior frequência associados aos períodos de chuva (outubro a março);
- O ciclo gonotrófico de *Lu. longipalpis* pode variar entre 4-8 dias, enquanto que a duração mínima do período de incubação extrínseco de *Le. i. chagasi* a 28°C é de 4 dias;
- A população de *Lu. longipalpis* é competente para transmitir a *Le. i. chagasi* num repasto sanguíneo subsequente;
- *Lu. longipalpis* apresenta comportamento oportunista em relação aos hospedeiros mais frequentes no local de estudo, com elevadas taxas de sobrevivência e grau elevado de cinofilia, o que pode potencializar seu papel vetorial;
- Apesar de alta prevalência da infecção no local (40%), a taxa de infecção natural dos flebotomíneos é baixa (1,2%);
- A taxa de infecção de flebotomíneos alimentados em cães naturalmente infectados com *Le. i. chagasi* foi heterogênea com variação entre 0 e 97,1%. Isto implica na necessidade de uma avaliação das estratégias de controle baseada na eutanásia da população canina;
- *Lu. longipalpis* tem o potencial de disseminar entre 0 e 2,5 picadas potencialmente infectivas por dia; dependendo das condições microambientais presentes no entorno dos domicílios.
- Recomenda-se a intensificação de medidas de controle vetorial durante a estação chuvosa, para diminuir o risco de infecção humana e canina;
- Recomenda-se a identificação de pontos estratégicos (áreas com vegetação próxima ao domicílio e manutenção de animais domésticos sem a retirada dos resíduos) para a realização de atividades de controle vetorial e campanhas educativas e de manejo ambiental, visando a diminuição de fontes potenciais de alimento e abrigo para o vetor e de habitats para o desenvolvimento das formas imaturas.

REFERÊNCIAS

1. Afonso MM, Duarte R, Miranda JC, Caranha L, Rangel EF. 2012. Studies on the Feeding Habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Populations from Endemic Areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. *J Trop Med*. 2012:858657.
2. Alencar, J.E. — Calazar canino. *Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil* Fortaleza, Imp. Oficial, 1959. (Tese da Universidade Federal do Ceará).
3. Alexander B, Carvalho RL, McCallum H, Pereira MH. 2002. Role of the Domestic Chicken (*Gallus gallus*) in the Epidemiology of Urban Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis*. 8(12): 1480–1485.
4. Alexander B, Young DG. 1992. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*;87(3):397-403.
5. Alexander B, Young DG. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992.87(3):397- 403.
6. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 7(5):e35671.
7. Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Texeira R & Johnson-JRWD. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infec Dis*.1986;154:1003-11.
8. Barretto MP. Contribuição para o estudo da biologia dos flebótomos em condições experimentais (Diptera, Psychodidae). [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP; 1942.
9. Barretto MP. Observações sobre a biologia, em condições naturais, dos flebótomos do Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae). [Tese de Livre-Docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP;1943.
10. Barros VLL. Estudo da importância do *Gallus gallus* como chamariz da *Lu. longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no ambiente doméstico e caracterização da fonte alimentar do flebotomíneo na localidade de Preiçueira, município de São José de Ribamar- MA, em 2005. [Dissertação de Mestrado]. Maranhão: Universidade Federal do Maranhão 2006.

11. Bates PA. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 37(10):1097-106.
12. Begon Michael. Ecological epidemiology. In: *The Princeton Guide to Ecology* Edited by Simon A. Levin Stephen R. Carpenter, H. Charles J. Godfray, Ann P. Kinzig, Michel Loreau, Jonathan B. Losos, Brian Walker & David S. Wilcove, associate editors. 2009.
13. Bortolletto D. 2010. Influência da esterilização cirúrgica na população canina de área endêmica para Leishmaniose visceral. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba. [Dissertação de Mestrado].
14. Bruford MW, Hanotte O, Brookfield JFY, Burke T (1998) Multilocus and single-locus DNA fingerprinting. In: *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*, 2nd edition, (ed. Hoelzel AR), pp. 287-336. IRL Press, Oxford, UK.
15. Camargo - Neves VLF; Rodas L, Gomes A. C. 2007. Avaliação do hábito alimentar de *Lutzomyia longipalpis* no Estado de São Paulo. BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista, v. 4, p. 1-8.
16. Campbell-Lendrum DH, Brandão-Filho SP, Ready PD, Davies CR. 1999. Host and/or loyalty of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in Brasil. *Medl and Vet Entomol.* 13:209-211,
17. Cardim MFM, Rodas LAC, Dibo MR, Guiraldo MM, Oliveira AM, et al. 2013. Introduction and expansion of human American visceral leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil, 1999–2011. *Rev Saúde Pública* 47(4): 1–9.
18. Casanova C, Costa AI, Natal D. 2005 Dispersal pattern of the sand fly *Lutzomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural area in Southeastern Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100(7):719-24.
19. Casanova C, Hamilton JGC, Trigo JR, Costa AI. 2006. Identification of sex pheromones of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) populations from the state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 113–115.
20. Casanova C, Natal D, Santos FAM. 2009. Survival, population size and gonotrophic cycle duration of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) at an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southern Brazil. *J Med Entomol.* 46: 42-50.
21. Casanova C, Colla-Jacques FE, Hamilton JG, Brazil RP, Shaw JJ. 2015. Distribution of *Lutzomyia longipalpis* chemotype populations in São Paulo state, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 17;9(3):e0003620.
22. Casanova C, Andrighetti MTM, Sampaio SMP, Marcoris MLG, Colla-Jacques FE, Prado AP. 2013. Larval Breeding Sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:

Psychodidae) in Visceral Leishmaniasis Endemic Urban Areas in Southeastern Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 7(9): e2443.

23. Chaniotis BN, Correa MA, Tesh RB, Johnson KM. 1974. Horizontal and vertical movements of phlebotomine sandflies in a Panamanian rain forest. J Med Entomol. 15;11(3):369-75.

24. Chaniotis BN, Parsons RE, Harlan HJ, Correa MA. 1982. A pilot study to control phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in a Neotropical Rain Forest. J Med Entomol. 19:1-5.

25. CIIAGRO. Centro integrado de informações agrometeorológicas. Available in <http://www.ciiagro.sp.gov.br/>. Updated November 2014.

26. Cipa Group. Computer-aided Identification of Phlebotomine Sandflies of America. 1999. <<http://cipa.snv.jussieu.fr>> (acessado em 22/11/2011).

27. Correa-Antonialli SA, Torres TG, Paranhos-Filho AC, Tolezano JE. 2007 Spatial analysis of American visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul state, Central Brazil. J Infect 54: 509–514. PMID 16979241.

28. Costa AP, Casanova C, Rodas LAC, Galati EAB. 1997. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde Pública. 31(6):632-3.

29. Costantini C, Li SG, Della Torre A, Sagnon N, Coluzzi M, Taylor CE. 1996. Density, survival and dispersal of Anopheles gambiae complex mosquitoes in a west African Sudan savanna village. Med Vet Entomol. 10(3):203-19.

30. Costantini C, Sagnon NF, della Torre A, Diallo M, Brady J, Gibson G, Coluzzi M. 1998. Odor-mediated host preferences of West African mosquitoes, with particular reference to malaria vectors. Am J Trop Med Hyg. 58(1):56-63.

31. Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. J Infect Dis. 2002.186(9):1314-20.

32. Cutolo AA, Ovallos FG., Lavitschka CO, Dantas MDS, Molla LM., Nogueira FDS, Pereira-Chioccola VL, Menz I, Galati EAB. “Aggregated pattern of *Leishmania infantum chagasi* transmission from naturally infected dogs to laboratory reared *Lutzomyia longipalpis* through xenodiagnosis. 8th International Symposium on Phlebotomine Sand flies, 22-25 september 2014, Argentine.

33. Da Silva WR.. Panorama-SP Entre o turismo e o lazer. [Dissertação de Mestrado]. Três Lagoas MS: Universidade Federal De Mato Grosso Do Sul; 2013.

34. de Freitas JS, Reinhold-Castro KR, Casanova C, da Silva JP, Previdelli I, Teodoro U: Spatial and/or olfactory memory in sandflies in an endemic area for

American cutaneous leishmaniasis, southern Brazil. *Rev Soc BrasMed Trop* 2009, 42:151–155.

35. De Oliveira EF, Silva EA, Casaril AE, Fernandes CE, Paranhos Filho AC, Gamarra RM, Ribeiro AA, Brasil RP, Oliveira AG. 2013. Behavioral aspects of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in urban area endemic for visceral leishmaniasis. *J Med Entomol.*50(2):277-84.

36. Deane LM Deane MP. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. *O hospital*, Rio de Janeiro. 1954. 45: 419-421.

37. Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios de *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. *Hospital*. 1955; 48:61-76.

38. Deane, L.M. — *Leishmaniose visceral no Brasil*; estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Rio de Janeiro, Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956. (Tese da Universidade de São Paulo).

39. Dejeux P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27:305-318.

40. Dia I, Diallo D, Duchemin JB, Ba Y, Konate L, Costantini C, Diallo M. 2005. Comparisons of human-landing catches and odor-baited entry traps for sampling malaria vectors in Senegal. *J Med Entomol.* 42(2):104-9.

41. Diniz MM, Ovallos FG, de Castro Gomes CM, de Oliveira Lavitschka C, Galati EA. 2014. Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. *Parasit Vectors.* 31;7:139.

42. Dye C, Davies CR, Lainson R. 1991. Communication among phlebotomine sandflies: a field study of domesticated *Lutzomyia longipalpis* populations in Amazonian Brazil. *Anim Behav* 42(2):183–192.

43. Fernández MS, Salomón OD, Cavia R, Perez AA, Acardi SA, Guccione JD 2010. *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with environmental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. *Acta Tropica* 114: 81-87.

44. Forattini O P. 1973. *Entomologia Médica. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose.* São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda, 658 p.

45. Forattini OP, Rabello EX; Galati EAB. Novos encontros de flebotomíneos no Estado de São Paulo, Brasil, com especial referência a *Lutzomyia longipalpis*. *Rev Saúde Pública.* 1976;10:125-8.

46. Galati EA, Fonseca MB, Marassá AM, Bueno EF. 2009. Dispersal and survival of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)

in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the speleological province of the Ribeira Valley, state of São Paulo, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104(8):1148-58.

47. Galati EA, Fonseca MB, Marassá AM, Bueno EF. 2009. Dispersal and survival of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the speleological province of the Ribeira Valley, state of São Paulo, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104(8):1148-58.

48. Galati, EAB. 2013. Apostila de Bioecologia e Identificação de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) - Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, Brasil.

49. Galati, EAB. 2015. Apostila de Bioecologia e Identificação de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) - Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, Brasil.

50. Garrett-Jones and G. R. Shidrawi. 1969. Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae* An exercise in epidemiological entomology. Bull World Health Organ. 1969; 40(4): 531–545.

51. Garrett-Jones C. 1964. The human blood index of malaria vectors in relations to epidemiological assessment. Bull. Wld hlth org. 30:241-261.

52. Gomes AC Controle diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar). Normas e Técnicas. Brasília. Fundação Nacional da Saúde, 1996.

53. Gomes AC. Vigilância entomológica. Inf Epidemiol SUS 2002;11(2):79-90.

54. Hamilton JG, Ramsoondar TM. 1994. Attraction of *Lutzomyia longipalpis* to human skin odours. Med Vet Entomol. 8(4):375-80.

55. Hamilton JGC, Maingon RDC, Alexander B, Ward RD, Brazil RP . 2005. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. Med Vet Entomol. 19: 480–488

56. Holcman MM, Sampaio SM, Rangel O, Casanova C. Spatial and seasonal distribution of *Lutzomyia longipalpis* in Dracena, a city in the western region of the State of São Paulo, Brazil, that is endemic with visceral leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop. 2013;46(6):704-12.

57. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=353540>.

58. Jimenez TV. Fatores de risco de Leishmaniose Visceral em cães no município de Panorama, Estado de São Paulo, SP, Brasil. São Paulo; 2015. (Dissertação de Mestrado, Universidade São Paulo).

59. Kamhawi S. 2006. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?. *Trends in Parasitology*.;22:439-445.
60. Kelly DW, Dye C 1997. Pheromones, kairomones and aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Anim Behav* 53: 721-731.
61. Killick-Kendrick R, Rioux JA. 2002 . Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. *Parassitologia*. 44(1-2):67-71.
62. Killick-kendrick R,. Rioux JA, Bailly M, Guy MW, Wilkes TJ, Guy FM, Davidson I, Knechtu R, Ward RD, Guilvard E, Perieres J, Dubois H. 1984. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes. *Ann Parasitol Hum Comp*.59(6):555-72.
63. Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GE, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, Wirth T, Miles MA, Schönian G. 2011. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. *PLoS Negl Trop Dis*. 5(6):e1155.
64. Lafferty KD. 2009. The ecology of climate change and infectious diseases. *Ecology* 90:888–900.
65. Lainson R, Shaw JJ. New World leishmaniasis, In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D, editors. *Topley & Wilson's Arnold. Microbiology and Microbial Infections, Parasitology*, London, Sydney, Auckland; 2005. p.313-349.
66. Lainson R, Ward RD, Shaw JJ. 1979. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of Neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature*. 266(5603):628-30.
67. Laurenti MD, Rossi CN, da Matta VL, Tomokane TY, Corbett CE, Secundino NF, Pimenta PF, Marcondes M. 2013. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the naturalvector. *Vet Parasitol*. 23;196(3-4):296-300.
68. MacDonald G. The analyses of the sporozoite rate. *Trop Dis Bull*.1952. 49(6):569-86.
69. Madden T. The BLAST Sequence Analysis Tool. 2002 . [Updated 2003 Aug 13]. In: McEntyre J, Ostell J, editors. *The NCBI Handbook* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2002-. Chapter 16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/>
70. Maingon RD, Ward RD, Hamilton JG, Bauzer LG, Peixoto AA. 2008. The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to Leishmania transmission? *Trends Parasitol*. 24(1):12-7.

71. Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*. 1999 Sep;119(Pt 3):237-46.
72. Meyer RP. 1989. Estimation of vectorial capacity: Pathogen extrinsic incubation and vector competence. *Bull. Soc. Vector Ecol.*, 14(1): 60-6.
73. Michalsky EM; Rocha MF; da Rocha-Lima AC; França-Silva JC., Pires MQ; Oliveira FS; Pacheco RS; dos Santos SL; Barata RA; Romanha AJ; Fortes-Dias CL; Dias ES; 2007. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet. Parasitol.* 147: 67-76.
74. Michalsky EM, Guedes Kde S, Lara e Silva Fde O, França-Silva JC, Dias CL, Barata RA, Dias ES. 2011. Natural infection with *Leishmania infantum chagasi* in *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sandflies captured in the municipality of Janaúba, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 44(1):58-62.
75. Milby MM, Reisen WK. Estimation of vectorial capacity: Vector survivorship. *Bull Soc Vector Ecol.* 1989. 14 (1): 47-54.
76. Ministério da saúde. Atlas da leishmaniose tegumentar americana. Diagnóstico clínico diferencial. 2006. Brasília, Ministério da Saúde. 136 p.
77. Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Glossário/ Leishmaniose visceral. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>.
78. Missawa NA, Lorosa ES, Dias ES. 2010. Feeding preference of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in transmission area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop.* 41(4):365-8.
79. Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD, Barazarte R, Travi BL, Lane RP. 2003. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Trop.* 85(1):19-29.
80. Morrison AC, Ferro C, Morales A, Tesh RB, Wilson ML. 1993. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J Med Entomol.* 30(2):427-35.
81. Nelson, R. L., C. H. Tempelis, W. C. Reeves, and P.E.M. Fine. 1978. Estimates of survival, population size, and emergence of *Culex tarsalis* at an isolated site. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 71: 801- 808.
82. Noyes HA, Stevens JR, Teixeira M, Phelan J, Holz P. 1999. A nested PCR for the
83. ssrRNA gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in
84. wombats and kangaroos in Australia. *Int J Parasitol.* 29(2):331-9.



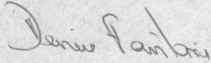
85. Noyes HA, Stevens JR, Teixeira M, Phelan J, Holz P. 1999. A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. In wombats and kangaroos in Australia. *Int J Parasitol.* 29(2):331-9.
86. Oliveira A. Estudos ecológicos de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) em área urbana no município de Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul [Doctoral Dissertation]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; 2006.
87. Oliveira AG, Marassa AM, Consales CA, Dorval MEC, Fernandes CE, Oliveira GR, Brazil RP, Galati EAB. Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Tropica.* 2008. 107. 238-241.
88. Oliveira EF, Silva EA, Fernandes CE, Paranhos Filho AC, Gamarra RM, Ribeiro AA, Brazil RP, Oliveira AG. Biotic factors and occurrence of *Lutzomyia longipalpis* in endemic area of visceral leishmaniasis, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(3):396-401.
89. Oliveira EF. Capacidade vetorial de *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania (Leishmania) infantum*. São Paulo; 2015.(Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo).
90. Ovallos FG. Estudo da capacidade vetorial de *Migonemyia migonei* (França) e de *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* Cunha & Chagas. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2011.
91. Paiva BR, Secundino NFC, Nascimento JC, Pimenta PF, Galati EA, Junior HF, et al. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop* 2006; 99:252-259.
92. Pardo RH, Torres M, Morrison AC, Ferro C. 1996. Effect of fluorescent powder on *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and a simple device for marking sand flies. *J Am Mosq Control Assoc.* 2:235-42.
93. Peel MC, Finlayson BL & McMahon TA (2007), Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification, *Hydrol. Earth Syst. Sci.*, 11, 1633-1644.
94. Pinto MC, Campbell-Lendrum DH, Lozovei AL, Teodoro U, Davies CR. Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Med Vet Entomol* 2001, 15:132–139.
95. Quinnell RJ, Dye C, Shaw JJ. 1992. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. *Med Vet Entomol.*;6(3):195-200.
96. Quinnell RJ, Dye C. 1994. Correlates of the peridomestic abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Amazonian Brazil. *Med. Vet. Entomol.*, 8:219-224.

97. Rangel EF Vilela ML. 2008. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saúde Pública*. 24:2948-2952.
98. Rangel O, Hiramoto RM, Henriques LF, Taniguchi HH, Ciaravolo RM Tolezano JE, França ACC, Yamashiro J, Oliveira SS. 2013. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, para 2013. BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online), 10(111), 3-14.
99. Rangel, EF; Souza NA; Wermelinger ED; Barbosa AF. 1985. Estabelecimento de colônia, em laboratório, de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 80: 219–226.
100. Rebêlo JM. Hourly frequency and seasonality of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) on São Luís Island, Maranhão, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2001;17(1):221-7.
101. Reisen WK. 2010. Landscape epidemiology of vector-borne diseases. *Annu Rev Entomol*. 55:461-83.
102. Reisen WK. 2010. Landscape epidemiology of vector-borne diseases. *Annu Rev Entomol*. 55:461-83.
103. Resende MC, Camargo MC, Vieira JR, Nobi RC, Porto MN, Oliveira CD, Pessanha JE, Cunha Mda C, Brandão ST . Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(1):51-5.
104. Ribeiro M, Rossignol PA, Spielman A. 1986. Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Comp. Biochem. Physiol*. 83: 683–686.
105. Sacks D, Kamhawi S. 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*. 55:453-83.
106. Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MM, Rangel EF. 2015. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 110(7):831-46.
107. SANTOS, Roseli La Corte dos; FORATTINI, Oswaldo Paulo. 1999. Marcação-soltura-recaptura para determinar o tamanho da população natural de *Anopheles albitalis* L.s. (Diptera: Culicidae). *Rev. Saúde Pública*. 33(3): 309-313.
108. Savani ES, Nunes VL, Galati EA, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. 2009. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Vet Parasitol*. 9; (1-2):18-24.

109. Secundino NF, de Freitas VC, Monteiro CC, Pires AC, David BA, Pimenta PF. The transmission of *Leishmania infantum chagasi* by the bite of the *Lutzomyia longipalpis* to two different vertebrates. Parasit Vectors. 19;5:20.
110. Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi-Jr G. 1984. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984; 9:511.
111. Silva EA, Andreotti R, Honer MR. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 2007; 40:420-425.
112. Silveira FT., Corbett CEP. 2010. *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937: indigenous or introduced? A brief review. Rev. Pan-Amaz Saúde, 1 (2): 143–147.
113. Soares MR, Carvalho CC, Silva LA, Lima MS, Barral AM, Rebêlo JM, Pereira SR. 2010. Molecular analysis of natural infection of *Lutzomyia longipalpis* in an endemic area for visceral leishmaniasis in Brazil. Cad Saude Publica. 26(12):2409-13.
114. Stocco AC. 2010. Diagnóstico molecular de leishmaniose tegumentar americana: Identificação de espécies de *Leishmania* por SSUrRNA PCR e G6PD PCR. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP; 2010.
115. Takken W; Verhulst NO. Host Preferences of Blood-Feeding Mosquitoes. Ann. Rev. Entomol. 2012. 58:433–53.
116. Teodoro U, Silveira TGV, Santos DR, Santos ES, Santos AR, Oliveira O, Kühli JB, Alberton D. 2003. Influência da reorganização, da limpeza do peridomicílio e da desinsetização de edificações na densidade populacional de flebotômíneos no Município de Doutor Camargo, estado do Paraná, Brasil. Cad Saúde Pública. 19(6):1801-13.
117. Tolezano JE; Luvizotto MCR; Uliana SRB; Araújo MFL, Taniguchi HH, Barbosa JAR; Pinto, PLS; Floeter-Winter LM & Shaw JJ. 1999. Leishmaniose visceral americana (LVA) em Araçatuba, região oeste do Estado de São Paulo. Investigações laboratoriais e diagnóstico etiológico de uma doença emergente em terras paulistas. Rev Soc Brasil Med Trop. 32(Supl. I):218.
118. Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. 2001. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. Am J Trop Med Hyg. 64(3-4):119-24.
119. Uribe S. 1999. The status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex and possible implications for *Leishmania* transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz, 94(6), 729-734.

120. Verçosa BL; Lemos CM; Mendonça IL; Silva SM; de Carvalho SM; Goto H; Costa FA. 2008. Transmission potential, skin inflammatory response and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Vet. Res.* 4, 45.
121. Verhulst NO, Loonen JA, Takken W. 2013. Advances in methods for colour marking of mosquitoes. *Parasit Vectors.* 8;6(1):200. doi: 10.1186/1756-3305-6-200.
122. Ward RD., Ribeiro AL., Ready PD., Murtagh A. 1983 Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae), the vector of *Leishmania donovani chagasi* Cunha & Chagas and its significance to kala-azar distribution in South America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 78, 269–280.
123. WHO. Leishmaniasis. Burden of disease. <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> (acessado em 10/09/2015).
124. WHO: World Health Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Geneva: World Health Organization; 2002.
125. Young DG, Duncan MA. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Entomol Insti.* 54:1-881.

ANEXO 1. CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

	<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO</p>	
<p>FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA</p>		
<p>Comissão de Ética no Uso de Animais</p>		
<h3>CERTIFICADO</h3>		
<p>Certificamos que o Projeto intitulado “Leishmaniose visceral americana: avaliação dos parâmetros da capacidade vetorial de <i>Lutzomyia longipalpis</i> em área urbana no estado de São Paulo, Brasil”, protocolado sob o nº 2988/2013, utilizando 10 (dez) galinhas, sob a responsabilidade Profa. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati (FSP/USP) e Prof. Dr. Fernando Ferreira, foi aprovado em reunião de 23/4/2014 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.</p>		
<p>We certify that the Research “American visceral Leishmaniasis: evaluation of the vectorial capacity parameters of <i>Lutzomyia longipalpis</i> in urban area in the São Paulo State, Brazil”, protocol number 2988/2013, utilizing 10 (ten) chickens, under the responsibility Profa. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati (FSP/USP) e Prof. Dr. Fernando Ferreira, was approved in the meeting of day 4/23/2014 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.</p>		
<p>São Paulo, 23 de abril de 2014.</p>		
		
<p>Denise Tabacchi Fantoni Presidente</p>		
<p>Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87 Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira” São Paulo/SP – Brasil 05508-270</p>	<p>Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904 Fax: +55 11 3032-2224 E-mail: ceuavet@usp.br http://www.fmvz.usp.br</p>	

ANEXO 2. LICENÇA DE CAPTURA DE MATERIAL ZOOLOGICO PELO SISBIO



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

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 25596-1	Data da Emissão: 28/09/2010 14:07
Dados do titular	
Nome: Eunice Aparecida Bianchi Galati	CPF: 056.110.168-04
Nome da Instituição : Faculdade de Saúde Pública, USP	CNPJ: 63.025.530/0017-71

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo ICMBio, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ORDEM	Diptera
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Faculdade de Saúde Pública, USP	colecção
2	Faculdade de Saúde Pública, USP	criadouro científico
3	Faculdade de Saúde Pública, USP	Estudos de ecologia e taxonomia

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

Código de autenticação: 94737534



Página 1/2

ANEXO 3. CURRÍCULO LATTES – FREDY GALVIS OVALLOS

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Fredy Galvis Ovallos)

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4450354T7>



Fredy Galvis Ovallos

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0162420844956315>
Última atualização do currículo em 30/07/2015

Possui graduação em Biologia - Universidade de Pamplona (2007) e mestrado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (2011), bolsista PEC-PG do CNPq. Atualmente é doutorando da Universidade de São Paulo, bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP. Tem experiência na área de Saúde Pública, atuando principalmente nos seguintes temas: Leishmaniasis, Eco-epidemiologia de doenças transmitidas por vetores, Sistemática e Taxonomia de Phlebotominae. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Fredy Galvis Ovallos
Nome em citações bibliográficas	Galvis F. O.;Ovallos, Fredy Galvis;GALVIS OVALLOS, FREDY

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. AV. DR ARNALDO 715 CERQUEIRA CESAR 01255000 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617788
------------------------------	---

Formação acadêmica/titulação

2012	Doutorado em andamento em Saúde Pública (Conceito CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Leishmanioses visceral americana: Avaliação dos parâmetros da capacidade vetorial de Lutzomyia longipalpis em área urbana no estado de São Paulo, Brasil., Orientador: Eunice A.B. Galati.
2009 - 2011	Mestrado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Estudo da competência vetorial de Mignonemys mignonei (França) e de Pintomyia fischeri (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para Leishmania (Leishmania) infantum chagasi Cunha & Chagas, Ano de Obtenção: 2011. Orientador: Eunice Aparecida Bianchi Galati. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Palavras-chave: Phlebotominae; Entomologia Médica. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Parasitologia / Subárea: Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Ecologia / Subárea: Ecologia Aplicada / Especialidade: Ecologia de Vetores de enfermidades Humanas. Setores de atividade: Saúde humana e serviços sociais; Educação.
2002 - 2007	Graduação em Biologia. Universidad de Pamplona, U.PAMPLONA, Colômbia. Título: Estudio Eintomológico en un foco activo de leishmaniosis cutanea en el municipio de Gramalote, Norte de Santander.. Orientador: Claudia Magaly Sandoval.
1996 - 2001	Ensino Médio (2º grau). Instituto Tecnoco Agrícola de Gramalote.

ANEXO 4. CURRÍCULO LATTES – EUNICE A. B. GALATI

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Eunice Aparecida Bianchi ... <http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4797713T8>




Eunice Aparecida Bianchi Galati

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1C - CA MP - Microbiologia e Parasitologia

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1359035734723864>
Última atualização do currículo em 20/10/2015

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo (1977), graduação em Ciências pela Universidade de São Paulo (1976), mestrado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (1981) e doutorado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (1990). Atualmente é professor associado da Universidade de São Paulo. Tem experiência no ensino sobre Epidemiologia e Entomologia em Saúde Pública. Em pesquisa em Entomologia Médica, atuando principalmente nos seguintes temas: Phlebotominae, Psychodidae, leishmaniose tegumentar, taxonomia e epidemiologia. Atualmente desenvolve projeto sobre capacidade vetorial de Phlebotominae em relação às leishmânias: *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* chagasi. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Eunice Aparecida Bianchi Galati 
Nome em citações bibliográficas	GALATI, E. A. B.;Galati, E.A.B.;Galati, Eunice A. B.;GALATI, EUNICE A.B.;BIANCHI GALATI, EUNICE APARECIDA;EUNICE APARECIDA GALATI;GALATI, EUNICE AB;GALATI, EUNICE APARECIDA;GALATI, EUNICE APARECIDA BIANCHI

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia. Av. Dr. Arnaldo, 715 Cerqueira Cesar 01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617786 Fax: (11) 30617926
------------------------------	---