



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Thais Oliveira Coelho

**OCORRÊNCIA E ANÁLISE DA INFECÇÃO NATURAL DE ESPÉCIES DA
SUBFAMÍLIA PHLEBOTOMINAE NA FERCAL, DISTRITO FEDERAL,
BRASIL/DF**

BRASÍLIA

2017

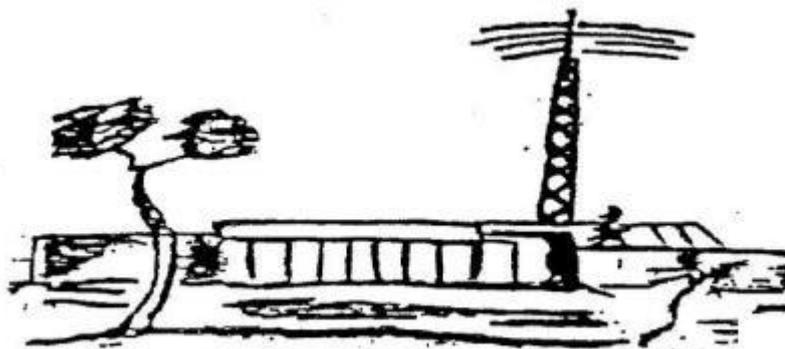
**OCORRÊNCIA E ANÁLISE DA INFECÇÃO NATURAL DE ESPÉCIES DA
SUBFAMÍLIA PHLEBOTOMINAE NA FERCAL, DISTRITO FEDERAL,
BRASIL/DF**

Thais Oliveira Coelho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para a obtenção do título de mestre em Medicina Tropical, na área de concentração: Biologia das doenças infecciosas e parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Takashi Obara

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisa Neves Vianna



Brasília

2017

Ficha catalográfica elaborada automaticamente, com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

OC672o Oliveira Coelho, Thais
OCORRÊNCIA E ANÁLISE DA INFECÇÃO NATURAL DE ESPÉCIES DA
SUBFAMÍLIA PHEBOTOMINAE NA FERCAL, DISTRITO FEDERAL,
BRASIL / Thais Oliveira Coelho; orientador Marcos
Takashi Obara; co-orientador Elisa Neves Vianna. --
Brasília, 2017. 115 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Medicina Tropical) -
Universidade de Brasília, 2017.

1. Phlebotominae. 2. Distrito Federal. 3. infecção
natural. 4. PCR. 5. Leishmaniose Visceral. I. Takashi
Obara, Marcos , orient. II. Neves Vianna, Elisa, co-
orient.
III. Título.

**OCORRÊNCIA E ANÁLISE DA INFECÇÃO NATURAL DE ESPÉCIES DA
SUBFAMÍLIA PHLEBOTOMINAE NA FERCAL, DISTRITO FEDERAL,
BRASIL/DF**

Universidade de Brasília

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcos Takashi Obara (Orientador)
Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr. Fredy Galvis Ovallos (Titular)
Faculdade de Saúde Pública – USP

Profa. Dra. Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo (Titular)
Universidade de Brasília - UnB

Profa. Dra. Thaís Tâmara Castro e Souza Minuzzi (Suplente)
Universidade de Brasília - UnB

Brasília

2017

Você deve acreditar em si mesmo, esse é o segredo.

Charles Chaplin

Dedico este trabalho a minha mãe Rosely Cerqueira de Oliveira meu maior exemplo de profissional, minha fortaleza, minha maior incentivadora e agradeço pelos seus ensinamentos e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela dádiva da vida e fazer-se presente em todos os momentos de sucesso e fragilidade, proporcionando-me muita força para me manter firme, me guiando em toda essa jornada e colocando pessoas muito especiais ao meu lado, e que sem as quais certamente não teria conseguido alcançar todos objetivos deste trabalho.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília-UnB, desde os servidores da secretaria, como a Lúcia, que sempre foram muito solícitos e em especial aos professores Maria Regina Fernandes, Pedro Luiz Tauil e Wildo Navegantes de Araújo pela transmissão de conhecimentos e inspiração profissional e Vagner José Mendonça também pela participação no trabalho.

Ao meu orientador Prof. Marcos Takashi Obara por mais uma vez me aceitar como sua orientanda, por ser uma referência profissional, pelo frequente incentivo, por acreditar no meu potencial, por compartilhar sabedorias e pela participação constante em todas as etapas deste trabalho, mas também pela parceria, compreensão, paciência e amizade durante toda esta caminhada.

Ao Professor Andrey José Andrade primeiramente pela pessoa e profissional maravilhoso e ético, pelo tempo e grande conhecimento compartilhado, pela identificação dos flebotomíneos, pelo enorme incentivo, participação em todas as etapas do trabalho e também pela grande amizade, conversas sinceras, paciência.

A Professora Elisa Neves Vianna, por me auxiliar na etapa final desse trabalho, especialmente com a análise dos dados, pela paciência e pelo incentivo para a finalização dessa dissertação. Ao Professor Fredy Galvis Ovallos por ter aceitado participar da banca de defesa da minha dissertação de mestrado.

À equipe do Laboratório de Parasitologia, especialmente ao professor e coordenador Rodrigo Gurgel Gonçalves por compartilhar e permitir que este trabalho fosse realizado, pelo incentivo, participação e ajuda em várias etapas de trabalho. Ao colega Douglas de Almeida Rocha pela parceria tanto no campo com as coletas de flebotomíneos, quanto no laboratório na identificação, pelas conversas, pela alegria e sinceridade em todos os momentos. À colega e técnica Renata Velôso Timbó, pela ajuda na execução de várias etapas do processo laboratorial, pela paciência, pelas conversas, pela transmissão de conhecimentos pelos “puxões de orelha” e pela grande

amizade construída. À colega Mariana Neiva pela ajuda na execução de diversas etapas do processo laboratorial, pelas risadas juntas, pela sinceridade e pela amizade. A colega e técnica Luciana Martins pela grande ajuda nas etapas laboratoriais. À colega Tauana de Souza Ferreira por ser sempre prestativa. À colega Aline Rapello por compartilhar o tempo e os conhecimentos profissionais, pelos agradáveis momentos juntas, pela amizade construída e por todo apoio emocional durante esta jornada. Vocês foram fundamentais para que este trabalho fosse realizado.

À equipe do Laboratório Interdisciplinar de Biociências e Faculdade de Medicina e em especial à Professora Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo pelo vasto conhecimento teórico e prático compartilhado, pelas palavras e dicas durante os seminários, e que ao longo mostrou-se uma pessoa maravilhosa, humana, e mulher de muita força, além de grande profissional na área de biologia molecular e também as colegas Thaís Tâmara Castro Minuzzi-Souza e Tamires Emanuele Vital por toda ajuda oferecida.

A Diretoria de Vigilância Ambiental - SES/DF, ao Núcleo de Entomologia e Animais Peçonhentos, aos profissionais e biólogos em especial a Maria do Socorro Laurentino e Lorrainy Bartasson pelo incentivo e apoio. A todos os profissionais do laboratório em especial a Solange pelo auxílio na triagem dos flebotomíneos a melhor equipe de coleta de campo, José Queiroz e Adevaldo pela parceria, amizade, conversas e ajuda durante todo o processo de coleta. Ao Divino dos Santos que permitiu a pesquisa com a técnica de Barraca de Shannon em sua propriedade, garantiu nossa segurança e ajudou nos dias de campo além de ter sido extremamente receptivo. A todos os colegas do órgão um muito obrigado.

Ao Ulysses de Ítaca McGregor Cerqueira Duarte, meu grande parceiro, pelo amor, paciência, pelo apoio e incentivo, pela compreensão nos momentos de privação de tempo em função do curso.

A minha filha Liz de Oliveira Araújo McGregor, que nasceu durante o mestrado, trazendo muita alegria, e que tem me mostrado que posso ser sempre melhor e que tenho forças aonde nunca teria imaginado.

Aos meus irmãos Thiago Oliveira Maniglia e Ana Paula Felipe Soares. Em especial ao Thiago pelas palavras de apoio e momentos de carinho e conforto.

A minha mãe Rosely Cerqueira Oliveira por todo o ensinamento, amor, apoio, incentivo. A minha mãe de criação Ivania Camilo da Costa (in memoriam) que nos deixou logo no início desta caminhada, mas que sempre

estava ao nosso lado. Sem vocês duas não seria a pessoa que sou hoje. Obrigada!

A minha família, em especial a minha tia avó Maria da Paz pelo carinho eterno e minha prima Cynthia Coelho Cortez pelas palavras de incentivo e amor.

Em memória dos meus avós maternos Edith Cerqueira Leite (*in memoriam*) e Orlando Cerqueira Leite (*in memoriam*) e paternos Maristela Coelho (*in memoriam*) e Luís Coelho (*in memoriam*) pilares da família, que ensinaram a importância dos estudos e da fé para uma vida digna.

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal/FAP/DF pelo financiamento deste trabalho.

Aos meus amigos pessoais Ionara Évelin e Aline Candelária e a todos os outros que não citei aqui, mas que sabem o quanto foram importantes para mim ao longo dessa etapa. Vocês são muito importantes!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Distribuição geográfica de casos de Leishmaniose Visceral (LV) em 2015. Fonte: WHO, 2017. Traduzido. 21
- Figura 2. Distribuição geográfica dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em 2015. Fonte: WHO, 2017. Traduzido 24
- Figura 3. Ciclo biológico de parasitos do gênero *Leishmania*. Fonte: CDC. Traduzido. 27
- Figura 4. Localização da área de captura dos flebotomíneos na Região Administrativa da Fercal/DF, pontos de amostragem e armadilha utilizada. 36
- Figura 5. Armadilhas utilizadas. A. Intradomicílio e B. Peridomicílio 37
- Figura 6. Armadilha de Shannon instalada em área de mata para captura de flebotomíneos, na RA da Fercal/DF. 39
- Figura 7. Número total de flebotomíneos capturados em área de mata e área urbana, entre agosto de 2014 e setembro de 2015, na RA da Fercal/DF. 52
- Figura 8. Número total de flebotomíneos capturados em área de mata e área urbana, na RA da Fercal/DF e valores de precipitação (mm) para Brasília/DF. 53
- Figura 9. Número total de flebotomíneos capturados em área de mata e área urbana, na RA da Fercal/DF e valores de temperatura média compensada (°C) para Brasília/DF. 53
- Figura 10. Número total de flebotomíneos capturados em área de mata e área urbana, na RA da Fercal/DF e valores de umidade relativa média para Brasília/DF. 54
- Figura 11. Fotografia do gel de agarose visualizado por luz ultravioleta. 1-R30: Amostras de flebotomíneos. Controles positivos: Lb (*L. braziliensis*) e Lc (*L. infantum*). 55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Lista de espécies capturadas e local de encontro registrado na literatura das espécies da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, coletadas na Região Administrativa da Fercal, DF, Brasil. 45
- Tabela 2. Espécies capturadas segundo sexo e local de captura na Região Administrativa da Fercal, entre agosto de 2014 a setembro de 2015, DF, Brasil. 49
- Tabela 3. Número de flebotomíneos da espécie *Ny. whitmani* e *Lu. longipalpis* conforme por sexo e local de encontro na Unidade Domiciliar, na Fercal/DF. 50
- Tabela 4. Distribuição das diferentes espécies de flebotomíneos capturadas na armadilha de Shannon, em área de mata, na RA da Fercal/DF. 51
- Tabela 5. Valores relacionados ao teste de correlação de Spearman entre abundância total de flebotomíneos e variáveis climáticas, na RA da Fercal/DF. 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APA	Área de Proteção Ambiental
BDMEP	Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa
CIPLAN	Cimento Planalto
DIVAL	Diretoria de Vigilância Ambiental
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs (Trifosfato)	Deoxyribonucleotide Triphosphates – Desoxirribonucleotídeo
FAPDF	Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal
GDF	Governo do Distrito Federal
GEVAZ	Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses
GPS	Global Positioning System
IC	Intervalo de Confiança
ITS-1 Interna 1	Internal Transcribed Spacer- Região Espaçadora Transcrita
KOH	Hidróxido de Potássio
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MS	Ministério da Saúde
NUID	Núcleo de Identificação e Diagnóstico
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde/World Health Organization
PCR	Polymerase chain reaction - Reação da Polimerase em Cadeia
PBS	Phosphate-buffered saline - Tampão Fosfato Salino
RA	Região Administrativa
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAr	RNA ribossômico
SESDF	Secretaria de Estado em Saúde do Distrito Federal

SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SINAN	Sistema Nacional de Agravos de Notificação
SSU	Subunidade Menor
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UD	Unidades Domiciliares
UNB	Universidade de Brasília

FINANCIAMENTO

O estudo foi financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal/ FAPDF, Edital 10/2012 sob processo nº 193.000.177/2013.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	
1.1 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral	20
1.2 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana	23
1.3 Agente etiológico	26
1.4 Vetores	28
1.5 Bioecologia de flebotomíneos	29
1.6 Infecção natural de flebotomíneos por <i>Leishmania sp.</i>	31
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos (s) específicos (s)	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 Área de estudo	35
4.2 Captura de flebotomíneos	35
4.3 Detecção molecular	
4.3.1 Extração de DNA de Flebotomíneos	40
4.3.2 PCR Cacophany	41
4.3.3 PCR dirigida à região espaçadora interna do DNA ribossômico (ITS) 1 de <i>Leishmania</i>	42
4.4 Dados meteorológicos	43
4.5 Análise de dados	43
5. RESULTADOS	44
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÕES	62
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
10. ANEXOS	76

RESUMO

COELHO, Thais O. OCORRÊNCIA E ANÁLISE DA INFECÇÃO NATURAL DE ESPÉCIES DA SUBFAMÍLIA PHLEBOTOMINAE NA FERCAL, DISTRITO FEDERAL, BRASIL/DF. Dissertação (Mestrado em Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

Introdução: Os insetos da subfamília Phlebotominae são vetores de vários protozoários do gênero *Leishmania* que produzem doenças como a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar americana (LTA). A fauna de flebotomíneos do Distrito Federal ainda é pouco conhecida com apenas 35 espécies registradas e as pesquisas sobre infecção natural destes vetores ainda é escassa. A Região Administrativa (RA) da Fercal é uma área situada entre a Bacia do Rio Maranhão e às margens da Área de Proteção Ambiental – APA Cafuringa, com grande potencial eco-turístico que apresenta uma expansão urbana desordenada, sendo considerada área de transmissão intensa para leishmaniose visceral humana e com elevada positividade canina para *Leishmania spp.* *Objetivo e Metodologia:* O presente estudo teve como objetivo identificar as espécies de flebotomíneos, assim como sua relação com as variáveis climáticas e estimar a infecção natural do gênero *Leishmania* nas espécies capturadas. As capturas foram realizadas na RA da Fercal/DF em 15 Unidades Domiciliares (UD) por meio de armadilhas CDC instaladas no intradomicílio e peridomicílio e armadilha de Shannon na área de mata. A análises de infecção natural foram realizada nas espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Nyssomyia whitmani* por meio de PCR. *Resultados:* Foram identificadas um total de 27 espécies com 8 registros novos para o DF, dentre 1883 espécimes capturadas e *Ny. whitmani* foi a espécie predominante. Verificou-se diferença significativa entre a ocorrência de flebotomíneos capturados em área de mata e área urbana, com maior ocorrência nos domicílios ($p < 0,0001$). Com relação a pluviosidade, temperatura e umidade não foram observadas associação com a maior ou menor abundância de flebotomíneos e a avaliação da infecção natural de 194 pools de

flebotomíneos não apresentou resultados positivos. *Conclusões:* Atualiza-se para 43 as espécies de flebotomíneos registradas no Distrito Federal. O período de maior coleta para flebotomíneos ocorreu em agosto a setembro de 2014 e as espécies *Ny. whitmani* e *Lu. longipalpis* foram mais abundantes no peridomicílio. A avaliação da infecção natural apresentou resultados negativos para *Leishmania sp.* Essas informações são de fundamental importância para as ações de vigilância e controle da LV e LTA, no DF.

Palavras-chave: Phlebotominae, Distrito Federal, infecção natural, PCR, Leishmaniose Visceral.

ABSTRACT

COELHO, Thais O. OCCURRENCE AND ANALYSIS OF NATURAL INFECTION OF SPECIES OF PHLEBOTOMINAE SUBFAMILY IN FERCAL, FEDERAL DISTRICT, BRAZIL/DF. Dissertation (Master in Biology in infectious and parasitic diseases) - Graduate Program in Tropical Medicine, University of Brasilia, Brasília, 2017.

Introduction: Insects of the subfamily Phebotominae are vectors of several protozoa of the genus *Leishmania* that produce diseases such as visceral leishmaniasis (LV) and American cutaneous leishmaniasis (ACL). The phlebotomine fauna of the Federal District is still little known with only 35 species registered and the research on natural infection of these vectors is still scarce. The Fercal Administrative Region (RA) is an area located between the Maranhão River Basin and the APA Cafuringa Environmental Protection Area, with great potential for eco-tourism that presents a disorderly urban expansion, being considered an intense transmission area for human visceral leishmaniasis and with high canine positivity for *Leishmania* spp. *Objective and Methodology:* The objective of this study was to identify sandfly species, as well as their relationship with climatic variables and to estimate the natural infection of the genus *Leishmania* in the captured species. The catches were taken at RA of Fercal / DF in 15 Domiciliary Units (UD) by means of CDC traps installed in the intradomicile and peridomicile and trap of Shannon in the forest area. The analyzes of natural infection were carried out in the species *Lutzomyia longipalpis* and *Nyssomyia whitmani* by means of PCR. *Results:* A total of 27 species with 8 new records were identified for DF, among 1883 specimens captured and *Ny. whitmani* was the predominant species. There was a significant difference between the occurrence of sand flies captured in forest and urban areas, with a higher occurrence in the households ($p < 0.0001$). Regarding rainfall, temperature and humidity, no association was observed with greater or less abundance of sand flies, and the evaluation of the natural infection of 194 sand flies did not present positive results.

Conclusions: Up to 43 species of sand flies are recorded in the Federal District. The period of greatest collection for sandflies occurred in August to September 2014 and the species *Ny. whitmani* and *Lu. longipalpis* were more abundant in the peridomicile. The evaluation of the natural infection presented negative results for *Leishmania* sp. This information is of fundamental importance for the actions of surveillance and control of LV and LTA in the DF. Key words: Phlebotominae, Federal District, natural infection, PCR, Visceral Leishmaniasis.

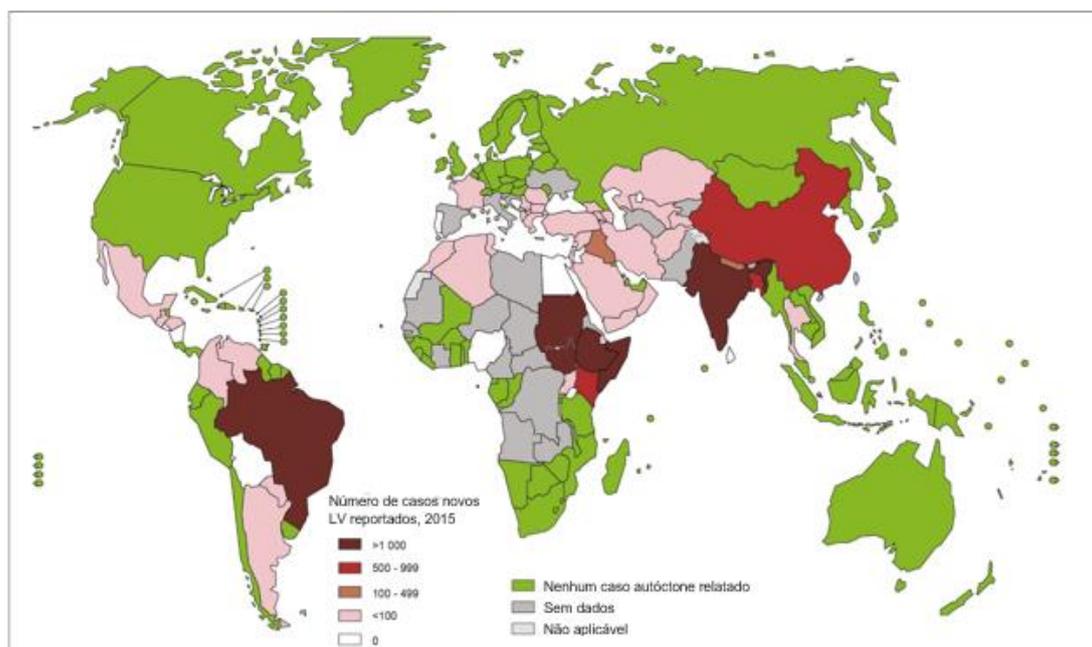
1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Primitivamente, a Leishmaniose Visceral (LV) foi classificada como uma zoonose de natureza eminentemente rural, porém hoje vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte (Brasil, 2014). A transmissão ocorre por meio da picada da fêmea de flebotomíneo por meio da saliva infectada por *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani* (WHO, 2017).

A LV está distribuída em 69 países, em todos os continentes exceto a Oceania, com notificação de 200 a 400 mil novos casos por ano, concentrados na Índia, Nepal, Sudão, Sudão do Sul, Bangladesh, Etiópia e Brasil (WHO, 2017). Ressalta-se que esses valores podem ser maiores devido as subnotificações de casos (WHO, 2014) pois a notificação compulsória ocorre em menos da metade das nações acometidas. Portanto, observa-se a ampla distribuição geográfica da doença, acometendo quase todos os continentes, (WHO, 2017), conforme mostra a Figura 1.

Status de endemicidade da Leishmaniose Visceral no mundo, 2015



Os limites e nomes apresentados e as designações utilizadas neste mapa não implicam a expressão de qualquer opinião por parte da Organização Mundial de Saúde em relação ao estatuto jurídico de qualquer país, território, cidade ou área ou de suas autoridades, ou em relação à delimitação das fronteiras ou limites. As linhas pontilhadas nos mapas representam linhas de borda aproximadas das quais ainda pode não haver acordo total. WHO 2017. Todos os direitos reservados.

Fonte de dados: Organização Mundial de Saúde
Produção de Mapa: Controle de Doenças Tropicais Negligenciadas (NTD)
Organização Mundial da Saúde.



Figura 1. Distribuição geográfica de casos de Leishmaniose Visceral (LV) em 2015. Fonte: WHO, 2017. Traduzido

No Brasil, a LV foi relacionada ao ambiente rural, conforme estudos realizados em Sobral, Estado do Ceará, em 1954-1956, devido a uma grave epidemia. Na época, o raciocínio epidemiológico indicou que os cães e o vetor eram elos da cadeia epidemiológica no ambiente doméstico e com base em um estudo sobre a competência vetorial destes flebotomíneos, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) foi a espécie incriminada como sendo o potencial vetor responsável pela transmissão da doença (Deane & Deane, 1954; Deane & Deane, 1954; Deane, 1956).

De acordo com os dados do SINAN/SVS, entre 1990 a 2016, a distribuição geográfica da LV indicava registros de casos confirmados em 22 das 27 Unidades Federativas do Brasil, com taxa de incidência média anual de aproximadamente 1,8 casos humanos por 100 mil habitantes, predominante na região Nordeste seguida das regiões Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (Brasil, 2017).

Segundo o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (Brasil, 2014), uma avaliação epidemiológica dos últimos 13 anos revelou alterações no perfil de transmissão, originalmente caracterizada como rural (com casos pontuais na periferia de algumas cidades), para um perfil atual relacionado a grandes cidades como Corumbá (Mato Grosso do Sul) e Araçatuba (São Paulo) e algumas capitais, incluindo Campo Grande (Mato Grosso do Sul), Belo Horizonte (MG), Palmas (Tocantins), Teresina (Piauí) e São Luís (Maranhão) (Brasil, 2003).

A ecologia de várias espécies de flebotomíneos tem sido alterada pelas grandes modificações ambientais, ocasionadas pelo homem, tais como desmatamento, construção de rodovias, maior produção de resíduos sólidos sem o destino adequado. Ainda, a elevada migração rural-urbana, o aumento da densidade populacional e a proximidade dos moradores com os animais domésticos são alguns dos fatores que podem facilitar a urbanização da LV (Brasil, 2006). Essas mudanças apresentam influência direta na dinâmica de transmissão e na epidemiologia da doença (Brasil, 2014).

Carranza-Tamayo et al. (2010) descreveram o primeiro caso confirmado de LV autóctone em Brasília diagnosticado, em julho de 2005. No Distrito Federal, de 2007 a 2016, foram confirmados 44 casos humanos de LV, na qual, 30 casos foram registrados, no período de 2009 a 2015 (Brasil, 2017). Por outro lado, os dados da Secretaria de Saúde do DF, em seus boletins epidemiológicos, apontam 28 casos autóctones, entre 2009 a 2015 (Brasília, 2016).

Com a primeira autoctonia de LV no DF, em 2005, a vigilância entomológica foi intensificada e também deu-se início aos inquéritos sorológicos caninos realizados em várias regiões, enfocando a vigilância da LV nos cães.

Ainda, a vigilância entomológica foi implantada para conhecer a distribuição geográfica das espécies de flebotomíneos vetores das leishmanioses e caracterizar áreas de risco para ocorrência destas parasitoses. Os relatórios da DIVAL/SVS/SES-DF mencionam o registro mensal da espécie *Lu. longipalpis*, desde 2005, na Fercal. Porém, no ano de

2013, a partir do levantamento entomológico não foi identificado a presença dessa espécie em Sobradinho II e Fercal, áreas em que esta espécie ocorria anteriormente (Brasília, 2013). Nesse mesmo ano, foi realizado inquérito canino que apontou índice de positividade para *Leishmania spp.* de 7,5% do total de casos caninos pesquisados. Estes resultados sugerem a permanência do ciclo enzoótico da infecção em cães mesmo sem a presença do vetor na Região Administrativa da Fercal e Sobradinho II.

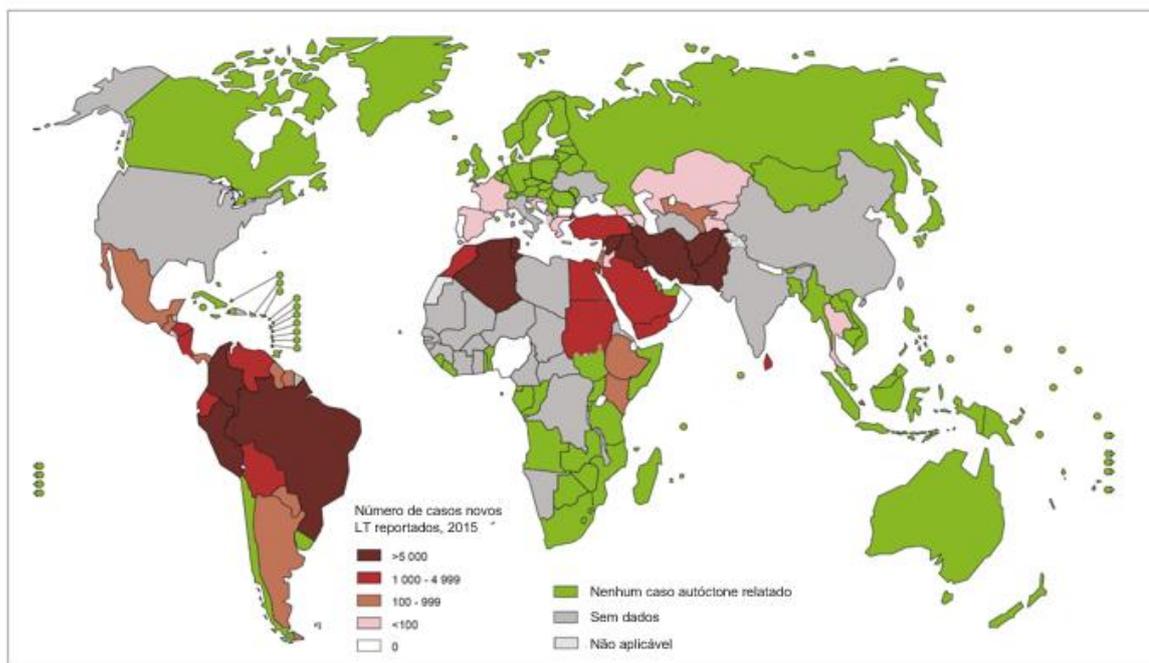
No DF, assim como no Brasil, o controle do *Lu. longipalpis* é uma das principais estratégias empregadas para limitar a propagação da LV, sendo realizado por meio de controle químico em áreas com casos humanos positivos. Dessa forma, a identificação de áreas com potenciais espécies transmissoras torna-se fundamental para aprimorar as ações de prevenção e controle do vetor.

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) assim como a LV é transmitida ao homem pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Existem três formas de manifestação clínica: i) leishmaniose cutânea - caracteriza-se exclusivamente por lesões cutâneas, ulcerosas ou não, porém limitadas, ii) leishmaniose cutâneo-mucosa ou leishmaniose mucocutânea - frequentemente complicam-se com o aparecimento de lesões nas mucosas do nariz, boca e faringe e iii) leishmaniose cutânea difusa – apresentam lesões difusas não ulceradas pela pele (Brasil, 2010).

No mundo, grandes epidemias de LTA ocorrem em diferentes localidades do Afeganistão e da República Árabe da Síria. No ano de 2014 seis regiões foram responsáveis por 90% de novos casos reportados ao WHO, estando o Brasil entre eles (Figura 4), conforme (WHO, 2017).

Status de endemidade da Leishmaniose Tegumentar no mundo, 2015



Os limites e nomes apresentados e as designações utilizadas neste mapa não implicam a expressão de qualquer opinião por parte da Organização Mundial de Saúde em relação ao estatuto jurídico de qualquer país, território, cidade ou área ou de suas autoridades, ou em relação à delimitação das fronteiras ou limites. As linhas pontilhadas nos mapas representam linhas de borda aproximadas das quais ainda pode não haver acordo total. WHO 2017. Todos os direitos reservados.

Fonte de dados: Organização Mundial de Saúde
Produção de Mapa: Controle de Doenças
Tropicais Negligenciadas (NTD)
Organização Mundial da Saúde.



Figura 2. Distribuição geográfica dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em 2015. Fonte: WHO, 2017. Traduzido.

Nas Américas, a leishmaniose cutânea e mucosa ocorre em mais de 18 países, com 46.082 casos registrados. Do total de casos registrados, 70% foram reportados no Brasil (19.395), Colômbia (7.541) e Peru (5.459) (WHO, 2017).

No Brasil, entre 1990 e 2015 foram registrados 675.092 casos de LTA conforme informações do SINAN/SVS/MS. Registram-se nas bases de dados do SINAN/SVS/MS que deste total 2.935 casos ocorreram na Região Centro-Oeste, distribuídos nos estados do Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal. Muito embora exista certa relação entre as distintas apresentações clínicas e diferentes espécies do parasito, cabe ressaltar que a apresentação clínica possui variações no espectro de gravidade dos sinais e sintomas, conforme o Ministério da Saúde (Brasil, 2007).

O controle da LTA demanda compromisso e esforço coletivo entre as várias esferas envolvidas, especialmente dos países em desenvolvimento, onde acontece o maior número de registros de casos.

O primeiro caso autóctone de LTA, no DF, teve registro na década de 1980. Em 1999 foram notificados 11 casos novos (Sampaio et al., 1999) demonstrando a expansão da LTA. Entre 1992 e 2015, foram confirmados 589 casos humanos, sendo que as áreas de maior ocorrência são as Regiões Administrativas de Brazlândia, Fercal, Paranoá, São Sebastião, Sobradinho e Lago Norte (Brasília 2004; Brasília, 2015; Brasília, 2016).

Segundo Informativo Ambiental das Leishmanioses no DF (Brasília, 2013) a maior incidência a LTA, no DF, ocorreu em populações concentradas localizadas em áreas rurais e/ou expansões urbanas, onde a vegetação está mais preservada ou áreas com vegetação residual, além dos locais com a presença de hospedeiros naturais como mamíferos silvestres e sinantrópicos e os vetores da *Leishmania*, especialmente *Ny. whitmani*.

Carvalho et al. (1989) registraram 22 espécies de flebotomíneos capturados em 11 municípios Goianos e no Distrito Federal. Entre 2006 a 2008, um levantamento entomológico realizado durante 24 meses consecutivos, em locais prováveis de infecção (LPI) para LTA, foram identificadas 27 espécies de flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* e *Brumptomyia*, sendo que a espécie mais coletada foi *Ny. whitmani* (Carvalho et al, 2010).

Rapello (2017) estudou a infecção natural por *Leishmania sp* em flebotomíneos capturados no Jardim Botânico de Brasília, Parque Nacional de Brasília, Fazenda Água Limpa e Reserva Biológica da Contagem detectando a presença de 16 espécies de flebotomíneos, no DF, porém sem observar positividade para *Leishmania sp*.

Poucos estudos sobre vetores e reservatórios de LTA foram realizados no DF, porém tem-se estudado muito sobre a evolução dos casos humanos de leishmaniose cutânea e mucocutâneas e as respostas aos seus tratamentos (Sampaio et al., 1999; Nogueira et al., 2001; Name et al., 2005)

1.3 AGENTE ETIOLÓGICO

O agente etiológico responsável pela infecção é um protozoário da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, parasito intracelular obrigatório encontrado nas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado na forma de amastigota e no tubo digestivo do inseto vetor na forma flagelada (promastigota).

Existem duas espécies de *Leishmania* envolvidas na infecção de LV dependendo da região geográfica: *Leishmania (Leishmania) donovani* (Laveran & Mesnil, 1903) na Ásia e *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908) no Velho Mundo e nas Américas.

Para LTA, são reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* que produzem infecções em humanos e 8 espécies descritas, apenas em animais. No Brasil, foram identificadas 7 espécies, sendo 6 do subgênero *Viannia* e 1 do subgênero *Leishmania* (Brasil, 2017).

As espécies de *Leishmania* apresentam ciclos biológicos similares (Laurenti, 2010). Os parasitas do gênero *Leishmania* são digenéticos (heteroxenos) e apresentam em seu ciclo de vida duas formas evolutivas: promastigota e amastigota, a primeira encontrada no sistema digestório de fêmeas de flebotomíneos e segunda dentro de células do sistema fagocitário mononuclear nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (Rey 2002). A forma promastigota apresentam corpo alongado, medindo entre 14 e 20 µm e flagelo livre e extracelular (Pêsoa & Martins, 1982). Ambos amastigotas e promastigotas dividem-se repetidamente por divisão binária (Palmer 1998).

As formas amastigotas são encontradas no hospedeiro vertebrado no interior de vacúolos parasitóforos, em macrófagos e células reticuloendoteliais (Palmer 1998, Jones et al. 2003). Multiplica-se por divisão assexuada até o rompimento da célula e dissemina-se através da via hematogênica e linfática para outros tecidos ricos em células do sistema fagocitário mononuclear (fígado, baço, medula óssea) (Palmer 1998, Basano & Camargo 2004).

No flebotomíneo, as formas variam desde amastigota até a forma promastigota metacíclica. Ao sugar o sangue infectado de algum hospedeiro

vertebrado, o flebotomíneo se infecta pelas formas amastigotas de *Leishmania* em seu citoplasma contidas nos monócitos do sangue ou nos histiócitos da derme (Basano & Camargo 2004). No intestino médio do hospedeiro invertebrado sofrem modificações morfológicas e bioquímicas e se transformam em promastigota que se aderem ao epitélio do tubo digestório e se multiplicam por divisão binária e migram para parte anterior do tubo digestório diferenciando-se em promastigota metacíclicas, sendo encontradas na válvula estomodeal dos flebotomíneos. Ao chegarem no pró-ventrículo obstruem o tubo digestório dificultando a ingestão de sangue, que levam a fêmea a picar diversas vezes e/ou diversos hospedeiros vertebrados, injetando as formas infectantes de *Leishmania*, levando ao desenvolvimento da doença em suas formas clínicas (Figura 3) (Palmer 1998).

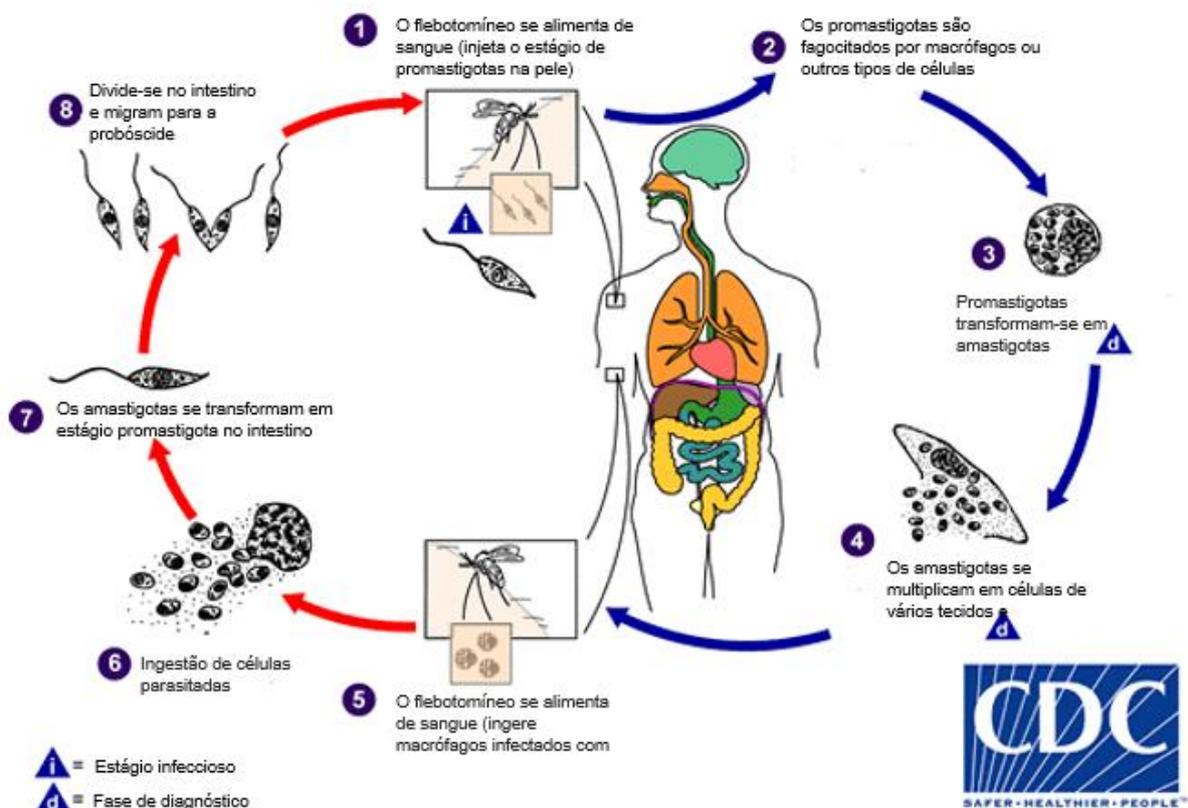


Figura 3. Ciclo biológico de parasitos do gênero *Leishmania*. Fonte: CDC. Traduzido.

1. 4 VETORES

Atualmente, 1003 espécies de flebotomíneos foram descritas no mundo, das quais cerca de 537 ocorrem na região Neotropical, sendo que 277 são registradas no Brasil (Shimabukuro et al., 2017). A maioria das espécies de flebotomíneos da região Neotropical possui habitat em áreas de floresta com índice pluviométrico em torno de 2000 mm por ano, mas estes insetos também podem ser encontrados em áreas semiáridas, com cobertura vegetal arbustiva (Gouveia et al., 2008; Shimabukuro et al., 2017).

Os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são considerados importantes para a saúde pública, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo incriminados como hospedeiros e transmissores de inúmeros outros microorganismos (Ashford, 2001; Birtles, 2001; Shaw et al., 2003; Gouveia et al., 2008), como a *Leishmania* spp., *Bartonella* sp. e arbovírus (Vesiculovirus, Phlebovirus, Orbivirus) (Birtles, 2001; Shaw et al., 2003; Gouveia et al., 2008).

Na classificação mais recente dos flebotomíneos, Galati (2003) divide a subfamília em duas tribos: Hertigiini e Phlebotomini. A tribo Hertigiini apresenta duas subtribos com cerca de 30 espécies não vetoras de protozoários do gênero *Leishmania* em humanos e está classificada em cinco gêneros. Já a tribo Phlebotomini, inclui mais de 970 espécies classificadas em seis subtribos e em 30 gêneros: Phlebotomina, Australophlebotomina, Brumptomyiina, Sergentomyiina, Lutzomyiina e Psychodopygina (Bates et al., 2015; Akhoundi et al., 2016). Entretanto, essa classificação da subfamília ainda não é aceita por todos os taxonomistas, especialmente com relação às espécies neotropicais, sendo que muitos preferem seguir a classificação de Young & Duncan (1994).

Young & Duncan (1994), dividem os flebotomíneos em seis gêneros: *Lutzomyia*, *Brumptomyia*, *Warleyia*, *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius*, os três primeiros encontrados no Novo mundo e os demais no Velho Mundo (Young, 1979). As espécies predominantes no Novo e Velho Mundo

apresentam características biológicas distintas e são do gênero *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, respectivamente (Young & Duncan, 1994; Brasil, 2006).

Segundo Ready (2013) 20 espécies são apontadas como vetores de *Leishmania* entre elas estão: *Lu. longipalpis*, *Lu. cruzi*, *Ny. whitmani*, *Ny. intermedia* e *Bi. flaviscutellata*. Duas espécies de flebotomíneos têm sido relacionadas com a transmissão da LV no Brasil, *Lu. longipalpis*, considerada a principal transmissora de *L. infantum* e *Lu. cruzi*, incriminada como potencial vetor no Mato Grosso do Sul nos municípios de Ladário e Corumbá por Santos et al. (1998).

A espécie *Lu. longipalpis* encontra-se distribuída, desde o sul do México ao norte da Argentina (Silva et al., 2007; Dantas-Torres, 2012). Certamente, *Lu. longipalpis* é a única espécie de flebotomíneo que atende a todos os critérios estabelecidos para capacidade vetorial, tais como antropofilia, distribuição espacial coincidindo com casos humanos da doença e infecção natural por *Leishmania infantum* (Killick-Kendrick, 1990; Lainson & Shaw, 1998; Faucher & Piarroux, 2011).

Segundo Maroli et al. (2013) as espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão de LTA no Brasil são *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia wellcomei*, *Lutzomyia complexa*, *Lutzomyia neivai*, *Lutzomyia fischeri* e *Lutzomyia migonei*.

1.5 BIOECOLOGIA DE FLEBOTOMÍNEOS

Os flebotomíneos são popularmente conhecidos como mosquito "palha", "asa dura" ou "birigui" entre outras denominações. São insetos muito pequenos (1 a 3 milímetros) de cor "dourada", com um par de asas que lhes permitem deslocamento por pequenos saltos (Galati, 2003).

Seu ciclo de vida envolve uma fase de ovo, quatro estádios larvários, seguindo do estágio de pupa e o estágio final de adulto alado, permitindo classificá-los como holometábolos (Lewis, 1974). Os adultos diferem dos demais dípteros psicodídeos, por possuírem corpo mais afilado e pernas mais longas e delgadas.

A respeito dos criadouros naturais desses vetores, são poucas as informações existentes para os flebotomíneos do Novo Mundo (Andrade, 2010), demonstrando que a identificação destes criadouros e das características ambientais são essenciais para desenvolver medidas de controle focadas nas formas imaturas do vetor (Alexander & Maroli, 2003).

As fêmeas e os machos para produzir energia e manter a homeostasia se alimentam de fontes de açúcar (Monteiro, 2012), porém as fêmeas necessitam também de alimentação sanguínea para possibilitar a maturação dos ovos. Cada fêmea adulta de flebotomíneo é capaz de realizar uma postura em média de 28 ovos (Morales et al., 2005), com média de oito dias e meio para eclodirem (Ferro et al., 1998). Conforme Ready (1979), existe uma relação direta entre o número de ovos produzidos e o volume de sangue ingerido. Estudos demonstraram que algumas espécies podem ser ecléticas quanto à fonte do repasto sanguíneo, entretanto outras possuem preferência alimentar restrita a uma espécie de hospedeiro (Ready, 1979; Adler & Theodor, 1957).

O estudo do conteúdo estomacal permite a identificação dos animais domésticos e sinantrópicos dos quais os flebotomíneos se alimentam, indicando os potenciais reservatórios de *Leishmania*, mostrando-se assim de grande significado ecológico (Dias et al., 2003). Contribuindo para a compreensão do papel destes animais hospedeiros na cadeia epidemiológica da doença, técnicas imunológicas e atualmente as técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas na identificação do conteúdo intestinal dos flebotomíneos, acrescentando informações essenciais para o entendimento da epidemiologia e comportamento alimentar destes vetores (Muniz et al, 2006).

A manutenção dos parasitos nos ambientes rurais e urbanos é realizada por reservatórios naturais, sendo que os responsáveis mais importantes são as canídeos, roedores, marsupiais (Brasil, 2006). Os marsupiais são apontados por realizar a transição entre ambientes silvestres e domiciliares (Dias et al., 2003), por meio da interação com os vetores.

De acordo com Muniz et al. (2006), “as ações humanas sobre o meio ambiente atuam na seleção das espécies de flebotomíneos e mamíferos reservatórios de *Leishmania*, permitindo àqueles com maior valência ecológica se adaptarem ao ambiente antrópico. Essas ações parecem favorecer a presença desses insetos e mamíferos no domicílio e peridomicílio, explicando, em parte, a persistência das leishmanioses nesse tipo de ambiente”.

A densidade populacional de flebotomíneos é vulnerável a variação das estações do ano (Tesh, 1988; Oliveira et al., 2003). Em áreas tropicais, a densidade populacional de flebotomíneos aumenta durante ou após períodos chuvosos e uma redução populacional é observada durante longos períodos secos (Tesh, 1988), resultando em um complexo dependente de fatores bióticos, físicos e ambiental (Lewis, 1974).

1.6 INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS POR *Leishmania* sp.

O estudo das taxas de infecção natural dos flebotomíneos por *Leishmania* sp. é tradicionalmente realizado a partir da visualização em microscopia óptica do tubo intestinal do inseto dissecado ou pelo isolamento do parasito in vivo ou in vitro. Estes métodos consomem muito tempo, possuem baixa sensibilidade, diminuindo a precisão dos dados obtidos (Ranasingue et al., 2008), sendo também necessária grande acurácia técnica principalmente devido ao tamanho reduzido dos insetos. Além disso, as fêmeas de flebotomíneos também são hospedeiras de algumas espécies de *Trypanosoma* e *Endotrypanum*, que passam por um estágio de promastigota indistinguível das leishmanias (Pita-Pereira et al., 2005), dificultando o diagnóstico microscópico e o isolamento em cultura (Ranasingue et al., 2008).

Atualmente novas técnicas têm sido utilizadas para detecção e identificação de *Leishmania*, a mais utilizada tem sido a reação em cadeia da polimerase (PCR), por ser mais rápida e mais sensível. No entanto no Brasil, ainda são escassos os estudos realizados para avaliar as taxas de infecção

natural de flebotomíneos, principalmente utilizando estes métodos moleculares (Pita-Pereira et al., 2005), porém nos últimos anos o número de trabalhos publicados com esta finalidade tem crescido.

No Distrito Federal, são poucos os trabalhos utilizando esta técnica e mais restritos na questão de identificação de leishmanias em flebotomíneos. Ferreira et al. (2015) utilizando a PCR, registraram pela primeira vez a presença dos Trypanosomatidae do gênero *Blastocrithidia* em *Ny. whitmani*, em trabalho realizado com flebotomíneos da região administrativa da Fercal. Além disso, esses mesmos autores confirmaram por meio de análises moleculares a associação entre *Trypanosoma sp* e vetor *Evandromyia evandroii*.

O progresso das técnicas de biologia molecular tem aumentado a sensibilidade e especificidade da identificação do parasita (Michalsky et al., 2002), independentemente da abundância do parasito (Cabrera et al., 2002), estágio, local e transmissibilidade (Fu et al., 1998) demonstrando que esta técnica é uma excelente ferramenta para determinar a taxa de infecção natural. Sendo assim pesquisadores tem indicado a PCR como uma metodologia molecular de grande valor significativo para as pesquisas da infecção de *Leishmania sp* em flebotomíneos e reservatórios (Miranda et al., 2002; Silva et al., 2002; Paiva et al., 2006), tendo em vista que as taxas de infecção por *Leishmania* em vetores são geralmente baixas na natureza (Paiva et al., 2006) com médias abaixo de 3% e raramente atingindo 10% quando avaliadas por dissecação ou PCR (Missawa et al., 2010).

2. JUSTIFICATIVA

O estudo da ocorrência de flebotomíneos na Região Administrativa da Fercal é importante considerando a alta prevalência da positividade canina e a baixa densidade do vetor registrada nessa região. Essa região do Distrito Federal registra casos humanos e/ou caninos ano após ano, sendo considerada uma área de transmissão importante e no ano de 2015 foi relatado um caso autóctone de LVH.

Nesse cenário epidemiológico torna-se fundamental o conhecimento das espécies de flebotomíneos e sua abundância, a fim de obter informações a respeito de possíveis espécies vetoras envolvidas na transmissão de LV e LTA, assim como flutuações sazonais destas espécies em relação as variáveis climáticas que podem indicar os momentos de maior ou menor circulação de flebotomíneos. Tais informações servirão para auxiliar na melhor compreensão da epidemiologia e controle das leishmanioses, na RA da Fercal.

Ainda, é de extrema importância a caracterização dos aspectos comportamentais e infecção natural desses flebotomíneos por *Leishmania* spp aumentando a percepção da circulação da doença por meio da detecção das Leishmanias circulantes nas diferentes espécies de flebotomíneos. Portanto, essas informações são importantes para o conhecimento da dinâmica de transmissão da LV e LTA, no DF, em especial na RA da Fercal, a fim de contribuir com as instituições de controle nas tomadas de decisões, principalmente na vigilância entomológica com a observação dos períodos de maior abundância para cada espécie vetora.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar a ocorrência e a infecção natural de espécies da subfamília Phlebotominae em área de transmissão de Leishmaniose Visceral na Região Administrativa da Fercal/DF.

3.2 OBJETIVO (S) ESPECÍFICO (S)

- Identificar a fauna de flebotomíneos existente na Região Administrativa da Fercal/DF e o período de maior infestação;
- Analisar a associação das variáveis climáticas na ocorrência de flebotomíneos na área de estudo;
- Estimar a ocorrência de flebotomíneos em relação ao tipo de armadilha e ambiente intra e peridomiciliar nos locais de captura;
- Avaliar a ocorrência de infecção natural por *Leishmania sp.* das fêmeas de flebotomíneos capturadas na área de estudo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado na XXXI Região Administrativa (RA), denominada de Fercal. Essa RA foi à última a ser criada no Distrito Federal em 2012 e está localizada ao norte do DF, entre Sobradinho e Sobradinho II. As primeiras comunidades da Fercal começaram a surgir há mais de 40 anos, quando foi instalada a fábrica de cimento CIPLAN - Cimento Planalto - na região. Atualmente, registra-se uma população de aproximadamente 30.000 habitantes, distribuídas em 14 comunidades, conhecidas como Rua do Mato, Bananal, Engenho Velho, Alto Bela Vista, Fercal Leste, Fercal Oeste, Boa Vista, Caatingueiro, Ribeirão, Queima Lençol, Lobeiral, P.A. Contagem, Córrego do Ouro e Sonhém de Cima (Codeplan, 2015).

Geograficamente, a Fercal situa-se entre a Bacia do Rio Maranhão e às margens da Área de Proteção Ambiental – APA Cafuringa, possuindo clima tropical de altitude, com duas estações bem definidas: uma seca (de maio a setembro) e outra chuvosa (de outubro a abril). As características do relevo assemelham-se a uma região serrana com áreas preservadas que se caracteriza pelos seus diversos atrativos turísticos, como cachoeiras, “canions” e áreas de florestas densas (cerradão), mas também possui graves problemas ambientais, dentre os quais se destacam a poluição, o desmatamento das áreas de preservação permanente, como as matas de galeria, e a extração irregular de areia (Ibram, 2013). Em maio de 2014 foi publicado documento criando o Refúgio de Vida Silvestre da Mata Seca, localizado na região administrativa da Fercal (Ibram, 2015)

4.2 CAPTURA DE FLEBOTOMÍNEOS

Para a realização das capturas de flebotomíneos foram selecionadas três comunidades, baseadas na maior média de cães positivos do inquérito

canino realizado em 2013 pela equipe de vigilância ambiental do NUID/GEVAZ/DIVAL/SVS/SES-DF. As localidades do Boa Vista, Fercal I e Fercal II foram selecionadas, conforme critério acima, sendo que um total de 15 Unidades Domiciliares (UD) participaram dessa pesquisa (Figura 4).

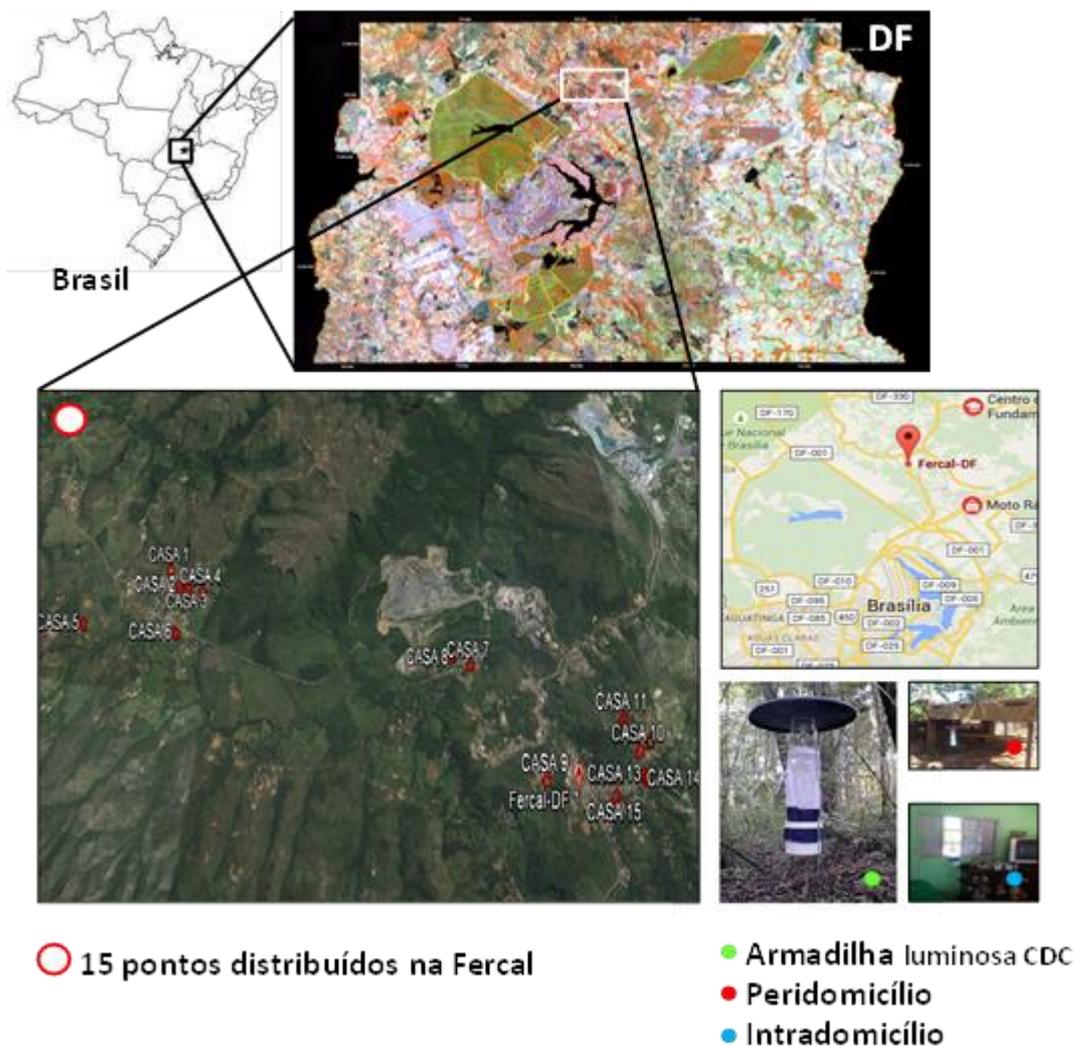


Figura 4. Localização da área de captura dos flebotomíneos na Região Administrativa da Fercal/DF, pontos de amostragem e armadilha utilizada.

Para as participações destas UD foram realizadas visitas em cada domicílio para esclarecer os objetivos da pesquisa acompanhado com uma equipe da Diretoria de Vigilância Ambiental do DF, apresentar o cronograma de captura e solicitar consentimento verbal para realização do trabalho para

cada morador. Caso houvesse desistência do morador durante a pesquisa, a casa mais próxima seria contatada para substituí-la. Foram tomadas as coordenadas geográficas das residências com equipamento GPS e seus respectivos donos foram orientados da importância da pesquisa, sua extensão. As capturas foram realizadas por 3 dias consecutivos, uma vez por mês, durante 14 meses, tendo seu início em agosto de 2014 estendendo-se até setembro de 2015 e o horário de funcionamento das armadilhas foi das 18 horas (crepúsculo) as 8 horas (amanhecer), totalizando cerca de 14 horas de funcionamento diárias, 42 horas por mês e 588 horas ao final da pesquisa. Este trabalho contou com a colaboração e auxílio da Diretoria de Vigilância Ambiental (DIVAL) em todas as suas fases.

Em cada unidade domiciliar foram instaladas duas armadilhas luminosas tipo CDC “miniature light trap” (Vilela et al., 2003), a uma altura do solo de aproximadamente 1,5 m, conectadas a baterias. A primeira armadilha permaneceu no intradomicílio, em local com maior permanência de pessoas, como quartos e salas (Figura 5A), enquanto a segunda armadilha foi instalada no peridomicílio, preferencialmente em abrigos de animais, como canil e galinheiro (Figura 5B).



Figura 5. Armadilhas utilizadas. A. Intradomicílio e B. Peridomicílio

Os potes coletores das armadilhas CDC eram retirados e trocados todos os dias pela manhã com a colaboração da equipe de entomologia da DIVAL.

Durante a retirada dos potes coletores as baterias foram verificadas e se caso estivessem com carga baixa, foram trocadas por novas baterias.

Após a retirada, todos os potes coletores foram transportados ao laboratório de Entomologia da DIVAL para triagem que foi realizada por meio do seguinte processo: i) imobilização dos insetos em freezer a -20°C ainda no pote entomológico, diretamente do campo; ii) transferência dos insetos, utilizando microscópio estereoscópio com auxílio de pinça entomológica e pincel e iii) acondicionamento em tubos de vidro ou acrílico com tampa e identificados com número da casa, local de captura (intra ou peri), dia e mês de coleta. Em seguida, todas as amostras foram acondicionadas em freezer, sendo transportadas até o Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da Universidade de Brasília-Unb.

A técnica de barraca de Shannon (Shannon, 1939) foi realizada uma vez ao mês, durante 14 meses, concomitantemente ao período da captura nas UD, porém em área mais preservada (Figura 6). Cada coleta foi realizada por no mínimo dois pesquisadores, com duração de 4 horas, iniciando-se no crepúsculo e finalizando por volta das 22 horas. Os espécimes capturados foram armazenados em potes entomológicos devidamente identificados e transportados ao Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores – UnB na mesma noite da captura.



Figura 6 – Armadilha de Shannon instalada em área de mata para captura de flebotomíneos, na RA da Fercal/DF.

No Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores foi realizada a separação de machos e fêmeas de todos os flebotomíneos capturados, seguida do processo de clarificação e de limpeza em KOH 10% (Potassa) por no mínimo 12 e no máximo 24 horas — permanecendo em média 16h —, depois lavagem com ácido acético a 10%, substituição por ácido acético a 100% deixando agir por 10 minutos, seguido de uma cadeia de série álcool de 70%, 80% e 95% cada um por 10 minutos e para a última etapa da clarificação a retirada total do álcool e a adição de Eugenol comercial, utilizado como conservante. Em todo o processo os machos foram trabalhados inteiros conforme procedimentos descritos em Forattini (1973) e montados em Bálsamo do Canadá, entre lâmina e lamínula e para as fêmeas foi utilizada apenas a cabeça e a porção final do abdome (últimos 3 tergitos), também montados em Bálsamo do Canadá, utilizando lâmina, lamínula, pinça, estiletos e identificados em microscópio óptico segundo chave dicotômica de Galati (2003, 2016) e Young e Duncan (1994).

As peças dos flebotomíneos não utilizadas para identificação das fêmeas como a porção anterior do abdome foi acondicionada individualmente em eppendorfs estéreis contendo PBS 1X (Tampão Fosfato Salino)

devidamente etiquetados conforme código referente à identificação da espécie e mantidos em freezer para realização de extração de DNA e exame de infecção natural.

4.3 DETECÇÃO MOLECULAR

Para a análise da infecção natural de flebotomíneos foram selecionadas as fêmeas das espécies *Lutzomyia longipalpis*, *Nyssomyia whitmani* agrupadas em pools de no máximo 10 espécimes, separados por mês, tipo de armadilha e mantidos em freezer até a realização da PCR. Devido à alta variação no número de indivíduos coletados a partir do sétimo mês oriundos das unidades domiciliares foram realizados pools de no máximo 10 espécimes, tanto para *Lu. longipalpis*, *Ny. whitmani* reunidos por espécies e separados apenas entre intra e peridomicílio.

4.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA DE FLEBOTOMÍNEOS

Para a detecção da infecção natural em fêmeas de flebotomíneos, cada pool de *Lu. longipalpis* e *Ny. whitmani* foi transferido para um eppendorf estéril de 1,5 mL com 50 µL de PBS 1X, e macerado através por meio das pontas de ponteiros individualizadas, sendo que as mesmas eram queimadas em lamparina e abauladas para facilitar a extração de DNA.

Para a extração de DNA foi utilizado o Kit Illustra™ Tissue and Cells Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare®, Piscataway, NJ, 57 EUA). As amostras permaneceram em proteinase K a 37°C durante a noite, e as etapas seguintes foram realizadas de acordo com as normas recomendadas pelo fabricante (ANEXO A) e conforme Lins (2002). As amostras de DNA extraídas foram quantificadas no NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA). Todas as amostras foram acondicionadas em freezer à -20°C até que as PCRs fossem realizadas.

4.3.2 PCR CACOPHANY

Algumas amostras foram selecionadas para realização da amplificação do gene cacophany a fim de verificar a integridade do DNA dos flebotomíneos, a existência de algum inibidor nas amostras e sua qualidade.

As amostras selecionadas foram dos meses de setembro, outubro, novembro e dezembro de 2014 totalizando 112 pools analisados. A extração do gene cacophany da região IVS6 de flebotomíneos foi realizada a partir de PCR, utilizando os iniciadores: primer forward Llcac 5'-GTGGCCGAACATAATGTTAG-3' e primer reverse Llcac 5'-CCACGAACAAGTTCAACATC-3' (Lins et al., 2002) específicos para esta região. A reação de amplificação foi realizada com volume final de 25 µL: 2,5 µL de tampão de reação 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl; Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), 1 µM de MgCl₂, 0,2 µM de solução de dNTPs (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA); 0,5 µM de cada iniciador, 1,5 U de Invitrogen Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, São Paulo, S.P., Brasil) e 3 µL de DNA das amostras (5 ng/µL). As reações de amplificação dos fragmentos foram realizadas no termociclador MyCycler™ (Bio-Rad, Santo Amaro, S.P., Brasil) com o seguinte programa: um ciclo de desnaturação a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação (95°C por 30 segundos), anelamento (57°C por 30 segundos), extensão (72°C por 30 segundos), extensão final (72°C por 10 minutos) e manutenção (40°C por tempo ∞). O controle positivo (DNA de Phlebotominae) e a amostra em branco (sem DNA) foram incluídos. Os fragmentos amplificados foram separados por intermédio de eletroforese em gel de agarose a 1.3%, corado com 0,5 mg/mL de brometo de etídeo e em tampão TAE (90 mM Tris-acetate, pH 8.0, 25 mM EDTA) e visualizados por meio de Alpha Imager R Mini System (Alpha Innotech, San Leandro, Califórnia, EUA).

4.3.3 PCR DIRIGIDA À REGIÃO ESPAÇADORA INTERNA DO DNA RIBOSSÔMICO (ITS) 1 DE *LEISHMANIA*

As amostras foram submetidas à PCR direcionada a região espaçadora interna do gene de RNAr 1 (RNA ribossomal) (ITS-1) de *Leishmania sp.*, com fragmento que varia entre 302 e 338 pb, utilizando os primers: LITS1 - 5' CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3' e L5.8S - 5' TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3' (El Tai et al., 2000; Tojal et al., 2006).

As reações foram preparadas em um volume final de 25 µL: 2,5 µL de tampão de reação 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl; Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA); 0,75 µL de MgCl₂; 0,2 µL de dNTPs (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA); 0,5 µL de cada iniciador; 0,3 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, S.P., Brasil); 18,25 µL de água (MilliQ) e 0,2 µL de DNA das amostras e processadas no seguinte programa: desnaturação inicial a 95 °C por dois minutos, seguido de 35 repetições de: desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. A extensão final foi a 72 °C por cinco minutos e posterior manutenção a 4 °C. Foram usados como controles positivos amostras de DNA extraídas de cultura de *L. braziliensis* (Lb) e *L. infantum* (Li) e como controles negativos DNA de camundongos não infectados e o Branco.

As reações de todas as PCR ocorreram por meio de termociclador TC-Plus (Techne, Inglaterra, UK) e os produtos de todas as PCRs foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1.3%, corado com 0,5 mg/mL de brometo de etídeo e em tampão TAE (90 mM Tris-acetate, pH 8.0, 25 mM EDTA) e visualizados por Alpha Imager R Mini System (Alpha Innotech, San Leandro, Califórnia, EUA).

O produto dessa PCR foi re-amplificado para aumentar a quantidade de produto amplificado. Um total de 2 µL do produto da primeira PCR foi diluído na proporção de 1:10 e com 2 µL dessa diluição foi feita a segunda PCR, usando os mesmos primers: LITS1 e L5.8S, os mesmos reagentes,

padronização de amplificação nas mesmas condições e os produtos amplificados foram separados também por eletroforese.

4.4 DADOS METEOROLÓGICOS

Os dados meteorológicos como precipitação e umidade relativa média do ar durante o período das coletas foram obtidos do Departamento de Estradas de Rodagem do Distrito Federal – DER/DF e retiradas da Estação: BRASILIA-DF (OMM:83377). As medidas de temperaturas mínimas e máximas foram obtidas no site do Inmet (Inmet, 2017) no Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa (BDMEP) e os dados foram trabalhados pelo programa Excel 2016.

4.5 ANÁLISE DOS DADOS

Foram elaboradas tabelas de contingência das espécies de flebotomíneos por captura nos diferentes locais, intra e peridomicílio e o teste de qui-quadrado foi aplicado a fim de analisar diferenças na ocorrência de flebotomíneos entre locais de captura utilizando o programa Biostat 3.5. Foram também realizados testes de regressão linear e correlação de Spearman entre precipitação, umidade, temperatura e número total de flebotomíneos capturado no estudo, considerando um IC a 95%.

5. RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta a lista de espécies coletadas nas UD e em área de mata, na qual foi de 27 espécies. Um total de 24 espécies foram encontradas no domicílio e 15 em área de mata, com 12 comuns aos dois ambientes. As espécies *Psathyromyia abonnenci*, *Pintomyia monticula* e *Pintomyia misionensis* foram capturadas exclusivamente em área de mata. A Tabela 2 mostra a distribuição do número de espécimes coletado segundo o ambiente intra e peridomiciliar, sendo o maior número de indivíduos capturados pertencente a espécie *Ny. whitmani*, seguida de *Lutzomyia longipalpis* e *Micropygomyia acanthopharynx*. Alguns flebotomíneos foram identificados apenas em nível de gênero, não sendo possível identificar a espécie, como no caso alguns exemplares determinados apenas como *Lutzomyia sp.*, *Pintomyia sp.* e *Pressatia sp.* Além disso, alguns exemplares apresentaram danos provenientes da retirada das armadilhas ou genitália danificada ao proceder a montagem em lâmina, lamínula e Bálsamo do Canadá.

Tabela 1. Lista de espécies capturadas e local de encontro registrado na literatura das espécies da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, coletadas na Região Administrativa da Fercal, DF, Brasil.

Sub-Tribo	Gênero	Espécie	Habitat**
Brumptomyiina (Artemiev, 1991)	<i>Brumptomyia</i> (França and Parrot, 1921)	<i>Brumptomyia brumpti</i> (Larrousse, 1920)	Peridomicílio e Silvestre
		<i>Brumptomyia cunhai</i> (Mangabeira, 1942)*	Silvestre
Sergentomyiina (Artemiev, 1991)	<i>Micropygomyia</i> (Barretto, 1962)	<i>Micropygomyia (Silvamyia) acanthopharynx</i> (Martins, Falcão & Silva, 1962)	Silvestre
		<i>Micropygomyia (Sauromyia) rorotaensis</i> (Floch & Abonnenc, 1944)*	Silvestre
Lutzomyiina (Abonnenc e Léger, 1976)	<i>Evandromyia</i> (Mangabeira, 1941)	<i>Evandromyia bacula</i> (Martins, Falcão & Silva, 1965)	Silvestre
		<i>Evandromyia (Aldamyia) carmelinoi</i> (Ryan, Fraiha, Lainson & Shaw, 1986)*	Silvestre
		<i>Evandromyia (Barrettomyia) cortelezii</i> (Brèthes, 1923)*	Intradomicílio, Peridomicílio, Silvestre

	<i>Evandromyia (Aldamyia) evandroi</i> (Costa Lima & Antunes, 1936)	Intradomicílio, Peridomicílio, Silvestre
	<i>Evandromyia (Aldamyia) lenti</i> (Mangabeira, 1938)	Intradomicílio, Peridomicílio, Silvestre
	<i>Evandromyia (Barrettomyia) sallesi</i> (Galvão & Coutinho, 1939)	Intradomicílio, Peridomicílio, Silvestre
	<i>Evandromyia (Barrettomyia) teratodes</i> (Martins, Falcão & Silva, 1964)	Silvestre
	<i>Evandromyia (Aldamyia) termitophila</i> (Martins, Falcão & Silva, 1964)*	Peridomicílio e Silvestre
	<i>Evandromyia (Aldamyia) walkeri</i> (Newstead, 1914)*	Silvestre
<i>Sciopemyia</i> (Barretto, 1962)	<i>Sciopemyia sordellii</i> (Shannon & Del Ponte, 1927)	Intradomicílio, Peridomicílio, Silvestre
<i>Lutzomyia</i> (França, 1924)	<i>Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis</i> (Lutz & Neiva, 1912)	Intradomicílio, Peridomicílio, Silvestre
<i>Pintomyia</i> Costa Lima, 1932	<i>Pintomyia (Pintomyia) christenseni</i> (Young & Duncan, 1994)	Silvestre

		<i>Pintomyia monticola</i> (Costa Lima, 1932)*	Silvestre
		<i>Pintomyia misionensis</i> (Castro, 1939)*	Silvestre
	<i>Pressatia</i> Mangabeira, 1942	<i>Pressatia</i> sp.	Peridomicílio e Silvestre
Psychodopygina (Galati, 1995)	<i>Psathyromyia</i> Barretto, 1962	<i>Psathyromyia (Forattiniella) aragaoi</i> (Costa Lima, 1932)	Silvestre
		<i>Psathyromyia (Psathyromyia) bigeniculata</i> (Floch & Abonnenc, 1941)	Peridomicílio e Silvestre
	<i>Psathyromyia</i> Barretto, 1962	<i>Psathyromyia (Forattiniella) brasiliensis</i> (Costa Lima, 1932)	Silvestre
	<i>Psathyromyia</i> Barretto, 1962	<i>Psathyromyia (Forattiniella) campograndensis</i> (Oliveira, Andrade-Filho, Falcão & Brazil, 2001)*	Peridomicílio e Silvestre
	<i>Psathyromyia</i> Barretto, 1962	<i>Psathyromyia (Forattiniella) lutziana</i> (Costa Lima, 1932)	Silvestre
	<i>Psathyromyia</i> Barretto, 1962	<i>Psathyromyia abonnensi</i>	Silvestre

<i>Psychodopygus</i> Mangabeira, 1941	<i>Psychodopygus davisii</i> (Root, 1934)	Silvestre
<i>Nyssomyia</i> Barretto, 1962	<i>Nyssomyia whitmani</i> (Antunes & Coutinho, 1939)	Intradomicílio, Peridomicílio, Silvestre

* Espécies pela primeira vez relatadas no DF. **De acordo ambientes coletados.

Tabela 2. Espécies capturadas segundo sexo e local de captura na Região Administrativa da Fercal, entre agosto de 2014 a setembro de 2015, DF, Brasil.

Espécie	Unidade domiciliar				Total	%
	Intradomicílio		Peridomicílio			
	F	M	F	M		
<i>Brumptomyia sp.</i>	0	0	1	0	1	0,1%
<i>Brumptomyia brumpti</i>	0	0	0	2	2	0,1%
<i>Brumptomyia cunhai</i>	0	0	0	2	2	0,1%
<i>Evandromyia lenti</i>	0	5	23	40	68	4,8%
<i>Evandromyia sallesi</i>	6	0	20	10	36	2,5%
<i>Evandromyia termithophila</i>	1	0	5	1	7	0,5%
<i>Evandromyia bacula</i>	0	0	1	0	1	0,1%
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	2	0	17	1	20	1,4%
<i>Evandromyia cortellezzi</i>	0	0	0	2	2	0,1%
<i>Evandromyia evandroii</i>	1		3	3	7	0,5%
<i>Evandromyia teratodes</i>	0	0	2	0	2	0,1%
<i>Evandromyia walkeri</i>	0	0	1	0	1	0,1%
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	6	13	15	82	116	8,2%
<i>Micropygomyia acanthopharynx</i>	26	1	26	2	55	3,9%
<i>Micropygomyia rorotaensis</i>	0	0	1	0	1	0,1%
<i>Micropygomyia sp.</i>	0	0	1	0	1	0,1%
<i>Nyssomyia whitmani</i>	97	24	484	382	987	69,8%
<i>Pintomyia christenseni</i>	1	0	1	0	2	0,1%
<i>Pintomyia sp.</i>	0	0	1	0	1	0,1%
<i>Pressatia sp.</i>	0	0	1	0	1	0,1%
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	0	0	2	17	19	1,2%
<i>Psathyromyia bigenicullata</i>	0	0	7	5	12	0,8%
<i>Psathyromyia brasiliensis</i>	0	0	1	1	2	0,1%
<i>Psathyromyia campograndensis</i>	1	0	11	0	12	0,8%
<i>Psathyromyia lutziana</i>	1	1	9	2	13	0,9%
<i>Psathyromyia sp.</i>	0	0	2	0	2	0,1%
<i>Psychodopygus davisii</i>	2	0	19	0	21	1,5%
<i>Sciopemyia sordellii</i>	2	0	5	2	9	0,6%
<i>Lutzomyia sp.</i>	2	1	5	3	11	0,8%
TOTAL	148	45	664	557	1414	100,0%

Foi detectada maior abundância de exemplares de *Ny. whitmani* e *Lu. longipalpis* no peridomicílio. Ainda, percebe-se maior número de fêmeas no intradomicílio de *Ny. whitmani* comparado às fêmeas de *Lu. longipalpis*. O número de fêmeas das duas espécies capturados no intra e peridomicílio apresentou diferença estatisticamente significativa pelo teste de qui-quadrado ($p < 0.0001$), assim como o número de machos das duas espécies capturados no intra e no peridomicílio ($p < 0.0001$), e o total ($p < 0.0001$), como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Número de flebotomíneos da espécie *Ny. whitmani* e *Lu. longipalpis* conforme por sexo e local de encontro na Unidade Domiciliar, na Fercal/DF.

<i>Ny. whitmani</i>	Fêmeas	Machos	TOTAL	%
Intradomicílio	97	24	121	10,9
Peridomicílio	484	382	866	78,5
<i>Lu. longipalpis</i>				
Intradomicílio	6	13	19	1,72
Peridomicílio	15	82	97	8,79
TOTAL	602	501	1103	100
				%

Na Tabela 4 apresenta a lista das espécies capturadas em área de mata com armadilha de Shannon. Percebe-se o grande número de indivíduos de *Ny. whitmani* capturados, em relação as outras espécies. A espécie de flebotomíneo *Psychodopygus davisii* também apresentou maior ocorrência na armadilha de Shannon e houve maior número de fêmeas capturadas em comparação com os machos dessa mesma espécie.

Tabela 4. Distribuição das diferentes espécies de flebotomíneos capturadas na armadilha de Shannon, em área de mata, na RA da Fercal/DF.

Espécie	Machos	Fêmeas	Total
<i>Evandromyia bacula</i>	0	1	1
<i>Evandromyia lenti</i>	2	1	3
<i>Evandromyia teratodes</i>	0	4	4
<i>Evandromyia termitophila</i>	0	1	1
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	0	1	1
<i>Luztomyia longipalpis</i>	2	4	6
<i>Micropygomyia acanthopharynx</i>	0	1	1
<i>Nyssomyia whitmani</i>	10	404	414
<i>Psathyromyia abonnensi</i>	1	0	1
<i>Psathyromyia bigenicullata</i>	0	2	2
<i>Psathyromyia campograndensis</i>	0	1	1
<i>Pintomyia monticola</i>	0	1	1
<i>Pintomyia misionensis</i>	0	1	1
<i>Sciopemyia sordellii</i>	0	1	1
<i>Psychodopygus davisii</i>	2	29	31
TOTAL	17	452	469

Verificou-se diferença entre a ocorrência de flebotomíneos capturados em área de mata (armadilha de Shannon) e nas unidades domiciliares (CDCs) (Figura 7), sendo a maior ocorrência nos domicílios ($p < 0,0001$).

No primeiro semestre de avaliação (agosto de 2014 a fevereiro de 2015) houve maior captura dos flebotomíneos nos domicílios e logo no segundo semestre essa população houve uma diminuição no número de capturas. Logo, registrou-se um aumento da captura dos flebotomíneos na área de mata (Figura 7).

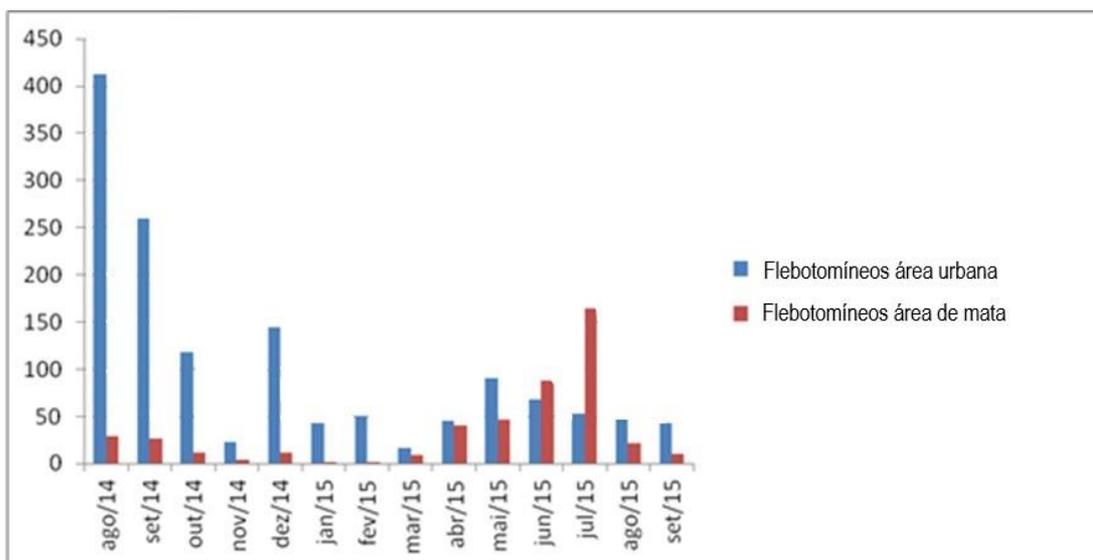


Figura 7. Número total de flebotomíneos capturados em área de mata e nas áreas urbanas, entre agosto de 2014 e setembro de 2015, na RA da Fercal/DF.

Não foi detectada nenhuma associação estatisticamente significativa entre a precipitação, umidade, temperatura média, temperatura mínima e temperatura máxima e o número de flebotomíneos. As Figuras 8, 9 e 10 demonstram as curvas destas variáveis climáticas, em relação a abundância de flebotomíneos capturados.

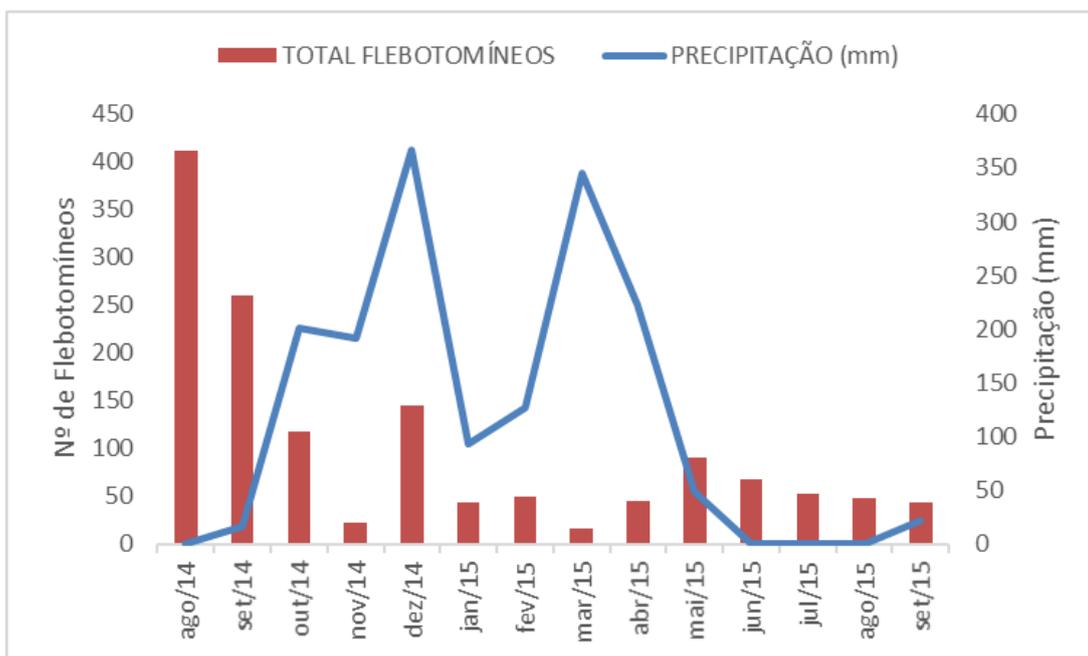


Figura 8. Número total de flebotomíneos capturados em área de mata e nas urbanas, na RA da Fercal/DF e valores de precipitação (mm) para Brasília/DF.

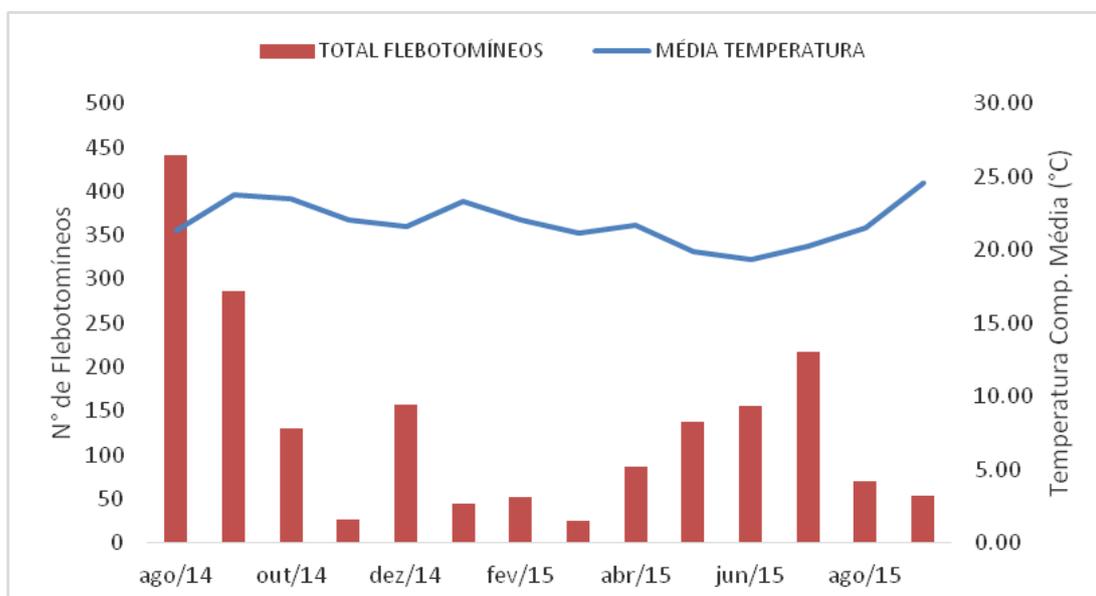


Figura 9. Número total de flebotomíneos capturados nas áreas de mata e nas áreas urbanas, na RA da Fercal/DF e valores de temperatura media compensada (°C) para Brasília/DF.

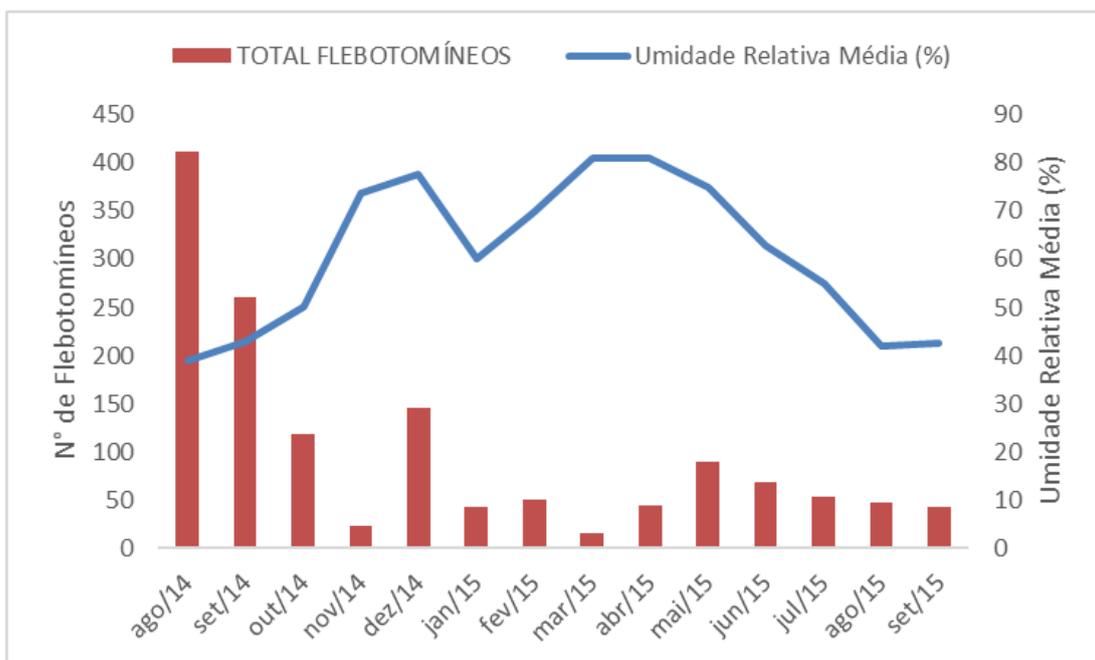


Figura 10. Número total de flebotomíneos capturados nas áreas de mata e nas áreas urbanas, na RA da Fercal/DF e valores de umidade relativa média para Brasília/ DF.

Ao realizar a análise de correlação de Spearman para verificar se ocorria uma inversão da abundância dessas populações, ao longo do período estudado, o teste não mostrou significância com IC 95% ($\rho=0.5$, $p=0.0661$).

Tabela 5. Valores relacionados ao teste de correlação de Spearman entre abundância total de flebotomíneos e variáveis climáticas, na RA da Fercal/DF.

	Precipitação	Temperatura média	Temperatura mínima	Temperatura máxima	Umidade
Coefficiente de Spearman (rho)	-0.4525	-0.2396	-0.3934	0.055	-0.5044
t =	-1.758	-0.8548	-1.4823	0.1908	-2.0236
(p)=	0.1041	0.4094	0.164	0.8518	0.0658
Número de pares =	14	14	14	14	14

AValiação de infecção natural por *Leishmania* sp

Na primeira etapa do trabalho, compreendida pelos meses de setembro a dezembro de 2014, foi extraído o DNA de 112 amostras de 422 fêmeas de *Ny. whitmani* e *Lu. longipalpis*. Para os demais meses, foram extraídos DNA de 82 amostras de 644 fêmeas de *Ny. whitmani* e *Lu. longipalpis*. O gel não revelou bandas compatíveis com amostras de *Leishmania* usadas no controle (Figura 11).

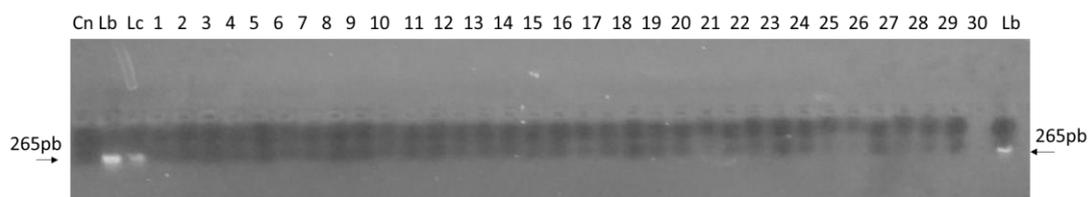


Figura 11. Fotografia do gel de agarose visualizado por luz ultravioleta. 1-R30: Amostras de flebotomíneos. Controles positivos: Lb (*L. braziliensis*) e Lc (*L. infantum*).

6. DISCUSSÃO

A Região Administrativa da Fercal é um local turístico do DF, com presença de montanhas, cachoeiras, domicílios periurbanos, urbanos e chácaras mais próximas ao meio silvestre, onde existe a presença de casos humanos de LV e caninos de *Leishmania* sp. notificados (Brasília, 2013). Este estudo revela a periodicidade de flebotomíneos associados a domicílios com casos caninos confirmados para LV, além de variáveis climáticas e um estudo da ecologia das principais espécies da área urbana da região.

A diversidade da fauna flebotomínica foi amostrada, com 27 espécies da área de mata, peridomiciliares e da área urbana na região, sendo 8 registros inéditos para o DF, as quais pertencem as seguintes espécies: *Brumptomyia cunhai*, *Evandromiyia termithophila*, *Evandromyia carmelinoi*, *Evandromyia cortellezzi*, *Evandromyia walkeri*, *Micropygomyia rorotaensis*, *Psathyromyia campograndensis* e *Pintomyia misionensis*. Todas ocorreram em área urbana, exceto *Pintomyia misionensis*, que foi coletada apenas em área de mata. A espécie *Psathyromyia campograndensis* foi encontrada tanto no área urbana como em área de mata.

Ao somar as espécies da lista registrada no presente trabalho com as registradas por Rapello (2017) totaliza-se 43 registros para o DF. *Micropygomyia rorotaensis* tem sido encontrada em áreas perirurais (Vilela et al., 2013), apesar de ser uma espécie de hábitos silvestres, assim como as espécies de *Brumptomyia* spp. *Evandromiyia evandroi* é uma espécie comumente encontrada em ambientes modificados, estando presente no peridomicílio (Donalísio et al., 2012). *Pa. abonnenci*, *Pa. bigeniculata*, *Pintomyia monticola*, e *Sciopemyia sordelli* são espécies até no momento sendo consideradas exclusivamente silvestres (Rangel e Lainson, 2003), porém neste trabalho as espécies *Pa. abonnenci*, *Pa. bigenicullata* foram encontradas no peridomicílio das UD e a espécie *Sciopemyia sordellii* foi capturada no intra e peridomicílio.

Chama a atenção à diferença da entomofauna de flebotomíneos comparada ao estudo Rapello (2017), onde foram registradas 10 espécies de flebotomíneos em comum e em reservas da mesma região (Reserva Biológica de Contagem e Parque Nacional de Brasília) em comparação à do presente trabalho que também obteve amostragem próxima de matas de galeria. A vegetação da Fercal também se mostra pertencente ao bioma do Cerrado, com presença de matas de galeria e bruscas transições que revelam formações savânicas e campestres (Ribeiro & Walter, 2008).

A fauna de flebotomíneos da Fercal revelou 17 espécies com somente cinco sendo compartilhadas ao trabalho prévio no DF: *Pa. abonnenci*, *Pa. bigeniculata*, *Pintomyia monticula*, *Ny whitmani* e *Sciopemyia sordelli*. Essa observação abre uma lacuna na ecologia de paisagem, associada a composição de fauna de flebotomíneos no local, onde certos fatores ambientais, como o processo de urbanização desorganizado da Fercal que avança sobre vegetação natural podem influenciar na diferença de fauna de flebotomíneos dessa região.

Nesse estudo, a razão sexual (fêmeas/machos) da totalidade de flebotomíneos capturados pela armadilha CDC foi de 1,34:1 não mostrando diferença significativa na proporção entre fêmeas e machos. Rodrigues et al. (2013) utilizando armadilhas tipo HP modificada encontraram resultados semelhantes em estudo realizado no Parque Estadual do Tiririca, estado do Rio de Janeiro, entre maio de 2010 a maio de 2011, onde a razão sexual encontrada foi de 1,13:1 (machos/ fêmeas), ou seja, também sem diferenças significativas.

A armadilha de Shannon apresentou maior proporção de fêmeas com uma razão de (26:1). Tal fato, pode ser explicado devido as fêmeas serem atraídas por odores, substâncias (CO₂, ácido láctico, feromônios) e temperatura do hospedeiro que encontra-se em atividade, durante o funcionamento da armadilha (Alexander, 2000).

O presente estudo detectou duas espécies de importância médica na transmissão das leishmanioses, sendo a primeira *Lu. longipalpis* e segunda *Ny. whitmani*. Vexenat (1991), estudando a fauna flebotomínica encontrou a

espécie *Ny. whitmani* largamente distribuída em diversas áreas do DF, assim como no trabalho realizado por Sampaio et al. (2009), onde *Ny. whitmani*, representou 98,9% dos espécimes capturadas nas Regiões Administrativas de São Sebastião, Gama e Planaltina do DF. Bastos et al. (2016), em área urbana situada no noroeste do estado de Goiás verificaram a predominância de *Ny. whitmani* (71,6%), sobre outras espécies de flebotomíneos, tais como *Lutzomyia longipalpis* (17,5%), *Evandromyia lenti* (7,3%) e *Nyssomyia intermedia* (1,8%).

Ny. whitmani também foi detectada, tanto no intra quanto no peridomicílio, entre julho e agosto, em maior abundância, no município de Águas de Miranda/MS, em área com predominância de vegetação de cerrado, conforme resultados de Brilhante et al. (2015), corroborando com os dados obtidos neste trabalho. Outros trabalhos (Galati et al., 1996; Souza et al., 2002) também relatam o encontro dessa espécie em maior quantidade, nesse mesmo período.

Almeida (2015) também observou que *Ny. whitmani* foi a espécie com maior ocorrência e distribuição geográfica no Centro Oeste do Brasil, quando analisou os dados de ocorrência das espécies de flebotomíneos entre os anos de 1996 a 2014, obtidos por meio do serviço de entomologia de Secretarias Estaduais de Saúde (MT, MS, GO e DF), além de dados de ocorrência de espécies da literatura e registros de coleções científicas do sistema Species Link e Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).

A região da Fercal trata-se de uma área que se encontra em processo de urbanização, sendo que a maioria das residências apresentam proximidade com as matas e possuem galinheiros e/ou canil com presença de *Ny. whitmani*, tanto no intra quanto no peridomicílio, levantando a possibilidade dessa espécie estar em processo de adaptação ao ambiente antrópico, como verificado por Oliveira et al. (2003), Azevedo et al. (1996), Azevedo & Rangel (1991) e Forattini (1960).

A observação do comportamento na captura no intradomicílio de *Ny. whitmani* deve ser levada em consideração, assim como sua antropofilia e seu envolvimento na transmissão de LTA (Galati et al. 1996; Lainson & Shaw 2005) pela sua grande importância epidemiológica como principal vetor de *L. braziliensis* em diversas regiões do país, mas também por estar associado à transmissão de *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Viannia) shawi* (Lainson et al., 1989).

Por outro lado, a espécie *Lu. longipalpis* mostra-se com comportamento inverso, sendo capturada em maior número na época úmida e chuvosa, entre novembro a março, conforme observado por Rebêlo (2001) na região Nordeste e por Nunes et al. (2008) no município de Bonito, na região de Mato Grosso do Sul. Neste estudo registra-se o pequeno número de exemplares de *Lu. longipalpis*, corroborando com o trabalho de Oliveira et al. (2003), que utilizou armadilhas de tipo CDC com coletas semanais em vários ecótopos na cidade de Campo Grande, tendo sugerido que o ano da coleta foi atípico com período de seca prolongado afetando a densidade de *Lu. longipalpis* que apresentou pico no mês de janeiro, logo após os meses de chuva.

Os resultados encontrados por Almeida (2015) verificaram a predominância de *Lu. longipalpis* em Campo Grande, Mato Grosso do Sul em ambiente antrópico. Andrade et al. (2009), Nunes et al. (2008) e Oliveira et al. (2006) demonstraram que *Lu. Longipalpis* foi encontrado em ambientes antrópicos com criação de animais, onde a LV canina e humana ocorrem.

No presente estudo, a espécie *Lu. longipalpis* foi registrada em baixa densidade, na Fercal/DF, levantando-se a suspeita de que outra possível espécie vetora de *Leishmania* poderia estar envolvida na transmissão de LV, nesse caso *Ny. whitmani*. Conforme estudos de Verlindo et al. (2011) em Belo Horizonte/MG e Saraiva et al. (2010) também realizado em Belo Horizonte/MG, *Ny. whitmani* foi encontrada naturalmente infectada por *L. infantum* demonstrando a potencialidade do vetor.

Várias outras espécies encontradas nesse estudo também já foram detectadas em outros estados brasileiros infectadas por *Leishmania*. Carvalho et al. (2008) e Andrade et al. (2011), descreveram *Evandromyia cortelezzii* naturalmente infectadas por *L. infantum*, em Santa Luzia/MG e Ponta Porã/MS, respectivamente. *Evandromyia termithophila* também foi descrita infectada pela mesma *Leishmania* (Saraiva et al. 2010).

As espécies de flebotomíneos *Ev. cortelezzii* e *Ev. lenti* foram encontradas infectadas por *L. braziliensis* em Belo Horizonte e Divinópolis/MG (Saraiva et al. 2010 Margonari et al. 2010). Essa mesma *Leishmania* também foi detectada em *Pa. aragaoi* em Mato Grosso do Sul (Oliveira et al. 2003 e Paiva et al 2010). Leite (2016) registrou pela primeira vez a presença de *L. amazonensis* nas espécies *Ev. lenti*, *Ev. teratodes* e *Sc. sordellii*.

Apesar do encontro das espécies de flebotomíneos mencionadas acima, na Região Administrativa da Fercal, os resultados de infecção natural por meio de biologia molecular apresentaram-se negativos para *Leishmania* sp. Os resultados negativos para infecção natural por *Leishmania* sp deste trabalho corroboram com os resultados de Rapello (2017), Figueiredo et al. (2016), Ferreira et al. (2015), Pérez et al. (2014) e Neitzke et al. (2008) reforçando a dificuldade de identificação de flebotomíneos naturalmente infectados. Mesmo tendo uma maior sensibilidade com a utilização da técnica de PCR, vários fatores podem influenciar os resultados dentre eles o alvo, as condições da PCR, o tipo e as condições da amostra de DNA (Pita-Pereira et al. 2005).

Frequentemente são encontradas taxas de infecção natural menores que 1% em flebotomíneos de áreas endêmicas divergindo dos altos índices da doença nessas regiões (Rodriguez et al. 1999; Luz et al. 2000). As taxas médias de infecção natural mais comumente encontradas em flebotomíneos permanecem menores que 3% podendo chegar raramente a 10% (Missawa, 2010). Alguns trabalhos encontraram taxas de infecção natural consideradas “altas” como 3,9% em *Lu. longipalpis* por *L. infantum* no Estado de Minas

Gerais (Michalsky *et al.* 2011) e 2,6% também para *L. infantum* em *L. longipalpis* na região de Mato Grosso do Sul (Nascimento *et al.*, 2007).

Independentemente do resultado negativo para infecção natural das espécies capturadas, observa-se transmissibilidade de *Leishmania sp*, na qual pode ser verificado por meio da soropositividade canina, presença constante e frequente de *Lu. longipalpis*, condições ambientais favoráveis e registro de casos humanos já ocorridos na região que podem manter o ciclo de transmissão de *Leishmania* nesta região do DF.

Finalmente, o presente estudo atualizou e ampliou o conhecimento das espécies registradas no Distrito Federal, o que poderá auxiliar tanto no conhecimento sobre o comportamento das mesmas, quanto nas estratégias de vigilância e controle das Leishmanioses, especialmente para a área estudada, tendo sido observadas algumas alterações na predominância de espécies durante tempos de frio e seca como para espécies que são mais frequentemente encontradas nos períodos após as chuvas.

7. CONCLUSÕES

- Nessa pesquisa foram capturadas 27 espécies de flebotomíneos, sendo o maior número de exemplares capturados pertencente a espécie *Ny. whitmani*, seguida de *Lu. longipalpis* e *Mi. acanthopharynx*, sendo 8 espécies inéditas para o DF;
- Foram capturadas maior número de flebotomíneos nas armadilhas CDC, em relação a armadilha de Shannon, sendo que as espécies *Ny. whitmani* e *Lu. longipalpis* foram mais abundantes no peridomicílio. Ainda, observa-se maior ocorrência fêmeas de *Ny. whitmani* no intradomicílio, em relação às fêmeas de *Lu. longipalpis*.
- O período de maior coleta para flebotomíneos ocorreu em agosto a setembro de 2014 e as variáveis climáticas pluviosidade, umidade, temperaturas mínimas e máximas não foram estatisticamente significativas em relação a número flebotomíneos capturados;
- Não foram encontrados flebotomíneos infectados por *Leishmania* sp. durante o período de agosto de 2014 a setembro de 2015 por meio das análises moleculares (PCR).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A RA da Fercal trata-se de uma área composta por áreas urbanas, periurbanas e chácaras muito próximas a matas de galeria, as quais possuem uma vasta fauna flebotomínica. O encontro de espécies silvestres de flebotomíneos nas regiões periurbanas, levanta a possibilidade de que as alterações ambientais tem sido um fator importante no processo adaptativo de “urbanização” de algumas espécies de flebotomíneos.

Essa presença de *Ny. whitmani* no intra e peridomicílio pode ser um indicativo de que haja a ocorrência de transmissão de LTA na região da Fercal, também, em área urbana. Além disso, observar a potencialidade para que este seja vetor de outros tipos de Leishmanias na região da Fercal/DF.

A espécie de flebotomíneos *Evandromyia lenti* deve ser melhor estudada, em relação ao seu papel na dinâmica de transmissão de protozoários do gênero *Leishmania*, tendo em vista que foi registrada sua ocorrência em ambiente intradomiciliar em quantidade que merece atenção por parte dos órgãos de controle. Destaca-se a necessidade de pesquisas futuras, a fim de caracterizar a sazonalidade das espécies de flebotomíneos na área de estudo.

Outros métodos moleculares como a técnica de PCR direcionada ao gene *Cacophany*, a técnica de PCR dirigida ao gene *SSU rDNA* de tripanossomatídeos e também métodos mais modernos podem ser utilizados para detectar espécies *Leishmania* e outros *Trypanosomatídeos* de importância epidemiológica, a fim de estimar possíveis relações entre flebotomíneos naturalmente infectados com as *Leishmanias*.

Portanto, o monitoramento periódico e sistemático das espécies de flebotomíneos, assim como a identificação molecular da infecção destes flebotomíneos podem auxiliar as medidas de prevenção e controle de casos de LTA e LV no DF.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler S, Theodor O. **Transmission of disease agents by phlebotomine sandflies.** Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 2, p. 203-226, 1957

Alexander B. **Sampling methods for phlebotomine sandflies.** Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v.14, n. 2, p. 109-122, 2000.

Alexander B, Maroli M. **Control of phlebotomine sandflies.** Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 17, n. 1, p. 1-18, 2003.

Almeida, PS. **Distribuição geográfica das espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) na região Centro-Oeste, Brasil.** / Paulo Silva de Almeida. – Dourados, MS: UFGD, 164f. Dissertação (Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade), Dourados-MS, 2015.

Andrade ARO, Nunes VLB, Galati EAB, Arruda CCP, Santos MFC, Rocca MEG, Aquino RB. **Epidemiological study on leishmaniasis in an area of environmental tourism and ecotourism, State of Mato Grosso do Sul, 2006-2007.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 42(5), 488-493, 2009.

Andrade AJ. **Ecologia química de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): desenvolvimento de uma armadilha e análise dos hidrocarbonetos cuticulares das espécies.** 167f. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

Andrade AR, Dorval ME, Andrade SM, Marques A, Lima-Junior MS, Silva BAK, *et al.* **First report of natural infection of phlebotomines for *Leishmania (Leishmania) chagasi* captured in Ponta Porã, on the border between Brazil and Paraguay.** Asian Pacific Journal of Tropical Disease;1:253-8, 2011.

Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno, D. **A Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies.** PLoS Neglected Tropical Diseases, 10(3): e0004349. 2016.

Ashford RW. **Phlebotomus fever.** In: Encyclopedia of arthropod transmitted Infections. Wallingford: CABI Publishing; p. 397-401, 2001.

Azevedo ACR, Rangel EF. **A study of sandfly species (Diptera, Psychodidae; Phlebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis**

in the municipality of Baturité, Ceará, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 86:405-410, 1991.

Azevedo ACR, Vilela ML, Souza NA, Andrade-Coelho CA, Barbosa AF, Firmino ALS, Rangel EF. **The sand fly fauna (Diptera, Psychodidae: Phlebotominae) of a focus of cutaneous leishmaniasis in Ilhéus, State of Bahia, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 91:75-79, 1996.

Basano SA, Camargo LMA. **Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle.** Revista Brasileira de Epidemiologia, 7(3), 328-337, 2004.

Bastos TSA, Linhares GFC, Madrid DMC. **Identificação Morfológica De Flebotomíneos Capturados Em Área Urbana.** Ciência Animal Brasileira, 17(3), 395-401, 2016.

Bates PA, Depaquit J, Galati EAB, Kamhawi S, Maroli M, McDowell MA, et al. **Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control.** Parasites & Vectors, 8:131, 2015

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Brasília: Ministério da Saúde.120p.2006.

Brasil. Ministério da Saúde- Indicadores de Morbidade. **Taxa de incidência de Leishmaniose Visceral.** Taxa de incidência por Ano segundo Região e Unidade da Federação1990-2012. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/d0205.def>>.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 8. ed. rev. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 271-276p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpresso. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 120 p.: il.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **SINAN. 2017.** Disponível em:

<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LV-Casos.pdf>. 2017

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)**. 2017. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-tegumentar-americana-lta>. 2017

Brasília. Secretaria de Saúde do Distrito Federal. **Informativo Epidemiológico Das Leishmanioses No Distrito Federal 2004**. Disponível em: http://www.saude.df.gov.br/images/Informativos/2004/Informativo_Epidemiologico_das_Leishmanioses.pdf 2004

Brasília. Secretaria de Saúde do Distrito Federal, **Informativo Ambiental das Leishmanioses 2013**. Disponível em: http://www.saude.df.gov.br/images/Informativos/DIVAL/Informativo_Ambiental_2013_Leishmanioses_EM_PDF.pdf

Brasília. Secretaria de Saúde do Distrito Federal. **Informativo Epidemiológico Das Leishmanioses No Distrito Federal 2015**. Disponível em: http://www.saude.df.gov.br/images/Informativos/2016/Informativo_Epidemiologico_das_Leishmanioses_no_DF_2015.pdf.

Brasília. Secretaria de Saúde do Distrito Federal. **Informativo Epidemiológico Das Leishmanioses No Distrito Federal 2016**. Disponível em: http://www.saude.df.gov.br/images/Informativos/2016/Informativo_Epidemiologico_das_Leishmanioses_no_DF_N_2_2016.pdf 2016.

Birtles RJ. **Carrion's disease**. In: Encyclopedia of arthropod transmitted. Wallingford: CABI Publishing; p. 104-6, 2001.

Brilhante AF, Nunes VLB, Kohatsu KA, Galati EABianchi, Rocca MEG, Ishikawa EAY. **Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) by Leishmania (Leishmania) amazonensis in an area of ecotourism in Central-Western Brazil**. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 21:39, 2015

Cabrera OL, Munsterman LE, Cardenas R, Gutierrez R, Ferro C. **Definition of appropriate temperature and storage conditions in the detection of Leishmania DNA with PCR in phlebotomine flies**. Biomédica (Bogotá) 2002; 22:296-302.

Carranza-Tamayo CO, Carvalho MSL, Bredt A, Bofil MIR, Rodrigues RMB, Silva AD, Cortez SMFC, Romero GAS. **Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 43(4), 396-399, 2010.

Carvalho MES, Lustosa ES, Naves HAM. **Contribuição ao conhecimento da fauna flebotomínica do Estado de Goiás e Distrito Federal**. II. 1986-1987. Revista de Patologia Tropical 18:7-14, 1989.

Carvalho GM, Andrade Filho JD, Falcão AL, Rocha Lima AC, Gontijo CM. **Naturally infected *Lutzomyia* Sand Flies in a *Leishmania*- Endemic Area of Brazil**. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 8(3): 407-414p. 2008.

Carvalho MS, Bredt A, Meneguim ER, Oliveira C. **Flebotomíneos (*Diptera: Psychodidae*) em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal, Brasil, 2006 a 2008**. Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde;19(3): 227-37, 2010.

Companhia de Planejamento do Distrito Federal – COEDEPLAN. **Pesquisa socioeconômica - Fercal /DF 2016**. Disponível em: http://www.codeplan.df.gov.br/images/CODEPLAN/PDF/pesquisa_socioeconomica/pdad/2016/Apresentacao_PDAD_Fercal_2015.pdf

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. **Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 151-156, 2012

Deane MP, Deane LM. **Infecção natural do *Phlebotomus longipalpis* por leptomonas, provavelmente de *Leishmania donovani*, em foco de calazar, no Ceará**. O Hospital 1954; 45:697-702.

Deane LM, Deane MP. **Encontro de leishmânias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará**. O Hospital 1954; 45:419-21.

Deane LM. **Leishmaniose visceral no Brasil**. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária; 1956.

Dias FOP, Lorosa ES, Rebelo JMM. **Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (*Psychodidae*, *Phlebotominae*)**. Cadernos de Saúde Pública, v.19, n.5, p.1373-1380, 2003.

Donalísio MR, Peterson AT, Costa PL, Silva FJ, Valença HF, Shaw JJ, Brandão FS. **Microspatial distributional patterns of vectors of**

cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Northeastern Brazil. Journal of Tropical Medicine. 2012.

El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schönian G. **Spacer in clinical samples of *Leishmania donovani*.** Trans R Soc Trop Med Hyg 94(5):575-579. 2000.

Faucher B, Piarroux R. **Actualités sur les leishmanioses viscérales.** La Revue de Médecine Interne, v.32, n.9, p.544-551, 2011.

Ferreira TS, Minuzzi-Souza TTC, Andrade AJ, Coelho TO, Rocha DA, Obara MT, Hecht M, Nitz N, Gurgel-Gonçalves R. **Molecular detection of *Trypanosoma* sp. and *Blastocrithidia* sp. (Trypanosomatidae) in phlebotomine sand flies (Psychodidae) in the Federal District of Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 48(6), 776-779. 2015

Ferro C, Cardenas E, Corredor D, Morales A, Munstermann LE. **Life cycle and fecundity analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae).** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 93, n. 2, p. 195- 199, 1998.

Figueiredo HR, Santos MFC, Casaril AE, Infran JOM, Ribeiro LM, Fernandes CES, Oliveira AG. **Sand flies (Diptera:Psychodidae) in an endemic area of leishmaniasis in Aquidauana municipality, Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil.** Revista do Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo;58:87,2016.

Forattini OP. **Novas observações sobre a biologia de flebotomos em condições naturais (Diptera, Psychodidae).** Arquivo de Higiene e Saúde Pública; 25:209-15, 1960.

Forattini, OP.**Entomologia médica.**1 ed. São Paulo: Edgard Blucher; 658 pp, 1973.

Fu G, Perona-Wright G, Barker DC. ***Leishmania braziliensis*: characterization of a complex specific subtelomeric repeat sequence and its use in the detection of parasites.** Experimental Parasitology 90: 236-243, 1998.

Galati EA, Nunes VL, Dorval ME, Oshiro ET, Cristaldo G, Espíndola MA, et al. **Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.** Revista de Saúde Pública;30:115-28, 1996.

Galati, EAB. **Classificação de Phlebotominae.** In: E. F. Rangel & R. Lainson, eds. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 23-51, 2003.

Galati EAB. **Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) Classificação, morfologia, terminologia e identificação de Adultos.** Apostila Disciplina HEP 5752. Bioecologia e Identificação de Phlebotominae Vol. I, 2016.

Gouveia C, Asensi MD, Zahner V, Rangel EF, Oliveira SMP. **Study on the bacterial midgut microbiota associated to different Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae).** Neotropical Entomology, Sep-Oct;37(5):597-601, 2008.

Instituto Nacional de Meteorologia - INMET- Dados. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/> . 2017

Instituto Brasília Ambiental- IBRAM. **Informações sobre as Bacias Hidrográficas do Distrito Federal [Internet].** Disponível em <http://www.ibramdf.gov.br>. 2013

Instituto Brasília Ambiental - IBRAM. **Notícias.** Disponível em : <http://www.ibram.df.gov.br/noticias/item/2514-brasilia-ganha-refugio-de-vida-silvestre.html>, 2015

Jones TC, Hunt RD, King NW. **Patologia Veterinária.** 6 a edição, São Paulo: Manole, 1415p, 2003.

Killick-Kendrick R. **Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review.** Medical and Veterinary Entomology; 4:1-24,1990.

Lainson R, Braga RR, Souza AA, Povoas MM, Ishikawa AY, Silveira FT. ***Leishmania (Viannia) shawi* sp. N., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil.** *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 64:200-207, 1989.

Lainson R, Shaw JJ. **New World leishmaniasis – the neotropical *Leishmania* species.** In: Collier L, Balows A, Sussman M, editors. Topley & Wilson's Microbiology Infections. 9th Ed. London: Topley & Wilson's; p. 241-66, 1998.

Lainson R, Shaw JJ. **Chapter 17. New World leishmaniasis.** In: Cox F. E. G., J. P. Kreier & D. Wakelin, eds. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Parasitology. Arnold, London, Sydney, Auckland; 313–349 p., 2005.

Laurenti MD. **Patologia e patogenia das leishmanioses.** 84 f. Tese (LivroDocência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Laveran A, Mesnil F. **Sur un Protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani*, Lav. et Mesn.) parasite d'une fièvre de l'Inde.** *C. R. Ac. Sci.* cxxxvii: 957-961,1903.

Leite. JA. **Fauna flebotomínea de fragmentos de mata e peridomicílios na área urbana de Nova Andradina-MS e infecção natural por *Leishmania***. Jhoy Alves Leite- Dourados, MS: UFGD, Dissertação Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade- Universidade Federal de Grande Dourados, 2016.

Lewis DJ. **The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis**. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 19, p. 363-384, 1974.

Lins RM, Oliveira SG, Souza NA, de Queiroz RG, Justiniano SC, Ward RD et al. **Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies**. Insect Molecular Biology; 11(2): 117–122, 2002.

Lutz A, Neiva A. **Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 4:84-95, 1912.

Luz B, Castro EA, Dereure J, Pratlong F, Medecale E, Brousseau RA. ***Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná state, southern Brazil**. Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 94(6):623–31, 2000.

Margonari C, Soares RP, Andrade-Filho JD. **Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil**. Journal of Medical Entomology.47: 1212–1219,2010.

Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. **Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern**. Medical and Veterinary Entomology; 27(2): 123-147, 2013.

Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES. **Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; 44:255-9, 2002.

Michalsky EM, Guedes KS, Lara e Silva FO, França-Silva JC, Dias CLF, Barata RA, Dias ES. **Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(1), 58-62,2011.

Miranda JC, Reis E, Schrieffer A, Gonçalves M, Reis MG, Carvalho L, et al. **Frequency of infection of *Lutzomyia* Phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint**

capture and polymerase chain reaction. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, p. 185–188, 2002.

Missawa NA, Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Dias ES. ***Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania (L.) chagasi* in Várzea Grande, Mato Grosso State, Brazil, an area of intense transmission of visceral leishmaniasis.** Caderno de Saúde Pública 2010;26(12):2414-2419.

Monteiro CC. **O papel da microbiota intestinal na competência vetorial do *Lutzomyia longipalpis* para a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e a transmissão do parasito ao vertebrado pela da picada.** 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte, 2012.

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

Muniz LHG, Rossi RM, Neitzke HC, Monteiro WM, Teodoro U. **Hábito alimentar de flebotomíneos.** Revista de Saúde Pública, 40(6):1087-93, 2006.

Name RQ, Borges KT, Nogueira LSC, Sampaio JHD, Tauil PL, Sampaio RNR. **Estudo clínico, epidemiológico e terapêutico de 402 pacientes com leishmaniose tegumentar americana atendidos no Hospital Universitário de Brasília, DF, Brasil.** Anais Brasileiros de Dermatologia [Internet]. 80(3): 249-254,2005.

Nascimento JC, Paiva BR, Santos Malafronte R, Fernandes WD, Galati EA. **Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a visceral-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil.** Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 119-122, Apr. 2007.

Neitzke HC, Scodro RBL, Castro KRR, Sversutti ACD, Silveira TGV, Teodoro U. **Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical;41(1):17-22, 2008.

Nicolle CJ. **Sur trois cas d'infection splénique infantile à corps de *Leishman* observes en Tunisie.** Archives de l'Institut Pasteur de Tunis; 3:1-26, 1908.

Nogueira LSC, Samapáio RNR. **Estudo Hospitalar de leishmaniose tegumentar Americana (LTA): epidemiologia e tratamento/Cases series study of mucocutaneous leishmaniasis (MCL): epidemiology and treatment.** Anais Brasileiros de Dermatologia; 76 (1): 51-62, jan-fev.2001.

Nunes VLB, Galati EAB, Cardozo C, Rocca MEG, Andrade ARO, Santos MFC et al. **Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área urbana do município de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil.** Revista Brasileira de Entomologia; São Paulo , v. 52, n. 3, p. 446-451, Sept. 2008.

Oliveira AG, Andrade FILHO JD, Flacão AL, Brazil RP. **Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000.** Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 933-944, 2003.

Oliveira AG, Galati EA, de Oliveira O, de Oliveira GR, Espindola IA, Dorval ME, et al. **Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz;101:869-74, 2006.

Paiva BR, Secundino NFC, Nascimento JC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade Junior HF, Malafronte RS. **Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR.** Acta Tropica, v. 99, p. 252–259, 2006.

Paiva BR, Oliveira AG, Dorval MEMC, Galati EAB, Malafronte RS. **Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil.** Acta Tropica;115: 126-130, 2010.

Palmer SR, Soulsby E JL, Simpson DIH. **Zoonoses: biology, clinical practice, and public health control.** Oxford University Press, Oxford ; New York, 948p, 1998.

Peréz J, Virgen A, Rojas JC, Rebollar-Tellez EAA, Castillo IF, Mikery O et al. **Species composition and seasonal abundance of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in coffee agroecosystems.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; 109(1): 80-86, 2014.

Pessôa SB, Martins AV. **Parasitologia médica.** 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, Britto CC. **Identifications of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio**

de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. Acta Trópica 99: 905-913, 2005.

Ranasingue S, Rogers ME, Hamilton JG, Bates PA, Maingon RD. **A real-time PCR assay to estimate Leishmania chagasi load in its natural sand fly vector Lutzomyia longipalpis.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 102, p. 875-882, 2008.

Rangel EF, Lainson R. **Flebotomíneos do Brasil.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 367 p., 2003.

Rapello AM. **Ocorrência e infecção natural de flebotomíneos e pequenos mamíferos por Leishmaniose em matas de galeria do Distrito Federal, Brasil.** 193p. Tese de Doutorado em Medicina Tropical-UNB, Brasília, 2017.

Ready PD. **Factors affecting egg production of laboratory-bred lutzomyia longipalpis (diptera: psychodidae).** Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 16, n. 5, p. 413-423, 1979.

Ready PD. **Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents.** Annual Review Entomology 2013; 58:227-250.

Rebêlo, JMM. **Freqüência horária e sazonalidade de Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae:Phlebotominae) na Ilha de São Luiz, Maranhão, Brasil.** Cadernos de Saúde Pública 1: 221– 227, 2001.

Rey L. **Bases da Parasitologia Médica.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

Ribeiro JF, Walter BMT. **As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. In Cerrado: ecologia e flora** (S.M. Sano, S.P. Almeida & J.F. Ribeiro, eds.). Embrapa Cerrados, Planaltina, p.151 -212, 2008.

Rodríguez N, Aguilar CM, Barrios MA, Barker DC. **Detection of Leishmania braziliensis in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 93:47–9, 1999.

Rodrigues AAF, Barbosa VA, Andrade Filho JD, Brazil RP. **The sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; 108(7): 943-946, 2013.

Santos SO, Arias J, Ribeira AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. **Incrimination of Lutzomyia cruzi as a vector of American visceral leishmaniasis.** Medical and Veterinary Entomology, v. 12, p. 315-317, 1998.

Sampaio RNR, Paula CDR. **Leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. Federal.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical [online], vol.32, n.5, pp.523-528, 1999.

Sampaio RNR, Gonçalves MC, Leite VA, França BV, Santos G, Carvalho MSL, Tauil PL. **Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 42, n. 6, p. 686-690, nov./dez. 2009.

Saraiva L, Andrade Filho JD, Silva SO, Andrade ASR, Melo MN. **The molecular detection of different Leishmania species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 105(8), 1033-1039, 2010.

Shannon R. **Methods for Collecting and Feeding Mosquitoes in Jungle Yellow Fever Studies.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene; 19: 131-140,1939.

Shaw J, Rosa AT, Souza A, Cruz AC. **Transmissão de outros agentes: os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies.** In: Rangel EF, Lainson R. (Orgs.). Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. p. 337-351. 2003.

Shimabukuro PHF, Andrade AJ, Galati EAB. **Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution.** ZooKeys, 660: 67–106, 2017.

Silva ES, Pacheco RS, Gontijo CMF, Carvalho IR. **Visceral Leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) braziliensis in a patient infected with human immunodeficiency virus.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 44, p. 145–149, 2002.

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.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.40, n.4, p.420-425, 2007.

Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF. **Seasonality of Lutzomyia intermedia and Lutzomyia whitmani (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; 97:759-65, 2002.

Tesh RB. **The genus Phlebovirus and its vectors.** Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 33, p. 169–181, 1988.

Tojal da Silva A, Cupolillo E, Volpini A, Almeida R, Romero G. **Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil**. Tropical Medicine & International Health 11: 1388-1398, 2006.

Verlindo AC, Fernandes MF, Peres LLS, Meira RO, Stefaneli M, Santos KM et al. **Primeiro relato de infecção por Leishmania infantum chagasi em Nyssomyia whitmani e Psathyromyia shannoni (Diptera, Psychodidae) em Mato Grosso Sul, Brasil**. 3º Congresso do Centro Oeste – Doenças Infecciosas Emergentes, Reemergentes e Negligenciadas, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2011.

Vexenat JA. **Temperatura, um fator determinante na atividade de Lutzomyia whitmani (Diptera, Psychodidae), Antunes e Coutinho (1939)**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. Brasília, 1991.

Vilela ML, Rangel EF, Lainson R. **Métodos de coleta e preservação de flebotomíneos**, p.353-367. In E.F. Rangel & R. Lainson (org.), Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 368p, 2003.

Vilela ML, de Pita-Pereira D, Azevedo CG, Godoy RE, Britto C, Rangel EF. **The phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of Guaraí, state of Tocantins, with an emphasis on the putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in rural settlement and periurban areas**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; 108(5): 578-85, 2013.

World Health Organization - WHO. **Leishmaniasis**. Ficha nº 375. Disponível em :<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en>>. Atualizado em Jan 2014.

World Health Organization - WHO. **Leishmaniasis** .2017

Yong DG. **A Review of the Bloodsucking Psychodide flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoacinae)**. Tech. Bull. 806, Agric.Exp.Station, IFAS, Univ. Florida, Gainesville. 226 p., 1979.

Young DD, Duncan MA. **Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in México, the West Indies, Central and South American (Diptera: Psychodidae)**. Associated Publishers American Entomological Institute, Memoirs of the American Entomological Institute, no 54: 1- 881. 1994.

10. ANEXOS

A. Normas recomendadas pelo fabricante

Quick Reference Protocol Card

illustra™ tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit

28-9042-75 (25 purifications)

28-9042-76 (250 purifications)

A. Protocol for extraction of genomic DNA from animal tissues

• Ensure 20 mg/ml Proteinase K and RNase A available • Ensure no precipitate present in Lysis buffer type 1 • Ensure ethanol added to Wash buffer type 6 • Ensure Elution buffer type 5 pre-heated to 70°C

🌀: Homogenize ➕: Add ⌚: Spin 🕒: Incubate

1. Homogenization of Animal Tissue

- 🌀 5–50 mg animal tissue into 2 ml microcentrifuge tube
- ➕ 1 ml PBS
- ⌚ 2 minutes 16 000 × g; discard supernatant
- ➕ 50 µl PBS
 - Homogenize (hand-held homogenizer recommended)
- ⌚ 10 seconds 2 000 × g

2. Lysis

- ➕ 50 µl Lysis buffer type 1
- ➕ 10 µl Proteinase K; vortex 15 seconds
- 🕒 1 hour 56°C
 - pre-heat Elution buffer type 5 (200 µl per purification)
- ⌚ 10 seconds 2 000 × g

3. RNA Removal (optional)

- ➕ 5 µl 20 mg/ml RNase A
- 🕒 15 minutes room temperature

4. Purification

- ➕ 500 µl Lysis buffer type 4; vortex 15 seconds
- 🕒 10 minutes room temperature
 - Transfer sample to tissue & cells mini column inside collection tube
- ⌚ 1 minute 11 000 × g; discard flowthrough

5. Wash & Dry

- ➕ 500 µl Lysis buffer type 4
- ⌚ 1 minute 11 000 × g; discard flowthrough
- ➕ 500 µl Wash buffer type 6
- ⌚ 3 minutes 11 000 × g; discard Collection tube

6. Elution

- Transfer column to a new 1.5 ml DNase-free microcentrifuge tube
- ➕ 200 µl pre-warmed Elution buffer type 5
- 🕒 1 minute room temperature
- ⌚ 1 minute 11 000 × g; retain flowthrough
 - Store purified genomic DNA at -20°C

B. NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL

Instruções aos autores

ESCOPO E POLÍTICA

A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical é um periódico multidisciplinar, com acesso aberto, que publica pesquisas originais e estudos clínicos sobre Medicina Tropical (incluindo Epidemiologia, Patologia, Imunologia, etc.) e doenças infecciosas. É um periódico oficial da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Os artigos de revisão são a convite do Editor, mas também publica artigos originais, comunicações breves, relatos de caso, editoriais, cartas ao editor, imagens em doenças infecciosas e parasitárias, relatórios técnicos e números especiais (suplementos). A Revista possui um sistema de revisão por pares, é publicada em inglês e sua periodicidade é bimestral e o conteúdo é de acesso livre para os leitores e nenhuma taxa é cobrada dos autores.

Considerando que a partir de 2016, a Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical apenas recebeu suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), não tendo recebido fomento de nenhum outro órgão. O suporte financeiro foi essencial para garantir a qualidade, a melhoria do fator de impacto, número de citações, a geração do XML e revisão/edição do inglês em todos os artigos aceitos, que foram pagos pela própria revista.

A partir de 2017, a Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical estabeleceu que, quando necessário, solicitará gentilmente aos autores que paguem pelo serviço profissional de revisão e edição do inglês realizado por uma empresa especializada, na versão final de seus manuscritos aceitos para publicação.

POLÍTICA DE AVALIAÇÃO

Submissões à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical indicam que não foram publicadas anteriormente (exceto resumo) e que não estão sendo consideradas para publicação em outro periódico.

Os manuscritos submetidos com vistas à publicação em nosso periódico, são avaliados inicialmente pelos profissionais da secretaria, quanto à adequação às normas. Em seguida, se estiverem dentro das Normas para Publicação, serão encaminhados, no mínimo, para dois revisores para avaliação e emissão de parecer fundamentado através do sistema de revisão por pares. Os editores, com base no parecer dos revisores, irão decidir quanto à aceitação ou não do manuscrito. Se houver divergência de opinião entre os revisores, o manuscrito será enviado a um terceiro revisor para validar a decisão editorial final de acordo com o fluxograma da Revista, disponível no seguinte endereço eletrônico:
<http://www.scielo.br/revistas/rsbmt/iinstruc.htm#005>

Os manuscritos devem ser escritos em Inglês e submetidos apenas eletronicamente através do endereço:
<http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>

A baixa qualidade do inglês é a maior causa de atraso na publicação. Recomendamos fortemente aos autores, com inglês como língua estrangeira, que seus manuscritos sejam preferencialmente traduzidos e editados por um serviço profissional de inglês ou verificados por um cientista com inglês como primeira língua, e uma cópia do certificado deve ser enviada para a Revista.

O contato com a Secretaria da Revista pode ser estabelecido no endereço abaixo:

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Av. Getúlio Guraritá s/n, Caixa Postal: 118, CEP: 38001-970 Uberaba, Minas Gerais, Brasil

Tel: 55 34 3318-5287; Fax: 55 34 3318-5279

e-mail: rsbmt@rsbmt.ufm.edu.br; <http://www.scielo.br/rsbmt>

TIPO DE MANUSCRITO

Artigos Originais: devem relatar pesquisas originais que não tenham sido publicadas ou consideradas para publicação em outros periódicos. O limite de palavras é de 3.500 (excluindo resumo, título e referências). O manuscrito deve conter resumo estruturado com até 250 palavras, com os tópicos Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões. O Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo Estruturado, Palavras-Chaves (máximo de cinco), Texto do Manuscrito (Introdução, Métodos, Resultados, Discussão), Agradecimentos, Conflito de Interesses, Suporte Financeiro, Lista de Referências e Título das Figuras/Legendas. Um total de cinco ilustrações (tabelas e figuras) é permitido.

FORMATAÇÃO DO MANUSCRITO

O manuscrito deve ser preparado usando *software* padrão de processamento de textos e deve ser impresso (fonte *Times New Roman* tamanho 12) com espaço duplo em todo o texto, título/legendas para as figuras, e referências, margens com pelos menos 3cm. O manuscrito deve ser dividido nas seguintes seções: Cartão de Apresentação (endereçada ao Editor-Chefe), Página de Título, Título, Resumo, palavras-chaves, Texto do Manuscrito, Agradecimentos, Declaração de Conflito de Interesses, Suporte Financeiro, Lista de Referências, Título das Figuras/Legendas. A Carta de Apresentação, Página de Título, Agradecimentos e Suporte Financeiro devem ser incluídos em documentos separados (estes dois últimos podem ser incluídos junto com a Página de Título). Abreviações devem ser usadas com moderação.

Página de Título: deve incluir o nome dos autores na ordem direta e sem abreviações, afiliações institucionais (Departamento, Instituição, Cidade, Estado e País de cada autor). O endereço completo do autor para correspondência deve ser especificado, incluindo telefone, fax e e-mail. Na página de título também podem ser incluídos agradecimentos e suporte financeiro. A quantidade de autores por manuscrito deve ser limitada ao número real de autores que realmente contribuíram com o manuscrito, exceto para estudos multicêntricos nacionais e internacionais, que devem limitar-se a vinte autores. Quando exceder a vinte autores, o restante será publicado em notas de rodapé.

Indicação de potenciais revisores: Os autores são convidados a fornecer os nomes e informações de contato (e-mail e telefone) por três potenciais revisores imparciais. Favor informar revisores de instituições diferentes dos autores.

Título: deve ser conciso, claro e o mais informativo possível, não deve conter abreviações e não deve exceder a 200 caracteres, incluindo espaços.

Título Corrente: com no máximo 40 caracteres.

Resumo Estruturado: deve condensar os resultados obtidos e as principais conclusões de tal forma que um leitor, não familiarizado com o assunto tratado no texto, consiga entender as implicações do artigo. O resumo não deve exceder 250 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves) e abreviações devem ser evitadas. Deve ser subdividido em: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões.

Palavras-chaves: 3 a 6 palavras devem ser listados em Inglês, imediatamente abaixo do resumo estruturado.

Introdução: deve ser curta e destacar os propósitos para o qual o estudo foi realizado. Apenas quando necessário citar estudos anteriores de relevância.

Métodos: devem ser suficientemente detalhados para que os leitores e revisores possam compreender precisamente o que foi feito e permitir que seja repetido por outros. Técnicas-padrões precisam apenas ser citadas.

Ética: em caso de experimentos em seres humanos, indicar se os procedimentos realizados estão em acordo com os padrões éticos do comitê de experimentação humana responsável (institucional, regional ou nacional) e com a Declaração de Helsinki de 1964, revisada em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000. Quando do relato de experimentos, em animais, indicar se seguiu um guia do conselho nacional de pesquisa, ou qualquer lei sobre o cuidado e uso de animais em laboratório foram seguidas e o número de aprovação deve ser enviado à Revista. No caso de pesquisa em seres humanos, os autores devem incluir na seção métodos no subtítulo Considerações Éticas uma declaração de que o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional.

Ensaio Clínico: No caso de Ensaio Clínico, o manuscrito deve ser acompanhado pelo número e órgão de registro do ensaio clínico (Plataforma REBEC). Estes requisitos estão de acordo com a BIREME/OPAS/OMS e o Comitê Internacional dos Editores de Revistas Médicas (<http://www.icmje.org>) e do Workshop ICTPR.

Resultados: devem ser um relato conciso e impessoal da nova informação. Evitar repetir no texto os dados apresentados em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve relacionar-se diretamente com o estudo que está sendo relatado. Não incluir uma revisão geral sobre o assunto, evitando que se torne excessivamente longa.

Agradecimentos: devem ser curtos, concisos e restritos aqueles realmente necessários, e, no caso de órgãos de fomento não usar siglas.

Conflito de Interesse: todos os autores devem revelar qualquer tipo de conflito de interesse existente durante o desenvolvimento do estudo.

Suporte Financeiro: informar todos os tipos de fomento recebidos de agências de fomento ou demais órgãos ou instituições financiadoras da pesquisa.

Referências: devem ser numeradas consecutivamente, na medida em que aparecem no texto. Listar todos os autores quando houver até seis. Para sete ou mais, listar os seis primeiros, seguido por “et al”. Digitar a lista de referências com espaçamento duplo em folha separada e no final do manuscrito.

**FAUNA E INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS DA FERCAL-
DISTRITO FEDERAL, BRASIL**

Thais Oliveira Coelho – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical: Biologia das doenças infecciosas e parasitárias (Mestrado) – Universidade de Brasília, UNB, Brasil. Email: oliveira.thais@gmail.com. Telefone: (61) 981386938

Douglas Almeida Rocha- Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical: Biologia das doenças infecciosas e parasitárias (Doutorado) – Universidade de Brasília, UNB, Brasil. Email: dougalmeidarocha@gmail.com. Telefone (61) 985900569

Andrey José Andrade- Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná - UFPR, Brasil. Email: bioandrey@gmail.com. Telefone (11) 964205552

Renata Vêloso Timbó- Laboratório de Parasitologia Médica, Universidade de Brasília- UNB, Brasil. Email: renata.timbo@gmail.com. Telefone:(61) 982384656

Mariana Neiva- Laboratório de Parasitologia Médica, Universidade de Brasília- UNB, Brasil. Email: maari_neiva@hotmail.com. Telefone (61) 981399359

José Queiroz- Diretoria de Vigilância Ambiental do Distrito Federal. Email: vigilanciaambiental@gmail.com. Telefone: (61) 981485479

Adevaldo Ferreira- Diretoria de Vigilância Ambiental do Distrito Federal. Email: vigilanciaambiental@gmail.com. Telefone: (61) 33438816

Elisa Neves Vianna- Universidade de Brasília, UNB, Brasil. Email: ramarrina@gmail.com .Telefone: (31) 991566928

Rodrigo Gurgel-Gonçalves- Universidade de Brasília, UNB, Brasil. Email: rgurgel@unb.br. Telefone: (61) 984524720

Marcos Takashi Obara - Universidade de Brasília, UNB, Brasil. Email: marcos.obara@gmail.com. Telefone: (61) 981321514

Suporte Financeiro: O estudo foi financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal/ FAPDF, Edital 10/2012 sob processo nº 193.000.177/2013.

Agradecimento: Diretoria de Vigilância Ambiental- Distrito Federal; Laboratório de Parasitologia Médica, Faculdade de Saúde – Universidade de Brasília.

FAUNA E INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS DA FERCAL-DISTRITO FEDERAL, BRASIL

Thais Oliveira Coelho ^[1], Douglas Almeida Rocha ^[5] Andrey José Andrade ^[3], Renata Vêloso Timbó ^[4], Mariana Neiva ^[4], José Queiroz^[6], Adevaldo Fereira^[6], Elisa Neves Vianna ^[2], Rodrigo Gurgel-Gonçalves^[2], Marcos Obara Takashi ^[2]

[1]. Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical: Biologia das doenças infecciosas e parasitárias (Mestrado) – Universidade de Brasília, UNB, Brasil. [2]. Universidade de Brasília, UNB, Brasil. [3]. Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná - UFPR, Brasil. [4]. Laboratório de Parasitologia Médica, Universidade de Brasília- UNB, Brasil. [5]. Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical: Biologia das doenças infecciosas e parasitárias (Doutorado) – Universidade de Brasília, UNB, Brasil. [6]. Diretoria de Vigilância Ambiental do Distrito Federal- SES/DF, Brasil.

Resumo

Introdução: Os insetos da subfamília Phlebotominae são transmissores de vários protozoários do gênero *Leishmania* que produzem doenças como a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). A fauna de flebotomíneos do Distrito Federal ainda é considerada pouco conhecida, sendo registradas 35 espécies e as pesquisas sobre de infecção natural destes vetores ainda é escassa. A Região Administrativa da Fercal é uma área situada entre a Bacia do Rio Maranhão e às margens da Área de Proteção Ambiental – APA Cafuringa, com grande potencial eco-turístico que está em expansão urbana desordenada, sendo considerada área de transmissão intensa para LV com a detecção de elevada positividade canina para *Leishmania infantum*. Objetivo e Metodologia: O presente estudo teve como objetivo

identificar as espécies de flebotomíneos, assim como sua relação com as variáveis climáticas e estimar a infecção natural das espécies capturadas por protozoários do gênero *Leishmania*. As capturas foram realizadas na Região Administrativa da Fercal/DF em 15 Unidades Domiciliares (UD) por meio de armadilhas CDC instaladas no intra e peridomicílio e armadilha de Shannon no ambiente silvestre. As análises de infecção natural foram realizadas nas espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Nyssomyia whitmani* por meio de PCR. Resultados: Foram identificadas um total de 28 espécies com 8 registros novos para o DF, dentre 1883 espécimes capturadas. *Ny. whitmani* foi a espécie predominante em relação as outras espécies. Verificou-se diferença significativa entre a ocorrência de flebotomíneos capturados em ambiente silvestre e domiciliar, com maior ocorrência nos domicílios ($p < 0,0001$). A pluviosidade, temperatura e umidade não tiveram associação com a maior ou menor abundância de flebotomíneos e a infecção natural de 82 pools de flebotomíneos apresentou resultados negativos. Conclusões: Atualiza-se para 43 as espécies de flebotomíneos registradas no Distrito Federal. O período de maior coleta para flebotomíneos ocorreu em agosto a setembro de 2014 e as espécies *Ny. whitmani* e *Lu. longipalpis* foram mais abundantes no peridomicílio. Essas informações são de fundamental importância para as ações de vigilância e controle da LV e LTA, no DF.

Palavras-chave: Distrito Federal, Phlebotominae, infecção natural, PCR, Leishmaniose Visceral.

ABSTRACT

Introduction: Insects of the subfamily Phlebotominae are transmitters of several protozoa of the genus *Leishmania* that produce diseases such as Visceral Leishmaniasis (LV) and American Cutaneous Leishmaniasis (LTA). The fauna of phlebotomines of the Federal District is still considered little known, being recorded 35 species and the research on natural infection of these vectors is still scarce. The Fercal Administrative Region is an area located between the Maranhão River Basin and the banks of the Environmental Protection Area - APA Cafuringa, with great eco-tourist potential that is in a disordered urban expansion, being considered of intense transmission to LV with the detection of a high rate of canine positivity. **Objective and Methodology:** The objective of this study was to identify sandfly species, as well as their relationship with climatic variables and to estimate the natural infection of the species captured by protozoa of the genus *Leishmania*. Captures were taken in the Administrative Region of Fercal / DF in 15 Domiciliary Units (UD) by means of CDC traps installed in the intra and peridomicile and Shannon trap in the wild. The analyzes of natural infection were performed in the species *Lutzomyia longipalpis* and *Nyssomyia whitmani* by means of PCR. **Results:** A total of 28 species with 8 new records were identified for DF, out of 1883 captured specimens. *Ny. whitmani* was the predominant species in relation to the other species. There was a significant difference between the occurrence of sandflies captured in the wild and at home, with a higher occurrence in the households ($p < 0.0001$). Rainfall, temperature and humidity were not associated with greater or less abundance of sand flies, and the natural infection of 82 pools of sand flies presented negative results. **Conclusions:** The species of sand flies registered in the Federal District are now updated to 43. The period of greatest collection for sandflies occurred in August to September 2014 and the

species *Ny. whitmani* and *Lu. longipalpis* were more abundant in the peridomicile. This information is of fundamental importance for the actions of surveillance and control of LV and LTA in the DF.

Key words: Federal District, Phlebotominae, natural infection, PCR, Visceral Leishmaniasis.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) foi classificada como uma zoonose de natureza eminentemente rural, porém vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte¹. A transmissão ocorre por meio da picada da fêmea de flebotomíneo infectada por *Leishmania infantum*² podendo acometer o homem, tornando-se uma antropozoonose³. A LV está distribuída em 69 países, com notificação de 200 a 400 mil novos casos por ano, concentrados na Índia, Nepal, Sudão, Sudão do Sul, Bangladesh, Etiópia e Brasil, observando-se a ampla distribuição geográfica da doença, acometendo quase todos os continentes².

No Brasil, a LV foi relacionada ao ambiente rural, conforme estudos realizados em Sobral, Estado do Ceará, em 1954-1956, devido a uma grave epidemia. De acordo com os dados do SINAN/SVS, entre 1990 a 2016, a distribuição geográfica da LV indicava registros de casos confirmados em 22 Unidades Federativas do Brasil, com taxa de incidência média anual de aproximadamente 1,8 casos humanos por 100 mil habitantes, predominante na região Nordeste seguida das regiões Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Sul⁴. Segundo o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral¹, uma avaliação epidemiológica dos últimos 13 anos revelou alterações no perfil de

transmissão, originalmente caracterizada como rural para um perfil atual relacionado a grandes cidades e algumas capitais.

A ecologia de várias espécies de flebotomíneos tem sido alterada pelas grandes modificações ambientais, ocasionadas pelo homem⁵ e essas mudanças apresentam influência direta na dinâmica de transmissão e na epidemiologia da doença¹.

Carranza-Tamayo et al.⁶ descreveram o primeiro caso confirmado de LV autóctone em Brasília diagnosticado, em julho de 2005. No Distrito Federal, de 2007 a 2016, foram confirmados 44 casos humanos de LV, na qual, 30 casos foram registrados, no período de 2009 a 2015⁷. Por outro lado, os dados da Secretaria de Saúde do DF, em seus boletins epidemiológicos, aponta 28 casos autóctones, entre 2009 a 2015⁸. O primeiro caso autóctone de LTA, no DF, teve registro na década de 80. Em 1999 foram notificados 11 casos novos⁹ demonstrando a expansão da LTA.

Atualmente, 1003 espécies de flebotomíneos já foram descritas no mundo, das quais cerca de 537 ocorrem na região Neotropical, sendo que 277 são registradas no Brasil⁹. A maioria das espécies de flebotomíneos da região Neotropical possui habitat em áreas de floresta com índice pluviométrico em torno de 2000 mm por ano, mas estes insetos também podem ser encontrados em áreas semiáridas, com cobertura vegetal arbustiva⁹.

Duas espécies de flebotomíneos têm sido relacionadas com a transmissão da LV no Brasil, *Lu. longipalpis*, considerada a principal transmissora de *L. infantum* e mais recentemente *Lu. cruzi*, incriminada como potencial vetor no Mato Grosso do Sul nos municípios de Ladário e Corumbá por Santos et al.¹⁰

Segundo Maroli et al.¹¹ as espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão de LTA no Brasil são *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia wellcomei*, *Lutzomyia complexa*, *Lutzomyia neivai*, *Lutzomyia fischeri* e *Lutzomyia migonei*.

Carvalho et al.¹² registraram 22 espécies de flebotomíneos capturados em 11 municípios Goianos e no Distrito Federal. Entre 2006 a 2008, um levantamento entomológico realizado durante 24 meses consecutivos, em locais prováveis de infecção (LPI) para LTA, foram identificadas 27 espécies de flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* e *Brumptomyia*, sendo que a espécie mais coletada foi *Ny. whitmani*¹³. Rapello¹⁴ estudou a infecção natural por *Leishmania sp* em pequenos mamíferos capturados no Jardim Botânico de Brasília, Parque Nacional de Brasília, Fazenda Água Limpa e Reserva Biológica da Contagem detectando a presença de 16 espécies de flebotomíneos, no DF.

Nesse cenário epidemiológico torna-se fundamental o conhecimento das espécies de flebotomíneos e sua abundância na região Administrativa da Fercal /DF, a fim de obter dados a respeito de possíveis espécies vetoras envolvidas na transmissão de LV e LTA, assim como flutuações sazonais destas espécies em relação as variáveis climáticas que podem indicar os momentos de maior ou menor circulação de flebotomíneos. Ainda, é de extrema importância a caracterização dos aspectos comportamentais e das taxas de infecção natural desses flebotomíneos por *Leishmania spp* aumentando a percepção da circulação da doença por meio da detecção das Leishmanias circulantes nos vetores. Portanto, o objetivo do trabalho foi identificar as espécies de flebotomíneos, assim como sua relação com as variáveis climáticas e estimar a infecção natural das espécies capturadas por protozoários do gênero *Leishmania*.

MÉTODOS

Área de Estudo: O estudo foi realizado na XXXI Região Administrativa (RA), denominada de Fercal. Essa RA foi à última a ser criada no Distrito Federal em 2012 e está localizada ao norte do DF, entre Sobradinho e Sobradinho II. As primeiras

comunidades da Fercal começaram a surgir há mais de 40 anos, quando foi instalada a fábrica de cimento CIPLAN - Cimento Planalto - na região. Atualmente, registra-se uma população de aproximadamente 30.000 habitantes, distribuídas em 14 comunidades.

A Fercal situa-se entre a Bacia do Rio Maranhão e às margens da Área de Proteção Ambiental – APA Cafuringa, possuindo clima tropical de altitude, com duas estações bem definidas: uma seca (de maio a setembro) e outra chuvosa (de outubro a abril). As características do relevo assemelham-se a uma região serrana com áreas preservadas que se caracteriza pelos seus diversos atrativos turísticos, como cachoeiras, “canions” e áreas de florestas densas (cerradão), mas também possui graves problemas ambientais, dentre os quais se destacam a poluição, o desmatamento das áreas de preservação permanente, como as matas de galeria, e a extração irregular de areia.

Captura de flebotomíneos: Foram selecionadas três comunidades, baseadas na maior média de cães positivos do inquérito canino realizado em 2013 pela DIVAL. As localidades do Boa Vista, Fercal I e Fercal II foram selecionadas, conforme critério acima, sendo que um total de 15 Unidades Domiciliares (UD) selecionadas e marcadas com equipamento GPS e seus respectivos donos foram orientados da importância da pesquisa. As capturas foram realizadas por 3 dias consecutivos, uma vez por mês, durante 14 meses, entre agosto de 2014 e setembro de 2015. Em cada unidade domiciliar foram instaladas duas armadilhas luminosas tipo CDC “miniature light trap”¹⁵, a uma altura do solo de aproximadamente 1,5 m, conectadas a baterias. Uma armadilha localizada no intradomicílio enquanto a outra foi instalada no peridomicílio, preferencialmente em abrigos de animais. A técnica de barraca de Shannon¹⁶ foi realizada uma vez ao mês, durante 14 meses, concomitantemente ao período da captura nas UD, porém em área mais

preservada. Cada coleta foi realizada por no mínimo dois pesquisadores, com duração de 4 horas, iniciando-se no crepúsculo e finalizando por volta das 22 horas.

No Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores foi realizada a separação de machos e fêmeas de todos os flebotomíneos capturados, seguida do processo de clarificação, limpeza e conservação e identificação.

As peças dos flebotomíneos não utilizadas para identificação das fêmeas como asas, pernas e porção anterior do abdome foram acondicionadas individualmente em eppendorfs limpos contendo PBS (Tampão Fosfato Salino) devidamente etiquetados conforme código referente à identificação da espécie para realização de extração de DNA e exame de infecção natural.

Deteção molecular: Para a detecção da infecção natural de flebotomíneos foram selecionadas as fêmeas das espécies *Lutzomyia longipalpis*, *Nyssomyia whitmani* agrupadas em pools de no máximo 10 espécimes tanto para as capturas em ambientes domiciliares como para o ambiente silvestre. Primeiramente as amostras foram submetidas à extração de DNA utilizando o Illustra Tissue and Cells Genomic Mini Prep Spin Kit, de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare®) e foram submetidas à PCR direcionada a região espaçadora interna do gene de RNAr 1 (RNA ribossomal) (ITS-1) de *Leishmania sp*, utilizando os primers: LITS1 - 5' CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3' e L5.8S - 5' TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3' ²³. Foram usados como controles positivos amostras de DNA extraídas de cultura de *L. braziliensis* (Lb) e *L. infantum* (Li) e como controles negativos amostras de sangue de pacientes de áreas endêmicas em Barcarena e Breves, estado do Pará, Brasil. As reações de todas PCR ocorreram por meio de termociclador TC-Plus (Techne, Inglaterra, UK) e os produtos de

todas as PCRs foram visualizados em gel de agarose a 1,3%, corados com brometo de etídeo.

Dados meteorológicos: Os dados meteorológicos como precipitação e umidade relativa média do ar durante o período das coletas foram obtidos em colaboração com geólogo do Departamento de Estradas de Rodagem do Distrito Federal – DER/DF e retiradas da Estação: BRASILIA-DF (OMM:83377). As medidas de temperaturas mínimas e máximas foram obtidas no site do Inmet (Inmet, 2017) no Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa (BDMEP) e os dados foram trabalhados pelo programa Excel 2016.

Análise dos dados: Foram elaboradas tabelas de contingência das espécies de flebotomíneos por captura nos diferentes locais, intra e peridomicílio e o teste de qui-quadrado foi aplicado a fim de analisar diferenças na ocorrência de flebotomíneos entre locais de captura utilizando o programa Biostat 3.5. Foi também realizado testes de regressão linear e correlação de Spearman entre precipitação, umidade, temperatura e número total de flebotomíneos capturado no estudo, considerando um IC a 95%.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta a riqueza das espécies coletadas nas UD e em ambiente silvestre, na qual foi de 28 espécies. Um total de 24 espécies foram encontradas no domicílio e 16 no ambiente silvestre, com 12 comuns aos dois ambientes e somente as espécies *Psathyromyia abonnensi*, *Pintomyia monticula* e *Pintomyia misionensis* exclusivamente provenientes de coleta silvestre. Destes 8 registros inéditos para o DF foram identificados, as quais pertencem as seguintes espécies: *Brumptomyia cunhai*, *Evandromyia termithophila*, *Evandromyia carmelinoi*, *Evandromyia cortellezzi*,

Evandromyia walkeri, *Micropygomyia rorotaensis*, *Psathyromyia campograndensis* e *Pintomyia misionensis*. Todas ocorreram em ambiente domiciliar exceto *Pintomyia misionensis* que foi coletada apenas no ambiente silvestre. A espécie *Psathyromyia campograndensis* foi encontrada tanto no ambiente domiciliar como no ambiente silvestre.

Tabela 1. Distribuição da riqueza e local de encontro registrado na literatura das espécies da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, coletadas na Região Administrativa da Fercal, DF, Brasil.

Sub-Tribo	Gênero	Espécie	Habitat**
Brumptomyiina	<i>Brumptomyia</i>	<i>Brumptomyia brumpti</i> (Larrousse, 1920)	Peridomicílio e Silvestre
Artemiev, 1991)	(França e Parrot, 1921)		
		<i>Brumptomyia cunhai</i> (Mangabeira, 1942)*	Silvestre
Sergentomyiina	<i>Micropygomyia</i>	<i>Micropygomyia (Silvamyia) acanthopharynx</i> (Martins, 1962)	Silvestre
(Artemiev, 1991)	(Barretto, 1962)	Falcão & Silva, 1962)	
		<i>Micropygomyia (Sauromyia) rorotaensis</i> (Floch & Abonnenc, 1944)*	Silvestre

Lutzomyiina	<i>Evandromyia</i>	<i>Evandromyia bacula</i> (Martins, Falcão & Silva, 1965)	Silvestre
(Abonnenc and Léger, 1976)	(Mangabeira, 1941)		
		<i>Evandromyia (Aldamyia) carmelinoi</i> (Ryan, Fraiha, Lainson & Shaw, 1986)*	Silvestre
		<i>Evandromyia (Barrettomyia) cortelezii</i> (Brèthes, 1923)	Intradomicílio, Peridomicílio, Silvestre
		<i>Evandromyia (Aldamyia) evandroi</i> (Costa Lima & Antunes, 1936)	Intradomicílio, Peridomicílio, Silvestre
		<i>Evandromyia (Aldamyia) lenti</i> (Mangabeira, 1938)	Intradomicílio, Peridomicílio, Silvestre
		<i>Evandromyia (Barrettomyia) sallesi</i> (Galvão & Coutinho, 1939)	Intradomicílio, Peridomicílio, Silvestre
		<i>Evandromyia (Barrettomyia) teratodes</i> (Martins, Falcão & Silva, 1964)	Silvestre
		<i>Evandromyia (Aldamyia) termitophila</i> (Martins, Falcão & Silva, 1964)*	Peridomicílio e Silvestre

		<i>Evandromyia (Aldamyia) walkeri</i> (Newstead, 1914)*	Silvestre
	<i>Sciopemyia</i>		
(Barretto, 1962)		<i>Sciopemyia sordellii</i> (Shannon & Del Ponte, 1927)	Intradomicílio, Peridomicílio, Silvestre
	<i>Lutzomyia</i>		
(França, 1924)		<i>Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis</i> (Lutz & Neiva, 1912)	Intradomicílio, Peridomicílio, Silvestre
Psychodopygina	<i>Psathyromyia</i>		
(Galati, 1995)	Barretto, 1962	<i>Psathyromyia (Forattiniella) aragaoi</i> (Costa Lima, 1932)	Silvestre
		<i>Psathyromyia (Psathyromyia) bigeniculata</i> (Floch & Abonnenc, 1941)*	Peridomicílio e Silvestre
	<i>Psathyromyia</i>		
Barretto, 1962		<i>Psathyromyia (Forattiniella) brasiliensis</i> (Costa Lima, 1932)	Silvestre

	<i>Psathyromyia</i>	<i>Psathyromyia (Forattiniella) campograndensis</i> (Oliveira, Andrade-Filho, Falcão & Brazil, 2001)*	Peridomicílio e Silvestre
	Barretto, 1962		
	<i>Psathyromyia</i>	<i>Psathyromyia (Forattiniella) lutziana</i> (Costa Lima, 1932)	Silvestre
	Barretto, 1962		
	<i>Psychodopygus</i>	<i>Psychodopygus davisi</i> (Root, 1934)*	Silvestre
	Mangabeira, 1941		
Lutzomyiina	<i>Nyssomyia</i>	<i>Nyssomyia whitmani</i> (Antunes & Coutinho, 1939)	Intradomicílio, Peridomicílio, Silvestre
(Abonnenc and Léger, 1976)	Barretto, 1962		
	<i>Pintomyia</i> Costa Lima, 1932	<i>Pintomyia (Pintomyia) christenseni</i> (Young & Duncan, 1994)	Silvestre

Lutzomyiina *Pressatia* *Pressatia sp.**

Peridomicílio e Silvestre

(Abonnenc and Mangabeira,

Léger, 1976) 1942

* Espécies pela primeira vez relatadas no DF. **De acordo com Rangel & Lainson, (2003), Brilhante et al. (2015).

A Tabela 2 observa-se que o maior número de indivíduos capturados pertencente a espécie *Ny. whitmani*, seguida de *Lutzomyia longipalpis* e *Micropygomyia acanthopharynx*.

Tabela 2. Espécies capturadas no intra e peridomicílio na Região Administrativa da Fercal, entre agosto de 2014 a setembro de 2015, DF, Brasil.

Espécie	Unidade domiciliar					%
	Intradomicílio		Peridomicílio		Total	
	F	M	F	M		
<i>Brumptomyia sp.</i>	0	0	1	0	1	0,1%
<i>Brumptomyia brumpti</i>	0	0	0	2	2	0,1%
<i>Brumptomyia cunhai</i>	0	0	0	2	2	0,1%
<i>Evandromyia lenti</i>	0	5	23	40	68	4,8%
<i>Evandromyia sallesi</i>	6	0	20	10	36	2,5%
<i>Evandromyia termithophila</i>	1	0	5	1	7	0,5%
<i>Evandromyia bacula</i>	0	0	1	0	1	0,1%
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	2	0	17	1	20	1,4%
<i>Evandromyia cortellezzi</i>	0	0	0	2	2	0,1%
<i>Evandromyia evandroii</i>	1		3	3	7	0,5%
<i>Evandromyia teratodes</i>	0	0	2	0	2	0,1%
<i>Evandromyia walkeri</i>	0	0	1	0	1	0,1%
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	6	13	15	82	116	8,2%
<i>Micropygomyia acanthopharynx</i>	26	1	26	2	55	3,9%
<i>Micropygomyia rorotaensis</i>	0	0	1	0	1	0,1%

<i>Micropygomyia sp.</i>	0	0	1	0	1	0,1%
<i>Nyssomyia whitmani</i>	97	24	484	382	987	69,8%
<i>Pintomyia christenseni</i>	1	0	1	0	2	0,1%
<i>Pintomyia sp.</i>	0	0	1	0	1	0,1%
<i>Pressatia sp.</i>	0	0	1	0	1	0,1%
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	0	0	2	17	19	1,2%
<i>Psathyromyia bigenicullata</i>	0	0	7	5	12	0,8%
<i>Psathyromyia brasiliensis</i>	0	0	1	1	2	0,1%
<i>Psathyromyia campograndensis</i>	1	0	11	0	12	0,8%
<i>Psathyromyia lutziana</i>	1	1	9	2	13	0,9%
<i>Psathyromyia sp.</i>	0	0	2	0	2	0,1%
<i>Psychodopygus davisi</i>	2	0	19	0	21	1,5%
<i>Sciopemyia sordellii</i>	2	0	5	2	9	0,6%
<i>Lutzomyia sp.</i>	2	1	5	3	11	0,8%
TOTAL	148	45	664	557	1414	100,0%

Foi detectada maior abundância de exemplares de *Ny. whitmani* e *Lu. longipalpis* no peridomicílio. Ainda, percebe-se maior número de fêmeas no intradomicílio de *Ny. whitmani* comparado às fêmeas de *Lu. longipalpis*. O número de fêmeas das duas espécies capturados no intra e peridomicílio apresentou diferença estatisticamente significativa pelo teste de qui-quadrado ($p < 0.0001$), assim como o número de machos das duas espécies capturados no intra e no peridomicílio ($p < 0.0001$), e o total ($p < 0.0001$), como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Número de flebotomíneos da espécie *Ny. whitmani* e *Lu. longipalpis* conforme por gênero e local de encontro na Unidade Domiciliar, na

Fercal/DF.	<i>Ny. whitmani</i>	Fêmeas	Machos	TOTAL
Intradomicílio		97	24	121
Peridomicílio		484	382	866
<i>Lu. longipalpis</i>				
Intradomicílio		6	13	19
Peridomicílio		15	82	97
TOTAL		602	501	1103

Na Tabela 4 observa-se as espécies capturadas em ambiente silvestre com armadilha de Shannon. Percebe-se o grande número de indivíduos de *Ny. whitmani* capturados, em relação as outras espécies. A espécie de flebotomíneo *Psathyromyia*

davisi também apresentou maior ocorrência na armadilha de Shannon e houve maior número de fêmeas capturadas em comparação com os machos dessa mesma espécie.

Tabela 4. Distribuição das diferentes espécies de flebotomíneos capturadas na armadilha de Shannon, em ambiente silvestre, na RA da Fercal/DF.

Espécie	Machos	Fêmeas	Total
<i>Evandromyia bacula</i>	0	1	1
<i>Evandromyia lenti</i>	2	1	3
<i>Evandromyia teratodes</i>	0	4	4
<i>Evandromyia termitophila</i>	0	1	1
<i>Evandromyia carmelinoi</i>	0	1	1
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	2	4	6
<i>Micropygomyia acanthopharynx</i>	0	1	1
<i>Nyssomyia whitmani</i>	10	404	414
<i>Psathyromyia abonnensi</i>	1	0	1
<i>Psathyromyia bigenicullata</i>	0	2	2
<i>Psathyromyia campograndensis</i>	0	1	1
<i>Pintomyia monticola</i>	0	1	1
<i>Pintomyia misionensis</i>	0	1	1
<i>Sciopemyia sordellii</i>	0	1	1
<i>Psychodopygus davisi</i>	2	29	31
TOTAL	17	452	469

Verificou-se diferença entre a ocorrência de flebotomíneos capturados em ambiente silvestre (Shannon) e nas unidades domiciliares (CDCs) (Figura 1), sendo a maior ocorrência nos domicílios ($p < 0,0001$).

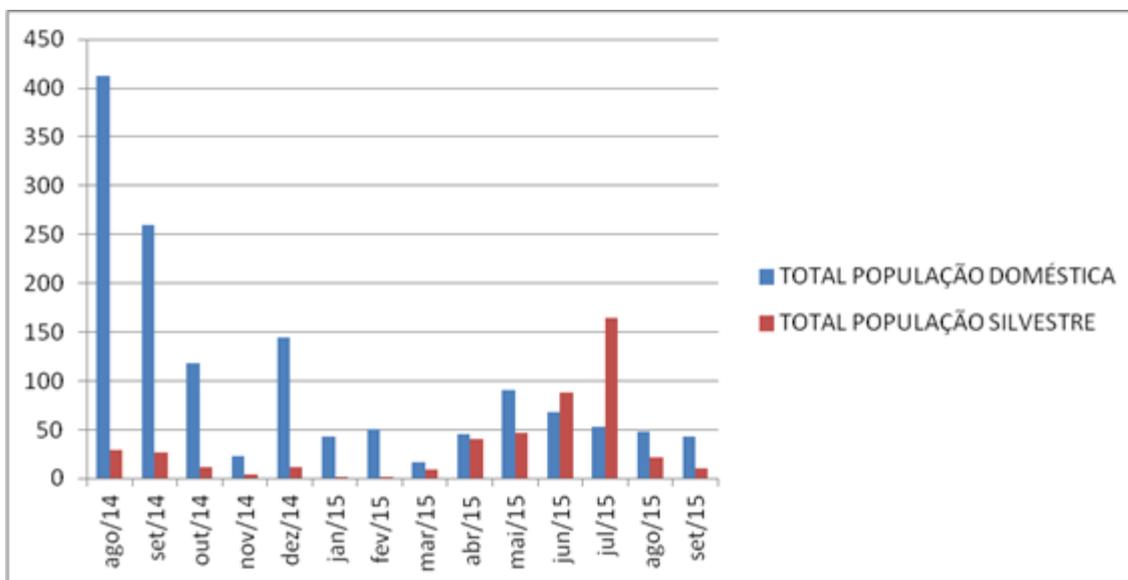


Figura 1. Número total de flebotomíneos capturados em ambiente silvestre e nos domicílios, entre agosto de 2014 e setembro de 2015, na RA da Fercal/DF.

DISCUSSÃO

A diversidade da fauna flebotomínica foi amostrada, com 28 espécies silvestres, semi domiciliadas e domiciliadas na região, sendo 8 registros inéditos para o DF, as quais pertencem as seguintes espécies: *Brumptomyia cunhai*, *Evandromiyia termithophila*, *Evandromyia carmelinoi*, *Evandromyia cortellezzi*, *Evandromyia walkeri*, *Micropygomyia rorotaensis*, *Psathyromyia campograndensis* e *Pintomyia misionensis*. Todas ocorreram em ambiente domiciliar, exceto *Pintomyia misionensis*, que foi coletada apenas no ambiente silvestre. A espécie *Psathyromyia campograndensis* foi encontrada tanto no ambiente domiciliar como no ambiente silvestre. Ao somar as espécies da lista

registrada no presente trabalho com as registradas por Rapello ¹⁴ totaliza-se 43 registros para o DF.

Chama a atenção à diferença da entomofauna de flebotomíneos comparada ao estudo Rapello ¹⁴, onde foram registradas 10 espécies de flebotomíneos em comum e em reservas da mesma região (Reserva Biológica de Contagem e Parque Nacional de Brasília) em comparação à do presente trabalho que também obteve amostragem próxima de matas de galeria. A vegetação da Fercal também se mostra pertencente ao bioma do Cerrado, com presença de matas de galeria e bruscas transições que revelam formações savânicas e campestres ¹⁷.

Nesse estudo, a razão sexual (fêmeas/machos) da totalidade de flebotomíneos capturados pela armadilha CDC foi de 1,34:1 não mostrando diferença significativa na proporção entre fêmeas e machos. Rodrigues et al.¹⁸ utilizando armadilhas tipo HP modificada encontraram resultados semelhantes em estudo realizado no Parque Estadual do Tiririca, estado do Rio de Janeiro, entre maio de 2010 a maio de 2011, onde a razão sexual encontrada foi de 1,13:1 (machos/ fêmeas), ou seja, também sem diferenças significativas.

A armadilha de Shannon apresentou maior proporção de fêmeas com uma razão de (26:1). Tal fato, pode ser explicado devido as fêmeas serem atraídas por odores, substâncias (CO₂, ácido láctico, feromônios) e temperatura do hospedeiro que encontra-se em atividade, durante o funcionamento da armadilha ¹⁹. Pérez et al.²⁰ utilizando armadilhas CDC, Disney e Shannon, na região de Soconusco, estado de Chiapas, no México detectaram maior proporção de flebotomíneos fêmeas capturadas em todas as técnicas, entre agosto de 2007 e julho de 2008.

O presente estudo detectou duas espécies de importância médica na transmissão das leishmanioses, sendo a primeira *Lu. longipalpis* e segunda *Ny. whitmani*. Vexenat ²¹, estudando a fauna flebotomínica encontrou a espécie *Ny. whitmani* largamente distribuída em diversas áreas do DF, assim como no trabalho realizado por Sampaio et al. ²², onde *Ny. whitmani*, representou 98,9% das espécies capturadas nas Regiões Administrativas de São Sebastião, Gama e Planaltina do DF. Bastos et al. ²³, em área urbana situada no noroeste do estado de Goiás verificaram a predominância de *Ny. whitmani* (71,6%), sobre outras espécies de flebotomíneos, tais como *Lutzomyia longipalpis* (17,5%), *Evandromyia lenti* (7,3%) e *Nyssomyia intermedia* (1,8%).

Ny. whitmani também foi detectado, tanto no intra quanto no peridomicílio, entre julho e agosto, em maior abundância, no município de Águas de Miranda/MS, em área com predominância de vegetação de cerrado, conforme resultados de Brilhante et al. ²⁴, corroborando com os dados obtidos neste trabalho. Outros trabalhos ^{25,26} também relatam o encontro dessa espécie em maior quantidade, nesse mesmo período.

Almeida²⁵ também demonstrou que *Ny. whitmani* foi a espécie com maior ocorrência e distribuição geográfica no Centro Oeste do Brasil, quando analisou os dados de ocorrência das espécies de flebotomíneos entre os anos de 1996 a 2014, obtidos por meio do serviço de entomologia de Secretarias Estaduais de Saúde (MT, MS, GO e DF), além de dados de ocorrência de espécies da literatura e registros de coleções científicas do sistema Species Link e Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).

A região da Fercal trata-se de uma área que se encontra em processo de urbanização, sendo que a maioria das residências apresentam proximidade com as matas e possuem galinheiros e/ou canil com presença de *Ny. whitmani*, tanto no intra quanto no

peridomicílio, levantando a possibilidade dessa espécie estar em processo de adaptação ao ambiente antrópico, como verificado por Oliveira et al.²⁸, Azevedo et al.²⁹, Azevedo & Rangel³⁰ e Forattini³¹.

A observação do comportamento domiciliado de *Ny. whitmani* deve ser levada em consideração, assim como sua antropofilia e seu envolvimento na transmissão de LTA^{25,32} pela sua grande importância epidemiológica como principal vetor de *L. braziliensis* em diversas regiões do país, mas também por estar associado à transmissão de *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Viannia) shawi*³³.

Por outro lado, a espécie *Lu. longipalpis* mostra-se com comportamento inverso, sendo capturada em maior número na época úmida e chuvosa, entre novembro a março, conforme observado por Rebêlo³⁴ na região Nordeste e por Nunes et al.³⁵ no município de Bonito, na região de Mato Grosso do Sul. Neste estudo registra-se o pequeno número de exemplares de *Lu. longipalpis*, corroborando com o trabalho de Oliveira et al.²⁸, que utilizou armadilhas de tipo CDC com coletas semanais em vários ecótopos na cidade de Campo Grande, tendo sugerido que o ano da coleta foi atípico com período de seca prolongado afetando a densidade de *Lu. longipalpis* que apresentou pico no mês de janeiro, logo após os meses de chuva.

Apesar do encontro das espécies de flebotomíneos mencionadas acima, na Região Administrativa da Fercal, os resultados de infecção natural por meio de biologia molecular apresentaram-se negativos para *Leishmania* sp. Os resultados negativos para infecção natural por *Leishmania* sp deste trabalho corroboram com os resultados de Rapello¹⁴, Figueiredo et al.³⁶, Ferreira et al.³⁷, Pérez et al.²⁰ e Neitzke et al.³⁸ reforçando a dificuldade de identificação de flebotomíneos naturalmente infectados. Mesmo tendo

uma maior sensibilidade com a utilização da técnica de PCR, vários fatores podem influenciar os resultados dentre eles o alvo, as condições da PCR, o tipo e as condições da amostra de DNA ³⁹.

Uma limitação do trabalho foi a recusa de um morador na continuidade da coleta em residência, onde se localizava um galinheiro que parecia agregar populações de *Ny. whitmani*. Outra dificuldade foi a padronização do número de exemplares de amostras discriminadas por espécie e local de coleta para composição dos pools, sendo ao final do experimento separados por ambiente intra, peri e silvestre, em pools de 7 a 10 indivíduos.

Finalmente, o presente estudo atualizou e ampliou o conhecimento das espécies registradas no Distrito Federal, o que poderá auxiliar tanto no conhecimento sobre o comportamento das mesmas, quanto nas estratégias de vigilância e controle das Leishmanioses, especialmente para a área estudada, tendo sido observadas algumas alterações na predominância de espécies durante tempos de frio e seca como para espécies que são mais frequentemente encontradas nos períodos após as chuvas.

Nessa pesquisa foram capturadas 28 espécies de flebotomíneos, sendo o maior número de exemplares capturados pertencente a espécie *Ny. whitmani*, seguida de *Lu. longipalpis* e *Mi. acanthopharynx*, sendo 8 espécies inéditas para o DF. Foram capturadas maior número de flebotomíneos nas armadilhas CDC, em relação a armadilha de Shannon, sendo que as espécies *Ny. whitmani* e *Lu. longipalpis* foram mais abundantes no peridomicílio. Ainda, observa-se maior ocorrência fêmeas de *Ny. whitmani* no intradomicílio, em relação às fêmeas de *Lu. longipalpis*.

Por fim, as espécies de flebotomíneos *Micropygomyia acanthopharynx* e *Evandromyia lenti* devem ser melhor estudadas, em relação ao seu papel na dinâmica de

transmissão de protozoários do gênero *Leishmania*, tendo em vista que foi registrada sua ocorrência em ambiente intradomiciliar em quantidade que merece atenção por parte dos órgãos de controle. Destaca-se a necessidade de pesquisas futuras, a fim de caracterizar a sazonalidade das espécies de flebotomíneos na área de estudo.

Lista de Referências

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpresso. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 120 p.: il.
2. World Health Organization - WHO. **Leishmaniasis** .2017
3. Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) e urbanização da leishmaniose visceral no Brasil. Cadernos de Saúde Pública 24: 2948-2952, 2008.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **SINAN. 2017.** Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LV-Casos.pdf>.
5. Brasil. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Brasília: Ministério da Saúde.120p.2006.
6. Carranza-Tamayo CO, Carvalho MSL, Bredt A, Bofil MIR, Rodrigues RMB, Silva AD, Cortez SMFC, Romero GAS. **Autochthonous visceral leishmaniasis**

- in **Brasília, Federal District, Brazil**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(4), 396-399, 2010.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)**. 2017. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-tegumentar-americana-lta>
 8. Brasília. Secretaria de Saúde do Distrito Federal. Informativo Epidemiológico Das Leishmanioses No Distrito Federal 2016. Disponível em : http://www.saude.df.gov.br/images/Informativos/2016/Informativo_Epidemiologico_das_Leishmanioses_no_DF_N_2_2016.pdf
 9. Shimabukuro PHF, Andrade AJ, Galati EAB. **Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution**. *ZooKeys*, 660: 67–106, 2017.
 10. Santos SO, Arias J, Ribeira AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. **Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis**. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 12, p. 315-317, 1998.
 11. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. **Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern**. *Medical and Veterinary Entomology*; 27(2): 123-147, 2013.
 12. Carvalho MES, Lustosa ES, Naves HAM. **Contribuição ao conhecimento da fauna flebotomínica do Estado de Goiás e Distrito Federal**. II. 1986-1987. *Revista de Patologia Tropical* 18:7-14, 1989.

13. Carvalho MS, Brecht A, Meneguim ER, Oliveira C. **Flebotomíneos (*Diptera: Psychodidae*) em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal, Brasil, 2006 a 2008.** Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde;19(3): 227-37, 2010
14. Rapello AM. **Ocorrência e infecção natural de flebotomíneos e pequenos mamíferos por Leishmaniose em matas de galeria do Distrito Federal, Brasil. 193p.** Tese de Doutorado em Medicina Tropical-UNB, Brasília ,2017.
15. Vilela ML, Rangel EF, Lainson R. **Métodos de coleta e preservação de flebotomíneos**, p.353-367. In E.F. Rangel & R. Lainson (org.), Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 368p, 2003.
16. Shannon R. **Methods for Collecting and Feeding Mosquitoes in Jungle Yellow Fever Studies.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene; 19: 131-140,1939.
17. Ribeiro JF, Walter BMT. **As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. In Cerrado: ecologia e flora** (S.M. Sano, S.P. Almeida & J.F. Ribeiro, eds.). Embrapa Cerrados, Planaltina, p.151 -212, 2008.
18. Rodrigues AAF, Barbosa VA, Andrade Filho JD, Brazil RP. **The sandfly fauna (*Diptera: Psychodidae: Phlebotominae*) of the Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; 108(7): 943-946, 2013
19. Alexander B. **Sampling methods for phlebotomine sandflies.** Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v.14, n. 2, p. 109-122, 2000.

20. Pérez J, Virgen A, Rojas JC, Rebollar-Tellez EAA, Castillo IF, Mikery O et al. **Species composition and seasonal abundance of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in coffee agroecosystems.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; 109(1): 80-86, 2014.
21. Vexenat JA. **Temperatura, um fator determinante na atividade de *Lutzomia whitmani* (Diptera, Psychodidae), Antunes e Coutinho (1939).** Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. Brasília, 1991.
22. Sampaio RNR, Gonçalves MC, Leite VA, França BV, Santos G, Carvalho MSL, Tauil PL. **Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 42, n. 6, p. 686-690, nov./dez. 2009.
23. Bastos TSA, Linhares GFC, Madrid DMC. **Identificação Morfológica De Flebotomíneos Capturados Em Área Urbana.** Ciência Animal Brasileira, 17(3), 395-401, 2016.
24. Brilhante AF, Nunes VLB, Kohatsu KA, Galati EABianchi, Rocca MEG, Ishikawa EAY. **Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) by Leishmania (Leishmania) amazonensis in an area of ecotourism in Central-Western Brazil.** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 21:39, 2015.
25. Galati EA, Nunes VL, Dorval ME, Oshiro ET, Cristaldo G, Espíndola MA, et al. **Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose**

- tegumentar no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.** Revista de Saúde Pública;30:115-28, 1996.
26. Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF. **Seasonality of Lutzomyia intermedia and Lutzomyia whitmani (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; 97:759-65, 2002.
27. Almeida, PS. **Distribuição geográfica das espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) na região Centro-Oeste, Brasil.** / Paulo Silva de Almeida. – Dourados, MS: UFGD, 164f. Dissertação (Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade), Dourados-MS, 2015.
28. Oliveira AG, Andrade FILHO JD, Flacão AL, Brazil RP. **Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000.** Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 933-944, 2003.
29. Azevedo ACR, Vilela ML, Souza NA, Andrade-Coelho CA, Barbosa AF, Firmino ALS, Rangel EF. **The sand fly fauna (Diptera, Psychodidae: Phlebotominae) of a focus of cutaneous leishmaniasis in Ilhéus, State of Bahia, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 91:75-79, 1996.
30. Azevedo ACR, Rangel EF. **A study of sandfly species (Diptera, Psychodidae; Phlebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in the municipality of**

- Baturité, Ceará, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 86:405-410, 1991.
31. Forattini OP. **Novas observações sobre a biologia de flebótomos em condições naturais (Diptera, Psychodidae).** Arquivo de Higiene e Saúde Pública; 25:209-15, 1960.
32. Lainson R, Shaw JJ. **Chapter 17. New World leishmaniasis.** In: Cox F. E. G., J. P. Kreier & D. Wakelin, eds. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Parasitology. Arnold, London, Sydney, Auckland; 313-349 p., 2005.
33. Lainson R, Braga RR, Souza AA, Pova MM, Ishikawa AY, Silveira FT. ***Leishmania (Viannia) shawi* sp. N., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil.** *Annales de Parasitologie Humane et Comparé*, 64:200-207, 1989.
34. Rebêlo, JMM. **Freqüência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae:Phlebotominae) na Ilha de São Luiz, Maranhão, Brasil.** *Cadernos de Saúde Pública* 1: 221- 227, 2001
35. Nunes VLB, Galati EAB, Cardozo C, Rocca MEG, Andrade ARO, Santos MFC et al. **Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área urbana do município de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil.** *Revista Brasileira de Entomologia*; São Paulo , v. 52, n. 3, p. 446-451, Sept. 2008.
36. Figueiredo HR, Santos MFC, Casaril AE, Infran JOM, Ribeiro LM, Fernandes CES, Oliveira AG. **Sand flies (Diptera:Psychodidae) in an endemic area of**

- leishmaniasis in Aquidauana municipality, Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil.** Revista do Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo;58:87,2016.
37. Ferreira TS, Minuzzi-Souza TTC, Andrade AJ, Coelho TO, Rocha DA, Obara MT, Hecht M, Nitz N, Gurgel-Gonçalves R. **Molecular detection of Trypanosoma sp. and Blastocrithidia sp. (Trypanosomatidae) in phlebotomine sand flies (Psychodidae) in the Federal District of Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 48(6), 776-779. 2015.
38. Neitzke HC, Scodro RBL, Castro KRR, Sversutti ACD, Silveira TGV, Teodoro U. **Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por Leishmania, no Estado do Paraná.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical;41(1):17-22, 2008.
39. Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, Britto CC. **Identifications of naturally infected Lutzomyia intermedia and Lutzomyia migonei with Leishmania (Viannia) braziliensis in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay.** Acta Trópica 99: 905-913, 2005.