

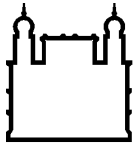
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ASPECTOS DA FAUNA FLEBOTOMÍNEA (DIPTERA: PSYCHODIDAE) E
DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* SPP. EM CÃES DOMÉSTICOS EM
UMA ÁREA DE ALTA INCIDÊNCIA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
EM RIO BRANCO, ACRE

MÁRCIA MOREIRA DE ÁVILA

Rio Branco
Março 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MÁRCIA MOREIRA DE ÁVILA

Aspectos da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) e da infecção por *Leishmania* spp. em cães domésticos em uma área de alta incidência de Leishmaniose Tegumentar em Rio Branco, Acre

Tese ou dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brasil

RIO BRANCO

Março de 2018

Ávila, Márcia Moreira de.

ASPECTOS DA FAUNA FLEBOTOMÍNEA (DIPTERA: PSYCHODIDAE) E DA INFECÇÃO POR LEISHMANIA SPP. EM CÃES DOMÉSTICOS EM UMA ÁREA DE ALTA INCIDÊNCIA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EM RIO BRANCO, ACRE / Márcia Moreira de Ávila. - Rio de janeiro, 2018.

100 f.

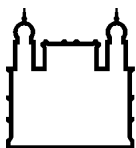
Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientador: Reginaldo Peçanha Brazil.

Bibliografia: f. 67-78

1. Leishmaniose. 2. Diagnóstico molecular. 3. Vetores. 4. Flebotomíneos.
5. Fonte alimentar. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MÁRCIA MOREIRA DE ÁVILA

**ASPECTOS DA FAUNA FLEBOTOMÍNEA (DIPTERA: PSYCHODIDAE) E DA
INFEÇÃO POR *LEISHMANIA* SPP. EM CÃES DOMÉSTICOS EM UMA ÁREA DE
ALTA INCIDÊNCIA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR (LT) EM RIO BRANCO,
ACRE**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brasil

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Elisa Cupolillo – Presidente (Instituto Oswaldo Cruz)

Prof. Dr. Gabriel Eduardo Ferreira (Fiocruz de Rondônia)

Prof. Dr. Jansen F. Medeiros (Fiocruz de Rondônia)

Prof. Dr. Dionatas O. Meneguetti (Universidade Federal do Acre)

Prof. Dr. Rita do Socorro U. da Silva (Universidade Federal do Acre)

Rio Branco, 01 de Março de 2018.

Dedico este trabalho aos meus queridos filhos Rafael, Ryan e Heitor...Tudo por vocês hoje e sempre, obrigada.

AGRADECIMENTOS

Agradecer Deus, nosso Senhor e Salvador, pela oportunidade à vida, a saúde, ao conforto, a fé e a esperança. Por ter traçado da melhor maneira possível meus passos ao longo dessa jornada e colocado pessoas para caminhar comigo ao longo desses quatro anos.

Agradecer a família, em especial minha querida mãe Eliete Moreira Lima, por sempre me incentivar, apoiar e ajudar nos momentos de maiores dificuldades, cuidando dos meus filhos e da minha vida.

Aos meus irmãos Mayara, Maurício e Cícero, pelo apoio, pela torcida de sempre. Agradecer aos meus amados filhos Rafael Kaíque, que comigo passou por todas as fases de estudo e conquistas ao longo das jornadas de Mestrado e Doutorado, sei que não foi fácil, mas acredite tudo foi para garantir sempre conhecimento e reconhecimento profissional e poder propiciar uma vida sempre melhor para você.

Ao meu amado e especial Ryan Arthur, que tão pequeno e com tantas dificuldades teve a ausência de sua mãe por várias vezes ao longo dessa caminhada, aí de nós senão fosse o Skype e whatsapp, que saudade era essa que nós consumíamos. Você sempre foi mais forte que eu... Amo você.

Ao meu pequeno Heitor, ainda no meu ventre e comigo já sentiu as angustias de uma vida corrida de doutorando no Rio de Janeiro, me acompanhou na última disciplina de Biologia Molecular e comigo estava nervoso no dia da qualificação. Ainda não te vi, mas já amo com todas as minhas forças e me sinto muito mais forte ao seu lado nesses momentos finais de doutorado. Ao meu amor Alain Matos, que me deu esse presente maravilhoso e comigo tem vivido esses ritos finais, com carinho, apoio e cuidado indispensáveis nesses momentos de ansiedade e stress. Enchendo de calma e pensamentos positivos de que tudo já deu certo.

Ao querido companheiro de longa data Arthur Alexandre, que não mediu esforços em me ajudar em casa, na criação das crianças e principalmente em todo trabalho de campo... Dirigindo, coletando as amostras, na logística e assumindo total o papel de mãe durante as longas viagens desse doutorado. Muito obrigada por tudo, esse trabalho também é seu.

Aos amigos queridos Andreia Brilhante e Cristian Souza que se despuseram a me ajudar, nas diversas etapas desse doutorado e ainda me conquistaram com amizade e com os melhores momentos dessa caminhada, regada de boas risadas, esperança e amor.

Ao querido Dr. Reginaldo Peçanha Brazil, meu orientador de segundo tempo, que me acolheu e me ajudou ao longo de todo trabalho e me ajudou a tornar realidade esse grande sonho.

A Dra. Eunice Galati, pelo conhecimento e pela coorientação durante todo trabalho de fauna, muito especial para mim.

Ao Instituto de Educação Ciência e Tecnologia do Acre-IFAC, pela oportunidade de capacitação visando um ensino pautado na qualidade e no diferencial para o nosso Estado.

A FIOCRUZ e IOC pelo apoio estrutural e financeiro para a realização desse trabalho mediante termo de Cooperação firmando com IFAC.

A banca pelas considerações ao trabalho final de tese e em especial ao Revisor Gabriel Eduardo Ferreira pela valiosa contribuição na correção da tese.

Aos amigos de jornada nesse Doutorado, juntos compartilhamos angústias, perdas de amigos queridos, momentos de alegrias. Esse foi nosso Doutorado IFAC-IOC, uma jornada e muitas emoções.

Muito Obrigada.

*Santo anjo do Senhor
Meu zeloso guardador.
Se a ti me confiou a piedade divina,
Sempre me regue,
Me guarde,
Me governe,
Me ilumine.
Amém...*

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Aspectos da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) e da infecção por *Leishmania* spp. em cães domésticos em uma área de alta incidência de Leishmaniose Tegumentar em Rio Branco, Acre

RESUMO

Os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) são insetos de importância médica pelo envolvimento no ciclo zoonótico de transmissão de *Leishmania* aos vertebrados. O objetivo deste trabalho foi estudar os aspectos ecológicos da fauna de flebotomíneos e da infecção por *Leishmania* nesses insetos e em cães domésticos, em áreas ambientes rurais e urbanos do município de Rio Branco, Estado do Acre. Para o estudo da fauna de flebotomíneos foram utilizadas armadilhas de Shannon e HP luminosa por 13 meses consecutivos (Dezembro de 2014 a Janeiro de 2016). Para investigação da infecção natural por *Leishmania* e fonte alimentar, amostras de DNA foram extraídas de fêmeas de flebotomíneos e submetidas à reação em cadeia polimerase (PCR) utilizando os iniciadores para as regiões ITS1 e *cyt b*; as espécies de *Leishmania* e fonte alimentar foram identificadas por blast. Um total, 2.517 indivíduos foram coletados, e 43 espécies foram identificadas. *Trichophoromyia auraensis* (839 – 33,35%), *Trichophoromyia* ssp. (537 – 21,35%) e *Evandromyia saulensis* (187 – 7,43%) foram as espécies mais abundantes. A riqueza de espécies foi maior no ambiente rural (S = 41 espécies) do que no parque urbano (S = 26 espécies), o ambiente florestal (43 espécies) foi mais rico do que o peridomicílio (28 espécies). Na análise comparativa da riqueza de espécies coletadas no ambiente peridomiciliar (rural) não apresentou diferença significativa (H= 0,04; p >0,05), porém com um número maior de espécies no ambiente rural (mata). DNA de *Leishmania* foi sequenciado de amplificação de treze amostras e a presença confirmada de *Leishmania* (*Vianna*) *braziliensis* em: *Trichophoromyia auraensis* – 1, *Evandromyia saulensis* - 2, *Evandromyia walkeri* - 2, *Psychodopygus llanosmartins* - 1, *Pintomyia nevesi* - 2, *Psychodopygus davisi* - 1, *Psychodopygus ayrozai* - 1, *Psathyromyia aragaoi* - 1, *Nyssomyia antunesi* - 1, *Evandromyia infraspinoso* – 1. Apenas uma amostra de *Psychodopygus ayrozai* foi similar à sequência de *Leishmania* (*Vianna*) *guyanensis*. Na análise microscópica, cinco espécies de *Evandromyia saulensis* apresentaram formas flageladas no intestino posterior, sugestivas a infecção por *Leishmania* e a taxa de infecção foi de 2,4%. Um total de 33 fêmeas ingurgitadas foi submetido à amplificação do gene *cyt b*. Após o sequenciamento todas as amostras foram similares à sequência depositada no GenBank da espécie *Gallus gallus*. No diagnóstico da infecção canina por *Leishmania* foram coletadas amostras de sangue periférico de 55 animais, para análise microscópica através de esfregaços em lâminas coradas com Giemsa e por PCR avaliando uma região do ITS1. As lâminas de esfregaço do sangue periférico dos cães não apresentaram nenhuma forma sugestiva de *Leishmania*, contudo foi evidenciada a presença de alguns hemoparasitas. O DNA de *Leishmania* ssp. foi amplificado em três amostras de sangue periférico, para posterior sequenciamento e identificação da espécie. Com os dados obtidos nesse estudo foi possível ampliar o conhecimento do ciclo da LT em Rio Branco e fornecer informações acerca dos aspectos ecológicos, fonte alimentar dos flebotomíneos e ciclo de transmissão do parasita na região.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Aspects of the phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and of the infection by *Leishmania* spp. in domestic dogs in an area of high incidence of Cutaneous Leishmaniasis in Rio Branco, Acre

ABSTRACT

Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) are insects of medical importance due to their involvement in the zoonotic cycle of transmission of *Leishmania* to vertebrates. The objective of this work was to study the ecological aspects of sandfly fauna and *Leishmania* infection in these insects and in domestic dogs, in rural and urban environments of the municipality of Rio Branco, State of Acre. For the study of sandfly fauna, Shannon and HP luminous traps were used for 13 consecutive months (December 2014 to January 2016). To investigate the natural infection by *Leishmania* and food source, DNA samples were extracted from females of sandflies and submitted to the polymerase chain reaction (PCR) using the primers for the ITS1 and *cyt b* regions; *Leishmania* species and food source were identified by blast. A total of 2,517 individuals were collected, and 43 species were identified. *Trichophoromyia auraensis* (839-33.35%), *Trichophoromyia* ssp. (537 - 21.35%) and *Evandromyia saulensis* (187 - 7.43%) were the most abundant species. The species richness was higher in the rural environment (S = 41 species) than in the urban park (S = 26 species), the forest environment (43 species) was richer than the peridomicile (28 species). In the comparative analysis of the richness of species collected in the peridomiciliary (rural) environment, there was no significant difference (H = 0.04, p > 0.05), but with a larger number of species in the rural environment (forest). *Leishmania* DNA was sequenced with amplification of thirteen samples and the confirmed presence of *Leishmania* (*Vianna*) *braziliensis* in: *Trichophoromyia auraensis* - 1, *Evandromyia saulensis* - 2, *Evandromyia walkeri* - 2, *Psychodopygus llanosmartinsi* - 1, *Pintomyia nevesi* - 2, *Psychodopygus davisi* - 1, *Psychodopygus ayrozai* - 1, *Psathyromyia aragaoi* - 1, *Nyssomyia antunesi* - 1, *Evandromyia infraspina* - 1. Only one sample of *Psychodopygus ayrozai* was similar to the *Leishmania* (*Vianna*) *guyanensis* sequence. In the microscopic analysis, five species of *Evandromyia saulensis* showed flagellate forms in the posterior intestine, suggestive of *Leishmania* infection and the infection rate was 2.4%. A total of 33 engorged females were submitted to *cyt b* gene amplification. After sequencing all the samples were similar to the sequence deposited on GenBank of *Gallus gallus* species. In the diagnosis of canine infection by *Leishmania*, peripheral blood samples from 55 animals were collected for microscopic analysis by smears on Giemsa stained slides and by PCR evaluating an ITS1 region. The smear blades of the peripheral blood of the dogs did not present any form suggestive of *Leishmania*, however was evidenced the presence of some hemoparasites. The DNA of *Leishmania* ssp. was amplified in three samples of peripheral blood, for later sequencing and identification of the species. With the data obtained in this study, it was possible to increase the knowledge of the LT cycle in Rio Branco and to provide information about the ecological aspects, feeding source of sandflies and the transmission cycle of the parasite in the region.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxonomia de espécies	21
Figura 2. Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp.....	23
Figura 3. (A) Município de Rio Branco no estado do Acre, BR (B) Localização aproximada dos pontos de coleta de flebotomíneos no parque urbano (1 e 2 = parque Horto Florestal) e rural (3 e 5 = assentamento Dom Joaquim 5 e 6 = ramal do Riozinho), município de Rio Branco Acre, Brasil.....	33
Figura 4. Localização aproximada dos pontos de estudo.....	34
Figura 5. Registro fotográfico do inquérito canino. A: avaliação clínica do cão. B: esfregaço com sangue canino. C: Biópsia D: cão com lesão no escroto.....	35
Figura 6. Armadilha tipo Shannon localizada em área de mata, Projeto de assentamento Dom Joaquim, município de Rio Branco, Acre, Brasil.....	37
Figura 7. Local de instalação da armadilha luminosa do tipo HP em área peridomiciliar (galinheiro), município de Rio Branco, Estado do Acre, Brasil.....	38
Figura 8. Local de instalação da armadilha luminosa do tipo HP em área florestal, Município de Rio Branco, Estado do Acre, Brasil.....	38
Figura 9. Curva de Abundância de espécies de flebotomíneos coletados em ambiente rural e parque urbano, no período de Dezembro de 2014 a Janeiro de 2016, no município de Rio Branco, Estado do Acre, Brasil.....	46
Figuras 10. Espécies de <i>Sciopemyia vattierae</i> coletadas em Rio Branco, Estado Acre, Brasil.....	50
Figura 11. PCR-ITS1 - Gel de agarose 2%, corado com GelRed mostrando o produto da amplificação da PCR-ITS1 do DNA extraído de fêmeas de flebotomíneos, coletadas no município de Rio Branco, Acre.....	51
Figura 12. PCR- cyt b - Gel de agarose 2% corado com GelRed mostrando o produto da amplificação da PCR- cyt b do DNA extraído de fêmeas de flebotomíneos coletados no município de Rio Branco, Acre.....	54
Figura 13. Lâmina com Mórula de <i>Ehrlichia</i> sp.....	55
Figura 14. Lâmina com Corpúsculo de Lentz.....	55
Figura 15. Lâmina com <i>Anaplasma platys</i>.....	55

Figura 16. Lâmina com Microfilária.....	55
Figura 17. Lâmina com forma semelhante a <i>Anaplasma phagocytophilum</i>.....	56
Figura 18. Lâmina com Neutrófilo Tóxico.....	56
Figura 19. PCR-ITS1 - Gel de agarose 2%, corado com GelRed mostrando o produto da amplificação da PCR-ITS1 do DNA extraído de sangue de cães coletadas no município de Rio Branco, Acre.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Leishmania</i> responsáveis pelas leishmanioses nas Américas, vetores e formas clínicas das leishmanioses.....	19
Tabela 2. Casos confirmados de leishmaniose tegumentar (LT), notificados no SINAN, Brasil, 2007-2015.....	28
Tabela 3. Casos confirmados de leishmaniose tegumentar (LT), notificados no SINAN, segundo Região de Notificação, Brasil, 2007-2015.....	28
Tabela 4. Pontos de coleta de flebotomíneos, coordenadas geográficas e tipo de armadilhas, município de Rio Branco, Acre.....	36
Tabela 5. Número de espécies de flebotomíneos coletados com armadilhas luminosas do tipo HP e Shannon.....	45
Tabela 6. Número de espécies coletados e índices de diversidade de flebotomíneos em ambientes distintos coletados, município de Rio Branco, Acre.....	47
Tabela 7. Abundância de flebotomíneos coletados em armadilha HP e médias mensais de temperatura (° C), humidade (%) e precipitação (mm) de dezembro de 2014 a janeiro de 2016, em Rio Branco, Acre, Brasil.....	49
Tabela 8. Resultados da identificação de espécies de <i>Leishmania</i> para os principais <i>hits</i> obtidos após análise no Blast.....	52
Tabela 9. Achados microscópicos de amostras sanguíneas de cães residentes em áreas de alta incidência de LT humana no município de Rio Branco, Acre.	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

BHI - Brain Heart Infusion

BOD - Demanda bioquímica de oxigênio

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CEUA - Comitê de Ética de Uso Animal

cm – Centímetro

COI - citocromo oxidase I

***cyt b* - citocromo B**

DATASUS - Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA - Ensaio imunoenzimático

HSP – em português: Proteínas de choque térmico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia Estatística

ITS – em português – espaçador interno transcrito

kDNA – em português: DNA do cinetoplasto

Km² - Quilometro quadrado

LB - Luria-Bertani

LED - *Light emitting diode*

LMC - Leishmaniose mucocutânea

LT - Leishmaniose tegumentar

LV -Leishmaniose visceral

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

NNN - Neal, Novy e Nicolle

OMS - Organização Mundial de Saúde

Pb – pares de bases

PNOC - prepronoci-ceptina

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RFLP - em português: Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição

RNA – em português: ácido ribonucleico

rpm - Rotação por minuto

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SSU rDNA - Small subunit Ribossomal RNA

U – unidades

μL – Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	
1.1 Considerações das leishmanioses.....	17
1.2 Agente etiológico das leishmanioses.....	17
1.3 Ciclo Biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	22
1.4 Detecção molecular de <i>Leishmania</i> spp.....	23
1.5 Os flebotomíneos.....	24
1.6 Hábitos alimentares dos flebotomíneos.....	26
1.7 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar – LT.....	27
1.8 Leishmanioses e flebotomíneos no Acre.....	29
1.9 Justificativa.....	31
2 OBJETIVOS	
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivos Específicos.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Área de estudo.....	33
3.2 Coleta e inquérito canino.....	34
3.2.1 Testes parasitológicos.....	35
3.3 Estudos dos flebotomíneos.....	36
3.3.1 Pontos de coleta dos flebotomíneos.....	36
3.4 Técnicas de coleta.....	37
3.4.1 Coletas com armadilha de Shannon.....	37
3.4.2 Coletas com armadilhas luminosas tipo HP.....	38
3.5 Análise da fauna flebotomínea.....	35
3.6 Processamento, identificação e estudo da infecção natural.....	40
3.7 Ensaio molecular para detecção de <i>Leishmania</i> spp.....	40
3.7.1 Extração de DNA.....	40
3.7.2 Condições da PCR.....	41
3.7.3 Clonagem.....	42
3.8 Estudo da fonte alimentar e condições da PCR.....	43
3.9 Sequenciamento e alinhamento.....	43
3.10 Considerações éticas.....	44
4 RESULTADOS	
4.1 Levantamento faunístico e aspectos ecológicos da fauna flebotomínea.....	45
4.2 Ocorrência de nova espécie.....	49
4.3 Diagnóstico de infecção de <i>Leishmania</i> spp. em flebotomíneos.....	50
4.4 Estudo da fonte alimentar em fêmeas flebotomíneos.....	54
4.5 Detecção de infecção natural por <i>Leishmania</i> spp. em cães.....	54
5 DISCUSSÃO	58

6 CONCLUSÕES	65
7 REFERÊNCIAS	67
8 ARTIGOS PUBLICADOS/ACEITOS OU SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO DURANTE O DOUTORADO (ANEXOS)	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações das leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças zoonóticas de transmissão vetorial, de grande importância clínica e diversidade epidemiológica. É uma doença infecciosa, porém, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, que vivem parte do seu ciclo e se multiplicam no interior das células que fazem parte do sistema de defesa mononuclear dos hospedeiros vertebrados. A transmissão é feita por insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (Brasil, 2014; Lessa, 2007; Gontijo e Carvalho, 2003).

Cerca de 12 milhões de pessoas são consideradas atualmente infectadas, de 1-2 milhões de novos casos ocorrendo a cada ano, as leishmanioses são consideradas um problema de saúde pública (WHO, 2017). As formas clínicas específicas da doença podem ser cutânea, mucocutânea ou visceral, e de gravidade variável. Sendo, a leishmaniose tegumentar (LT) a forma com maior número de casos notificados, com uma estimativa de 1,5 milhões de novos casos por ano, podendo ser causada por *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani*, *Leishmania braziliensis* (WHO, 2012).

No Brasil, a LT tem sido notificada em todos os estados, com uma adaptação dos parasitas e seus vetores a ambientes antropizados, com possíveis interferências na dinâmica populacional dos flebotomíneos (Patz et al., 2000, Ptney, 2001; Molineux, 2006), e uma migração desses ao ambiente domiciliar, exposto a remanescentes florestais (Silva & Muniz, 2009; Ximenes et al., 2007). O Brasil se destaca na transmissão de espécies de *Leishmania*, pela ampla diversidade de insetos vetores em seu território (Gontijo e Carvalho, 2003; Young & Duncan, 1994).

De acordo com os dados do Ministério da Saúde do Brasil, até o ano de 2015 foram notificados mais de 200 mil casos de leishmaniose tegumentar no país, dos quais 85.933 na região Norte (Ministério da Saúde, 2017), mostrando um endemismo para a região.

1.2 Agente etiológico das leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas por parasitas intracelulares que se multiplicam no sistema fagócito mononuclear dos hospedeiros vertebrados. Esses microrganismos foram taxonomicamente alocados no grupo dos protozoários eucariontes e classificados na Classe Kinetoplastea, Ordem

Trypanossomatida, Família Trypanosomatidae, Gênero *Leishmania*, divididos nos Subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (Lainson & Shaw, 1987; Gontijo & Melo, 2004; Moreira et al., 2004, Adl et al., 2012). Nesses protozoários heteroxênicos seu ciclo de vida tem a participação de um hospedeiro definitivo, um mamífero e um hospedeiro intermediário, o flebotomíneo (Forattini 1973; Gontijo & Carvalho, 2003).

O gênero *Leishmania* apresenta diferentes espécies que causam uma variedade de manifestações clínicas no homem, incluindo desde a forma visceral a lesões cutâneas que podem evoluir para formas metastáticas de infecção orofaríngea, com gravidade clínica dependendo da resposta imunológica do hospedeiro e da espécie de parasito envolvido na infecção. (WHO, 2010; Goto & Lindoso, 2010; Cupolillo et al., 2014).

Cerca de trinta espécies de *Leishmania* que infectam vertebrados são conhecidas, agrupadas e classificadas em cinco subgêneros (*Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania*, *complexo Leishmania enriettii* e *Paraleishmania*) (**Figura 1**). O sistema de classificação apresentando por Lainson & Shaw em 1987 dividiu o gênero *Leishmania* em subgênero *Leishmania*, espécies que se desenvolvem em vetores naturais na porção média e intestino anterior inseto (seção suprapilaria), enquanto as espécies do subgênero *Viannia*, desenvolvem-se nas partes anterior e média, como no intestino posterior dos flebotomíneos (seção peripilaria) (Lainson & Shaw, 1987; Lainson, 2010; WHO 2010; Cupolillo et al., 2014, Akhoundi et al., 2016).

A identificação de *Leishmania* no nível de gênero, na década de noventa foi baseada em critérios clínicos, relação com vetores e distribuição geográfica. Estudos baseados em técnicas moleculares permitiram a identificação de espécies de *Leishmania* circulantes de forma mais precisa (WHO, 2010; Cupolillo 2014). Como a técnica de isoenzima, por comparação com as cepas de referência (Rioux et al., 1990), a análise por marcadores moleculares, análise da sequência do gene de mini-exon (Fernandes et al., 1994), análise dos perfis de restrição (RFLP) dos espaçadores internos do gene ribossômico sub-unidade menor (SSU rRNA) (Cupolillo et al., 2000). Pita-Pereira et al. (2012), demonstraram o potencial de aplicação da análise de uma região conservada dos minicírculos de *kDNA* para diferenciar entre subgêneros de *Leishmania* por PCR em tempo real, contudo o alvo *kDNA* não possibilita a identificação em nível de espécies. Dessa forma, estudos complementares feitos por Graça et al. (2012) com PCR-*kDNA* utilizando um fragmento de 234 pb do gene *hsp70* de *Leishmania*. Segundo Zampiere et al. (2016), utilizando o alvo *hsp70* a partir de desenhos de fragmentos internos menores (144 e 104 pb), acoplou-se a PCR em tempo real para explorar regiões polimórficas por meio da análise de High Resolution Melting (HRM) para a distinção entre espécies de *Leishmania*.

Aplicações moleculares na taxonomia têm sido utilizadas para contribuir com o sistema de classificação atual de *Leishmania* que apontam relações filogenéticas usadas para organizar os parasitos em dois grupos *Euleishmania*, incluem todas as espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, e *Paraleishmania* que compreende espécies que não podem ser classificadas naqueles subgêneros e que são filogeneticamente semelhantes ao gênero *Endotrypanum* (família Trypanosomatídea) (Cupolillo et al., 2000; 2014; Schönian, 2010; Akhouni et al., 2016).

Nas Américas, como agentes causais das formas cutâneas e mucocutâneas das leishmanioses estão envolvidas pelo menos 13 espécies de *Leishmania* distribuídas, quatro pertencente ao subgênero *Leishmania* e nove ao subgênero *Viannia* (**Tabela 1**). No entanto, no Brasil, foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e um do subgênero *Leishmania* e há um número variável de vetores incriminados, com alguns deles participando do ciclo de transmissão de diferentes *Leishmania*. (Brazil et al., 2015) (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de *Leishmania* responsáveis pelas leishmanioses nas Américas, vetores e formas clínicas.

<i>Leishmania</i> spp.	Distribuição geográfica	Formas Clínicas	Vetores
<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	América do Sul e Central	Visceral	<i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Lutzomyia cruzi</i> , <i>Lutzomyia evansi</i>
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	América do Sul e Central	Cutânea e Mucocutânea	<i>Nissomyia intermedia</i> , <i>Nissomyia neivai</i> , <i>Nissomyia whitmani</i> , <i>Migonemyia migonei</i> , <i>Psychodopygus wellcomei</i> , <i>Psychodopygus complexus</i>
<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	Norte do Brasil, Guiana Francesa e Suriname	Cutânea e Mucocutânea	<i>Nissomyia umbratilis</i>
<i>Leishmania (Viannia) panamensis</i>	Norte da América do Sul e América do Sul	Cutânea	<i>Nissomyia trapidoi</i> , <i>Nissomyia ylephiletor</i> , <i>Lutzomyia gomezi</i> , <i>Psychodopygus panamensis</i>
<i>Leishmania (Viannia) peruviana</i>	Peru	Cutânea	<i>Lutzomyia peruensis</i> , <i>Lutzomyia verrucarum</i>
<i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i>	Norte do Brasil, Bolívia e Peru	Cutânea	<i>Trichophoromyia ubiquitalis</i> , <i>Lutzomyia nuneztovari</i> , <i>Trichophoromyia velascoi</i>

<i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>naiff</i>	Norte do Brasil e Guiana Francesa	Cutânea	<i>Psychodopygus ayrozai</i>
<i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>shawi</i>	Norte do Brasil	Cutânea	<i>Nyssomyia whitmani</i>
<i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>colombiensis</i>	Colômbia e Panamá	Cutânea	<i>Lutzomyia hartmanni</i> , <i>Lutzomyia gomezi</i> , <i>Psychodopygus panamensis</i>
<i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>lindenbergi</i>	Norte do Brasil	Cutânea	<i>Nyssomyia antunesi</i>
<i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) <i>amazonensis</i>	América do Sul e América Central	Cutânea/difusa	<i>Bichromomyia flaviscutellata</i> , <i>Pintomyia</i> <i>nuneztovari</i>
<i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) <i>mexicana</i>	Sul dos Estados Unidos, México e América Central	Cutânea/difusa	<i>Bichromomyia olmeca olmeca</i>
<i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) <i>venezuelensis</i>	Venezuela	Cutânea	<i>Bichromomyia olmeca bicolor</i>

(Fonte: Brazil et al., 2015).

A relação reservatório e *Leishmania* é um sistema complexo e dinâmico onde inclui o homem/ ou animal doméstico, o parasito, o vetor e o animal reservatório dentro de um determinado ambiente. O parasito das leishmanioses já foi isolado de diferentes animais, como roedores e marsupiais, sugerindo esses como possíveis reservatórios primários (Arias et al., 1981; Brandão-Filho et al., 2003). Alguns animais domésticos, como cães, têm sido encontrados parasitados com *L. (V.) braziliensis* (Madeira et al., 2005; Castro et al., 2007; Brilhante et al., 2016), porém, ainda não está claro qual o papel desses animais no ciclo de transmissão desse parasito, se são hospedeiros acidentais ou reservatórios secundários.

Alguns estudos indicam que cães infectados por *L. (V.) braziliensis* não são bons reservatórios desse parasito (Madeira et al., 2005, 2006; Castro et al., 2007) sendo, assim como os seres humanos, hospedeiros acidentais nos ciclos de transmissão no ambiente silvestre. Todavia, em áreas endêmicas de leishmaniose visceral os cães podem ter papel importante no ciclo de transmissão intra e peridomicilar, possivelmente atuando como atrativos de vetores pela oferta alimentar (Dantas-Torres, 2007).

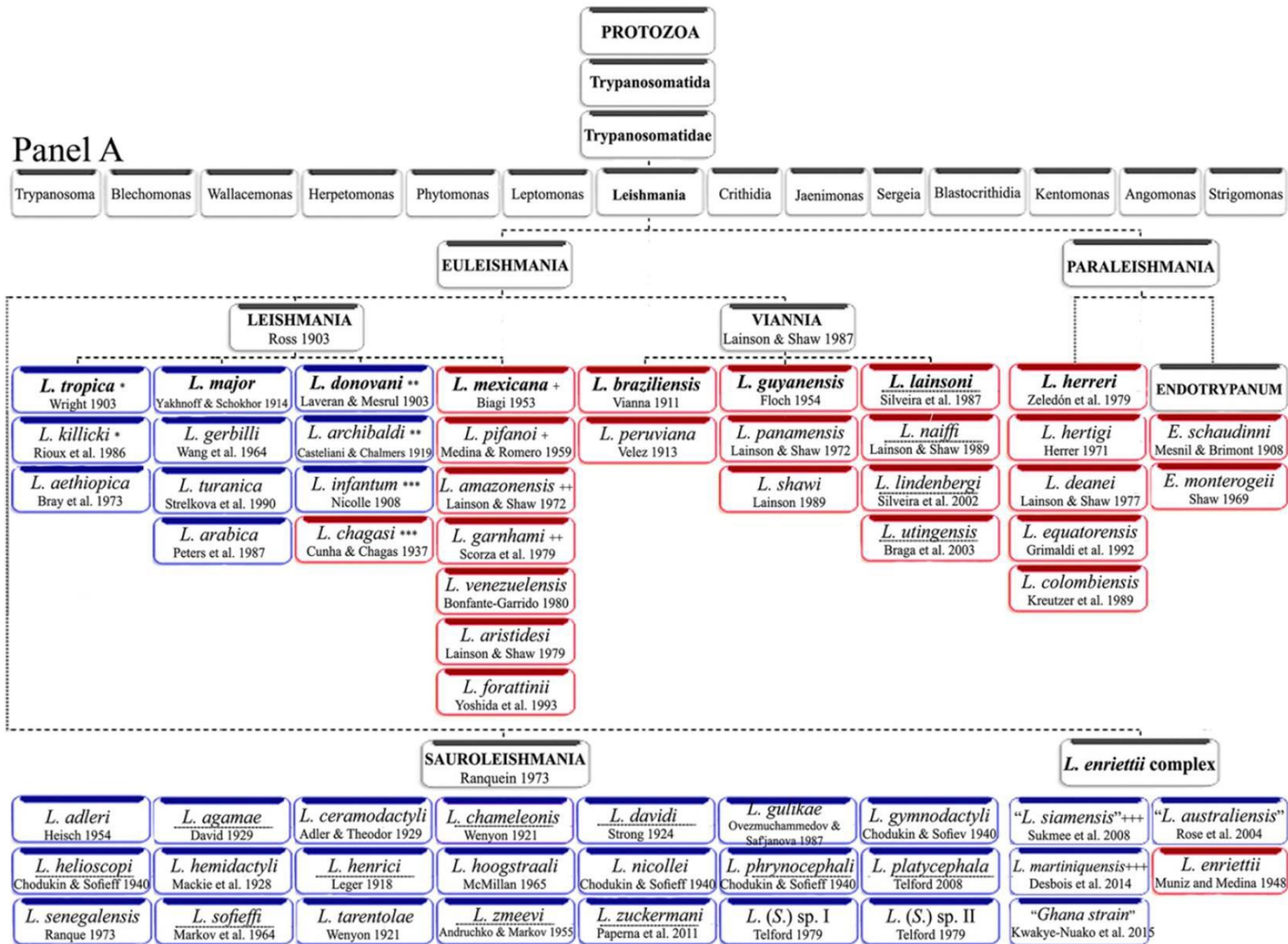


Figura 1. Taxonomia de espécies *Leishmania*. Azul: espécies do velho mundo; vermelho: espécies do novo mundo (Akhoundi et al., 2016).

1.3 Ciclo Biológico da *Leishmania* spp.

No ciclo biológico das Leishmanioses, os flebotomíneos são a ligação entre os reservatórios e o homem (**Figura 2**). Nesse ciclo epidemiológico o homem é hospedeiro acidental de *Leishmania* spp., e embora não ter um papel importante na transmissão do parasito em algumas regiões pode influenciar, em virtude da transmissão das *Leishmania* variar de acordo com a região geográfica, envolvendo uma diversidade de espécies de parasitos, vetores, reservatórios e hospedeiros diferentes (Brasil, 2010).

A transmissão do parasito acontece durante o repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos que necessitam de alimentação sanguínea para maturação dos ovos. Ao se alimentarem do sangue de hospedeiros vertebrados, as fêmeas ingerem, juntamente com o sangue, macrófagos e monócitos parasitados pelas formas amastigotas. No aparelho digestivo as formas amastigotas ingeridas se diferenciam em promastigotas procíclicos não infectivas e se multiplicam no intestino do inseto.

Durante a metaciclogênese, o parasito desprende do epitélio e migra para o pró-ventrículo do inseto, na forma de promastigotas metacíclicas infectivas. As promastigotas metacíclicas migram para a probóscide e são regurgitadas para o hospedeiro vertebrado durante um novo repasto sanguíneo do inseto vetor. No local da picada, as formas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos presentes na derme. Nessas células, os parasitos ficam no vacúolo parasitóforo, se transformam em formas amastigotas, capazes de resistir aos mecanismos de defesa celular e multiplicar-se, levando ao rompimento celular, que levam os parasitos liberados a infectar células adjacentes (**Figura 2**) (CDC, 2017, Rey, 2001; Nieves e Pimenta, 2000; Lainson & Shaw, 2005; Stuart et al., 2008; Lamour et al., 2012).

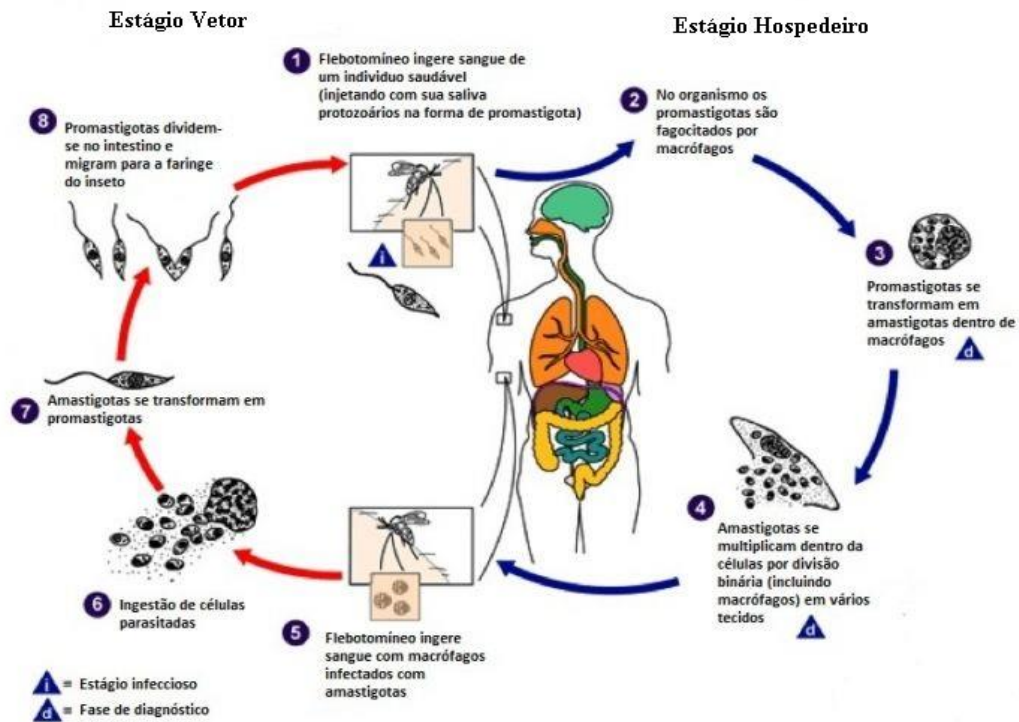


Figura 2. Ciclo de vida da *Leishmania* spp. (Fonte: www.dpd.cdc.gov/dpdx – Adaptado)

1.4 Detecção molecular de *Leishmania* spp.

O diagnóstico da leishmaniose é baseado em aspectos clínicos e laboratoriais, relação com vetores, aspectos epidemiológicos e distribuição geográfica (Cupolillo, 2005; Zampieri et al., 2016). Além do diagnóstico laboratorial necessário para confirmar a suspeita clínica, diversas técnicas têm sido propostas para auxiliar no diagnóstico das leishmanioses (Marques et al., 2001; Disch et al., 2005, Cupolillo, 2005). Essas técnicas que podem apresentar uma alta sensibilidade e especificidade e com o fato de que pode ser aplicada diretamente a amostras, com a possibilidade de amplificação de sequências de DNA do parasito (Volpini et al., 2004; Marcussi et al., 2008).

A PCR é uma técnica de amplificação de DNA, que trouxe inovação nos estudos sobre o parasito em vetores e hospedeiros, podendo detectar uma única cópia de DNA numa amostra em pequenas quantidades. A técnica baseia-se em uma reação enzimática, onde regiões alvo do DNA são amplificadas em milhares de cópias em ciclos automatizados. Tanto a PCR convencional quanto a PCR em tempo real (qPCR) têm apresentado alta sensibilidade na detecção de DNA e kDNA de *Leishmania* em diferentes amostras de pacientes (Ferreira et al., 2007; Pita-Pereira et al., 2012).

Nesse sentido regiões conservadas do DNA mitocondrial, os minicírculos, têm sido utilizadas como alvo para amplificação de DNA e detecção molecular de *Leishmania* visto que o *kDNA* corresponde a 30% do DNA total da célula sendo então um bom alvo para o diagnóstico molecular pois estão representadas em grande número de cópias no cinetoplasto, em cerca de 10.000 - 15.000 cópias por rede e representam bons marcadores moleculares para diagnóstico *kDNA* (Degraeve et al., 1994; Ferreira et al., 2007;).

Alguns alvos são empregados em estudos voltados para a identificação espécie de *Leishmania*, baseados em análises de sequências repetitivas do genoma nuclear e mitocondrial tem mostrado grande heterogeneidade dentro do gênero *Leishmania*, sendo alvos específicos para identificação de parasitos (Simpson, 1987; Schönian et al., 2010).

Dentre os marcadores moleculares utilizados, destacamos o gene codificante para RNA ribossômico (rDNA), pela análise da subunidade menor (SSU), baseando-se na diversidade genética que incluem amplificação das regiões espaçadoras (ITS 1 e 2), seguido de digestão com enzimas de restrição, um método denominado PCR-RFLP (análise dos perfis de restrição). O potencial das regiões espaçadoras transcritas (ITS 1 e 2), em experimentos moleculares tem potencial para distinguir as espécies do subgênero *Viannia* (Cupolillo et al., 1995; Volpini et al., 2004).

Diferentes metodologias baseadas em alvos gênicos com sequências repetitivas presentes no núcleo tem permitido a distinção entre gêneros e espécies de *Leishmania*. Dentre esses marcadores destacamos, os microssatélites, DNA do cinetoplasto (*kDNA*), *gp63*, *hsp70*, miniexon e b-tubulina, têm sido propostas para detecção e tipagem de parasitos (Barker, 1989; Grimaldi Júnior & Tehs, 1993; Fernandes et al., 1994; Tavares et al., 2003).

Os avanços em experimentos moleculares permitiram o diagnóstico em casos de doenças subclínicas ou com baixa parasitemia contribuindo para o acompanhamento do tratamento e avaliação mais precisa da prevalência das leishmanioses em regiões endêmicas. As técnicas moleculares tornaram-se uma ferramenta importante para o diagnóstico de infecções e na tomada decisão na resposta terapêutica (Goto & Lindoso, 2010).

1.5 Os flebotomíneos

Os flebotomíneos recebem diversas denominações populares, como mosquito palha, devido sua coloração; tatuquira, por se abrigarem em tocas de tatus, “asa branca”, “asa dura”, porque as permanecem levantadas na posição de pouso ; “arrepinado”, por possuírem o corpo piloso; “pula-pula”, por ficarem saltitando nos locais de pouso (Forattini, 1983).

Os flebotomíneos são insetos pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (Young & Duncan, 1994). A subfamília Phlebotominae passou por diversas modificações taxonômicas e Galati, no ano de 1995, baseada nos estudos de filogenia do grupo, com ênfase para os flebotomíneos da América, que elevou a gênero os subgêneros propostos na taxonomia de Young & Duncan (1994) empregados anteriormente.

Segundo a classificação de Galati (2003), os flebotomíneos americanos são divididos em 23 gêneros; os vetores de *Leishmania* estão distribuídos principalmente em sete deles: *Bichromomyia*, *Lutzomyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Psychodopygus*, e *Trichophoromyia*.

Esses insetos possuem ampla distribuição geográfica, sendo conhecidas aproximadamente 1.000 espécies, 530 delas encontradas no Novo Mundo. Dessas, cerca de 56 espécies são consideradas vetores de agentes etiológicos de leishmanioses nas Américas. No Brasil, em termos de riqueza de espécies, a fauna de flebotomíneos da Amazônia é considerada umas das mais diversas do mundo (Maroli et al., 2012; Brazil et al., 2015; Galati, 2016).

Esses dípteros são insetos de pequeno porte com 1 a 3 mm de comprimento, holometábolos, de coloração castanho claro e apresentam grande pilosidade no corpo. Para identificação de machos e fêmeas são consideradas estruturas internas e externas que resistem ao processo de clarificação e permitem a identificação da espécie. Geralmente, para a identificação de fêmeas são considerados os seguintes caracteres, coloração do tórax dentes do cibário e espermateca, enquanto que nos machos, a coloração do tórax e genitália são os principais caracteres (Galati, 2017).

A duração de cada estágio de vida varia de acordo com diferentes espécies, com as condições ambientais, alimentares a quem são expostos. Sendo que as formas imaturas são terrestres, e necessitam de abrigos ricos em matéria orgânica em decomposição e alta umidade para seu desenvolvimento (Young e Duncan, 1994; Brazil & Brazil, 2003).

As formas adultas podem viver em diferentes habitats como abrigos e tocas de animais, troncos de árvores e serapilheira. No ambiente peridoméstico, esses insetos estão associados aos criadouros animais devido à oferta de fonte alimentar (Aguiar & Vilela, 1987; Brazil & Brazil, 2003; Galati et al., 2003). Os flebotomíneos adultos, tanto machos quanto as fêmeas necessitam de açúcares como fonte energética, porém somente a fêmea é hematófaga e alimenta-se de sangue para o desenvolvimento ovariano. A oviposição ocorre cerca de cinco a sete dias após o repasto sanguíneo. (Brazil & Brazil, 2003; Forattini, 1983).

1.6 Hábitos alimentares dos flebotomíneos

O hábito alimentar de flebotomíneos tem sido estudado por conta do envolvimento das fêmeas na transmissão de leishmanioses ao homem que necessitam do sangue para a maturação dos ovários (Oliveira-Pereira et al., 2008). Ao realizar a hematofagia as fêmeas podem transmitir protozoários do gênero *Leishmania*. O estudo do padrão alimentar dos flebotomíneos, com repasto sanguíneo em diversos hospedeiros de acordo com sua afinidade por determinadas fontes alimentares, têm sido útil no esclarecimento da epidemiologia das leishmanioses, e pode auxiliar as atividades de controle e vigilância dessa doença (Muniz et al., 2006).

Desde a década de 90 a métodos imunológicos (métodos de precipitação, imunoenzimáticos) e outros (cristalização da hemoglobina, cortes histológicos, PCR) vem sendo utilizados para a identificação de fontes de alimentação desses insetos (Marassá et al., 2004; Dias et al., 2003; Afonso et al., 2012), contudo técnicas imunológicas requer grande quantidade de sangue, além de possuir baixa sensibilidade e baixa especificidade (Sant'anna et al., 2008; Maleski-Ravasan et al., 2009). Técnicas sorológicas como ELISA, foram adaptadas ao estudo de hábito alimentar, tornando-se uma alternativa (Blackwell et al., 1995; Gomes et al., 2001), todavia esses métodos estão sendo substituídos por ferramentas moleculares de maior precisão, como a PCR (Haous et al., 2007; Jaouadi et al., 2013; Steuber et al., 2005; Sant'anna et al., 2008). Desse modo, diferentes alvos moleculares têm sido empregados para identificar a origem do repasto sanguíneo de insetos vetores, tais como, citocromo b (*cty b*), citocromo oxidase I (*COI*) e prepronoci-ceptina (*PNO*) (Kocher et al., 1989; Haous et al., 2007; Abassi et al., 2009; González et al., 2015; Azizi et al., 2016;). O sequenciamento do DNA dos fragmentos amplificados é um dos mecanismos utilizados para estudo da fonte alimentar dos flebotomíneos e de outros vetores hematófagos (Kirstein & Gray, 1996; Danabalan et al., 2014). Outra técnica alternativa utilizada é a PCR seguida pelo corte com enzimas de restrição (PCR-RFLP) que tem demonstrado ser uma análise confiável para estudar as fontes alimentares em mosquitos, moscas tsé-tsé e flebotomíneos (Steuer et al., 2005; Maleski-Ravasan et al., 2009; Quaresma et al., 2012; Jiménez et al., 2013, 2014; Soares et al., 2014; González et al., 2015; Azizi et al., 2016).

Entendendo melhor a oferta alimentar existente, desses dípteros hematófagos quando esses se encontram em diversos ambientes, além de conhecer reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão da doença é de fundamental importância nas tomadas de decisões para controle das leishmanioses (Bheham & Garret-Jones 1973, Duarte 1997; Oliveira-Pereira et al., 2008).

2003, foi confirmada a autoctonia em todos os estados brasileiros. A partir do indicador da densidade de casos, houve identificação, no período de 2009 a 2011, de 20 circuitos ativos de produção da doença de importância epidemiológica, os quais foram responsáveis por 48,5% do total de casos registrados em 2011, distribuídos em 477 municípios do total de 1.792 que apresentaram casos em todo o país (Brasil, 2017).

Mais recentemente, segundo dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde, no período de 2007 a 2015, foram notificados no Brasil mais de 200 mil casos de LT; cerca de 42,5 % do total de casos são provenientes da região Norte (**Tabela 2**). Os estados do Pará, Amazonas, Acre e Rondônia foram os que notificaram mais casos nesse período, que somados correspondem a 82% das notificações no Norte do País (**Tabela 3**).

Tabela 2. Casos confirmados de leishmaniose tegumentar americana (LT), notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), segundo Região de Notificação, Brasil, entre 2007 e 2015.

Região	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
Norte	10302	9270	8842	7632	9188	10904	9002	11125	9668	85933
Nordeste	6272	6605	7384	9453	8533	8876	5775	5429	5671	63998
Sudeste	2112	1791	1811	2654	2458	1626	1377	1705	2048	17582
Sul	557	670	521	304	364	483	344	420	550	4213
Centro-Oeste	3313	3245	4760	3450	2511	3363	3154	3280	3224	30300
Total	22556	21581	23318	23493	23054	25252	19652	21959	21161	202026

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net, 2017.

Tabela 3. Casos confirmados de leishmaniose tegumentar americana (LT), notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), por estado, na Região Norte, Brasil, entre 2007 e 2015.

Região de notificação	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
Rondônia	1030	997	1118	994	740	1229	1295	1229	1139	9771
Acre	1009	1077	1013	1126	985	1250	1012	1146	1181	9799
Amazonas	2280	1881	1542	1249	2384	2372	1537	1939	1723	16907
Roraima	342	361	462	649	231	468	545	491	509	4058

Pará	4431	3845	3531	2465	3811	4279	3224	4526	3848	33960
Amapá	710	680	556	508	581	802	837	1099	615	6388
Tocantins	500	429	620	641	456	504	552	695	653	5050
TOTAL	10302	9270	8842	7632	9188	10904	9002	11125	9668	85933

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net, 2017.

1.8 Leishmanioses e flebotomíneos no Acre

No Acre estudos incriminam espécies de flebotomíneos como principais vetores da leishmaniose tegumentar americana, porém, poucos os estudos foram realizados sobre essa doença no Estado. Estudos realizados por Martins e Silva (1964) sobre a fauna flebotomínea na capital Rio Branco revelaram 30 espécies, sendo *Pintomyia (Pifanomyia) nevesi* a espécie dominante. No início da década de 80, Arias e Freitas (1982) realizaram pesquisas nas cidades de Cruzeiro do Sul, Feijó e Rio Branco, encontrando 50 espécies, sendo *Trichophoromyia auraensis* a mais frequente. Pouco depois, Arias et al. (1985) buscando infecções naturais por flagelados em flebotomíneos, encontrou *Nyssomyia whitmani* possivelmente infectada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e espécies do gênero *Psathyromyia* infectadas por *Trypanosoma rangeli*. Outras espécies como, *Pintomyia nevesi* e do gênero *Lutzomyia* foram encontradas infectadas por flagelados.

Azevedo et al. (2008), estudando a fauna de flebotomíneos em três municípios do Estado do Acre, identificou 52 espécies dentre as quais *Nyssomyia antunesi*, *Nyssomyia whitmani*, e *Psychodopygus davisi* foram responsáveis por 47,51% das espécies coletadas, sendo a espécie *Nyssomyia whitmani* mais abundante. Silva-Nunes et al. (2008), estudando a epidemiologia da leishmaniose tegumentar e fauna de flebotomíneos para identificar possíveis vetores no município de Acrelândia, coletou 14 espécies, sendo três conhecidas como possíveis vetores da doença: *Nyssomyia antunesi* (59,1%) no peridomicílio e margens de matas; *Nyssomyia whitmani* mais frequente no peridomicílio (15%) e a única registrada no intradomicílio e *Trichophoromyia ubiquitalis*, no peridomicílio. Araújo-Pereira et al. (2014), estudando a fauna de flebotomíneos em três áreas no município de Rio Branco durante um ano, identificou 23 espécies, sendo algumas como *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia antunesi* e *Bichromomyia flaviscutellata* conhecidas como vetores de parasitas de leishmaniose tegumentar. Azevedo et al. (2008) a ocorrência de três possíveis ciclos de transmissão de *Leishmania* no Estado pelos vetores *Nyssomyia. umbratilis*, *Nyssomyia whitmani* e *Trichophoromyia ubiquitalis*.

Recentemente Brilhante et al. (2017) coletaram 36 espécies de flebotomíneos no município de Xapuri, com maior abundância das espécies *Psychodopygus carrerai carrerai*

(42%), *Nyssomyia shawi* (36%) e *Psychodopygus davisi* (13%). Em Assis Brasil, região de tríplice fronteira Brasil-Bolívia-Peru, Teles et al. (2016) coletaram 67 espécies, com três novos registros para o Acre, *Evandromyia georgii*, *Lutzomyia evangelistai* e *Psychodopygus complexus*, sendo as espécies mais abundantes *Trichophoromyia* spp. (*Trichophoromyia auraensis* / *Trichophoromyia ruifreitasi*) e *Psychodopygus davisi* ambas diagnosticadas com *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* através de análises moleculares. No mesmo município, foram descritas duas espécies *Lutzomyia naiffi* e *Trichophoromyia ruifreitasi*, sendo a fêmea dessa indistinguível de várias outras do gênero *Trichophoromyia*.

Atualmente, no Acre, são registradas 82 espécies de flebotomíneos, com o incremento de três recentes descrições no Estado e uma que teve seu status revalidado, a partir de exemplares machos e fêmeas: *Lutzomyia. naiffi*, *Trichophoromyia ruifreitasi*, *Psathyromyia elizabethdorvalae* e *Psathyromyia pifanoi*, essa tendo *Lutzomyia cuzquena* como seu sinônimo júnior (Sábio et al., 2016). Dessa forma, esses estudos recentes têm demonstrado um aumento considerável na riqueza registrada de flebotomíneos do Acre, com novos registros e espécies sendo descritas, refletindo a necessidade de mais levantamentos da fauna flebotomínea em diferentes áreas do Estado, onde a LT é endêmica (Sábio et al., 2016).

Estudos ecológicos associados à competência vetorial e diagnóstico de infecção natural por *Leishmania* são importantes temas a serem estudados no sentido de entender o ciclo de doença na região. Contudo, no Estado do Acre, os estudos acerca desse agravo ainda são escassos, principalmente na ecologia dos flebotomíneos e ciclo de transmissão do parasito na região.

Com relação à epidemiologia da LT no Acre, o primeiro estudo foi realizado por Silva et al. (1999) no período de 1992 a 1997, tendo verificado que a doença era predominante na mesorregião Vale do Acre, que abrange 14 municípios, desses, Rio Branco, Brasiléia, Xapuri e Assis Brasil contribuem com as notificações mais numerosas e uma prevalência de 55,7/10 mil hab. A forma clínica cutânea prevaleceu (84,1%) e a mucosa ocorreu em 4,73% dos casos. Dez anos depois, Silva e Muniz (2009) publicaram um novo estudo sobre os aspectos epidemiológicos da LT no Acre entre 2001 a 2006, e verificaram que prevalência da doença (128,5/10 mil hab.) mais que dobrou em relação ao estudo anterior, concluindo os autores que os indicadores epidemiológicos da LT no Estado do Acre aumentaram.

No Estado do Acre, a partir de técnica moleculares, foram registradas todas as espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* e *L. (L.) amazonensis*, que ocorrem no Brasil, exceto *L. (V.) lindenbergi*, descrita no estado do Pará (Tojal et al., 2006; Teles et al., 2015).

Recentemente, no município de Rio Branco, Araújo-Pereira (2017) em um diagnóstico de infecção natural em 173 espécimes fêmeas de flebotomíneos, revelou um total de 12

amostras positivas, conferindo taxa de infecção natural por *Leishmania* spp. de 6,94% na área estudada. Desse total de fêmeas, cinco sequências foram obtidas e a infecção por *L. (V.) braziliensis* confirmada em *Pressatia* ssp. (1) e *Trichophoromyia auraensis* (3) e *Evandromyia saulensis* (1).

1.9 Justificativa

A alta incidência das leishmanioses no Estado do Acre, e a expansão acentuada de casos nas últimas décadas, mediadas pela apropriação do uso da terra e exploração dos recursos florestais, vêm causando um impacto importante na saúde pública. A presença de populações de espécies envolvidas no ciclo de transmissão (agentes etiológicos, reservatórios e vetores) e manutenção de uma endemia em determinado local, depende de um ambiente favorável ao seu desenvolvimento (Ximenes et al., 2007). Essas condições podem ser naturais ou propiciadas pelas alterações antrópicas levando à adaptação das espécies de flebotomíneos as novas condições ambientais. Todavia, as lacunas no conhecimento ecológico da fauna de flebotomíneos e identificação de espécies vetoras envolvidas na transmissão, bem como, o diagnóstico de infecção natural de flebotomíneos, como fator de inclusão de uma espécie como possível vetor do parasito, carecem de estudos.

. Durante a execução desta pesquisa, viu-se a necessidade de estudar em áreas outros possíveis reservatórios para a doença, visto que o estudo de reservatórios domésticos pode demonstrar a importância dos cães no ciclo de transmissão da doença, onde sua participação no ciclo de transmissão do agente da leishmaniose visceral, contudo a participação do cão como reservatório no ciclo da leishmaniose tegumentar e desconhecida, apesar de estudos sobre infecção natural em cães por espécies de *Leishmania* causando a LT (Figueiredo e Madeira, 2014; Madeira et al., 2003; Dantas-Torres, 2007; Dantas-Torres, 2009). Nesse cenário, acredita-se que o estudo da fauna flebotomínea, análise da infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos e em cães e a identificação da fonte alimentar das espécies de flebotomíneos em diferentes ambientes podem contribuir no sentido de conhecer os diferentes elos da cadeia epidemiológica dessa endemia na região.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar aspectos da fauna de flebotomíneos e o índice de infecção por *Leishmania* spp. em flebotomíneos e cães animais domésticos, em áreas rurais e florestais do município de Rio Branco, Estado do Acre.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a infecção natural em cães por *Leishmania* através de pesquisas parasitológicas e moleculares;
- Identificar a fauna de flebotomíneos coletados na região;
- Descrever possíveis novas espécies de flebotomíneos;
- Apontar para os possíveis vetores;
- Estimar a diversidade, riqueza e equitabilidade das espécies de flebotomíneos;
- Estimar a taxa de infecção natural por flagelados e *Leishmania* spp. em flebotomíneos, por meio de dissecação e biologia molecular;
- Identificar fonte alimentar por ensaios moleculares de fêmeas de flebotomíneos alimentadas;
- Identificar amostras de *Leishmania* spp. circulantes em flebotomíneos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

Este estudo foi realizado no município de Rio Branco (09°59'11" S, 67°49'52" W), capital do estado do Acre localizado no sudoeste da região Amazônica, norte do Brasil (Figura 3A) que compreende uma área de 9.222,58 km² e população local estimada 377.057 habitantes em 2016 (IBGE, 2017). A vegetação é composta, por floresta tropical densa e aberta com predominância de Bambu e Palmeira. Com um clima equatorial que varia de 24°C a 32°C e índice pluviométrico anual entre 1.877 e 1.982 mm. O período mais quente do ano corresponde aos meses de julho a agosto, marcados por intensas queimadas devido à conversão da floresta para formação de pastos (Governo do Acre, 2010).

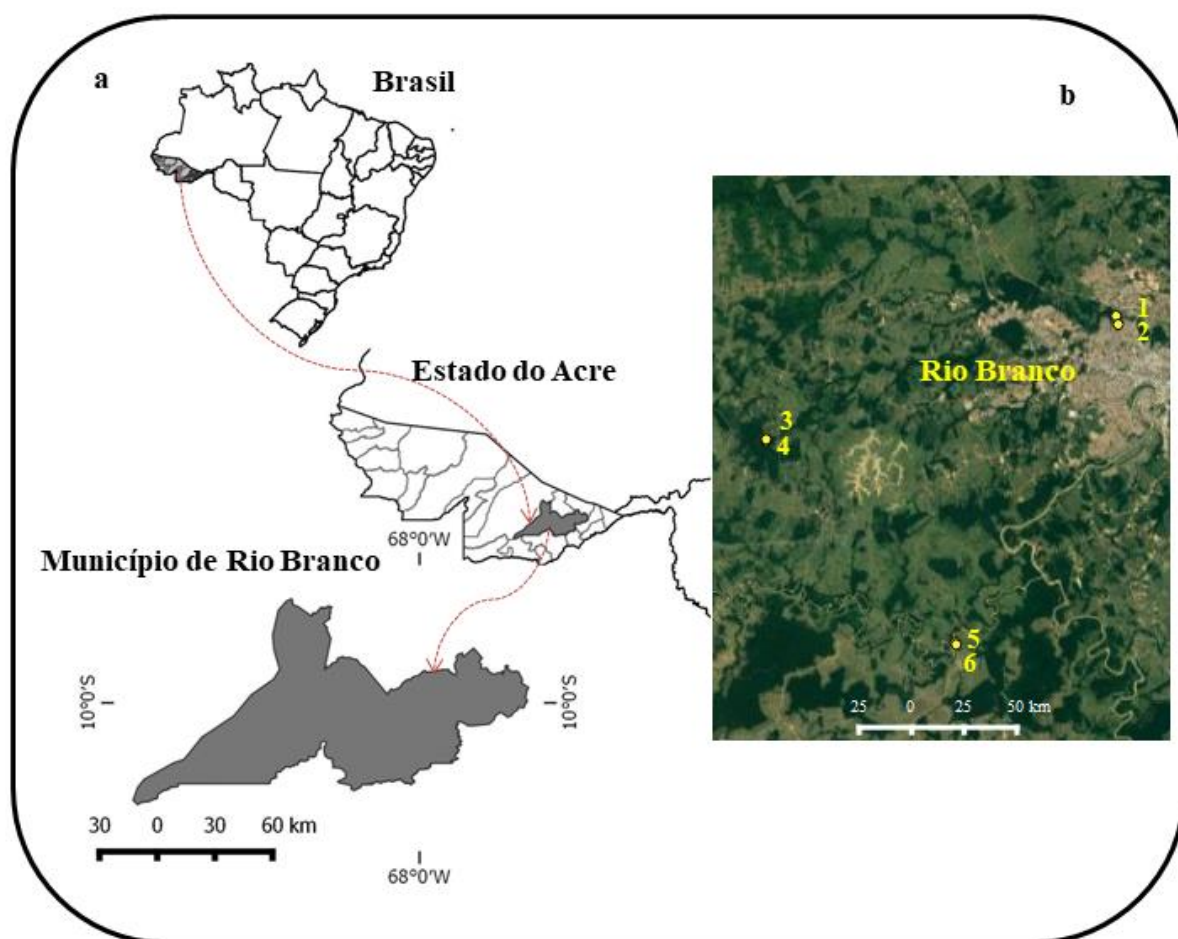


Figura 3. (A) Município de Rio Branco no estado do Acre, BR (B) Localização aproximada dos pontos de coleta de flebotomíneos no parque urbano (1 e 2 = parque Horto Florestal) e rural (3 e 5 = assentamento Dom Joaquim 5 e 6 = ramal do Riozinho), município de Rio Branco Acre, Brasil

3.2 Coleta e inquérito canino

No período de novembro a dezembro de 2016, foram realizadas visitas domiciliares em áreas rurais do município, pequenas propriedades como sítios e chácaras, próximos aos pontos de coletas onde foi realizado o inquérito entomológico da fauna de flebotomíneos (**Figura 4**).

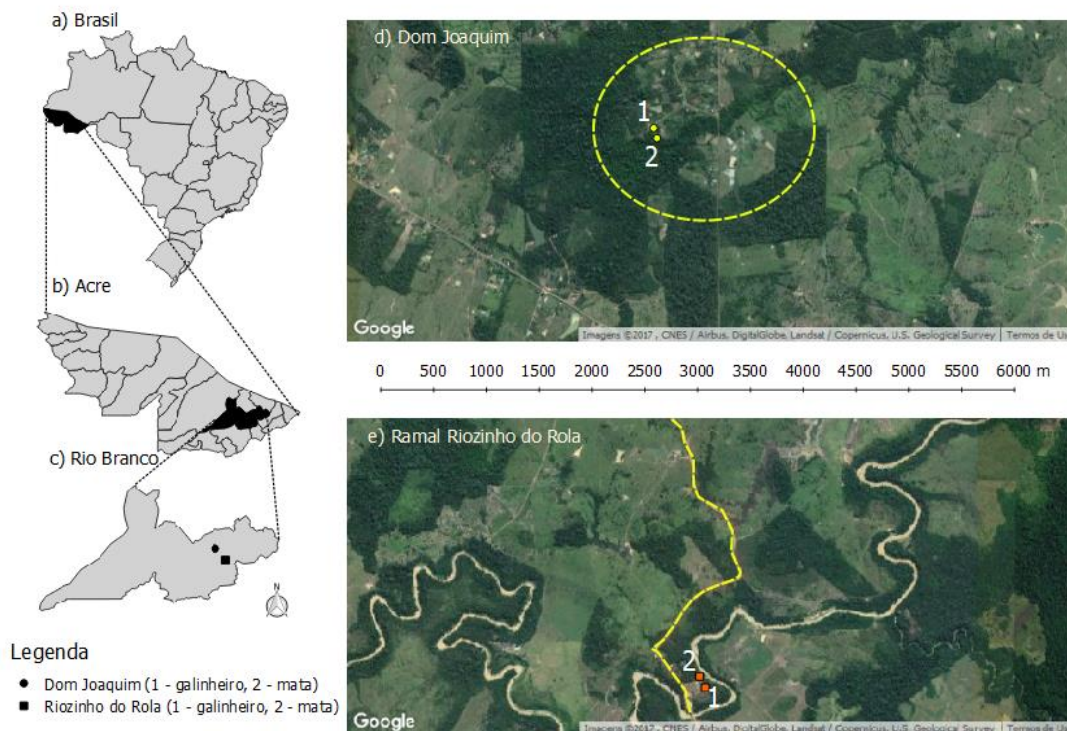


Figura 4. Localização aproximada dos pontos de estudo. a) Brasil; b) Estado do Acre; c) Município de Rio Branco; d) Projeto de assentamento Dom Joaquim e) Ramal do riozinho do rôla. Elaborado por Melchior, 2017 (Fonte Google Earth).

Com autorização dos proprietários e aprovação do comitê de ética animal, os cães foram submetidos à avaliação clínica para a identificação de manifestações sugestivas de LT. Foram coletados cerca de 5 ml de sangue venoso por punção da veia jugular ou cefálica, feitos esfregaços para análise microscópica. As lâminas foram coradas pelo método de Giemsa para pesquisa de formas amastigotas e uma parte do material posteriormente armazenado em tubos sem e com anticoagulante (ácido etilenodiaminotetracético; EDTA) para testes moleculares e parasitológicos (**Figura 5**).

Os animais que apresentaram lesões sugestivas de LT foram anestesiados e submetidos à biópsia para a colheita de fragmento da lesão. As lesões foram previamente higienizadas com água e sabão, e as coletas do fragmento das lesões foram realizadas com o auxílio de um “punch” de 4 mm de profundidade. Estes fragmentos foram divididos e acondicionados em tubos contendo etanol absoluto e solução salina com antibiótico (Gentamicina) para realização de técnicas moleculares descritas no item 3.7, e parasitológicas

conforme item 3.2.1.



Figura 5. Registro fotográfico do inquérito canino. A: avaliação clínica do cão. B: esfregaço com sangue canino. C: Biópsia D: cão com lesão no escroto. Fotos: Ávila, 2016.

3.2.1 Testes parasitológicos

Utilizando uma parte dos fragmentos de lesões, foram confeccionadas lâminas por aposição, que após fixação com álcool metílico e corados pelo método de Giemsa, foram examinadas através de microscopia de campo claro (100x) para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp.

Para o isolamento de formas flageladas, outra parte dos fragmentos das lesões (após 24h imerso em solução salina com sulfato de gentamicina) e amostras de sangue foram semeados em meio de cultura NNN (Neal, Novy, Nicolle), contendo BHI 20% (Brain Heart

Infusion) como fase líquida. As culturas foram mantidas em estufa B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 25°C e examinadas semanalmente por 60 dias.

3.3 Estudos dos flebotomíneos

3.3.1 Pontos de coleta dos flebotomíneos

As coletas dos flebotomíneos foram realizadas no período de dezembro de 2014 a janeiro de 2016, em ambientes peridomiciliares rurais e áreas florestais urbana, distribuídos em 06 pontos: Projeto de assentamento Dom Joaquim (2 pontos), Ramal do Riozinho (2 pontos) parque urbano Horto Florestal (2 pontos) (**Figura 3B**), todos localizados em área de ocorrência de LT, de acordo com informações obtidas pela Gerência de Endemias do município de Rio Branco. As características dos pontos de coleta, modelo de armadilha utilizado, estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Pontos de coleta de flebotomíneos, coordenadas geográficas e tipo de armadilha, município de Rio Branco, Acre, Brasil, entre dezembro de 2014 a janeiro de 2016.

Pontos de Coleta	Armadilhas	Coordenadas geográficas
Assentamento Dom Joaquim-galinheiro: área peridomiciliar, cerca de 100 metros da borda da mata, com criação de animais domésticos como galinhas, cães e gatos.	HP	9°59'46,8"S 67°58'51,7"W
Assentamento Dom Joaquim- Mata da casa: área com floresta secundária remanescente e com elevado antropismo ambiental e retirada de madeira.	HP Shannon	9°59'49.8"S 67°58'50.7"W
Ramal do Riozinho do rôla- galinheiro: área peridomiciliar, cerca de 150 metros da borda da mata, com criação de animais domésticos como galinhas e cães.	HP	10°05'03.5"S 67°53'54.3"W
Ramal do Riozinho do rôla- Mata da casa: área com floresta secundária remanescente em margem de aflente com elevado antropismo ambiental devido à prática de queimadas e retiradas de madeiras	HP	10°05'00.3"S 67°53'56.1"W
Parque ambiental urbano Horto Florestal – remanescente de floresta primária ciliar ao igarapé São Francisco.	HP	9°56'37.1"S 67°49'47.0"W
Parque ambiental urbano Horto Florestal – floresta secundária as margens da rua José Magalhães.	HP	9°56'51.7"S 67°49'42.8"W

3.4 Técnicas de coleta

3.4.1 Coletas com armadilha de Shannon

A armadilha do tipo Shannon na cor branca foi instalada em área de mata secundária no (área de mata) no Projeto de Assentamento Dom Joaquim, cerca de 100 metros da casa (**Figura 6**). As coletas foram realizadas uma vez por mês durante o período de dezembro de 2014 a janeiro de 2016, das 18:00 às 22:00.



Figura 6. Armadilha tipo Shannon localizada em área de mata, Projeto de assentamento Dom Joaquim, município de Rio Branco, Acre, Brasil. Foto: Ávila, 2015.

A armadilha foi iluminada com uma luz de LED (*Light emitting diode* – 2W), e com lanternas manuais. As coletas foram realizadas por dois indivíduos em cada armadilha utilizando aspiradores de Castro. Os insetos foram mantidos em frascos. Em seguida, foram levados ao laboratório no campo, onde os frascos foram abertos em uma gaiola de nylon (30 cm x 30 cm x 30 cm). Amostras de fêmeas foram recapturadas e dissecadas para investigar a presença de flagelados. As fêmeas foram imobilizadas com acetado de etila e dissecadas em lâmina seca sob uma gota de solução fisiológica estéril, para retirada das pernas e asas e exposição do tubo digestivo e espermatecas, para pesquisa de infecção natural por flagelados e identificação da espécie de flebotomíneo, respectivamente. Os machos foram identificados após processo de clarificação e montados entre lâmina e lamínula. A classificação adotada para a identificação dos flebotomíneos foi a de Galati (2003, 2016). As abreviações dos nomes das espécies de flebotomíneos seguiram a proposta por Marcondes (2007).

3.4.2 Coletas com armadilhas luminosas tipo HP

No mesmo período das coletas com armadilhas de Shannon, foram realizadas coletas com armadilhas luminosas automáticas do tipo HP (**Figuras 7 e 8**), modificadas com coletores contendo álcool 70%, por 48 horas consecutivas, uma vez ao mês, que foram distribuídas em seis pontos, sendo duas na área urbana e quatro em áreas rurais (**Figura 3B**), conforme descritas na Tabela 4. Os insetos capturados foram examinados conforme descrito acima para aqueles obtidos com a armadilha de Shannon.



Figura 7. Local de instalação da armadilha luminosa do tipo HP em área peridomiciliar (galinheiro), município de Rio Branco, Estado do Acre, Brasil. Foto: Ávila, 2016.



Figura 8. Local de instalação da armadilha luminosa do tipo HP em área florestal, Município de Rio Branco, Estado do Acre, Brasil. Foto: Ávila, 2016.

3.5 Análise da fauna flebotomínea

Os resultados foram tabulados utilizando o software Microsoft Excel 2013. Os testes ecológicos e estatísticos utilizados foram:

- Para calcular os descritores ecológicos diversidade, equitabilidade, riqueza e dominância das espécies entre os ambientes amostrados foram utilizados os índices de diversidade de espécies calculados pela fórmula de Shannon-Wiener (Magurran, 2003).

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

Onde:

p_i = proporção de indivíduos representados na amostra pela espécie i , \ln = Logaritmo neperiano.

A dominância foi obtida pelo índice de Berger-Parker (d), que expressa a importância proporcional da espécie mais abundante de uma determinada amostra (Magurran, 2003). O valor deste índice foi obtido pela expressão:

$$d = N_{\text{máx}}/N,$$

Onde: $N_{\text{máx}}$ é o número de indivíduos da espécie mais abundante e N o número total de indivíduos amostrados na área.

Foi utilizado o cálculo da uniformidade da distribuição de abundância entre as espécies, sendo calculada segundo a fórmula:

$$J' = H'/H_{\text{máx}},$$

Onde: H' , é o índice de Shannon-Wiener e $H_{\text{máx}}$, é o logaritmo neperiano (\ln) do número total de espécies na amostra; este índice varia de 0 a 1 (Magurran, 2003).

- O índice de Kruskal-Wallis index foi usado para o teste à hipótese de igualdade entre os descritores ecológicos nos diferentes pontos estudados, utilizando o software PAST. Os índices abióticos (temperatura, umidade relativa e precipitação) foram correlacionados com a

frequência de espécies coletadas mensalmente, utilizando o coeficiente de correlação de Spearman (r_s) com um nível de significância $p \leq 0,05$ em software IBM SPSS 20.

- A taxa de infecção natural por flagelados e *Leishmania* spp. foi calculada de acordo com fórmula descrita por Paiva et al. (2007) adotando a taxa mínima de infecção dos flebotomíneos, pela seguinte fórmula: taxa mínima (TM) = número de grupos positivos x 100/número total de insetos.

3.6 Processamento, identificação e estudo da infecção natural

Após as capturas, os flebotomíneos foram levados para o laboratório triados e conservados em álcool 70% até a clarificação segundo (Forattini, 1983) e identificados utilizando chave de identificação taxonômica de Galati (Galati, 2003). As fêmeas de flebotomíneos coletadas em armadilhas de Shannon foram colocadas em lâminas com solução salina para dissecação utilizando estilete entomológico estéril com exposição dos tubos digestivos e espermatecas, para a pesquisa de flagelados e identificação da espécie, respectivamente. Após a microscopia, foram conservadas em tubos tipo *ependorf* contendo álcool 90% identificados para posterior análises moleculares da infecção por *Leishmania* spp.

As fêmeas com repasto sanguíneo coletadas em armadilhas de HP tiveram seu aparelho reprodutor exposto para identificação de espécies e, em seguida, foram armazenadas em etanol absoluto a 90% para análise de fontes alimentares.

3.7 Ensaio molecular para detecção de *Leishmania* spp.

3.7.1 Extração de DNA

As fêmeas de flebotomíneos identificadas e armazenadas em microtubos de polipropileno de 1,5 ml com álcool 70% até a extração de DNA. Em relação ao sangue canino armazenado individualmente em microtubos de polipropileno de 1,5 ml e estocado à temperatura de -20°C para a extração de DNA, como controle negativo foi utilizado água livre de DNA.

Durante a extração do DNA foi utilizado o kit comercial de extração Genra Puregene® Cell and Tissue (QIAGEN), as concentrações dos reagentes não foram especificadas pelo fabricante. A extração das amostras seguiu utilizando a mesma sequência da metodologia para todas as amostras, porém os utilizados nos reagentes: lise celular, proteinase K e RNase foram diferentes, foi utilizado um volume para amostras de fêmeas de flebotomíneos e outro volume as demais amostras (cães). Os volumes empregados na extração das amostras de cães estão especificados a seguir dentro dos parênteses. Os microtubos de

polipropileno contendo as amostras foram retirados do freezer -20°C e, após o descongelamento, as amostras foram macerados, com ajuda de um pistilo estéril e descartável, foi adicionado em 100µl (300µl para amostras de cães) de solução de lise celular, contendo 1µl (1,5µl para amostras de cães) de proteinase K nos microtubos.

Em seguida, os microtubos foram incubados em banho-maria a 55°C overnight. Após esse período, foi adicionado 1µl (1,5µl para amostras de cães) de RNase, os microtubos foram homogeneizados e incubados em banho-maria a 37°C por 1 hora, incubado por 1 min no gelo e foi adicionado 100µl de solução de precipitação de proteína. Em seguida, os microtubos foram centrifugados por 3 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril e identificado, contendo 300µl de isopropanol (100%). Os microtubos foram homogeneizados e, novamente, centrifugados por 5 minutos a 14.000rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300µl de etanol (70%) e 30µl de acetado de sódio (10%) em cada amostra.

Os tubos foram incubados em freezer -80°C por 1 hora e, posteriormente foram centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm. Ao término da centrifugação, descartou-se novamente o sobrenadante e os microtubos foram invertidos em papel absorvente para a evaporação do etanol. O DNA extraído foi ressuspenso em 20µl de solução de reidratação e os microtubos foram incubados a 65°C por 1 hora para a reidratação do DNA. Em seguida, o DNA foi incubado em temperatura ambiente overnight, e posteriormente, foram estocados em freezer -20°C até a utilização. As amostras de DNA total extraído das fêmeas de flebotomíneos chegaram a uma concentração final media de 6 ng/µl, já a concentração das amostras de cães foi padronizada em 100 ng/µl.

3.7.2 Condições da PCR

Após a extração do DNA, a PCR foi feita para região alvo do DNA de *Leishmania* ssp. O ITS1 (*internal transcribed spacer 1*), usando os iniciadores LITSR - Forward (5' CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3') e L5.8S - Reverse (5' TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3') (Schonian et al., 2003), para detectar infecção natural por *Leishmania* ssp. Em fêmeas não alimentadas, a região amplifica um fragmento de 350 pb por meio da seguinte reação: solução tampão1x (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,5 pmol do iniciador LITSR, 0,5 pmol do iniciador L5.8S, 1 U Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen), 5 µl de DNA molde em um volume total de 25µL.

A amplificação foi realizada em termociclador automático (MaxyGene Gradient - AXYGEN[®]) com 33 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 53° C por 1 min e extensão a 72°C por 1 minuto. Para o controle negativo foi utilizada água pura e DNA

de flebotomíneos machos. O produto da reação foi analisado em gel de agarose 2% corado com GelRed (Nucleic Acid Gel Stain - Biotium[®]) e comparado com o resultado do controle positivo, que era DNA extraído de cultura da cepa de referência de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) cedida pelo laboratório de microbiologia da Universidade Federal de Viçosa.

3.7.3 Clonagem

As amostras de fêmeas de flebotomíneos que apresentaram banda de aproximadamente 350 pb na PCR ITS1, foram submetidas à clonagem por meio de transformação bacteriana, com cepas competentes de *Escherichia coli* (DH5- α) cedidas pela Universidade Federal de Viçosa e kit comercial. ClonetJET[™] PCR Cloning Kit, seguindo o protocolo do fabricante.

A clonagem molecular consiste na difusão de moléculas de DNA idênticas e baseia-se na propagação natural de células ou indivíduos geneticamente idênticos. O experimento de clonagem gênica consiste em introduzir o gene dentro de células bacterianas e isolá-las em colônias, utilizada para aumentar a material gênico das amostras positiva e selecionar apenas o fragmento amplificado para sequenciamento.

Para reação de ligação foi utilizado microtubo de 0,2 ml, onde foram adicionados 10 μ L de tampão 2x, 4 μ L de produto da PCR, 3 μ L de água pura livre de DNA e 1 μ L de T4 DNA ligase; a reação foi incubada a temperatura ambiente por 30 min. A etapa seguinte foi a transformação em células competentes DH5- α . Para cada amostra foi preparada uma solução que foi adicionada as células competentes 10 μ L da reação de ligação, homogeneizadas e em seguida mantidas em gelo por 45 min, seguida de choque térmico a 42°C por 2min e recolocadas em gelo por mais 2 min. Posteriormente foi adicionado às amostras 1 ml de meio Luria-Bertani (LB) e incubação a 37 sob agitação (150 rpm) por 60 min. Ao término da etapa anterior aplicou-se um spin com a centrífuga e descartou-se o sobrenadante. O sobrenadante foi ressuspensão em 200 μ L do meio LB. As amostras foram em seguida plaqueadas em meio sólido LB Agar com ampicilina, as placas foram identificadas e incubadas a 37° C *overnight* para as colônias crescerem.

Foram selecionadas aleatoriamente colônias transformadas nas placas para reação de PCR, no entanto o volume final da reação foi de 50 μ L, com 4 μ L de DNA substituído por água livre de DNA (para o controle negativo) e 1 μ L de colônias de bactérias clonadas, ciclo do termociclador seguiu a mesma metodologia do item 3.7.2.

3.8 Estudo da fonte alimentar e condições da PCR

Fêmeas de flebotomíneos com repasto sanguíneo foram submetidas à técnica de PCR para amplificação do gene *citocromo b* que amplifica um fragmento de 359 pb utilizando os iniciadores para *cyt b* Forward (*cyt b1*): 5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3' Reverse (*cyt b2*): 51-GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3' (Steuber et al., 2005).

A extração do DNA das fêmeas seguiu o mesmo protocolo já descrito, em cabine de fluxo laminar adotando-se medidas de desinfecção e cuidados para não contaminação das amostras com DNA humano. A reação de PCR foi realizada usando uma solução tampão 1x b (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,5 pmol do iniciador *cyt b1*, 0,5 pmol do iniciador *cyt b2*, 1U Taq DNA polimerase platinum (Invitrogen) e 5 µl DNA molde, em volume total de 50 µl.

As amostras foram amplificadas em termociclador automático (MaxyGene Gradient - AXYGEN®) com 33 ciclos de 95° C por 30 segundos (desnaturação), 53°C por 1 min (anelamento), e 72° C por 1 min (extensão). No controle negativo foi utilizado água pura autoclavada, DNA de machos e fêmeas de flebotomíneos sem presença de repasto sanguíneo intestinal. As bandas amplificadas foram analisadas em gel de agarose 2% corado com 0,1 µL. GelRed e 5 µL do produto amplificado e comparados ao controle positivo de coágulo canino.

3.9 Sequenciamento e alinhamento

Tanto para o estudo da infecção natural quanto para a da fonte de alimento, os produtos de PCR amplificados das amostras que apresentaram os perfis de banda de foram enviados para sequenciamento para na empresa MacroGen® (Seul, Coréia), onde foi utilizado o sequenciador automático (Applied Biosystems 3730XL), cada mostra teve seu DNA sequenciado nas duas direções. As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas utilizando o programa Sequencher®4.1.4. Após as sequências alinhadas foi realizada uma busca no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando como algoritmo Blast (Basic Local Alignment Search Tool), que consiste em uma ferramenta de busca de similaridade em sequências biológicas (DNA ou aminoácidos), para verificar a identidade entre espécie depositada no Genbank (National Center for Biotechnology Information) e as sequências amplificadas das amostras.

3.10 Considerações éticas

Este estudo foi realizado mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Universidade Federal do Acre (CEUA-UFAC) sob o parecer número 23107.002090/2016-56.

O inquérito de flebotomíneos foi realizado mediante autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob o parecer número 32669-4

4 RESULTADOS

4.1 Levantamento faunístico e aspectos ecológicos da fauna flebotomínea

Dados publicados no anexo 1.

Um total de 2.517 flebotomíneos foi coletado com 43 espécies identificadas pertencentes a 13 gêneros: *Brumptomyia*, *Bichromomyia*, *Evandromyia*, *Lutzomyia*, *Micropygomyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Pressatia*, *Psathyromyia*, *Psychodopygus*, *Sciopemyia* e *Tricophoromyia* (Tabela 5). O gênero *Psychodopygus* representou a maioria das espécies coletadas (17,0%), seguido por *Evandromyia* (10,0%), *Tricophoromyia* (10,0%) e *Brumptomyia* (10,0%).

Tabela 5. Número de espécies de flebotomíneos coletados com armadilhas luminosas do tipo HP e Shannon, na estrada Transaereana e parque urbano Horto Florestal, Rio Branco, Acre, entre dezembro de 2014 e janeiro de 2016.

Espécies	Área rural	Área urbana	Total
	Estrada Transaereana	Parque Urbano	
<i>Bi. flaviscutellata</i>	51	6	57
<i>Br. avellari</i>	9	0	9
<i>Br. brumpti</i>	0	1	1
<i>Br. pentacantha</i>	2	1	3
<i>Brumptomyia</i> sp.	7	1	8
<i>Ev. infraspinoso</i>	2	1	3
<i>Ev. andersoni</i>	–	1	1
<i>Ev. saulensis</i>	174	13	187
<i>Ev. walkeri</i>	85	3	88
<i>Lu. evangelistai</i>	1	0	1
<i>Lu. gomezi</i>	1	0	1
<i>Lu. sherlocki</i>	17	4	21
<i>Mi. micropyga</i>	1	3	4
<i>Mi. trinidadensis</i>	3	–	3
<i>Micropygomyia (Sauromyia)</i> sp.	2	0	2
<i>Mg. migonei</i>	2	1	3
<i>Ny. antunesi</i>	35	23	58
<i>Ny. shawi</i>	7	0	7
<i>Ny. whitmani</i>	22	17	39
<i>Pa. abonnenci</i>	1	0	1
<i>Pa. aragoia</i>	1	0	1
<i>Pa. abunaensis</i>	1	0	1
<i>Pa. bigeniculata</i>	4	0	4
<i>Psathyromyia</i> sp.	2	0	2
<i>Pi. nevesi</i>	61	14	75
<i>Pi. serrana</i>	8	2	10
<i>Pr. calcarata</i>	132	6	138
<i>Pr. choti</i>	42	3	45
<i>Pressatia</i> sp.	84	2	86
<i>Ps. carrerai carrerai</i>	97	2	99
<i>Ps. llanosmartinsi</i>	7	–	7

<i>Ps. amazonensis</i>	1	–	1
<i>Ps. ayrozai</i>	5	–	5
<i>Ps. clautrei</i>	7	–	7
<i>Ps. davis</i>	89	1	90
<i>Ps. hirsutus hirsutus</i>	47	–	47
<i>Sc. servulolimai</i>	1	1	2
<i>Sciopemyia</i> sp.	7	4	11
<i>Th. auraensis</i>	774	65	839
<i>Th. brachipyga</i>	11	1	12
<i>Trichophoromyia</i> sp.	500	37	537
<i>Th .ubiquitalis</i>	1	0	1
Total	2304*	213*	2517

* Comparação entre a abundância de flebotomíneos coletados no ambiente rural e urbano (Kruskal-Wallis test, $H = 17,4$, $df = 42$, $P = 0,0002$).

As espécies mais abundantes no estudo da fauna foram: *Trichophoromyia auraensis* (33,3%), seguida de fêmeas indistinguíveis de *Trichophoromyia* spp. (21,3%). *Evandromyia saulensis*, foi a terceira espécie mais abundante (7,4%) nas coletas, todas distribuídas nos ambientes estudados e com predominância no ambiente rural (mata) (**Tabela 6**). Nas capturas com armadilhas de Shannon, *Evandromyia saulensis* ($n = 66$) teve maior frequência seguida de *Psychodopygus davis* ($n = 48$).

Um total de 2.304 espécimes foi coletado nos projetos de assentamentos rurais registrando 41 espécies de flebotomíneos, sendo as mais abundantes *Trichophoromyia auraensis*, *Trichophoromyia* spp., *Evandromyia saulensis*, *Pressatia calcarata* e *Psychodopygus carrerai carrerai*. Na área urbana (Parque Ambiental Horto Florestal), 213 espécimes foram coletados compondo 26 espécies. As mais frequentes foram *Trichophoromyia auraensis*, *Trichophoromyia* spp. e *Nyssomyia antunesi*. A abundância de flebotomíneos foi maior no ambiente rural quando comparado ao parque ambiental urbano ($H=17,9$; $df = 42$; $P < 0,05$) (**Figura 9**).

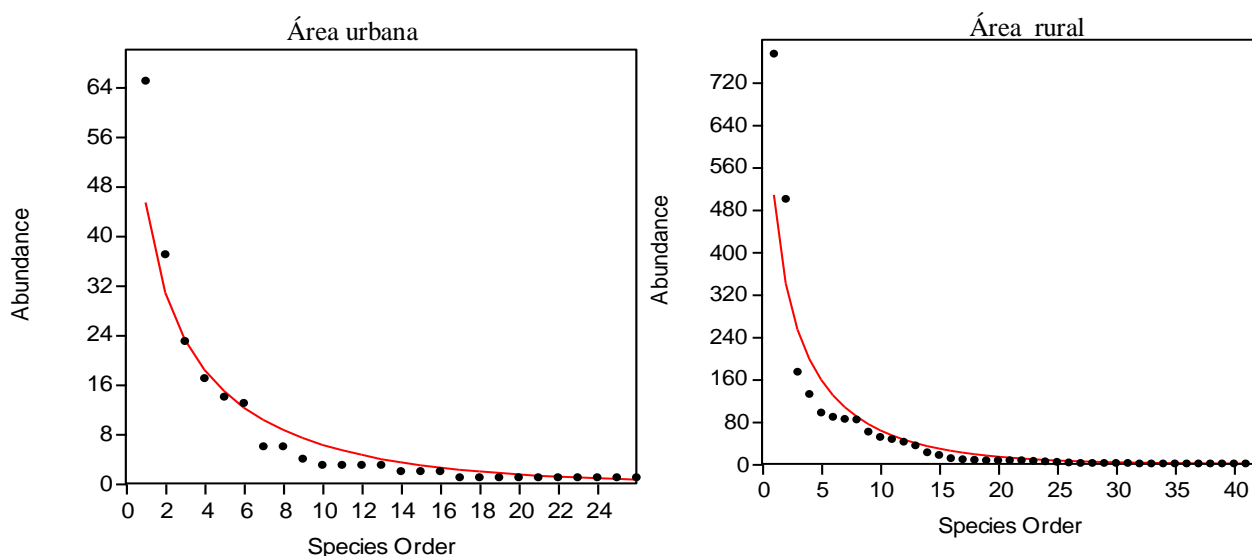


Figura 9. Curva de Abundância de espécies de flebotomíneos coletados em ambiente rural e parque urbano, no período de dezembro de 2014 a janeiro de 2016, no município de Rio Branco, Estado do Acre, Brasil.

No ambiente rural, o índice de riqueza de espécies total apresentou média de 5,16 ($S = 41$) e índice médio de equitabilidade (J') de 0,61, enquanto a riqueza média no parque ambiental urbano foi menor 4,66 ($S = 26$), e a equitabilidade ($J' = 0,72$) na distribuição de indivíduos, sendo um ambiente com padrão mais uniforme de abundância. O índice de diversidade foi maior no ambiente urbano, mas não apresentou diferença significativa quando comparado ao ambiente rural pelo teste de Kruskal-Wallis ($H = 1$; $df = 1$; $P > 0,05$) para duas amostras. A dominância de espécies pelo índice de Berger-Parker apresentou uma média de 0,33 e 0,30, para o ambiente rural e parque urbano, respectivamente.

Tabela 6. Número de espécies coletados e índices de diversidade de flebotomíneos em ambientes distintos coletados no município de Rio Branco, Acre, Brasil, no período de dezembro de 2014 a janeiro de 2016.

Ambiente	Área Rural			Área Urbana		Total %	
	Peridomicíliar			Parque			
	Floresta/ HP	Floresta/ Shannon	Galinheiro/ HP	Floresta 1°	Floresta 2°		
Ecótopo							
Espécies	<i>N</i>	<i>N</i>	<i>N</i>	<i>N</i>	<i>N</i>		
<i>Bi. flaviscutellata</i>	42	5	4	3	3	57	2,26
<i>Br. avellari</i>	1	–	8	–	–	9	0,36
<i>Br. Brumpti</i>	–	–	–	–	1	1	0,04
<i>Br. Pentacantha</i>	–	–	2	1	–	3	0,12
<i>Brumptomyia</i> sp.	2	3	2	–	1	8	0,32
<i>Ev. infraspinosa</i>	1	1	–	–	1	3	0,12
<i>Ev. andersoni</i>	–	–	–	1	–	1	0,04
<i>Ev. saulensis</i>	81	66	27	10	3	187	7,43
<i>Ev. walkeri</i>	30	14	41	2	1	88	3,50
<i>Lu. Evangelistai</i>	1	–	–	–	–	1	0,04
<i>Lu. Gomezii</i>	1	–	–	–	–	1	0,04
<i>Lu. Sherlocki</i>	6	7	4	2	2	21	0,83
<i>Mi. Micropyga</i>	–	–	1	2	1	4	0,16
<i>Mi. Trinidadensis</i>	1	–	2	–	–	3	0,12
<i>Micropygomia (Sauromyia)</i> sp.	1	–	1	–	–	2	0,08
<i>Mg. Migonei</i>	1	–	1	–	1	3	0,12
<i>Ny. antunesi</i>	11	8	16	21	2	58	2,30
<i>Ny. shawi</i>	4	–	3	–	–	7	0,28
<i>Ny. whitmani</i>	11	9	2	10	7	39	1,55
<i>Pa. Abonnenci</i>	–	1	–	–	–	1	0,04
<i>Pa. Aragoia</i>	–	1	–	–	–	1	0,04

<i>Pa. Abunaensis</i>	1	–	–	–	–	1	0,04
<i>Pa. Bigeniculata</i>	4	–	–	–	–	4	0,16
<i>Psathyromyia</i> sp.	2	–	–	–	–	2	0,08
<i>Pi. Nevesi</i>	41	13	7	11	3	75	2,98
<i>Pi. Serrana</i>	–	–	8	2	–	10	0,40
<i>Pr. Calcarata</i>	32	2	98	6	–	138	5,48
<i>Pr. Choti</i>	3	4	35	2	1	45	1,79
<i>Pressatia</i> sp.	16	5	63	2	–	86	3,42
<i>Ps. carrerai carrerai</i>	55	29	13	–	2	99	3,93
<i>Ps. llanosmartinsi</i>	–	7	–	–	–	7	0,28
<i>Ps. amazonenses</i>	–	1	–	–	–	1	0,04
<i>Ps. ayrozai</i>	–	5	–	–	–	5	0,20
<i>Ps. clautrei</i>	1	6	–	–	–	7	0,28
<i>Ps. davisi</i>	17	48	24	–	1	90	3,58
<i>Ps. hirsutus hirsutus</i>	34	8	5	–	–	47	1,87
<i>Sc. Servulolimai</i>	1	–	–	–	1	2	0,08
<i>Sciopemyia</i> ssp.	4	1	2	–	4	11	0,44
<i>Tr. auraensis</i>	482	22	270	13	52	839	33,33
<i>Tr. brachipyga</i>	8	–	3	1	–	12	0,48
<i>Trichophoromyia</i> ssp.	275	12	213	3	34	537	21,33
<i>Tr. ubiquitalis</i>	–	1	–	–	–	1	0,04
Total (n)	1170	279	855	92	121	2517	100
Índices de Diversidade							
Richness (S)	32 ^a	–	26 ^a	17	20		
Shannon-Wiener's (H')	1,99 ^b	–	2,11 ^b	2,39 ^b	1,85 ^b		
Pielou's (J)	0,57	–	0,64	0,84	0,61		
Berger-Parker's (D)	0,41	–	0,31	0,22	0,42		

^aComparação entre riqueza de espécies (S) de flebotomíneos coletados na área peridomiciliar (área ural) (Kruskal-Wallis test, $H = 0,04$, $df = 1$, $P = 0.0531$)

^bComparação do índice de diversidade (H') entre Area rural e Area urbana (Kruskal-Wallis test, $H = 1$, $df = 1$, $P = 0.317$)

Observou-se correlação significativa entre o número total de flebotomíneos coletados e a média da temperatura nos dias das coletas (Spearman's rho = 0,58, $n = 13$, $P = 0,03$) (Tabela 7). Todavia, não houve correlação significativa entre o número de espécies coletados nas armadilhas HP em relação à umidade relativa do ar (Spearman's rho = - 0,66, $n = 13$, $P = 0,831$) e pluviosidade mensal (Spearman's rho = - 0,38, $n = 13$, $P = 0,45$) durante o período estudado.

A análise comparativa da riqueza de espécies coletadas no ambiente no ambiente rural (peridomicílio) não apresentou diferença significativa ($H = 0,04$; $df = 1$; $P > 0,05$), porém com um número maior de espécies na mata próximo a casa. A maior diversidade (Índice de Shannon, 'H) de espécies foi obtida na floresta de mata primária, no parque ambiental urbano com 17 espécies ('H = 2,39) seguido do peridomicílio rural ('H = 2,11) com 26 espécies,

peridomicílio rural (mata) ('H = 1,99) com 32 espécies e floresta secundária no parque urbano ('H = 1,85) com 20 espécies (**Tabela 5**).

Tabela 7. Abundância de flebotomíneos coletados em armadilha HP e médias mensais de temperatura (° C), humidade (%) e precipitação (mm) de dezembro de 2014 a janeiro de 2016, em Rio Branco, Acre, Brasil.

Período de coleta	Total n.º. de flebotomíneos coletados	Porcentagem m do total	Temperatura (°C)	Humidade (%)	Precipitação (mm)
Dezembro 2014	603	26,9	32,2	76,6	149,2
Fevereiro 2015	102	4,6	32,1	70,4	292,6
Março 2015	116	5,2	30,9	76,3	351,3
Abril 2015	110	4,9	29,7	75,4	231,7
Mai 2015	51	2,3	31,0	74,4	256,3
Junho 2015	31	1,4	29,2	65,3	31,0
Julho 2015	128	5,7	29,3	60,7	9,5
Agosto 2015	26	1,2	28,3	64,7	45,2
Setembro 2015	158	7,1	35,6	51,7	80,7
Outubro 2015	248	11,1	32,3	57,3	96,0
Novembro 2015	100	4,5	33,4	60,2	292,4
Dezembro 2015	412	18,4	32,6	65,9	171,8
Janeiro 2016	153	6,8	33,4	59,0	132,6
Total	2238 ^a	100	31,5 ^b	66,0 ^a	2140,3 ^a

Nota: As letras iguais indicam uma correlação não significativa entre o número total de flebotomíneos coletados e a temperatura, umidade relativa e precipitação ($P > 0,05$); e diferentes letras indicam uma correlação significativa ($P < 0,05$).

4.2 Ocorrência de nova espécie

Dados submetidos no anexo 2

Durante as coletas apenas a espécie *Sciopemyia vattierae* foi registrada pela primeira vez no município de Rio Branco e no Brasil, sendo coletados nove exemplares (cinco machos e quatro fêmeas). De acordo Galati (2003, 2016) o gênero *Sciopemyia* inclui oito espécies, dentre essas espécies, *Sciopemyia vattierae* é morfologicamente muito semelhante à *Sciopemyia sordellii*. A distinção de machos e fêmeas dessas duas espécies é baseada em características morfométricas (comprimento do primeiro flagelômero (FI) e do ducto edeagal) (**Figura 10**) e características morfológicas das fêmeas (*Sciopemyia vattierae* apresenta cabeça terminal claramente separado da espermateca, sendo sésil em *Sc. sordellii*) (Figura 11). As lâminas de dois espécimes machos e fêmeas estão depositadas no Laboratório de Flebotomíneos da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de Saúde Pública sob o número E-15630, E-15631 (fêmeas), E15632 e E-15633 (machos).



Figuras 10. Espécies de *Sciopemyia vattierae* coletadas em Rio Branco, Acre, Brasil. (A) terminá-la do macho (B) espermateca da fêmea.

4.3 Diagnóstico de infecção de *Leishmania* ssp. em flebotomíneos

Um total de 206 fêmeas de flebotomíneos foram coletas na armadilha de Shannon no ambiente rural (mata) para estudo da infecção natural por microscopia e análise molecular, as espécies foram agrupadas em 39 pools e 43 amostras individuais. Dessas, em 17 pools (*Trichophoromyia auraensis*, 3 pools; *Evandromyia saulensis*, 2; *Evandromyia walkeri*, 2; *Bichromomyia flaviscutellata*, 1; *Psychodopygus llanosmartinsi*, 1; *Pintomyia nevesi*, 3; *Psychodopygus davisi*, 2; *Psychodopygus ayrozai*, 2; *Lutzomyia sherlocki*, 1) e 8 amostras individuais (*Pintomyia nevesi*, 1; *Nyssomyia whitmani*, 2; *Psathyromyia aragaoi*, 1; *Evandromyia saulensis*, 1; *Nyssomyia antunesi*, 1; *Lutzomyia sherlocki*, 1; *Evandromyia infraspionosa*, 1), foi amplificada a região alvo ITS1 do DNA de *Leishmania* (**Figura 11**). Na análise microscópica, cinco espécimes de *Evandromyia saulensis* apresentaram formas flageladas, com uma taxa de infecção de 2,4%.

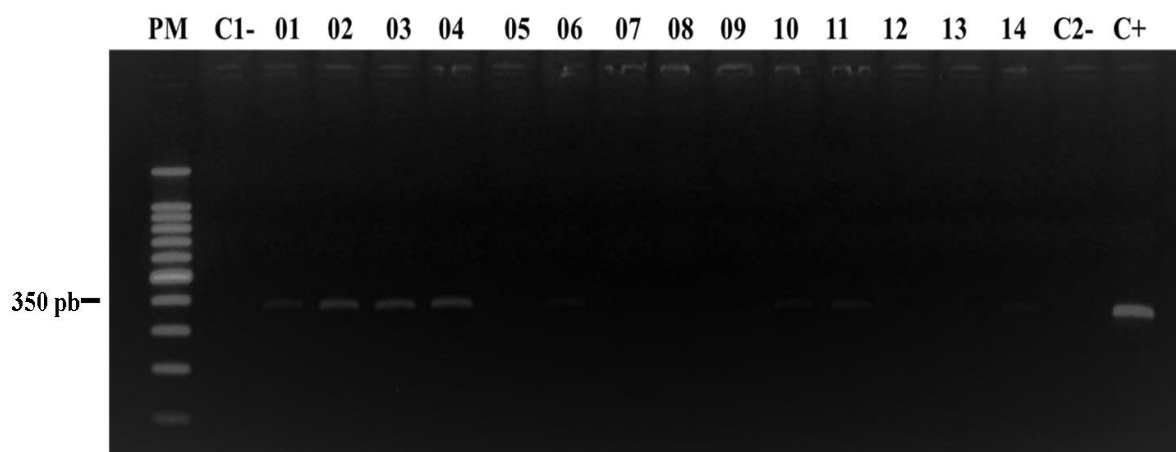


Figura 11. PCR-ITS1 - Gel de agarose 2%, corado com GelRed mostrando o produto da amplificação da PCR-ITS1 do DNA extraído de fêmeas de flebotomíneos, coletadas no município de Rio Branco, Acre, Brasil. Linhas 01, 02, 03, 04, 06, 10, 11 e 14: fêmeas de flebotomíneos coletadas positivas para infecção natural com *Leishmania* spp; Linhas 05, 07, 08 e 09: fêmeas de flebotomíneos coletadas negativas para infecção com *Leishmania* Linhas C1- e C2-: controles negativos (água pura H2O Milli-Q); Linha C+: controle positivo (cepa de *Leishmania braziliensis*).

As sequências foram analisadas e a identificação foi realizada através de análise de similaridade no algoritmo BLAST, comparando com sequências disponíveis no GenBank. Das amostras analisadas treze sequências de DNA foram similares com *L. (V.) braziliensis* em (Tabela 8): *Trichophoromyia auraensis* (n = 1); *Evandromyia saulensis* (n = 2); *Evandromyia. walkeri* (n = 1); *Psychodopygus llanosmartinsi* (n = 1); *Pintomyia nevesi* (n = 2); *Psychodopygus davisii* (n = 1); *Psychodopygus ayrozai* (n = 1); *Psathyromyia aragaoi* (n = 1); *Nyssomyia antunesi* (n = 1) e *Evandromyia infraspinosa* (n = 1). Somente na espécie *Psychodopygus ayrozai*, a sequência analisada foi similar (100%) a *L. (V.) guyanensis* a sequência depositada na base de dados do GenBank.

Após o sequenciamento das amostras as sequências genéticas foram depositadas no GenBank sob o número (MF802812-MF802824).

Tabela 8: Resultados da identificação de espécies de *Leishmania* para os principais *hits* obtidos após análise no Blast.

Amostra	Descrição	Max score	Total score	Query cover	E value	Max identity	Accession number
<i>Psychodopygus llanosmartinsi</i>	<u>Leishmania braziliensis isolate AM60 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	555	555	100%	4e-154	100%	<u>MF802822.1</u>
<i>Nyssomyia antunesi</i>	<u>Leishmania braziliensis isolate AM73B internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	553	553	100%	1e-153	100%	<u>MF802813.1</u>
<i>Evandromyia walkeri</i>	<u>Leishmania braziliensis isolate AM57B internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	556	556	100%	1e-154	100%	<u>MF802814.1</u>
<i>Evandromyia saulensis</i>	<u>Leishmania braziliensis isolate AM58 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	329	329	59%	2e-86	100%	<u>MF802815.1</u>
<i>Psychodopygus ayrozai</i>	<u>Leishmania guyanensis isolate AM26 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	551	551	100%	5e-153	100%	<u>MF802816.1</u>
<i>Trichophoromyia auraensis</i>	<u>Leishmania braziliensis isolate AM51 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	549	549	100%	2e-152	100%	<u>MF802817.1</u>
<i>Pintomyia nevesi</i>	<u>Leishmania braziliensis isolate AM43 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	555	555	100%	4e-154	100%	<u>MF802818.1</u>
<i>Psychodopygus davisi</i>	<u>Leishmania braziliensis isolate AM76 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	527	527	100%	7e-146	100%	<u>MF802819.1</u>

<i>Evandromyia infraespinosa</i>	<u>Leishmania braziliensis isolate AM55 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	532	532	100%	2e-147	100%	<u>MF802820.1</u>
<i>Pintomyia nevesi</i>	<u>Leishmania braziliensis isolate AM66 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	556	556	100%	1e-154	100%	<u>MF802821.1</u>
<i>Psychodopygus ayrozai</i>	<u>Leishmania braziliensis isolate AM60 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	555	555	100%	4e-154	100%	<u>MF802822.1</u>
<i>Psathyromyia aragoia</i>	<u>Leishmania braziliensis isolate AM30 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	556	556	100%	1e-154	100%	<u>MF802823.1</u>
<i>Evandromyia saulensis</i>	<u>Leishmania braziliensis isolate AM68 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	558	558	100%	3e-155	100%	<u>MF802824.1</u>

4.4 Estudo da fonte alimentar em fêmeas flebotomíneos

Um total de 33 fêmeas de flebotomíneos foi submetido a PCR e amplificação do gene *cyt b*, das quais 25 foram coletadas na área rural (*Trichophoromyia* sp.: 10; *Pressatia* sp.: 2; *Evandromyia saulensis*: 7; *Evandromyia walkeri*: 1; *Nyssomyia antunesi*: 1; *Psychodopygus davisii*: 1; *Psychodopygus hirsutus*: 1; *Psychodopygus carrerai*: 1; e *Pintomyia nevesi*: 1) e oito coletadas no parque urbano (*Trichophoromyia* sp.: 1; *Evandromyia saulensis*: 1; *Evandromyia walkeri*: 1; *Nyssomyia antunesi*: 2; *Psychodopygus davisii*: 1; *Pintomyia serrana*: 1; e *Migonemyia migonei*: 1) (**Figura 12**). Após o sequenciamento, todas as amostras foram similares às sequências de DNA depositada no GenBank foram da espécie *Gallus gallus* (galinha doméstica).

As sequências obtidas foram depositadas no Genbank sob o número (MG027586-MG027618)

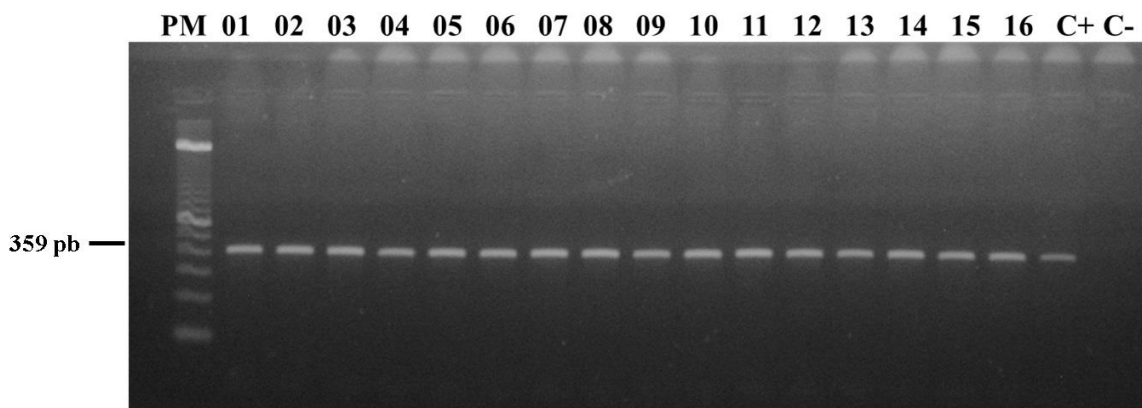


Figura 12. PCR-*cyt b* - Gel de agarose 2% corado com GelRed mostrando o produto da amplificação da PCR- *cyt b* do DNA extraído de fêmeas de flebotomíneos coletados no município de Rio Branco, Acre, Brasil. Linhas 1–16: produtos amplificados a partir do DNA extraído de fêmeas de flebotomíneos coletadas com repasto sanguíneo intestinal; linha C+: controle positivo (coágulo de sangue canino); C-: controle negativo (água bi-destilada H2O Milli-Q).

4.5 Detecção de infecção natural por *Leishmania* ssp. em cães

Para o estudo da infecção natural 55 cães foram investigados, o inquérito canino foi no ambiente rural próximo aos pontos de coletas da fauna de flebotomíneos. Dentre esses cães, apenas dois apresentavam lesão sugestiva de LT no escroto e nasal e os demais, embora debilitados, não apresentavam sintomatologia de leishmaniose.

Nenhuma das culturas dos fragmentos de lesão e amostras de sangue desses animais apresentou formas promastigotas. As lâminas examinadas com esfregaço de sangue periférico

e lesão não apresentaram formas amastigotas, no entanto, a pesquisa das lâminas evidenciou a presença de alguns hemoparasitas, como: *Ehrlichia* spp. (5/55; 9,1%) (**Figura 13**); *Anaplasma platys* (1/55; 1,81%) (**Figura 15**); microfilária (1/55; 1,81%) (**Figura 16**) e em dois animais (2/55; 3,63%) foram vistas formas semelhantes ao *Anaplasma phagocytophilum* (**Figura 17**), parasito que invade neutrófilos, porém, é necessário executar teste molecular (PCR) para confirmação de espécie, pois não existem relatos do parasito no Estado do Acre.

Uma amostra de cão demonstrou presença de corpúsculo de Lentz (Cinomose) (1/55; 1,81%) (**Figura 14**) e quatro amostras (4/55; 7,27%) demonstraram corpúsculo de Howell-Jolly e/ou ponteados basofílicos, sugerindo liberação de hemácias jovens na circulação. Quatro amostras (4/55; 7,27%) demonstraram presença de neutrófilos tóxicos (**Figura 18**), que sugerem processos inflamatórios agudos, e duas amostras (2/55; 3,63%) apresentaram presença de neutrófilos hipersegmentados que sugerem doenças inflamatórias crônicas. Os achados laboratoriais do presente trabalho encontram-se dispostos na tabela 9.

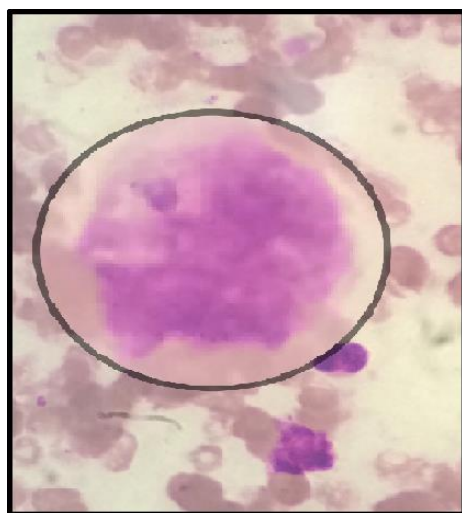


Figura 13. Mórula de *Ehrlichia* sp.

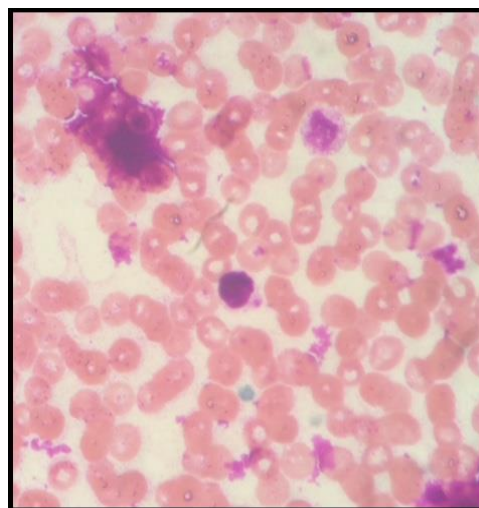


Figura 14. Corpúsculo de Lentz

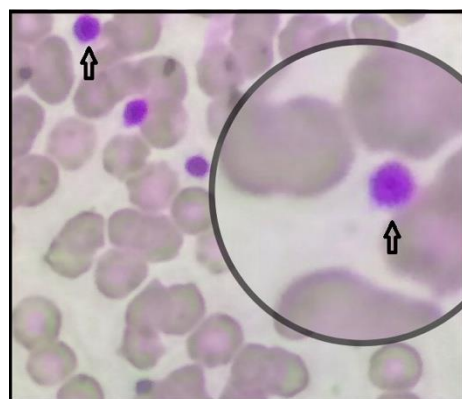


Figura 15. *Anaplasma platys*

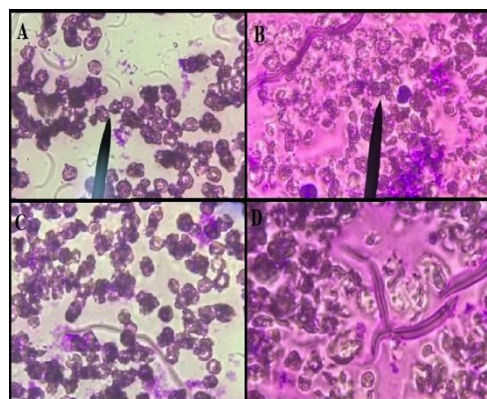


Figura 16. Microfilária

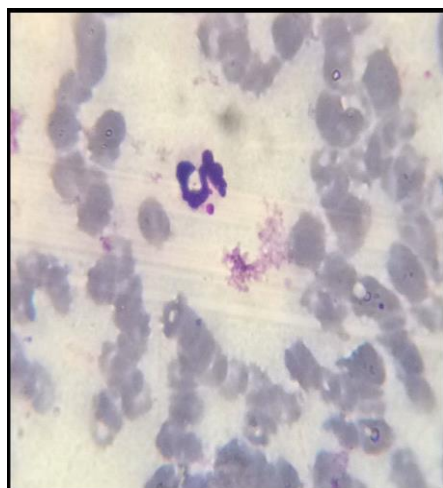


Figura 17. Forma semelhante a *Anaplasma phagocytophilum*

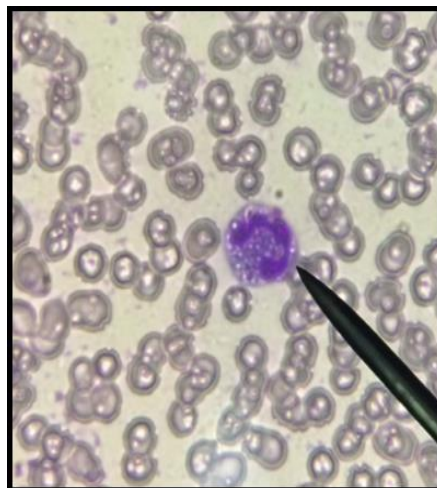


Figura 18. Neutrófilo Tóxico

Das 55 amostras de sangue periférico avaliadas, em três foi detectada a presença de DNA de *Leishmania* spp. (**Figura 19**) com a PCR-ITS1. No entanto, os resultados ainda são inconclusivos para o diagnóstico molecular, precisando ser realizado a análise do sequenciamento das amostras para saber o subgênero e espécie. A taxa de infecção por *Leishmania* spp. nos animais, obtida pela detecção molecular, foi de 5,0%.

Tabela 9. Achados microscópicos de amostras sanguíneas de cães residentes em áreas de alta incidência de LT humana no município de Rio Branco, Acre.

Local coleta	Achados microscópicos	Observações
Dom Joaquim	Presença de neutrófilos tóxicos	Animal assintomático
Dom Joaquim	Microfilária	Animal assintomático
Dom Joaquim	<i>Ehrlichia</i> spp.	Animal assintomático
Dom Joaquim	Presença de neutrófilos tóxicos	Animal assintomático
Wilson Pinheiro	<i>Ehrlichia</i> spp.	Animal assintomático
Início Transacreeana	Artefato mimetizando <i>Leishmania</i> spp.; <i>Ehrlichia</i> sp.	Lesão em plano nasal
Wilson Pinheiro	<i>Ehrlichia</i> sp.; Corpúsculo de Howell-Jolly	Tumor venéreo transmissível
Wilson Pinheiro	Corpúsculo de Howell-Jolly	Animal assintomático
Wilson Pinheiro	Artefato mimetizando <i>Leishmania</i> spp.	Animal assintomático
Wilson Pinheiro	<i>Anaplasma platys</i> ; presença de neutrófilos tóxicos	Animal assintomático
Wilson Pinheiro	Howell-Jolly; ponteados basofílicos	Animal assintomático
Ramal do Riozinho	Presença de neutrófilos hipersegmentados	Animal assintomático
Ramal do Riozinho	Corpúsculo de Howell-Jolly	Animal debilitado
Wilson Pinheiro	<i>Ehrlichia</i> spp.; presença de neutrófilos hipersegmentados	Animal assintomático
Ramal da Peladeira	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Animal assintomático
Ramal da Peladeira	Artefato mimetizando <i>Leishmania</i> spp.	Animal assintomático

Ramal da Peladeira	Artefato mimetizando <i>Leishmania</i> spp; Corpúsculo de Lentz	Animais de criadouro
Ramal da Peladeira	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Animal assintomático
Ramal da Peladeira	Presença de neutrófilos tóxicos	Animal assintomático
Ramal da Peladeira	Corpúsculo de Howell-Jolly	Animal assintomático

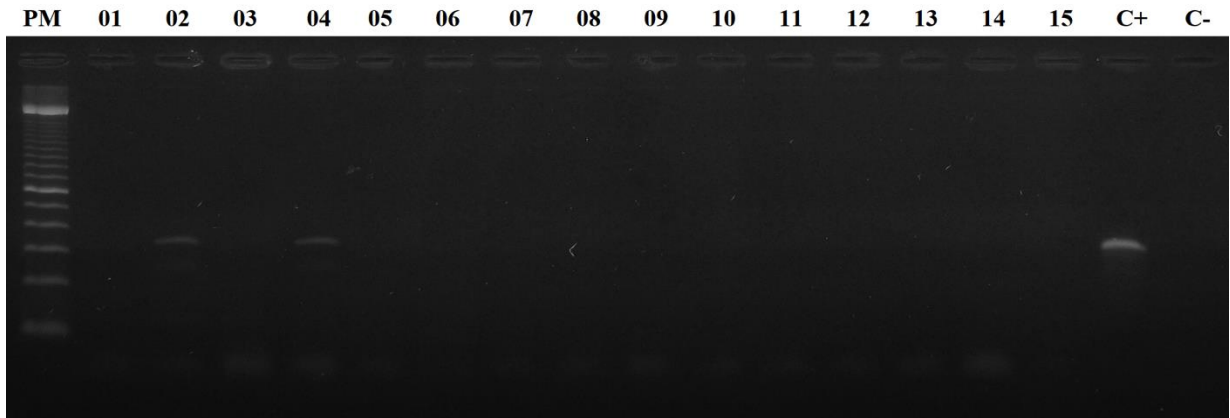


Figura 19. PCR-ITS1 - Gel de agarose 2%, corado com GelRed mostrando o produto da amplificação da PCR-ITS1 do DNA extraído de sangue de cães coletadas no município de Rio Branco, Acre, Brasil. Linhas 02 e 04: amostras de sangue canino positivas para infecção natural com *Leishmania* spp.; Linhas 01, 03, 05 a 15, amostras negativas para *Leishmania* spp.; Linha C+: controle positivo). C-: controle negativo (água bi-distilada H2O Milli-Q).

5 DISCUSSÃO

No Acre a LT e o impacto ambiental estão historicamente relacionados aos processos de ocupação humana que, a partir da década de 1970, teve conversão gradual do modelo extrativista da região com populações oriundas do nordeste brasileiro (Governo do Acre, 2010). Essas mudanças ambientais, associadas com a construção de projetos de assentamentos rurais, urbanização e derrubadas em massa da floresta com vistas à ocupação da terra tiveram um papel primordial na disseminação desse agravo em Rio Branco e no Estado. Os impactos decorrentes dessa dinâmica de uso da terra na Amazônia têm consequências ambientais nas elevadas taxas de desmatamento, perda da biodiversidade, adaptação de espécies vetoras ao ambiente rural e extinção de espécies raras (Ávila et al., 2015; 2018).

O aumento no número de casos notificados na região norte, sugere uma adaptação de espécies potencialmente vetoras na transmissão de agentes etiológicos de LT (Silva-Muniz, 2009) como consequência direta as ações antrópicas ao ambiente, associado à criação de animais favorecendo a domiciliação de espécies vetoras de *Leishmania*, modificando o ciclo na transmissão desse agravo (Costa et al, 2007). Em todo estado, o levantamento da distribuição geográfica, índices ecológicos da fauna e taxas de infecção natural é escasso (Silva-Nunes et al., 2008; Brilhante et al., 2017, Teles et al., 2016).

Neste estudo, dentre as espécies identificadas, registra-se a primeira ocorrência da espécie *Sciopemyia vattierae* no Brasil e no estado do Acre. Essa espécie foi descrita pela primeira vez por Le Pont & Desjeux (1992) a partir de exemplares coletados na floresta amazônica boliviana em Yucumo (BO). A fêmea de *Sciopemyia vattierae* foi reescrita por Bejerano et al. (2006) a partir de espécimes coletados em La Macarena, Departamento de Meta na Colômbia. As espécies do gênero *Sciopemyia* têm preferência alimentar por anfíbios e outros animais de sangue frio.

Atualmente, a distribuição de *Sc. vattierae* está em áreas de florestas tropicais úmidas da Bolívia, Peru e Colômbia, e, de acordo com as localidades em que essa espécie tem sido registrada, sugere que sua distribuição seja cis-andina (Le Pont and Desjeux, 1992; Cáceres e Galati, 2001; Ogosuku et al. 2001; Bejerano et al. 2006; Cabrera et al. 2009; Trujillo et al. 2013). Assim, com essa descoberta, a distribuição geográfica do *Sciopemyia vattierae* na América do Sul e o número de espécies de flebotomíneos no Brasil e no estado de Acre foram ampliadas.

Um total de 2.517 espécimes de flebotômíneos foi capturado. As mais abundantes *Evandromyia saulensis* e *Pressatia calcarata*, frequência de 73,8% nas coletas. Dessas *Trichophoromyia auraensis* e *Evandromyia saulensis* foram detectadas com DNA de *L. (V.) braziliensis*, corroborando outros estudos no estado que apontam *Trichophoromyia auraensis* como uma espécie abundante nos ambientes de coletas no Acre (Azevedo et al., 2008; Araujo-Pereira et al., 2014) e potencialmente envolvida na no ciclo de transmissão da leishmaniose. Recentemente, no município de Assis Brasil, essa espécie foi encontrada infectada com *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* por PCR-RFLP (Teles et al., 2016), indicando a sua importância na manutenção da circulação de espécies de *Leishmania*, embora sua competência vetorial ainda não possa ser comprovada (Ogawa et al., 2016). Em Madre de Dios, Peru já foi encontrado infectada com *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) braziliensis* (Valdivia et al., 2012) reforçando a importância dessa espécie e sua possível capacidade vetorial na região amazônica.

Evandromyia saulensis, dentre as espécies potencialmente vetoras no ciclo de transmissão da LT ao homem, não apresenta importância médica reforçando a participação de novas espécies tipicamente silvestres potencialmente envolvidas na transmissão da doença no Estado, além dos vetores já incriminados.

Sendo pouco representativa em estudo de fauna flebotômínea, no entanto, já foi encontrada infectada por *L. (V.) brasiliensis* no município de Rio Branco (Araújo- Pereira et al., 2017) e neste trabalho foi a terceira espécie mais frequente nas coletas com armadilhas luminosas e a primeira mais abundante com armadilha do tipo Shannon, com distribuição em todos ambientes de coletas e dominância no peridomicílio rural (mata). No estudo microscópico da infecção natural, observou-se pela primeira vez formas flageladas sugestivas de promastigotas em cinco espécimes de *Evandromyia saulensis*, sugerindo sua participação no ciclo enzootico de transmissão desse agravo e a necessidade de estudo de capacidade e competência vetorial em transmitir *Leishmania* ao homem.

O gênero *Psycodopygus* foi mais abundante nas coletas com um total de sete espécies coletadas. *Psycodopygus carrerai carrerai* e *Psycodopygus. davisii* foram as mais abundante no estudo, espécies desse gênero são frequentes em estudos de fauna e infecção natural na Amazônia (Silva et al., 2007; Neto et al., 2012; Neto et al., 2010; Souza et al., 2010). Neste estudo *Psycodopygus davisii* foi encontrada infectada por *L. (V.) braziliensis* e corrobora o estudo no município de Assis Brasil, que encontrou DNA de *L. (V.) braziliensis* (Teles et al., 2016) reforçando a importância dessa espécie na região que já foi encontrada infectada com *Leishmania* no estado de Rondônia, (Gil et al., 2003; Grimaldi et al., 1991), e naturalmente infectada por *L. (V.) braziliensis* na Serra dos Carajás, Pará e no Peru (Valdivia et al. 2012,

Souza et al., 2010). *Psychodopygus davisii*, tem sido encontrada frequentemente no peridomicílio, sugerindo sua possível adaptação a ambientes antropizados. Essa espécie associada a sua antropofilia, densidade populacional nas coletas de fauna e infecção natural, incrimina esta espécie no ciclo de transmissão da doença nessa Região (Grimaldi et al., 1991; Gil et al., 2003; Souza et al., 2010; Valdivia et al., 2012).

As espécies *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia antunesi*, *Bichromomyia flaviscutellata*, *Psychodopygus hirsutus hirsutus*, *Psychodopygu ayrozai*, *Migonemyia migonei* foram encontradas em baixa frequência nos diferentes ambientes estudados e incriminadas como vetores de espécies de *Leishmania* na região (Azevedo et al., 2008). *Ps. ayrozai* foi encontrada naturalmente infectada com *L. (V.) guyanensis*, reforçando a circulação dessa espécie na transmissão da LT no estado, já descritos em outros estudos de fauna e epidemiologia (Teles et al, 2016., Tojal et al., 2006). *Psychodopygus ayrozai* com ampla ocorrência no Norte do Brasil (Brazil et al., 2015), tem seu habitat no peridomicílio e apresenta alta antropofilia (Basano e Camargo, 2004), na Amazônia as espécies de *Psychodopygus* estão associadas à transmissão da LT e podem ser vetores importantes nos ciclos zoonóticos e enzoóticos (Alves et al., 2012).

A espécie *Trichophoromyia ubiquitalis*, foi descrita como vetor de *L. (V.) lainsoni* no estado do Pará (Silva-Nunes et al., 2008) e em um trabalho realizado nas proximidades do Rio Solimões (AM) foi a espécie predominante, contribuindo com 57,94% (Pereira et al., 2015). No presente estudo, foi capturado apenas um exemplar desse flebotomíneo na armadilha de Shannon.

O estudo da fauna de flebotomíneos em três municípios do Estado do Acre identificou 52 espécies dentre as quais, *Trichophoromyia auraensis*, *Nyssomyia antunesi*, *Nyssomyia whitmani*, e *Ps. davisii* foram responsáveis por 66,95% dos espécimes coletadas, sendo a espécie *Nyssomyia whitmani* mais abundante (Azevedo et al., 2008). Neste estudo, as mesmas espécies representaram 40,7% nas coletas, sendo a mais frequente a espécie *Trichophoromyia auraensis* com 33,3%.

Em 2008, Silva-Nunes et al. (2008), estudando a epidemiologia da leishmaniose tegumentar e fauna de flebotomíneos para identificar possíveis vetores no município de Acrelândia, coletou 14 espécies, sendo três conhecidas como possíveis vetores da doença: *Nyssomyia antunesi* (59,1%) no peridomicílio e margens de matas; *Nyssomyia whitmani* mais frequente no peridomicílio (15%) e a única registrada no intradomicílio no *Trichophoromyia ubiquitalis*, no peridomicílio. Neste estudo *Nyssomyia whitmani* e *Nyssomyia antunesi* foram mais frequentes no ambiente rural (mata).

Araújo-Pereira et al. (2014), em levantamento de fauna em três áreas no município de Rio Branco durante um ano, mostrou alta diversidade da fauna flebotomínea, com maior

abundância de *Trichophoromyia auraensis* e *Nyssomyia whitmani*, com 72% dos espécimes coletados, sendo algumas como a *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia antunesi* e *Bichromomyia flaviscutellata*, já conhecidas como vetores de agentes etiológicos de leishmaniose tegumentar. Os dados corroboram a maior frequência de *Trichophoromyia auraensis* (33,3%) coletadas durante o levantamento da fauna e a presença das mesmas espécies potencialmente vetoras de parasitos de *Leishmania* ao homem (Araújo-Pereira et al., 2014; Teles et al., 2016; Brilhante, 2017).

A diversidade de espécies coletadas nas duas áreas deste estudo, foi menor no ambiente rural, com um menor índice de uniformidade devido à alta dominância de espécies. Assim, a frequência de flebotomíneos, parece se relacionar ao nível de degradação do ambiente e a oferta alimentar propiciada pelos animais no peridomicílio alterando o comportamento populacional das espécies (Silva et al., 2008). Dessa forma, o parque ambiental interligado a uma área de proteção ambiental, mesmo com índice de riqueza menor, parece sofrer menos efeitos antrópicos, e tende manter o equilíbrio na distribuição de espécies no ecossistema. Os índices ecológicos nos diferentes ambientes estudados, não apresentaram diferenças significativas, tendo a maior diversidade para mancha de floresta primária no parque urbano. Silva et al, (2008) sugere áreas com vegetações em diferentes estágios sucessionais podem influenciar na dominância e frequência dos flebotomíneos.

No total de flebotomíneos coletados em armadilha luminosa, houve um aumento na abundância de espécies no início da estação chuvosa de dezembro a abril, com menores quantidades, durante os meses secos de baixa umidade e ocorrência do chamando inverno amazônico. Um aumento significativo é observado no início da estação chuvosa. A frequência de espécies teve uma correlação significativa positiva para variação da temperatura ($rs = 0,58$; $P = 0,030$), indicando que com o aumento da temperatura, há um aumento para abundância de flebotomíneos coletados.

Com relação aos dados climáticos neste trabalho apresentam resultados similares aos encontrados em outros estudos. Em Campo Grande (MT), houve um aumento na abundância de espécimes capturados, após os meses de maiores índice pluviométricos (Oliveira et al., 2003) e alta umidade, assim como resultados observados neste estudo. Ressalta-se que há padrões de sazonalidade distintos em diferentes estados no Brasil. No Rio Grande do Norte, um estudo mostrou que os flebotomíneos foram predominantes durante a estação de seca, com um declínio na abundância de espécies na estação chuvosa, com temperaturas mais baixas e alta umidade relativa (Pinheiro et al., 2013).

Os estudos de fonte alimentar em flebotomíneos têm sido úteis no esclarecimento da epidemiologia das leishmanioses, no entendimento do ciclo biológico do inseto, visando

auxiliar a atividade de controle (Dias et al., 2003). Neste trabalho todas as 33 fêmeas de flebotomíneos com repasto foram positivas pela PCR-*cyt b*. A análise de fonte alimentar mostrou similaridade alta com a espécie *Gallus gallus* (galinha doméstica).

A presença de animais domésticos no ambiente peridomicíliar, e a abundante oferta de alimentos e abrigo, oferecem condições favoráveis para a manutenção de algumas espécies de flebotomíneos, como observado em estudos no Estado do Maranhão, onde a amostragem da fauna flebotomínea não teve êxito em ambientes sem a presença de animais domésticos (Dias et al., 2003). No entanto, mesmo que as galinhas não representam uma fonte de infecção por flebotomíneos, à presença dessas em grande número no ambiente peridomicíliar, e a distância dos abrigos de animais domésticos para as residências dentro do raio de dispersão dos flebotomíneos, são aspectos relevantes, pois quanto mais próximos estiverem dessas residências, maior poderá ser o acesso do vetor ao intradomicílio, considerando o desenvolvimento da antropofilia pelos flebotomíneos e o tipo das habitações encontradas, caracteristicamente feitas de taipa ou de madeira pode ser altamente atraente e contribuir para a manutenção de seu ciclo de vida do inseto constituindo um problema epidemiológico, mantendo o vetor no ambiente humano (Dias et al., 2003; Brazil et al., 1991).

Os galináceos adquirem importância como fonte de repasto sanguíneo, essas aves têm sido consideradas refratárias no ciclo de transmissão da doença e há uma possibilidade que elas possam influenciar a dinâmica da população dos flebotomíneos com o aumento da densidade populacional nas áreas peridomiciliares. Isso poderia contribuir para aumentar o risco de transmissão de *Leishmania* aos humanos (Teodoro et al., 1993).

Vale ressaltar que as presenças de fêmeas de flebotomíneos infectadas e de reservatórios sinantrópicos podem permitir a ocorrência do ciclo de transmissão no ambiente peridomicíliar do presente estudo. Assim, neste estudo, a galinha doméstica parece ser uma fonte de sangue oportunista para as fêmeas de flebotomíneos, provavelmente porque é mantida em grande número, se tornando uma fonte alimentar de fácil acesso aos flebotomíneos (Brazil et al., 1991).

Devido ao elevado número de casos humano de LT em Rio Branco (AC) (Ministério da Saúde/ SINAN, 2017). O presente estudo visou avaliar a possível participação do cão doméstico no ciclo de transmissão da leishmaniose. Apesar de não terem sido encontrados cães positivos para *Leishmania* no exame parasitológico três cães foram positivos para DNA do parasita em testes moleculares.

Ainda assim, hemoparasitas de grande importância na clínica veterinária foram observados, mostrando a importância do cão em outros aspectos. pois são de elevada

prevalência, alta disseminação e difícil controle. Muitas vezes, apresentam sinais inespecíficos, o que dificulta o direcionamento do diagnóstico (Costa, 2014).

A ausência de detecção de parasitos de *Leishmania* em sangue periférico ou em tecidos saudáveis e intactos de cães tem contribuído pela não implicação desses animais na participação do ciclo de transmissão desse parasito (Castro et al., 2007; Madeira et al., 2005, 2006). No entanto, o encontro desses animais doentes em uma determinada região pode ser um indício da ocorrência de casos humanos (Figueiredo et al., 2012), sugerindo uma semelhança com a realidade encontrada em Rio Branco para a LT.

A ausência de formas flageladas nas culturas das amostras de sangue dos animais está de acordo com estudos de alguns autores que usaram amostras biológicas no diagnóstico de LT. Isto se deve à baixa sensibilidade dos testes de isolamento, em decorrência do pequeno número de parasitos circulantes (Reithinger et al., 2017; Madeira et al., 2005; Santos et al., 2010). Os resultados negativos de testes moleculares como a PCR em amostras de sangue também pode ser justificada pelo fato de a disseminação hematogênica da doença ter sido controlada pelo sistema imune desses animais (Massunari et al., 2009).

A baixa sensibilidade da técnica utilizada neste estudo e a maioria de animais assintomáticos incluídos na pesquisa condizem para a ausência de formas amastigotas. A visualização de agentes patogênicos no esfregaço sanguíneo pode indicar que o indivíduo está na fase aguda da doença, que podemos considerar uma condição incomum para LT canina, visto que muitos animais permanecem assintomáticos por longos períodos (Brasil, 2017). Devem ser levados em consideração outros fatores, tais como, escassez de parasitos no tecido lesionado (Zanzarini et al., 2005) e cronicidade e tempo de evolução das lesões (Furtado, 1980). As infecções bacterianas podem dificultar a visualização das formas amastigotas, interferindo negativamente no resultado (Schubach et al., 2001). Estudos realizados na Bahia têm verificado baixa sensibilidade no diagnóstico de LT em amostras de sangue, mesmo apresentando lesões características da doença (Leça-júnior et al., 2015).

Segundo o Ministério da Saúde (Brasil, 2010) os exames diretos em esfregaços sanguíneos provenientes de sangue periférico, conferem somente 30% de sensibilidade. É importante ressaltar que, clinicamente, os exames de rotina mais utilizados, segundo Gontijo et al., (2011), são os exames de observação direta, tais como: raspado de pele, biópsia de pele, esfregaço sanguíneo, aspirado de medula óssea e aspirado de linfonodos para a observação de formas amastigotas de *Leishmania* spp. intra ou extracelulares. A não observação do parasito não descarta a possibilidade de sua existência no organismo. A técnica de aspirado de linfonodo confere por volta de a 85% de sensibilidade, e é considerado um teste confirmatório.

Exames sorológicos são comumente utilizados em consultórios veterinários para auxiliar o diagnóstico de LT em cães e são exames preconizados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento como diagnóstico comprobatório para a doença. Exames RIFI e ELISA detectam anticorpos específicos, possuindo sensibilidade de 95% e especificidade por volta de 86% (Gontijo et al., 2011). A PCR é o método mais eficiente e pode permitir a detecção da espécie do parasito (Gontijo et al., 2011).

Na região Amazônica, são poucos os estudos sobre LT envolvendo cães domésticos, sendo a maioria, diagnosticada a partir de técnicas sorológicas, moleculares e exame parasitológico direto, confirmando assim, a circulação de *Leishmania* spp. nesses animais (Mayrink et al., 1981; Aguiar et al., 2010; Reis et al., 2011). No Acre, Braga et al. (2017), detectaram em 1 de 41 amostras, formas amastigotas em *imprint* de lesão em um cão com sinais clínicos sugestivos de LT canina na zona rural de Xapuri, Acre. Por meio de técnicas moleculares reportaram-se infecções naturais de *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi* e *L. (L.) amazonensis* em humanos (Oliveira et al., 2005; Tojal et al., 2006; Teles et al., 2015), e em flebotômíneos, a circulação de *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* em flebotômíneos considerados suspeitos de serem vetores (Teles et al., 2016).

Em nosso estudo os dados ainda são inconclusivos nas técnicas moleculares com a detecção de DNA de *Leishmania* em três animais (3/56; 5,0). Todavia, não se descarta a possibilidade de haver espécies de *Leishmania* presentes em cães na área de amostragem.

Em relação aos fatores associados à transmissão, foi observado que os cães vivem próximos ao peridomicílio (matas), com a presença de reservatórios e de vetores comprovados e suspeitos de *Leishmania*. Além de acompanhar seus donos em atividades de caça, ficando tanto a população canina e humana expostas a dois ciclos de transmissão de *Leishmania*, um selvático devido às atividades de caça, e um peridoméstico, que pelo fato das residências estarem próximas aos ambientes florestais. (Mayrink et al., 1981; Brandão-Filho et al., 1994; Heusser et al., 2010; Brilhante et al., 2016).

6 CONCLUSÕES

- A fauna de flebotomíneos do município de Rio Branco é bem diversificada com a espécie *Sciopemyia vattierae* registrada pela primeira vez em coletas no Brasil e com maior abundância da espécie *Trichophoromyia auraensis* (33,3%) durante o levantamento da fauna, além da presença de espécies potencialmente vetores de parasitos de *Leishmania* ao homem na região;
- Este foi o primeiro relato de uma possível infecção natural por *Leishmania* em *Evandromyia saulensis* feito por dissecação, que corrobora achados neste e em outros estudos utilizando técnicas moleculares dessa espécie infectada com *L (V) braziliensis*, reforçando a necessidade de estudos complementares sobre a competência vetorial dessa espécie;
- Este foi o primeiro relato de infecção natural por *L. (V.) braziliensis* nas espécies, *Psychodopygus llanosmartinsi*, *Pintomyia. nevesi*, *Psathyromyia aragaoi* e *Evandromyia infraspinosa* o que sugere a necessidade de estudos complementares buscando inferir a competência vetorial destas espécies;
- Somente a espécie *Psychodopygus ayrozai* apresentou infecção similar a *L (V.) guyanensis* em sequência depositada na base de dados do GenBank. Reforçando a importância da vigilância epidemiológica destas espécies como possíveis vetores desses parasitos;
- Todas as fêmeas ingurgitadas submetidas à amplificação do gene *cyt b* apresentaram sequências similares à sequência depositada no GenBank da espécie *Gallus gallus* (galinha), reforçando a importância da participação desses animais na manutenção do ciclo biológico dos flebotomíneos no peridomicílio;
- No diagnóstico da infecção canina nenhuma forma sugestiva de *Leishmania* foi encontrada nas análises microscópicas, contudo foi evidenciada a presença de hemoparasitas;

- No diagnóstico molecular canino o DNA de *Leishmania* ssp. foi amplificado em três amostras de sangue periférico, sendo necessário posterior sequenciamento para identificação da espécie.
- *L. (V.) braziliensis* representou a principal espécie do parasita identificada por infecção natural nas fêmeas de flebotomíneos analisadas.

7 REFERÊNCIAS

- Abassi I, Cunio R, Warburg A. Identification of bloodmeals imbibed by phlebotomine sand flies using *cytochrome b* PCR and reverse line blotting. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2009; (9): 79–86.
- Acre. Programa Estadual de Zoneamento Ecológico Econômico Fase II: documento Síntese Rio Branco, Acre: SEMA; 2010.
- Adl S.M., Simpson A.G., Lane C.E., Lukeš J., Bass D., Bowser S.S., Brown M.W., Burki F., Dunthorn M., Hampl V., Heiss A., Hoppenrath M., Lara E., Le Gall L., Lynn D.H., McManus H., Mitchell E.A., Mozley-Stanridge S.E., Parfrey L.W., Pawlowski J., Rueckert S., Shadwick R.S., Schoch C.L., Smirnov A., Spiegel F.W. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol.* 2012; 59: 429-493.
- Afonso MMS, Duarte R, Miranda JC, Caranha, L, Rangel, EF. Studies on the Feeding Habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Populations from Endemic Areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. *J Trop Med* 2012; (2012): 1-5.
- Aguiar DM, Oliveira TMFS, Cavalcante GT, Labruna MB, Camargo LMA, Machado RZ, et al. Seroprevalence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in rural dogs from the city of Monte Negro, State of Rondônia, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2010; 19 (1): 71-72.
- Aguiar GM, Medeiros WM. Distribuição e habitats. In: Rangel EF, Lainson R, orgs. Aguiar, GM, Vilela ML. Aspects of the ecology of sandflies at Serra dos Órgãos National Park, State of Rio de Janeiro. VI Shelters and breeding places (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; 82 (4): 585-86.
- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10(3):1-40.
- Alves VR, Freitas RA, Santos FL, Oliveira AFJ, Barrett TV, Shimabukuro PHF. Sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from Central Amazonia and four new records for the state of Amazonas, Brazil. *Rev Bras Entomol* 2012, (56): 220–7.
- Ambroise-Thomas P. Emerging parasite zoonoses: the role of host–parasite relationship. *Int J Parasitol* 2000; (30): 1361-7.
- Araújo-Pereira T, Fuzari AA, Andrade-Filho JD, Pita-Pereira D, Britto C, Brazil RP. Sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in an area of leishmaniasis transmission in the municipality of Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Paras vectors* 2014; 7(360):1-5.
- Araujo-Pereira T, Pita-Pereira D, Boité MC, Melo M, Costa-Rego TA, Fuzari AA, et al. First description of *Leishmania (Viannia)* infection in *Evandromyia saulensis*, *Pressatia* sp. and *Trichophoromyia auraensis* (Psychodidae: Phlebotominae) in a transmission area of cutaneous leishmaniasis in Acre state, Amazon Basin, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2017; (112):75–8.

- Arias JR, Freitas RA. The known geographical distribution of sand flies in the state of Acre, Brazil (Diptera: Psychodidae). *Acta Amaz* 1982; (12): 401-08.
- Arias JR, Miles MA, Naiff RD, Povoá MM, Freitas RA, Biancardi CB, et al. Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34 (6): 1098-08.
- Arias JR, Naiff RD, Miles MA, Souza AA. The opossum *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae) as a reservoir host of *Leishmania brasiliensis* and *guyianensis* in the Amazon Basin of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; (75): 537-41.
- Azevedo AC, Costa SM, Pinto MC, Souza JL, Cruz HC, Vidal J, et al. Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American Cutaneous Leishmaniasis in state of Acre, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; (103):760-6.
- Ávila MM, Wadt PGS. Avaliação do impacto ambiental em assentamentos rurais do estado do Acre, na Amazônia Brasileira. 2015; 8(1):24. Epub 2015-04-29.
- Ávila MM, Brilhante AF, de Souza CF, Bevilacqua PD, Galati EAB, Brazil RP. Ecology, feeding and natural infection by *Leishmania* spp. of phlebotomine sand flies in an area of high incidence of American tegumentary leishmaniasis in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. *Parasites & Vectors*. 2018;11(1):64.
- Azizi K, Askari MB, Kalantari M, Moemenbellah-Fard MD: Molecular detection of *Leishmania* parasites and host blood meal identification in wild sand flies from a new endemic rural region, south of Iran. *Pathog Glob Health* 2016; (110): 303-09.
- Barker DC. Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology* 1989; (99): 125-46.
- Basano SA, Camargo LMA. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. *Rev Bras Epidemiol* 2004; (7):328–37.
- Bejarano EE, Duque P, Vélez ID. Redescrición de la hembra de *Lutzomyia vattierae* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) de la serranía de La Macarena, Colombia. *Biomédica* 2006; (26):556-561.
- Bheham PFL, Garret-Jones C. Prevalence of mixed blood meals and double feeding in malaria vector (*Anopheles sacharovi* Frave). *Bull Who* 1973; (48): 605-14.
- Blackwell A, Brown M, Mordue W. The use of an enhanced ELISA method for the identification of Culicoides blood meals in host-preference studies. *Med Vet Entomol* 1995; (9): 214-18.
- Braga PO, Brilhante AF, Galati EAB, Dorval MEC, Malavazi PFNS. Ocorrência de Leishmaniose Tegumentar Americana em animais domésticos no município de Xapuri, Acre, Brasil. In: *Anais do 4º Simpósio sobre Sanidade e Produção Animal*. Universidade Federal do Acre, Rio Branco – Acre, Brasil. 2017.
- Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco state, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; (97): 291–296.

Brandão-Filho SP, De Carvalho FG, De Brito M, Almeida FA, Nascimento, LA. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: eco-epidemiological aspects in 'Zona da Mata' region. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89 (3): 445-9.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 180 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Brasil. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]. Brasília. 2017.

Brasil. Ministério da Saúde. Informações de Saúde. TabnetDatusus. [cited 2017 dez 20] Available from: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=02>

Brasil. Ministério da Saúde, Ministério de Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde: Guia de vigilância em saúde. Brasília; 2014. 812p.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ªed. 3ª reimpressão. Brasília-DF. 2013. 187p.

Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Accessed 28 Nov 2017.

Brazil RP, Brazil BG. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2003. p.257-274.

Brazil RP, De Almeida DC, Brazil BG, Mamede SM. Chicken house as resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. Parasitologia 1991; (33):113-7.

Brazil, RP, Rodrigues AAF, Filho JDA. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas - a mini review. Entomol Ornithol Herpetol 2015; (4):144.

Brilhante AF, De Ávila MM, De Souza JF, Medeiros-Sousa AR, Sábio PB, De Paula MB, et al. Attractiveness of black and white modified Shannon traps to phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in the Brazilian Amazon Basin, an area of intense transmission of American cutaneous leishmaniasis. Parasite 2017; 24 (20): 1-13.

Brilhante AF, Souza AI, Dorval MEC, França AO, Lima RB, Galati EAB, Nunes VLB. Canine cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an agricultural settlement, endemic area for leishmaniasis. Arq Bras Med Vet Zootec 2016; (68): 927-30.

Cabrera O, Mosquera L, Santamaría E. Flebotomos (Diptera: Psychodidae) del departamento de Guaviare, Colombia, con nuevos registros para el país. Biomédica 2009; 29(1): 73-86.

Cáceres A, Galati EAB. Lista de Phlebotominae (Diptera:Psychodidae) para el Perú y especies consideradas como vectores naturales e incriminadas en la transmisión de patógenos de la Leishmaniosis Tegumentaria y de la Enfermedad de Carrión (verruca peruana). Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Pública 2001; 18:3-4.

Castro EA, Soccol VT, Augur C, Luz E. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). *Exp Parasitol* 2007; (117): 13-21.

CDC. Leishmaniasis. Centers for Disease Control and Prevention. 2017. [Acesso em 20 nov 2017]. Disponível em <http://www.cdc.gov/parasites/>

Costa MP. Avaliação hematológica de sangue e medula óssea e bioquímica sérica de cães infectados naturalmente por hemoparasitas. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG; 2014.

Costa SM, Cechinel M, Banderia V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil Mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; (102):149–53.

Cupolillo E, Grimaldi Júnior G, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1995; (73):145-155.

Cupolillo E, Boité MC, Porrozzi R. Considerações sobre a Taxonomia do Gênero *Leishmania* In: Silva-Conceição F, Alves. *Leishmanioses do Continente Americano*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2014.p. 39-41.

Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi Junior G. A Revised Classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today* 2000; (16):142-144.

Cupolillo E. Avanço dos estudos moleculares de *Leishmania (Leishmania) chagasi* aplicados ao diagnóstico de LV no Brasil. Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas. 2005: 57-62.

Da Cruz AM, Pirmez C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: José Rodrigues Coura (ed). *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 697-712.

Da Graça GC, Volpini AC, Romero GAS, De Oliveira Neto MP, Hueb M, Porrozzi R, et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous Leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107(5): 664-74.

Danabalan R, Monaghan MT, Ponsonby DJ, Linton YM. Occurrence and host preferences of *Anopheles maculipennis* group mosquitoes in England and Wales. *Med Vet Entomol* 2014; (28): 169–78.

Dantas-Torres F. Canine leishmaniasis in South America. *Paras vectors* 2009; 2 (Suppl 1):1-8.

Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 2007; (149):139-146.

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*- a mini-review. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; (89): 463-469.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 2004; (27): 305-318.

Dias FDOP, Lorosa ES, Rebêlo JMM. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). Cad de Saúde Pública 2003; (19):1373-80.

Disch J. et al. *Leishmania* (Viannia) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 51 (3): 185-90.

Duarte R. Ensaio Imunoenzimático ELISA para identificação experimental de fontes alimentares em *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (Hemíptera: Reduviidae), Tese; Instituto Oswaldo Cruz, 1997.

Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degrave WM, Campbell DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. Mol Biochem Parasitol 1994; 66(2): 261-71.

Ferreira GA, Soares FC, Vasconcellos SA, Rodrigues EH, Werkhäuser RP, De Brito ME, et al. Discrimination of *Leishmania braziliensis* variants by kDNA signatures produced by LSSP-PCR. J Parasitol 2007; (93): 712-714.

Figueiredo FB, Madeira MF. Os Parasitos e a questão da infecção em animais domésticos e domiciliados. Vetores na Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Conceição-Silva F, Alves CR. Leishmaniose do continente americano. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2014. p. 259-273.

Figueiredo LA, Cavalcanti-Paiva M, Almeida EL, Brandão-Filho SP, Dantas-Torres F. Clinical and hematological findings in *Leishmania braziliensis*- infected dogs from Pernambuco, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 2012; 21(4): 418-20.

Forattini OP. Entomologia Médica IV. Psychodidae: Phlebotominae, Leishmaniose e Bartonelose. Edgar Blucher Ltda, São Paulo.1983:658.

Furtado T. Critérios para diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. In. Anais Brasileiros de Dermatologia. 1980; 65: 51-86.

Galati EAB. Morfologia e Taxonomia: Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. Flebotomíneos do Brasil, Editora Fiocruz. 2003;176.

Galati EAB. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): classificação, morfologia, terminologia e identificação de adultos [apostila]. Vol. 1. São Paulo: USP; 2016.CDC.

Gomes LAM, Duarte R, Lima DC, Diniz BS, Serrão ML, Labarthe N. Comparison between precipitin and ELISA tests in the bloodmeal detection of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes flaviatilis*(Lutz) mosquitoes experimentally fed on feline, canine and humans hosts. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; (96): 693-95.

- Gontijo B, Carvalho MDL. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36(1):71–80.
- Gontijo CMF & Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e Perspectivas *Rev Bras Epidemiol*. 2004; 7(3): 338-349.
- Gontijo B, Pavão FF, Silva FSA, Silva FD, Tavares GC, Coelho GL. Esporotricose e *Leishmania* tegumentar em cães e gatos: semelhanças e diferenças. *Pubvet* 2011;5(38):1-19.
- González E, Gállego M, Molina R, Abras A, Alcover MM, Ballart C, et al. Identification of blood meals in field captured sand flies by a PCR-RFLP approach based on cytochrome b gene. *Acta Trop* 2015; (152): 96–102.
- Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; (8):419-433.
- Gil LHS, Basano SA, Souza AA, Silva MGS, Barata I, Ishikawa EA, et al. Recent Observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisi* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; (98):751–5.
- Grimaldi Júnior G, Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barrett TV. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon Region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1991; (44):645–61.
- Grimaldi Júnior G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Ver* 1993; (6): 230-250.
- Haouas N, Pesson B, Boudabous R, Dedet JP, Babba H, Ravel C. Development of a molecular tool for the identification of Leishmania reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77 (6): 1054-5.
- Heusser JA, Bellato V, Souza AP, Moura AB, Sartor AA, Santos EG, Silva VL. Canine tegumentar leishmaniasis in the town of Balneário Camboriú in the State of Santa Catarina. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43 (6): 713-8.
- IBGE. Instituto Nacional Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário Estatístico do Brasil. 2016 . www.ibge.gov.br. Accessed Nov, 2017.
- Jaouadi K, Haouas N, Chaaara D, Boudabous R, Gorchii M, kidar A, et al. Phlebotomine (Diptera, Psychodidae) blood meal sources in Tunisian cutaneous leishmaniasis foci: could *Sergentomyia minuta*, which is not an exclusive herpetophilic species, be implicated in the transmission of pathogens? *Ann Entomol Soc Am* 2013; (106): 79-85.
- Jiménez M, González E, Iriso A, Marco E, Alegret A, Fúster F, Molina R. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol Res* 2013; (112): 2453–2459.
- Kirstein F, Gray JS. A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of Lyme borreliosis by analysis of the blood meal in its European vector *Ixodes ricinus*. *Appl Environ Microbiol* 1996: 4060–65.

- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci U.S. A.* 1989; (86): 6196–6200.
- Lainson R & Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Biology and Epidemiology.* London: Academic Press; 1987; (1), p. 1-120.
- Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D (org.). *Microbiology and Microbial Infections, Parasitology.* Topley & Wilson's, Arnold, Sydney, Auckland 2005: 313–49.
- Lainson R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Rev Pan-Amaz Saude* 2010; 1(2): 13-32.
- Lamour SD, Choi BS, Keun HC, Müller I, Saric J.. Metabolic characterization of *Leishmania major* infection in activated and nonactivated macrophages. *J Proteome Res* 2012; 11 (8):4211-222.
- Lessa MM, Lessa HA, Castro TWN, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, et al. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2007; (73): 843–7.
- Le Pont F and Desjeux P. Phlébotomes de Bolivie. Description de *Lutzomyia vattierae* n. sp. et de la femelle de *L. antezanai* Le Pont, Dujardin et Desjeux, 1989 (Diptera, Psychodidae). *Bulletin de la Société entomologique de France* 1992; (97):263-8.
- Madeira MF, Schubach AO, Schubach TM, Pereira AS, Figueiredo FB, Baptista C, et al. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* 2006; (138): 366-370.
- Madeira MF, Schubach AO, Schubach TM, Serra CM, Pereira AS, Figueiredo FB, et al. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? *Parasitology Res* 2005; (97): 73-76.
- Madeira MF, Uchoa CMA, Leal CA, Silva RMM, Duarte R, Magalhães CM, Serra CMB. *Leishmania (viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003, 36(5): 551-555.
- Maleski-Ravasan N, Oshaghi MA, Javadian E, Rassi Y, Sadraei J, Mohtarami F. Blood meal identification in field-captured sand flies: comparison of PCRRFLP and ELISA assays. *Iran. J. Arthropod-Borne Dis* 2009; (3): 8–18.
- Marassá AM, Consales CA, Galati EAB. Padronização da técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina para a identificação de sangue ingerido por *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37(6): 441-46.
- Marcondes CB. A proposal of generic and subgeneric abbreviations of phlebotomines sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world *Entomol News* 2007; (118):351–356.

- Marcussi V, Marcussi L, Barbosa-Tessmann I, Lonardoni M, Silveira T. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*: new primers for identification using polymerase chain reaction. *Exp Parasitol* 2008;120 (4):300-5.
- Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel, RN, Grandoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol* 2012; 27(2): 123-147.
- Marques M, Volpini A, Genaro O, Mayrink W, Romanha A. Simple form of clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. *Am. j. trop. med. hyg* 2001;65(6):902-6.
- Martins AV, Silva JE. Notas sobre os flebotomíneos do estado do Acre, com a descrição de duas espécies novas (Diptera: Psychodidae). *Rev Bras Bio* 1964; (24): 127-38.
- Massunari GK, Voltarelli EM, Santos DR, Santos AR, Poiani, LP, De oliveira O, et al. A serological and molecular investigation of American cutaneous leishmaniasis in dogs, three years after an outbreak in the Northwest of Paraná State, Brazil. *Cad Saúde Pública* 2009; 25 (1): 97-104.
- Mayrink W, Magalhães PA, Meio MN, Dias M, Costa C A, Michalick MSM, Willians P. Canine cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas State, Brazil. *Trans. Transactions of Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* 1981; (75) p.757.
- Ministério da Saúde. Informações de Saúde. Tabnet/Datasus. [acessado em 10/11/2017] Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=02>.
- Molyneux DH. Control of human parasitic diseases: Context and overview. *Adv Parasitol* 2006; (61):1-45.
- Moreira D., López-García P., Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004; 54: 1861-1875.
- Muniz LHG, Rossi RM, Neitzke HC, Monteiro WM, Teodoro U. Estudo dos hábitos alimentares de flebotomíneos em área rural no sul do Brasil. *Rev Saúde Púb* 2006; (40):1087-93.
- Neto GJL, Baima JM, Freitas RAD, Passos MAB. Fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em floresta preservada e alterada do Município de Caroebe, Estado de Roraima, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2012; (3): 41-6.
- Neto GJL, Freitas RAD, Baima JM, Passos MAB. Fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) da Serra do Tepequém, Município de Amajari, Estado de Roraima, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* 2010; (1): 131-6.
- Nieves E, Pimenta PF. Development of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 2000; 37 (1):134-40.

- Ogawa GM, Pereira Júnior AM, Resadore F, Ferreira RGM, Medeiros JF, Camargo LMA. Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) from caves in the state of Rondônia, Brazil. *Braz J Vet Parasitol.* 2016; 25(1): 61–8.
- Ogusuku E, Guevara Z, Revilla L, Inga A, Perez JE. Descripción de *Lutzomyia pisuquia* sp. n. (Diptera:Psychodidae) y dos registros nuevos de *Lutzomyia* para el Perú. *Revista peruana de Entomología* 2001; (42): 21-25.
- Oliveira AGD, Andrade Filho JD, Falcão AL, Brazil RP. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. *Cad de Saúde Pública* 2003;(19): 933–44.
- Oliveira JGS, Novais FO, Oliveira CI, Cruz-Júnior AC, Campos LF, Rocha AV, et al. Polymerase chain reacton (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Acta Trop* 2005; (94): 55–9.
- Oliveira-Pereira YN, Moraes JLP, Lorosa ES, Rebêlo JMM. Preferência alimentar sanguínea de flebotomíneos da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Cad Saúde Pública* 2008; 24(9): 2183-2186.
- Paiva BR, Secundino NFC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade-Junior HF, Malafrente RDS. Standardization of conditions for PCR detection of *Leishmania* spp. DNA in sandflies (Diptera, Psychodidae). *Cad Saude Pública* 2007; (23):87–94.
- Patz JA, GT Geller N, Vitor YA. Effects of environmental changes on emerging parasitic disease. *Int j parasitol* 2000; (30):1395-405.
- Pereira Jr AM, Teles CBG, dos Santos APA, Souza Rodrigues MD, Marialva EF, Pessoa FAC, et al. Ecological aspects and molecular detection of *Leishmania* DNA Ross (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in terra firme and várzea environments in the Middle Solimões Region, Amazonas State, Brazil. *Parasit Vectors* 2015;8: 180.
- Pinheiro MPG, Silva JHT, Cavalcanti KB, de Azevedo PRM. Ecological interactions among phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in an agroforestry environment of Northeast Brazil. *J Vector Ecol.* 2013; 38(2):307-16.
- Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BAS, Moreira OC, et al . SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors* 2012; 5:15.
- Petney TN . Environmental, cultural and social changes and their influence on parasite infections. *International Journal for Parasitology* 2001; (31):919-32.
- Quaresma PF, De Lima Carvalho GM, Das Neves FRMC, Andrade Filho JD. Natural *Leishmania* spp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. *Mem Ins Oswaldo Cruz* 2012; (107): 480–485.

Reis SR, Franco AMR, Michalick MSM. Leishmaniose tegumentar experimental e natural no cão doméstico (*Canis familiaris*), Município de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. *rev Pan-Amaz Saude* 2011; 2 (2): p. 811.

Reithinger PO, Brilhante AF, Galati EAB, Dorval MEC, Malavazi PFNS. Ocorrência de Leishmaniose Tegumentar Americana em animais domésticos no município de Xapuri, Acre, Brasil. In: *Anais do 4º Simpósio sobre Sanidade e Produção Animal*. Universidade Federal do Acre, Rio Branco – Acre, Brasil. 2017.

Rey L. *Parasitologia*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. p.856.

Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlon G F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasit Hum Comp* 1990; (65): 111-125.

Sábio PB, Brilhante AF, Quintana MG, Andrade AJ, Galati EAB. On the Synonyms of *Psathyromyia (Psathyromyia) shannoni* (Dyar, 1929) and *Pa. bigeniculata* (Floch & Abonnenc, 1941) and the Resuscitation of *Pa. pifanoi* (Ortiz, 1972) with the description of its female (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Journal of Medical Entomology* 2016; 53 (5): 1140-47.

Sant'anna MRV, Jones NG, Hindley JA, Mendes-Sousa AF, Dillon RJ, Calvacante RR, et al. Blood meal identification and parasite infection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* PCR using FTA databasing paper. *Acta Trop* 2008; (107): 230-37.

Santos JML, Dantas-Torres F, Mattos MRF, Lino FRL, Andrade LSS, Souza RCA, et al. Prevalência de anticorpos antileishmania spp em cães de Garanhuns, Agreste de Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; (43): 41-45.

Schönian G, Mauricio I, Cupolillo E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends in parasitol* 2010; 26(10): 466-9.

Schubach A, Cruzzi-Maia T, Oliveira AV, Sartori A, Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Araújo M, et al. Leish-manial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of americantegumentary leishmaniasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96 (7): 987–96.

Silva AMD, Camargo NJD, Santos DRD, Massafra R, Ferreira AC, Postai C, et al. Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. *Neotrop Entomol* 2008; (37): 209–25.

Silva DF, Freitas RA, Franco AM. Diversidade e abundância de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em áreas de mata do nordeste de Manacapuru, AM. *Neotrop Entomol* 2007; 36(1): 138–44.

Silva NS, Muniz VD. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Acre, Amazônia brasileira. *Cad de Saúde Pública* 2009; 25(6):1325-36.

Silva NS, Viana AB, Cordeiro JA, Cavasini CE. Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Acre, Brasil. *Rev Saúde Públ* 1999; 33:554–9.

Silva-Nunes M, Cavasini CE, Silva NS, Galati EAB. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar e descrição das populações de flebotomíneos no município de Acrelândia, Acre, Brasil. *Rer bras epidemiol* 2008; (11): 241-51.

Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2011;105(1):1-6.

Simpson L. The mitochondrial genome of Kinetoplastida: transcription, replication and evolution. *Annual Review of Microbiology* 1987; (4)1: 363-382.

Soares VY, Silva JC, Silva KR, Pires CM S, Santos MP, Ribolla PE, et al. Identification of bloodmeal sources of *Lutzomyia longipalpis* using polymerase chainreaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the cytochrome B gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014; (109): 379–383.

Souza AAA, Silveira FT, Lainson R, Barata IDR, Silva MDGS, Lima JAN, et al. Fauna flebotomínea da Serra dos Carajás, Estado do Pará, Brasil, e sua possível implicação na transmissão da leishmaniose tegumentar americana. *Rev Pan-Amaz Saude* 2010; (1): 45–51.

Steuber S, Abdel-Rady A, Clausen PH. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Parasitol res* 2005; 97 (3): 247-54.

Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gurtler RE., Mckerrow J, Reed S, Tarleton R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* 2008; 118 (4): 1301-10.

Tavares CA, Fernandes AP, Melo MN: Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2003; (3): 657-67.

Teles CBG, Medeiros JF, Santos AP, Freitas LAR, Katsuragawa TH, Cantanhede LM, et al. Molecular Characterization of American Cutaneous Leishmaniasis in the Tri-Border Area of Assis Brasil, Acre State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2015; (57): 343-47.

Teles CBG, Santos APA, Freitas RA, Oliveira AFJ, Ogawa GM, Rodrigues MS, et al. Phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) diversity and their *Leishmania* DNA in a hot spot of American Cutaneous Leishmaniasis human cases along the Brazilian border with Peru and Bolivia. *Mem Instit Oswaldo Cruz* 2016; 111 (7): 423-432.

Teodoro U, La Salvia FV, Lima EM, Spinosa RP, Barbosa OC, Ferreira MEMC et al. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. *Rev de Saúde Pública* 1993; (27): 242-249.

Tojal AC, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GAS: Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health* 2006; (11):1388–98.

Trujillo AV, Reina AEG, Orjuela AG, Suarez EP, Palomares JE, Alvarez LSB. Seasonal variation and natural infection of *Lutzomyia antunesi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae),

an endemic species in the Orinoquia region of Colombia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2013; 108(4): 463-469.

Valdivia HO, De Los Santos MB, Fernandez R, Baldeviano GC, Zorrilla VO, Vera H, et al. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia (Trichophoromyia) auraensis* in Madre de Dios, Peru, detected by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. 2012; (87): 511–7.

Volpini ÂC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L.(Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. Acta trop 2004; 90(1): 31-7.

World health organization (WHO)– Leishmaniasis – Forms of Leishmaniasis [<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>], 2011.

World health organization (WHO)- Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010.

World health organization (WHO)- Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. (Technical report series ; no. 975), 2012.

World health organization (WHO)- Weekly epidemiological record, Geneva, 557–572 Sept 2017.

Ximenes MFFM, Silva VPM, Queiroz PVS, Rego MM, Cortez AM, Batista LMM, et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil – reflexos do ambiente antrópico. Neotrop Entomol 2007; (36):128-37.

Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, West Indies, Central and South America. Mem Am Entomol Inst 1994; (54):1–881.

Zampieri R.A., Laranjeira-Silva M.F., Muxel S.M., Stocco de Lima A.C., Shaw J.J., Floeter-Winter L.M. High Resolution Melting Analysis Targeting hsp70 as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of *Leishmania* Species. PLoS Negl Trop Dis 2016;10(2): e0004485.

Zanzarini PD, Santos DR, Santos AR, Oliveira O, Poiani LP, Lonardoní MCV, et al. Leishmaniose tegumentar americana canina em municípios do norte do Estado do Paraná, Brasil. Cad de Saúde Pública 2005; 21(6):1957-61.

8 ARTIGOS PUBLICADOS/ACEITOS OU SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO DURANTE O DOUTORADO (ANEXOS)

1. Márcia Moreira de Ávila, Andreia Fernandes Brilhante, Cristian Ferreira de Souza, Paula Dias Bevilacqua, Eunice Aparecida Galati and Reginaldo Peçanha Brazil. Ecology, feeding and natural infection by *Leishmania* spp. of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in an area of high incidence of American tegumentary leishmaniasis (ATL) in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil .Parasites & Vectors, 2017. (in press) (**Anexo 1**).
2. Márcia Moreira de Ávila, Andreia Fernandes Brilhante, Eunice Aparecida Galati, Acigelda da Silva Cardoso and Reginaldo Peçanha Brazil. *Sciopemyia vattierae* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae Rondani, 1840): New record and geographical distribution of Acre state and Brazil. (Submetido) (**Anexo 2**).

RESEARCH

Open Access



Ecology, feeding and natural infection by *Leishmania* spp. of phlebotomine sand flies in an area of high incidence of American tegumentary leishmaniasis in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil

Márcia Moreira de Ávila¹, Andreia Fernandes Brillhante², Cristian Ferreira de Souza³, Paula Dias Bevilacqua⁴, Eunice Aparecida Bianchi Galati² and Reginaldo Peçanha Brazil^{3*}

Abstract

Background: Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) are insects of medical importance due to their involvement in the zoonotic transmission of *Leishmania* spp. to vertebrates. The aim of this work was to study the ecology of the sand fly fauna of two types of environments, a rural environment (the Transacrea Road) and an urban park (Horto Florestal Park), both located in the municipality of Rio Branco in the state of Acre, Brazil. Additionally, this study intended to investigate *Leishmania* infection and blood meal sources of these sand flies using molecular techniques.

Methods: The sand fly fauna was studied in different environments (i.e. forest and peridomestic environments in a rural area, and an urban forest) using Shannon traps and HP light traps to collect sand fly specimens over 13 consecutive months (December 2014 to January 2016). For investigating natural infection by *Leishmania* and the source of sand fly blood meals, DNA samples were extracted from female sand flies and subjected to polymerase chain reaction targeting ITS1 and *cytb* genes. DNA sequencing was subsequently used to identify species of *Leishmania* and the source of blood meals.

Results: A total of 2515 individual sand flies of 43 species were collected and identified, *Trichophoromyia auraensis* (839; 33.35%), *Trichophoromyia* spp. (537; 21.35%) and *Evandromyia saulensis* (187; 7.43%) were more abundant in the rural area ($S = 41$ species) than in the urban forest. No significant differences were found in species richness between forest and peridomestic environments in the rural area ($H = 0.04$; $P > 0.05$), but a larger number of species was found in the forest. *Leishmania* DNA was sequenced in 13 samples, confirming the presence of *L. (V.) braziliensis* in *Th. auraensis* ($n = 1$), *Ev. saulensis* ($n = 2$), *Ev. walkeri* ($n = 1$), *Ps. llanosmartinsi* ($n = 1$), *Pi. nevesi* ($n = 2$), *Ps. davisii* ($n = 1$), *Ps. ayrozai* ($n = 1$), *Pa. aragaoi* ($n = 1$), *Ny. antunesi* ($n = 1$) and *Ev. infraspinoso* ($n = 1$). Only *Ps. ayrozai* possessed a sequence similar to that of *L. (V.) guyanensis* (99%). Through microscopic analysis, five specimens of *Ev. saulensis* were found to possess flagellate forms in the hindgut, with an infection rate of 2.4%. Samples from 33 fed females were submitted to *cytb* gene amplification, for which sequencing determined that all were similar to the sequence deposited on GenBank for *Gallus gallus* (domestic chicken).

(Continued on next page)

* Correspondence: brazil.reginaldo@gmail.com

³Oswaldo Cruz Institute, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



(Continued from previous page)

Conclusions: The high abundance of *Trichophoromyia auraensis* and *Ev. saulensis*, and the detection of *L. (V.) braziliensis* DNA, suggests that both species may be vectors of American tegumentary leishmaniasis. *Psychodopygus ayrozai* was found to be infected by *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis*, and although collected in low abundance, it may be a potential vector in the region. The sand fly fauna was found to be rich and diverse with predominance of the genus *Psychodopygus*. Identification of food sources of fed females showed that 100% amplified a gene region compatible with the domestic chicken, which although considered refractory in the disease transmission cycle, may have an influence on the population dynamics of sand flies.

Keywords: Tegumentary leishmaniasis, Diversity, Ecology, Vectors, *Leishmania* spp.,

Background

Leishmaniasis is a complex of vector-transmitted zoonotic diseases, of great clinical importance and epidemiological diversity. It is caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* (order Kinetoplastida, family Trypanosomatidae) in vertebrate hosts including man. Transmission is performed by hematophagous insects of the subfamily Phlebotominae (family Psychodidae), known as sand flies, which have complex ecological behavior [1–3]. There are two main clinical types of leishmaniasis, which are caused by different protozoan species of the genus *Leishmania*: visceral leishmaniasis (VL) in which the etiological agent is *Leishmania infantum* and tegumentary leishmaniasis (TL) that affect the skin and mucous membranes [1, 4]. American tegumentary leishmaniasis (ATL) is a significant disease in Brazil due in part to the great abundance of sand fly vectors of the various species of *Leishmania* that occur in the country [3–6]. With 20,187 cases reported in 2015 [7], ATL has been reported in all states, suggesting adaptation of the parasites and their vectors to anthropic environments [8–11]. They have adapted to urban environments that are surrounded by forest remnants, also because of the greater supply of food sources for the vectors in the form of domestic animals in peridomestic areas [11, 12]. In the North Region of Brazil, ATL is endemic with 45% (9278) of the confirmed cases for the country in 2015 [7]. This region is characterized by human occupation associated with agricultural activities, mineral extraction and intense deforestation. It is also a region possessing low human development indices, with the absence of basic services such as sanitation in most residences, which are considered potential sites for the occurrence of tropical diseases [12–14].

In the state of Acre, located southwest of the Amazon in Brazil, ATL is considered endemic with high rates of incidence and prevalence [11, 15, 16]. Of the few studies that have been undertaken in the region, there have been reports of *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) lainsoni* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* [17–19]. Likewise, these studies have reported the sand fly species *Bichromomyia flaviscutellata*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia*

whitmani, *Ny. antunesi*, *Ny. umbratilis*, *Psychodopygus ayrozai*, *Ps. davisi*, *Ps. paraensis* and *Trichophoromyia ubiquitousalis* as the main vectors of the etiological agents of leishmaniasis [11, 16, 20–22]. Rio Branco is a municipality in Acre with the greatest occurrence of the disease, with 500 ATL cases reported between 2013 and 2014 [7]. However, studies of leishmaniasis are still incipient, especially with regard to sand fly ecology and food sources, and the transmission cycle of *Leishmania* spp. In addition, little information has been acquired regarding natural infection of possible vectors by dissection and observation of trypanosomatids [23–25], or by molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR), which are capable of identifying *Leishmania* DNA, such the studies carried out in Assis Brasil [22] and Rio Branco [26].

The objective of this study was to investigate the sand fly fauna of rural and urban environments, and determine their food source and natural infection by *Leishmania* in an endemic area of ATL in Rio Branco.

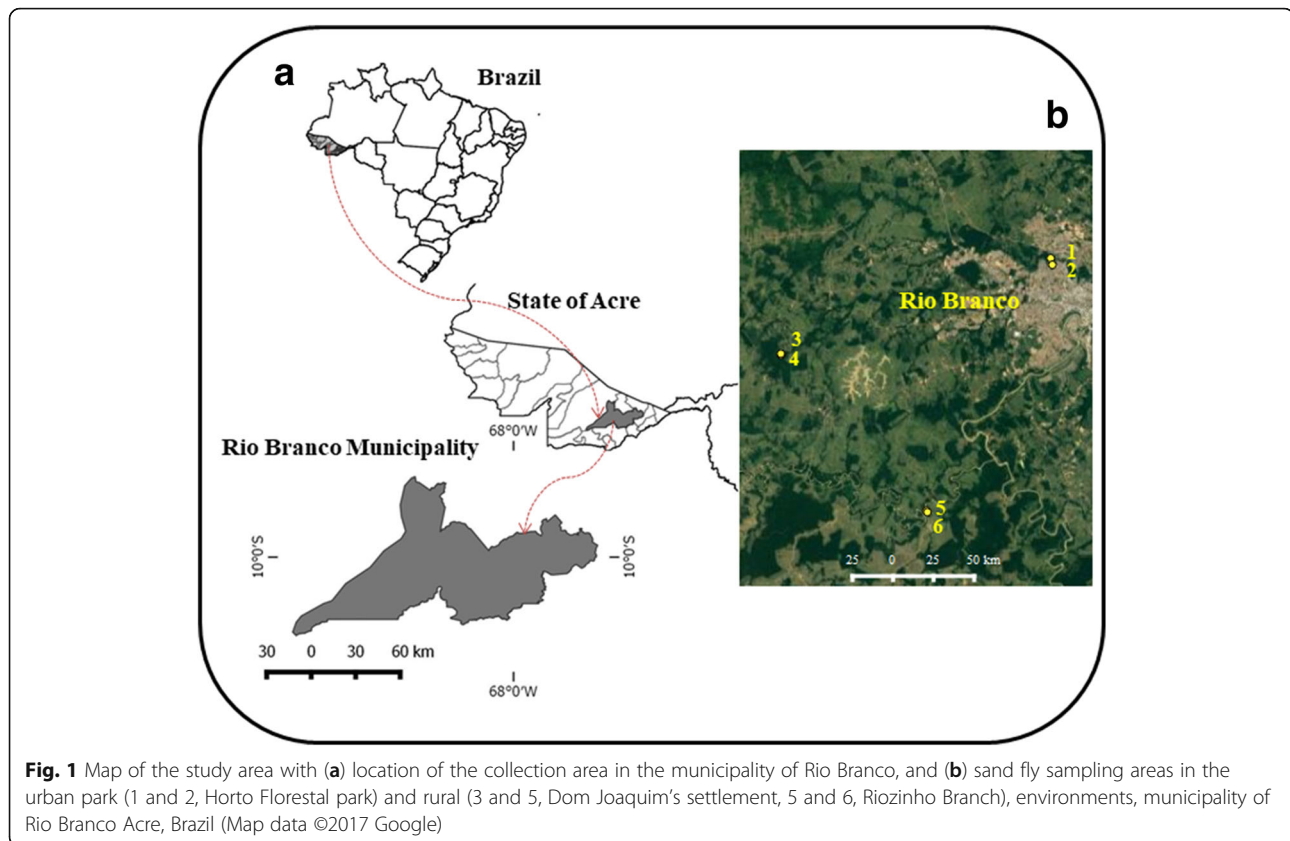
Methods

Study area

The municipality of Rio Branco (09°59′11″S, 67°49′52″W), capital of the state of Acre (AC), is located in the southwestern part of the Amazon Region of northern Brazil (Fig. 1a). It encompasses an area of 8835.52 km² [27], and possesses an estimated population of 377,057 inhabitants [27]. The vegetation is composed of dense and open tropical forest with predominance of bamboo and palm trees. The climate is equatorial, with temperatures varying from 24 °C to 32 °C and annual rainfall of between 1877 and 1982 mm. The hottest period of the year corresponds to the months of July to August, marked by intense fires due to the conversion of forest to pastures [28].

Sand fly sampling

Sand flies were collected in forest and peridomestic environments in a rural area, and in an urban forest, between December 2014 and January 2016. Sampling was carried out once a month using six HP light traps, set at



6:00 pm and retrieved at 6:00 am, distributed among the following sampling sites: Dom Joaquim Settlement Pole - Highway AC-90 (9°59'46.6"S, 67°58'51.0"W); Ramal do Riozinho - Highway AC-90 (10°05'00.1"S, 67°53'56.0"W); and Horto Florestal Urban Environmental Park (9°56'39.0"S, 67°49'43.6"W) (Fig. 1b).

To determine sand fly anthropophily, nocturnal sampling (06:00 pm to 08:00 pm) was performed by 2 persons using a Shannon trap in an area of peridomestic forest at Dom Joaquim Settlement during 13 nights. The females collected during this sampling were killed with ethyl acetate and dissected on slides with a drop of sterile saline solution to expose and examine the digestive tract and spermathecae for flagellate research and species identification, respectively. The specimens were then stored, in microtubes containing absolute ethanol, in pools of up to 10 females according to the month of collection and species, for subsequent molecular detection of *Leishmania* spp.

Fed females collected in HP light traps had only their genitalia exposed for species identification, and then were stored in 90% absolute ethanol for food source analysis.

All the remaining specimens collected in the Shannon trap were clarified according to Forattini [29] and identified according to the taxonomic key proposed by Galati

[30]. The abbreviation of species names followed Marcondes [31].

DNA extraction and PCR conditions

After being identified, female sand flies were subjected to DNA extraction using the Gentra Puregene® Cell and Tissue Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), following the manufacturer's protocol.

After DNA extraction, PCR was performed targeting the internal transcribed spacer 1 (ITS1) using the primers LITSR - Forward (5'-CTG GAT CAT TTT CCG ATG-3') and L5.8S - Reverse (5'-TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT-3') [32], to detect natural infection by *Leishmania* spp. In non-engorged females, the region amplifies a 350 bp fragment by means of the following reaction: 1× buffer solution (200 mM Tris-HCl, pH 8.4; 500 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.5 pmol of the LITSR primer, 0.5 pmol of the L5.8S primer, 1 U of Taq DNA Polymerase Platinum (Invitrogen, California, USA) of 5 µl template DNA in a total volume of 25 µl. Samples were amplified in an automatic thermocycler (MaxyGene Gradient - AXYGEN, Corning, USA) with 33 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 53 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1 min. In negative control, pure water was used with DNA from male sand flies. The amplified product was analyzed on a 2% agarose gel

stained with GelRed (Nucleic Acid Gel Stain - Biotium, Fremont, USA) and compared with amplified material from positive samples from reference strains of *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903). Positive samples were cloned into competent *Escherichia coli* (DH5- α) cells using the CloneJet PCR cloning kit (Thermo Scientific, California, USA) following the manufacturer's protocol. The colonies of transformed bacteria were selected, re-submitted to PCR of the ITS1 gene and sequenced.

Blood-feeding study and PCR conditions

DNA extracted from blood-fed female sand flies was submitted to PCR for amplification of the Cytochrome B gene, which amplifies a fragment of approximately 359 bp using the *cytb* primers (forward: 5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3'; and reverse: 5'-GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3') [33]. DNA extraction from the females followed the same protocol as described previously but in a laminar flow booth and adopting disinfection measures with care not to contaminate samples with human DNA. The PCR reaction was performed using 1 \times buffer solution (200 mM Tris-HCl, pH 8.4; 500 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.5 pmol LITSR primer, 0.5 pmol L5.8S primer, 1 U of Taq DNA polymerase platinum (Invitrogen, California, USA) and 5 μ l template DNA, in a total volume of 50 μ l. Samples were amplified in an automatic thermocycler (MaxyGene Gradient - AXYGEN, Corning, USA) with 32 cycles of 95 °C for 20 s (denaturation), 53 °C for 30 s (annealing) and 72 °C for 1 min (extension). As negative control, pure autoclaved water and DNA of male and female sand flies without the presence of intestinal blood were used. Five μ l of the amplified product was analyzed on a 2% agarose gel stained with 0.1 μ l of GelRed (Biotium Acid Gel Stain - Biotium, Fremont, USA) and compared to the band obtained by positive control (DNA amplified from canine clot).

Sequencing

For both the study of natural infection and that of food source, amplified PCR products were sent to Macrogen (South Korea) for sequencing using a 3730XL Applied Biosystems. The sequences obtained were edited using the program Sequencher, compared by BLAST with sequences available in GenBank.

Data analysis

Kruskal-Wallis was used to test the hypothesis of equality among the ecological descriptors in the different ecotopes studied. The measures of diversity among the environments were obtained using the Shannon-Wiener's (H') diversity index, the Pielou's equitability index (J'), Margalef's richness index and the Berger-

Parker's dominance index [34], followed by comparisons and Spearman's correlation tests between species and climatic variables (temperature, relative humidity and rainfall). The analyses were performed using the Past 2.17c program and IBM SPSS 20 software, with a 5% level of significance. The minimum natural infection rate was calculated considering the number of positive pools multiplied by 100 and divided by the number of insects tested [35].

Results

A total of 2515 sand flies were collected of 43 species belonging to 13 genera: *Brumptomyia*, *Bichromomyia*, *Evandromyia*, *Lutzomyia*, *Micropygomyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Pressatia*, *Psathiromyia*, *Psychodopygus*, *Sciopemyia* and *Tricophoromyia* (Table 1). The genus *Psychodopygus* was the most frequently collected (17.0% of the total), followed by *Evandromyia* (10.0%), *Thricophoromyia* (10.0%) and *Brumptomyia* (10.0%). *Evandromyia saulensis* was the third most abundant species in the collections (7.4%), and occurred in all of the studied ecotopes, but predominantly in the rural area (Table 2).

Evandromyia saulensis ($n = 66$) was the most frequently captured species in Shannon traps, indicating the anthropophilic behavior of this species, followed by *Psychodopygus davisii* ($n = 48$). A total of 2304 specimens of 41 species were collected at rural sites, with the most abundant being *Th. auraensis*, *Trichophoromyia* sp., *Ev. saulensis*, *Pr. calcarata* and *Ps. carrerai carrerai*. In the urban park, 213 specimens of 26 species were collected, with the most abundant being *Th. auraensis*, *Trichophoromyia* sp. and *Ny. antunesi*. Sand fly abundance was higher in the forest and peridomestic environments in the rural area than in the urban forest ($H = 17.9$, $df = 42$, $P < 0.05$) (Fig. 2). In the rural area, mean species richness was 5.16 ($S = 41$) and mean equitability (J') 0.61, whereas in the urban park the mean richness was lower at 4.66 ($S = 26$), and equitability higher ($J' = 0.72$), since it is an environment with a more uniform pattern of abundance. The diversity index was higher in the urban forest, but not significantly different from that of the rural area according to the Kruskal-Wallis test ($H = 1$, $df = 1$, $P > 0.05$) for two samples. Species dominance, according to the Berger-Parker's index, averaged 0.33 and 0.30 for the rural area and urban forest, respectively. There was a significant correlation between the total number of sand flies collected and mean temperature on the days of collection (Spearman's $\rho = 0.58$, $n = 13$, $P = 0.03$) (Table 3); however, there was no significant correlation between the number of sand flies collected by HP light traps and relative humidity (Spearman's $\rho = -0.66$, $n = 13$, $P = 0.831$) or monthly rainfall (Spearman's $\rho = -0.38$, $n = 13$, $P = 0.45$) during the study period. Species richness for

Table 1 Abundance of sand flies collected (with CDC and Shannon traps), during the study period of December 2014 to January 2016 in Rio Branco, Acre, Brazil

Environment/Species	Rural area	Urban area	Total
	AC-90 road (n)	Urban park (n)	
<i>Bi. flaviscutellata</i>	51	6	57
<i>Br. avellari</i>	9	0	9
<i>Br. brumpti</i>	0	1	1
<i>Br. pentacantha</i>	2	1	3
<i>Brumptomyia</i> sp.	7	1	8
<i>Ev. infraspinoza</i>	2	1	3
<i>Ev. andersoni</i>	–	1	1
<i>Ev. saulensis</i>	174	13	187
<i>Ev. walkeri</i>	85	3	88
<i>Lu. evangelistai</i>	1	0	1
<i>Lu. gomezi</i>	1	0	1
<i>Lu. sherlocki</i>	17	4	21
<i>Mi. micropyga</i>	1	3	4
<i>Mi. trinidadensis</i>	3	–	3
<i>Micropygomia (Sauromyia)</i> sp.	2	0	2
<i>Mg. migonei</i>	2	1	3
<i>Ny. antunesi</i>	35	23	58
<i>Ny. shawi</i>	7	0	7
<i>Ny. whitmani</i>	22	17	39
<i>Pa. abonnenci</i>	1	0	1
<i>Pa. aragoia</i>	1	0	1
<i>Pa. abunaensis</i>	1	0	1
<i>Pa. bigeniculata</i>	4	0	4
<i>Psathyromyia</i> sp.	2	0	2
<i>Pi. nevesi</i>	61	14	75
<i>Pi. serrana</i>	8	2	10
<i>Pr. calcarata</i>	132	6	138
<i>Pr. choti</i>	42	3	45
<i>Pressatia</i> sp.	84	2	86
<i>Ps. carrerai carrerai</i>	97	2	99
<i>Ps. llanosmartinsi</i>	7	–	7
<i>Ps. amazonensis</i>	1	–	1
<i>Ps. ayrozai</i>	5	–	5
<i>Ps. clautrei</i>	7	–	7
<i>Ps. davisii</i>	89	1	90
<i>Ps. hirsutus hirsutus</i>	47	–	47
<i>Sc. servulolimai</i>	1	1	2
<i>Sciopemyia</i> sp.	7	4	11
<i>Th. auraensis</i>	774	65	839
<i>Th. brachipyga</i>	11	1	12
<i>Trichophoromyia</i> sp.	500	37	537

Table 1 Abundance of sand flies collected (with CDC and Shannon traps), during the study period of December 2014 to January 2016 in Rio Branco, Acre, Brazil (Continued)

Environment/Species	Rural area	Urban area	Total
	AC-90 road (n)	Urban park (n)	
<i>Th. ubiquitousis</i>	1	0	1
Total	2304*	213*	2517

*Comparison for the abundance of collected sand flies in the rural and urban environment (Kruskal-Wallis test, $H = 17.4$, $df = 42$, $P = 0.0002$)

forest and peridomestic environments in the rural area did not differ significantly ($H = 0.04$, $df = 1$, $P > 0.05$), although there was a greater number of species in the forest. The greatest diversity (Shannon index, H') of species was in the primary forest of the urban forest, with 17 species ($H' = 2.39$), followed by rural peridomestic environments ($H' = 2.11$) with 26 species, rural forest ($H' = 1.99$) with 32 species and secondary forest in the urban forest ($H' = 1.85$) with 20 species (Table 2).

Leishmania infection in sand flies

A total of 206 female sand flies were collected using Shannon traps in a forest environment and used to determine natural infection by microscopy and molecular analysis. Sand fly species were grouped into 39 pools and 43 individual samples. Of these, 17 pools (*Th. auraensis*, 3 pools; *Ev. saulensis*, 2; *Ev. walkeri*, 2; *Bi. flaviscutellata*, 1; *Ps. llanosmartinsi*, 1; *Pi. nevesi*, 3; *Ps. davisii*, 2; *Ps. ayrozai*, 2; *Lu. sherlocki*, 1) and 8 individual samples (*Pi. nevesi*, 1; *Ny. whitmanni*, 2; *Pa. aragoi*, 1; *Ev. saulensis*, 1; *Ny. antunesi*, 1; *Lu. sherlocki*, 1; *Ev. infraspinoza*, 1) were amplified for the target ITS1 region (Fig. 3). The microscopic analysis revealed that five specimens of *Ev. saulensis* had flagellated forms in the hindgut, with an infection rate of 2.4%. Of the analyzed samples, 13 sequences showed similarity (99%) with *L. (V.) braziliensis* as follows: *Th. auraensis* ($n = 1$); *Ev. saulensis* ($n = 2$); *Ev. walkeri* ($n = 1$); *Ps. llanosmartinsi* ($n = 1$); *Pi. nevesi* ($n = 2$); *Ps. davisii* ($n = 1$); *Ps. ayrozai* ($n = 1$); *Pa. aragoi* ($n = 1$); *Ny. antunesi* ($n = 1$); and *Ev. infraspinoza* ($n = 1$). Only a specimen of *Ps. ayrozai* exhibited similarity (94%) to the *L. (V.) guyanensis* sequence deposited in the GenBank database (MF802812–MF802824).

Sand fly blood sources

A total of 33 fed females were submitted to amplification of the *cytb* gene, of which 25 were collected in rural areas (*Trichophoromyia* sp.: 10; *Pressatia* sp.: 2; *Ev. saulensis*: 7; *Ev. walkeri*: 1; *Ny. antunesi*: 1; *Ps. davisii*: 1; *Ps. hirsutus*: 1; *Ps. carrerai*: 1; and *Pi. nevesi*: 1) and eight collected in the urban park (*Trichophoromyia* sp.: 1; *Ev. saulensis*: 1; *Ev. walkeri*: 1; *Ny. antunesi*: 2; *Ps. davisii*: 1; *Pi. serrana*: 1; and *Mig. migonei*: 1 (Fig. 4). After

Table 2 Abundance and diversity indices for sand flies collected from December 2014 to January 2016 in Rio Branco, Acre, Brazil

Environment Ecotope Species	Area I(Rural)		Peridomiciliar	Area II (Urban)		Total	%
	Extradomiciliar			Wild			
	Forest/ CDC trap	Forest/ Shannon trap	Chicken/ CDC trap		Forest 1	Forest 2	
	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>		
<i>Bi. flaviscutellata</i>	42	5	4	3	3	57	2.26
<i>Br. avellari</i>	1	–	8	–	–	9	0.36
<i>Br. brumpti</i>	–	–	–	–	1	1	0.04
<i>Br. pentacantha</i>	–	–	2	1	–	3	0.12
<i>Brumptomyia</i> sp.	2	3	2	–	1	8	0.32
<i>Ev. infraspinoza</i>	1	1	–	–	1	3	0.12
<i>Ev. andersoni</i>	–	–	–	1	–	1	0.04
<i>Ev. saulensis</i>	81	66	27	10	3	187	7.43
<i>Ev. walkeri</i>	30	14	41	2	1	88	3.50
<i>Lu. evangelistai</i>	1	–	–	–	–	1	0.04
<i>Lu. gomezi</i>	1	–	–	–	–	1	0.04
<i>Lu. sherlocki</i>	6	7	4	2	2	21	0.83
<i>Mi. micropyga</i>	–	–	1	2	1	4	0.16
<i>Mi. trinidadensis</i>	1	–	2	–	–	3	0.12
<i>Micropygomia (Sauromyia)</i> sp.	1	–	1	–	–	2	0.08
<i>Mg. migonei</i>	1	–	1	–	1	3	0.12
<i>Ny. antunesi</i>	11	8	16	21	2	58	2.30
<i>Ny. shawi</i>	4	–	3	–	–	7	0.28
<i>Ny. whitmani</i>	11	9	2	10	7	39	1.55
<i>Pa. abonnenci</i>	–	1	–	–	–	1	0.04
<i>Pa. aragoia</i>	–	1	–	–	–	1	0.04
<i>Pa. abunaensis</i>	1	–	–	–	–	1	0.04
<i>Pa. bigeniculata</i>	4	–	–	–	–	4	0.16
<i>Psathyromyia</i> sp.	2	–	–	–	–	2	0.08
<i>Pi. nevesi</i>	41	13	7	11	3	75	2.98
<i>Pi. serrana</i>	–	–	8	2	–	10	0.40
<i>Pr. calcarata</i>	32	2	98	6	–	138	5.48
<i>Pr. choti</i>	3	4	35	2	1	45	1.79
<i>Pressatia</i> sp.	16	5	63	2	–	86	3.42
<i>Ps. carrerai carrerai</i>	55	29	13	–	2	99	3.93
<i>Ps. llanosmartinsi</i>	–	7	–	–	–	7	0.28
<i>Ps. amazonensis</i>	–	1	–	–	–	1	0.04
<i>Ps. ayrozai</i>	–	5	–	–	–	5	0.20
<i>Ps. clautrei</i>	1	6	–	–	–	7	0.28
<i>Ps. davisii</i>	17	48	24	–	1	90	3.58
<i>Ps. hirsutus hirsutus</i>	34	8	5	–	–	47	1.87
<i>Sc. servulolimai</i>	1	–	–	–	1	2	0.08
<i>Sciopemyia</i> sp.	4	1	2	–	4	11	0.44
<i>Tr. auraensis</i>	482	22	270	13	52	839	33.33
<i>Tr. brachipyga</i>	8	–	3	1	–	12	0.48

Table 2 Abundance and diversity indices for sand flies collected from December 2014 to January 2016 in Rio Branco, Acre, Brazil (Continued)

Environment	Area I(Rural)		Peridomiciliar	Area II (Urban)		Total	%
	Extradomiciliar			Wild			
Ecotope	Forest/ CDC trap	Forest/ Shannon trap	Chicken/ CDC trap	Forest 1	Forest 2		
Species	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>		
<i>Trichophoromyia</i> sp.	275	12	213	3	34	537	21.33
<i>Tr. ubiquitous</i>	–	1		–	–	1	0.04
Total (<i>n</i>)	1170	279	855	92	121	2517	100.0
Diversity indices							
Richness (S)	32 ^a	–	26 ^a	17	20		
Shannon-Wiener's (H')	1.99 ^b	–	2.11 ^b	2.39 ^b	1.85 ^b		
Pielou's (J)	0.57	–	0.64	0.84	0.61		
Berger-Parker's (D)	0.41	–	0.31	0.22	0.42		

^aComparison for species richness (S) of sand flies collected in peri- and extra-domiciliary areas (Kruskal-Wallis test, $H = 0,04$, $df = 1$, $P = 0.0531$)

^bComparison for the diversity index (H') between Area I and Area II (Kruskal-Wallis test, $H = 1$, $df = 1$, $P = 0.317$)

sequencing, all samples were found to be similar to the sequence deposited in GenBank (MG027586–MG027618) for *Gallus gallus* (domestic chicken).

Discussion

In the state of Acre, ATL and environmental impacts have historically been related to the processes of human occupation, which from the 1970's experienced a gradual conversion from the extractive model of the region to agricultural activity [28]. These environmental changes, associated with the construction of rural settlements, urbanization and massive logging with a view to human occupation, played a major role in the dissemination of this disease in the region and the state. The impacts resulting from the dynamics of land use in the Amazon have had environmental consequences such as high rates of deforestation, loss of biodiversity, adaptation of vector species to peridomestic environments, potentially leading to extinction of rare species or increasing others.

The increase in ATL cases reported in the North Region of Brazil suggests an adaptation of sand flies to transmit ATL agents in the peridomestic environment [11], also as a consequence of the impact of anthropic activities on the environment, including animal farming near houses. This may have favored the adaptation of the vectors to human dwellings and modified the transmission cycle of ATL [36]. Studies of geographical distribution [16], ecological indices of the fauna and rates of natural infection rates are scarce in Brazil. In this study, a total of 2515 sand flies were captured and the most abundant species sampled were *Th. auraensis*, indistinguishable females of *Trichophoromyia* sp., *Ev. saulensis* and *Pressatia calcarata*, altogether representing 73.8% of the collections. Of these, *L. (V.) braziliensis* was detected in *Th. auraensis* and *Ev. saulensis*, corroborating other studies in the state that point to *Th. auraensis* as an abundant species in the sampled environments in Acre [20–22, 26] and its potential involvement in the

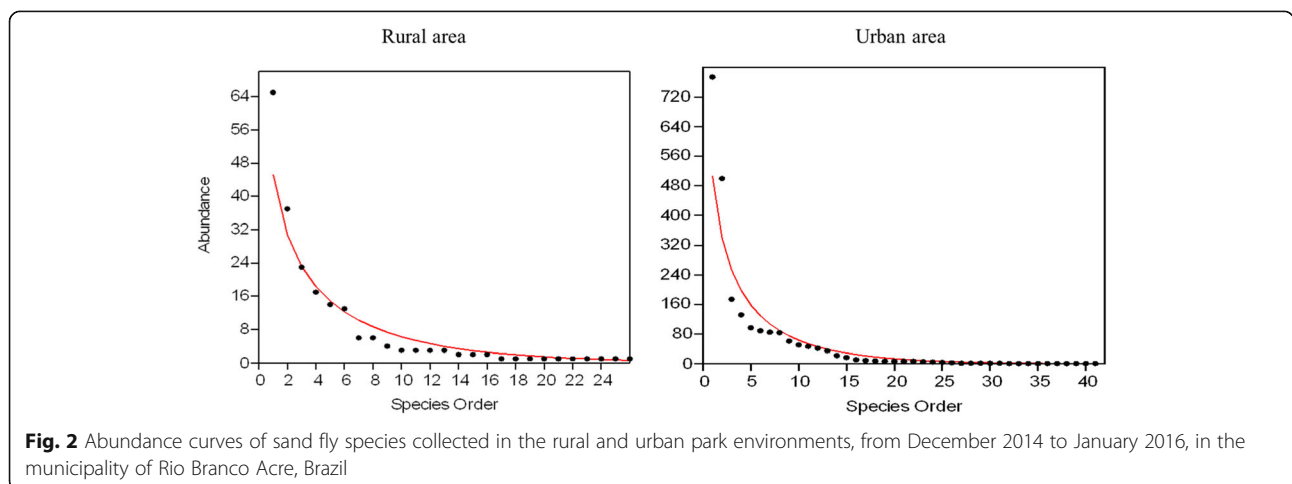


Fig. 2 Abundance curves of sand fly species collected in the rural and urban park environments, from December 2014 to January 2016, in the municipality of Rio Branco Acre, Brazil

Table 3 Abundance of sand flies collected in CDC light traps and monthly means for temperature, relative humidity and rainfall from December 2014 to January 2016 in Rio Branco, Acre, Brazil

Collection period	Total no. of sand files collected	Percent of total	Temperature (°C)	Humidity (%)	Rainfall (mm)
December 2014	603	26.9	32.2	76.6	149.2
February 2015	102	4.6	32.1	70.4	292.6
May 2015	116	5.2	30.9	76.3	351.3
April 2015	110	4.9	29.7	75.4	231.7
May 2015	51	2.3	31.0	74.4	256.3
June 2015	31	1.4	29.2	65.3	31.0
July 2015	128	5.7	29.3	60.7	9.5
August 2015	26	1.2	28.3	64.7	45.2
September 2015	158	7.1	35.6	51.7	80.7
October 2015	248	11.1	32.3	57.3	96.0
November 2015	100	4.5	33.4	60.2	292.4
December 2015	412	18.4	32.6	65.9	171.8
January 2016	153	6.8	33.4	59.0	132.6
Total	2238 ^a	100	31.5 ^b	66.0 ^a	2140.3 ^a

Note: Equal letters indicate a non-significant correlation between the total number of sand flies collected and temperature, relative humidity and rainfall ($P > 0.05$); and different letters indicate a significant correlation ($P < 0.05$)

transmission cycle of *Leishmania* spp. Recently, in the municipality of Assis Brasil, this species was found infected with *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* by PCR-RFLP [22], indicating its importance in maintaining the circulation of *Leishmania* spp., although its vectorial competence has not yet been proven [37]. In Madre de Dios, Peru, *Th. auraensis* has been found infected with *L. (V.) lainsoni* and *L. (V.) braziliensis* [38], reinforcing the importance of this species and its possible capacity as a vector in these regions of the Amazon Basin.

Among potential vectors of ATL agents to humans, *Ev. saulensis* has not been considered of medical importance. Although it has a large distribution from central Brazil to Central America, this species is not commonly collected in sand fly studies. However, this species has been found infected with *L. (V.) braziliensis* in Rio Branco [26], and in the present study was the third most

frequent species in light-trap collections, the most abundant species in the collections using Shannon, being present in all environments sampled and with dominance in the forest environment, confirming its anthropophilic behavior. We also found flagellated forms in five specimens of *Ev. saulensis*, reinforcing its participation in the enzootic transmission cycle of ATL and the need for studies of the vectorial capacity and competence in transmitting *Leishmania* to humans. Furthermore, the potential participation of *Ev. saulensis* in the transmission of ATL agents, in addition to the vectors already incriminated needs to be investigated within the state of Acre. The genus *Psychodopygus* was the most dominant genus in the collections, with a total of seven species collected, of which *Ps. carrerai carrerai* and *Ps. davisi* were the most abundant in the study. Species of this genus are frequent in faunal studies of this region and

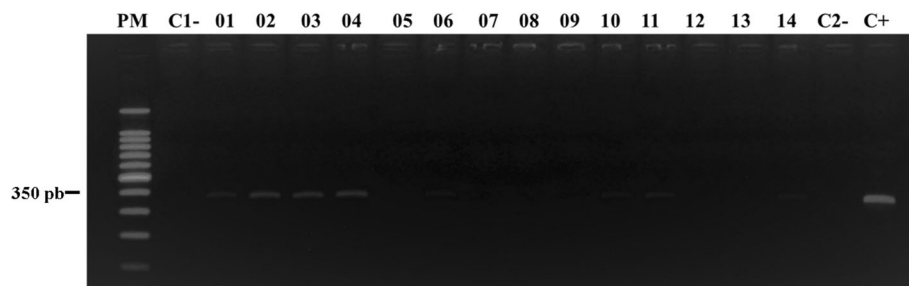


Fig. 3 PCR-ITS1-2% agarose gel, colored with GelRed showing ITS1 PCR amplification product from DNA extracted from female sand flies collected in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. Lanes 1–4, 6, 10, 11 and 14: collected female sand flies positive for natural infection with *Leishmania* sp.; Lanes C1- and C2-: negative controls (Milli-Q ultrapure water); Lane C+: positive control (*Leishmania (Viannia) braziliensis* DNA) (MHOM/BR/75/M2903)

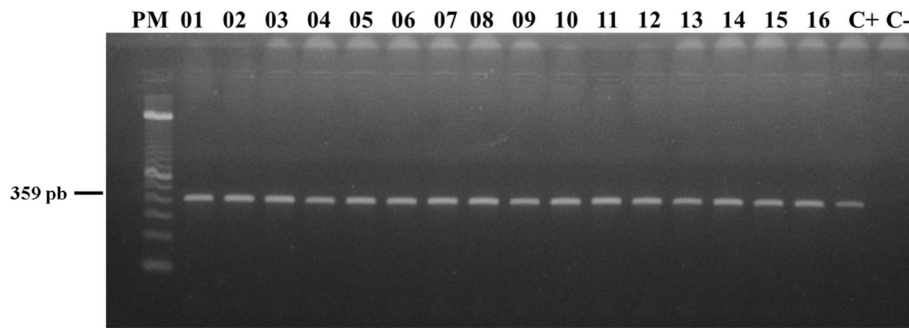


Fig. 4 PCR-cytb- 2% agarose gel colored with GelRed showing *cytb* PCR amplification product from DNA extracted from female sand flies collected in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. Lanes 1–16: female sand flies collected containing a blood meal; Lane C+: positive control (canine blood clot); Lane C-: negative control (Milli-Q ultrapure water)

have been found naturally infected in the Amazon Region [39–42]. In our studies, *Psychodopygus davisi* was found infected with *L. (V.) braziliensis*, which corroborate a previous study carried out in Assis Brasil where parasite of the *L. (V.) braziliensis* complex was found [22]. Reinforcing the importance of this species in the region is that it has been found naturally infected with *Leishmania* sp. in the state of Rondônia [43, 44], and also infected by *L. (V.) braziliensis* in the Serra dos Carajás, Pará and in the neighboring country of Peru [38, 42]. *Psychodopygus davisi* has been frequently found in peridomesitic environments, suggesting its adaptation to anthropic environments. Based on its anthropophilic behavior, density and occurrence of natural infection of *Leishmania*, this species is incriminated in the transmission cycle of ATL in the Amazon Region [37, 43–45].

The species *Ny. whitmani*, *Ny. antunesi*, *Bi. flaviscutellata*, *Ps. hirsutus hirsutus*, *Ps. ayrozai* and *Migonemyia migonei* were found in low abundance in the different environments studied, yet these are considered vectors of species of *Leishmania* in the region [20]. *Psychodopygus ayrozai* was found naturally infected with *L. (V.) guyanensis*, reinforcing its role in the etiological agent's circulation of ATL in the state. In other studies, *L. (V.) guyanensis* was isolated from human cases and in sand flies already described in other epidemiological studies [18, 22]. *Psychodopygus ayrozai* is common in the North Region of Brazil [6], especially in peridomiciliar areas, indicative of its high degree of anthropophilia [14]. In the Amazon Region, species of *Psychodopygus* are associated with ATL transmission and can be important vectors in zoonotic and enzootic cycles [46]. *Thricophoromyia ubiquitalis* was described as a vector of *L. (V.) lainsoni* in the state of Pará [16, 46]. In a study carried out near the Solimões River (AM), *Th. ubiquitalis* was found to be the predominant species, accounting for 57.94% of flies sampled, and was also found naturally infected by *L. (V.) lainsoni* [47]. In our study, only one specimen of *Th. ubiquitalis* was captured in a Shannon

trap. Faunal studies of sand flies in three municipalities of Acre identified 52 species, among them *Th. auraensis*, *Ny. antunesi*, *Ny. whitmani*, and *Ps. davisi* were responsible for 66.95% of the collected flies, with *Ny. whitmani* being the most abundant [20]. In the present study, these species represented 40.7% of the species collected, with the most frequent being *Th. auraensis* (33.3%). In 2008, Silva-Nunes et al. [16] investigating the epidemiology of ATL and surveying the phlebotomine fauna in order to identify possible vectors in the municipality of Acrelândia, collected 14 species, three of which are known vectors of the disease: *Ny. antunesi* (59.1%), in the peridomesitic environment and forests edges; *Ny. whitmani*, more frequent in peridomesitic environment (15%) and the only one within a house; and *Th. ubiquitalis*, also in peridomesitic environment. In this study, *Ny. whitmani* and *Ny. antunesi* were more frequent in forest environments.

In a faunal survey of three areas of the city of Rio Branco during the course of a single year, Araújo-Pereira et al. [21] found high diversity of sand flies, with the most abundant being *Th. auraensis* and *Ny. whitmani*, representing 72% of the collected specimens. Some of the species collected by these authors were already known as vectors of the parasite that causes ATL (i.e. *Ny. whitmani*, *Ny. antunesi* and *Bi. flaviscutellata*). These data corroborate the high frequency of *Th. auraensis* (33.3%) and other species known to be potentially vectors of *Leishmania* parasites to humans.

In Assis Brasil, Teles et al. [22] evidenced a rich and diverse sand fly fauna of 67 species, of which *Th. auraensis/ruifreitasi* and *Ps. davisi* were dominant. These species were collected in domestic and peridomesitic forest environments, demonstrating their potential as vectors of ATL agents in the region.

In the present study, species diversity was lower in the rural area than in the urban forest, with a lower index of equitability due to high species dominance. Thus, sand fly frequency seems to be related to levels of

environmental degradation and food supply provided by animals in peridomestic environments, with changing the behavior of those populations compared with sand flies in unaltered environments [48]. Thus, an environmental park interconnected to an area of environmental protection, even with low frequency and lower richness, suffers less anthropic effects, and thus tends to maintain the balance on species distribution in the ecosystem. The ecological indices in the different studied ecotopes did not show any significant differences, having the greatest diversity for primary forest in the urban park. Silva et al. [48] suggested that areas with vegetation in different successional stages may influence the dominance and frequency of sand flies. Also, high species diversity is common in the Amazon Region, as observed by other authors [37, 43, 47].

There was an increase in the abundance of sand flies collected with light traps at the beginning of the rainy season, from December to April, with smaller quantities during the dry months with low humidity and the occurrences of Amazonian cool periods. The species frequency had a significant positive correlation with temperature variation (Spearman's $\rho = 0.58$, $P = 0.030$), indicating that with increasing temperature there is an increase for abundance of collected sand flies. Other studies have recognized a similar pattern of seasonal variation in sand flies such in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, with an increase in the abundance of captured specimens after the months of highest rainfall and humidity [49]. It should be noted that there are distinct seasonal patterns for sand flies in different regions of Brazil. In Rio Grande do Norte, a study found that sand flies were most abundant during the dry season, and declined in abundance in the rainy season when temperatures decreased and relative humidity was high [50].

All fed female sand flies submitted to analysis of blood sources exhibited an amplified gene region compatible with *Gallus gallus* (domestic chicken). Although chickens do not act as reservoirs of *Leishmania* spp., their presence may influence on the population dynamics of sand flies with increasing population density in the peridomestic environment, which could contribute to increase the risk of the transmission of *Leishmania* to humans [51]. The presence of animal shelters (e.g. stables and chicken pen) in the peridomestic environment represents a permanent food supply and provides shelter for sand flies, as observed in studies in the State of Maranhão, where sand fly sampling was unsuccessful in environments without the presence of domestic animals [52]. Again, the presence of large numbers of chickens in peridomestic environments can be highly attractive to sand flies and may contribute to the maintenance of their life cycle, and thus constitute an epidemiological problem by keeping the vector near the human

environment [52, 53]. It is worth noting that the presence of infected sand flies and the presence of synanthropic reservoirs can increment the transmission cycle in the peridomestic environment of the present study. Thus, in this study, domestic chicken appears to be a common blood source for sand flies, probably because it does not offer resistance and are kept in large number in the study area [53].

Conclusions

The sand fly fauna found in the present study was composed of 43 species and included known vectors of ATL, such as *Nyssomyia whitmani*, *Ny. antunesi*, *Bichromomyia flaviscutellata* and *Mg. migonei*. The high frequency of *Trichophoromyia auraensis* and *Evandromyia saulensis*, and the detection of *L. (V.) braziliensis* DNA, and *Ps. aroyzai* with *L. (V.) guyanensis* DNA, indicate that these species could be putative vectors for ATL in this Amazonian region. Investigation of blood sources of sand flies revealed a preference among female sand flies collected in this area for domestic chicken, which may be participating in the population dynamics of these insects.

Acknowledgements

We thank the Municipal Government of Rio Branco, the Service of entomology and chemical Control of municipality, Janis Lunier de Souza and Acigelda da Silva Cardoso for their help and Arthur Alexandre de Souza de Vieira for support with field collections; to Cleilton Sampaio for making the map of the sampling sites; and to the Federal Institute of Acre (IFAC) and the Oswaldo Cruz Institute (IOC) through the Cooperation Instrument 004/2012 IFAC/IOC.

Funding

This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Acre (FAPAC) (grant agreement number PPSUS nº00011878); the Foundation for Scientific and Technological Development (FIOTEC), which provided the scholarship granted to Ávila MM; and Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq).

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in the article and are available from the corresponding author upon reasonable request. Representative sequences are submitted in the GenBank database under accession numbers MF802812–MF802824 and MG027586–MG027618.

Authors' contributions

MMA and RPB designed the study. AF, MMA, CFS and EABG performed the fieldwork. MMA, AFB, RPB and EABG prepared the materials and identified phlebotomine specimens. MMA, AFB and CFS performed the data analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Federal Institute of Acre, Rio Branco, Acre, Brazil. ²Faculty of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. ³Oswaldo Cruz Institute, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. ⁴Federal University of Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

Received: 3 March 2017 Accepted: 12 January 2018

Published online: 26 January 2018

References

- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde; 2014. p. 812
- Lessa MM, Lessa HA, Castro TW, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, et al. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2007;73:843–7.
- Gontijo B, Carvalho MDL. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(1):71–80.
- Lainson R, Shaw JJ. New world Leishmaniasis. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D, editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections.* Wiley; 2005. p. 313–49.
- Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, West Indies, central and South America. *Mem Am Entomol Inst.* 1994;54:1–881.
- Brazil RP, Rodrigues AAF, Filho JDA. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas - a mini review. *Entomol Ornithol Herpetol.* 2015;4:144.
- Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. <http://portalsinan.saude.gov.br/>. Accessed 28 Nov 2016.
- Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor YA. Effects of environmental changes on emerging parasitic disease. *Int J Parasitol.* 2000;30:1395–405.
- Petney TN. Environmental, cultural and social changes and their influence on parasite infections. *Int J Parasitol.* 2001;31:919–32.
- Molyneux DH. Control of human parasitic diseases: context and overview. *Adv Parasitol.* 2006;61:1–45.
- Silva NS, Muniz VD. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Acre, Amazônia brasileira. *Cad de Saúde Pública.* 2009;25:1325–36.
- Ximenes MFFM, Silva VPM, Queiroz PVS, Rego MM, Cortez AM, Batista LMM, et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil – reflexos do ambiente antrópico. *Neotrop Entomol.* 2007;36:128–37.
- Ambrose-Thomas P. Emerging parasite zoonoses: the role of host-parasite relationship. *Int J Parasitol.* 2000;30:1361–7.
- Basano SA, Camargo LMA. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. *Rev Bras Epidemiol.* 2004;7:328–37.
- Silva NS, Viana AB, Cordeiro JA, Cavasini CE. Leishmaniose tegumentar americana no estado do Acre, Brasil. *Rev Saúde Públ.* 1999;33:554–9.
- Silva-Nunes M, Cavasini CE, Silva NS, Galati EAB. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar e descrição das populações de flebotomíneos no município de Acrelândia, Acre, Brasil. *Rev Bras de Epidemiol.* 2008;11(2):241–51.
- Tojal AC, Romero GAS, Cupolillo EA. A diversidade das espécies causadoras de leishmaniose cutânea em Rio Branco - Acre. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36:49.
- Tojal AC, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GAS. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of acre, Brazil. *Tropical Med Int Health.* 2006;11:1388–98.
- Oliveira JGS, Novais FO, Oliveira CI, Cruz-Júnior AC, Campos LF, Rocha AV, et al. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Acta Trop.* 2005;94:55–9.
- Azevedo ACR, Costa SM, Pinto MCG, Souza JL, Cruz HC, Vidal J, et al. Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American cutaneous leishmaniasis in state of Acre, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103:760–7.
- Araújo-Pereira T, Fuzari AA, Andrade-Filho JD, Pita-Pereira D, Britto C, Brazil RP. Sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in an area of leishmaniasis transmission in the municipality of Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Parasit Vectors.* 2014;7:360.
- Teles CBG, Santos APA, Freitas RA, Oliveira AFJ, Ogawa GM, Rodrigues MS, et al. Phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) diversity and their *Leishmania* DNA in a hot spot of American cutaneous leishmaniasis human cases along the Brazilian border with Peru and Bolivia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111:423–32.
- Pessoa FAC, Medeiros JF, Barrett TV. Effects of timber harvest on phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a production forest: abundance of species on tree trunks and prevalence of trypanosomatids. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:593–9.
- Pinheiro FG, Luz SLB, Franco AMR. Infecção natural por tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) em áreas de leishmaniose tegumentar americana no Amazonas, Brasil. *Acta Amaz.* 2008;38:165–72.
- Reis SR, Gomes LHM, Ferreira NM, Nery LR, Pinheiro FG, Figueira LP, et al. Ocorrência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no ambiente peridomiciliar em área de foco de transmissão de leishmaniose tegumentar no município de Manaus, Amazonas. *Acta Amaz.* 2013;43:121–3.
- Araujo-Pereira T, Pita-Pereira D, Boité MC, Melo M, Costa-Rego TA, Fuzari AA, et al. First description of *Leishmania (Viannia)* infection in *Evandromyia saulensis*, *Pressatia* sp. and *Trichophoromyia auraensis* (Psychodidae: Phlebotominae) in a transmission area of cutaneous leishmaniasis in Acre state, Amazon Basin, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;112:75–8.
- IBGE. Instituto Nacional Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário Estatístico do Brasil. 2016. www.ibge.gov.br. Accessed 28 Nov 2016.
- Acre. Programa Estadual de Zoneamento Ecológico Econômico Fase II: documento Síntese Rio Branco. Acre: SEMA; 2010.
- Forantini OP. Entomologia Médica IV. Psychodidae: Phlebotominae, Leishmaniose e Bartonelose. São Paulo: Edgar Blucher Ltda; 1983. p. 658.
- Galati EAB. Morfologia e Taxonomia: Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América, Flebotomíneos do Brasil, Editora Fiocruz; 2003. p. 176.
- Marcondes CB. A proposal of generic and subgeneric abbreviations of phlebotomines sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomol News.* 2007;118:351–6.
- Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;47:349–58.
- Steuber S, Abdel-Rady A, Clausen P-H. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Parasitol Res.* 2005;97:247–54.
- Magurran AE. Measuring biological diversity. Oxford: Blackwell Science; 2004.
- Paiva BR, Secundino NFC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade-Junior HF, Malafrente RDS. Standardization of conditions for PCR detection of *Leishmania* spp. DNA in sandflies (Diptera, Psychodidae). *Cad Saude Pública.* 2007;23:87–94.
- Costa SM, Cechinel M, Banderia V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:149–53.
- Ogawa GM, Pereira Júnior AM, Resadore F, Ferreira RGM, Medeiros JF, Camargo LMA. Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) from caves in the state of Rondônia, Brazil. *Braz J Vet Parasitol.* 2016;25(1):61–8.
- Valdivia HO, De Los Santos MB, Fernandez R, Baldeviano GC, Zorrilla VO, Vera H, et al. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia (Trichophoromyia) auraensis* in Madre de Dios, Peru, detected by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87:511–7.
- Silva DF, Freitas RA, Franco AM. Diversidade e abundância de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em áreas de mata do nordeste de Manacapuru, AM. *Neotrop Entomol.* 2007;36(1):138–44.
- Neto GJL, Baima JM, Freitas RAD, Passos MAB. Fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) em floresta preservada e alterada do Município de Caroebe, Estado de Roraima, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2012;3:41–6.
- Neto GJL, Freitas RAD, Baima JM, Passos MAB. Fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) da Serra do Tepequém, Município de Amajari, Estado de Roraima, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2010;1:131–6.
- Souza AAA, Silveira FT, Lainson R, Barata IDR, Silva MDGS, Lima JAN, et al. Fauna flebotomínica da Serra dos Carajás, Estado do Pará, Brasil, e sua possível implicação na transmissão da leishmaniose tegumentar americana. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2010;1:45–51.
- Gil LHS, Basano SA, Souza AA, Silva MGS, Barata I, Ishikawa EA, et al. Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the state of Rondônia, western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisii*

- as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:751–5.
44. Grimaldi G, Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barrett TV. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;44:645–61.
 45. Alves VR, Freitas RA, Santos FL, Oliveira AFJ, Barrett TV, Shimabukuro PHF. Sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from Central Amazonia and four new records for the state of Amazonas, Brazil. *Rev Bras Entomol*. 2012;56:220–7.
 46. Silveira FT, Souza AAA, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EA. Cutaneous leishmaniasis in the Amazon region: natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Pará state, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991;186:127–30.
 47. Pereira AM Jr, Teles CBG, dos Santos APA, Souza Rodrigues MD, Marialva EF, Pessoa FAC, et al. Ecological aspects and molecular detection of *Leishmania* DNA Ross (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in terra firme and várzea environments in the middle Solimões region, Amazonas state, Brazil. *Parasit Vectors*. 2015;8:180.
 48. Silva AMD, Camargo NJD, Santos DRD, Massafra R, Ferreira AC, Postai C, et al. Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. *Neotrop Entomol*. 2008;37:209–25.
 49. Oliveira AGD, Andrade Filho JD, Falcão AL, Brazil RP. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. *Cad Saúde Pública*. 2003;19:933–44.
 50. Pinheiro MPG, Silva JHT, Cavalcanti KB, de Azevedo PRM. Ecological interactions among phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in an agroforestry environment of Northeast Brazil. *J Vector Ecol*. 2013;38(2):307–16.
 51. Teodoro U, La Salvia FV, Lima EM, Spinosa RP, Barbosa OC, Ferreira MEMC, et al. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1993;27:242–9.
 52. Dias FDOP, Lorosa ES, Rebêlo JMM. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad Saúde Pública*. 2003;19:1373–80.
 53. Brazil RP, De Almeida DC, Brazil BG, Mamede SM. Chicken house as a resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. *Parassitologia*. 1991;33:113–7.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



NGD

Ávila et al. | First record of *Sciopemyia vattierae* in the Brazil

***Sciopemyia vattierae* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae Rondani, 1840): new record
from Acre state and Brazil**

Márcia Moreira de Ávila^{1*}, Andreia Fernandes Brilhante², Eunice Aparecida Bianchi Galati³, Acigelda da Silva Cardoso⁴ and Reginaldo Peçanha Brazil⁵

¹ Federal Institute of Acre, Xavier Maia, Av. Brasil, 920, Rio Branco, AC, Brazil

² Federal University of Acre, Rodovia BR 364, Km 04, s/n - Distrito Industrial, Rio Branco, AC, Brazil

³ Faculty of Public Health, Av. Dr. Arnaldo, 715, Pacaembu, University of São Paulo, SP, Brazil

⁴ Rio Branco City Hall, Entomological Surveillance Service, Avenida Ceará, 3.335, Jardim Nazle, Rio Branco, AC, Brazil

⁵ Oswaldo Cruz Institute, IOC/FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil

* Corresponding author: Email: marcia.avila@ifac.edu.br

Abstract:

Sciopemyia vattierae (Le Pont & Desjeux, 1992) (Diptera: Psychodidae) is reported for the first time from Brazil. Five males and four females were collected using a CDC light traps in a rural area of the municipality of Rio Branco, state of Acre, Brazil, from December 2014 to January 2016. This species was previously known only from Bolivia, Peru and Colombia. Our new record extends the known distribution of *Sc. vattierae* to the Amazonian region of Acre and represents a new national record for Brazil.

Key words: Sandflies; Geographic distribution; Amazonia; South America

INTRODUCTION

Phlebotomine sand flies are dipterans of public health importance for transmitting parasites of the genus *Leishmania*, *Bartonella* and arboviruses. It is estimated that there are about 530 taxa of Phlebotominae in the Americas (Shimabukuro et al. 2017) and the Amazonia biome contributes with the greatest richness and diversity of species. In the State of Acre, 92 species of sand flies had been reported, corresponding to 34.6% of the species found in Brazil (Galati 2016, Teles et al. 2016, Brilhante et al. 2017a).

The Amazon region is considered endemic for American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) and studies has been concentrated on the vectorial aspect of phlebotomine sand flies. However, there are still incipient studies on the ecological, biological and diversity aspects of the phlebotomine fauna in the State of Acre, which shows to be rich and diverse with recent descriptions and new records of species (Tojal et al. 2006, Teles et al. 2013, 2016, Araújo-Pereira et al. 2014, 2017, Brilhante et al. 2017b). The present study had as objective to report the first record of *Sciopemyia vattierae* in the State of Acre and Brazil increasing the number of species for this region and for Brazil.

MATERIALS AND METHODS

The specimens of phlebotomine sand flies were collected between December 2014 to January 2016 in the municipality of Rio Branco, state of Acre in a rural area of the municipality (09°59'11" S, 67°49'52" W) with CDC light traps installed at 18:00 and collected at 6:00. The specimens were clarified according to Forattini (1973) and identified according to the taxonomic key proposed by Galati (2003) and the abbreviation of species name followed Marcondes (2007).

It was collected under a permanent license to collect zoological material granted to Reginaldo P. Brazil by the Ministério do Meio Ambiente (MMA), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) and Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO).

RESULTS

New record. A total of 2517 phlebotomines were collected, 43 species belonging to 13 genera *Brumptomyia*, *Bichromomyia*, *Evandromyia*, *Lutzomyia*, *Micropygomyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Pressatia*, *Psathyromyia*, *Pschodopygus*, *Sciopemyia* and *Trichophoromyia*. Among those phlebotomine sand flies, five males and four females of *Sciopemyia vattierae* (Le Pont & Desjeux, 1992) were identified. The slides of four sandflies specimens were deposited under the number E-15630, E-15631 (female), E15632 and E-15633 (male) in the Laboratory of Phlebotomines of the Faculty of Public Health of the University of São Paulo.

Identification. The genus *Sciopemyia* Barreto, 1962 is characterized by antennal flagellomeres relatively long with simple ascoids. Palmomere V shorter or subequal to palp III. Female cibarium with 4 horizontal teeth with inner pair separated by a relatively wide gap. Male genitalia: style with 4 spines and no subterminal seta. According to Galati (2003, 2016), the genus *Sciopemyia* includes eight species, *Sc. fluviatilis* (Floch & Abonnenc, 1944), *Sc. microps* (Mangabeira, 1942), *Sc. nematoducta* (Young & Arias, 1984), *Sc. pennyi* (Arias & Freitas, 1981), *Sc. preclara* (Young & Arias, 1984), *Sc. servulolimai* (Damasceno & Causey, 1945), *Sc. sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927) and *Sc. vattierae* (Le Pont & Desjeux, 1992). Among these species, *Sc. vattierae* is morphologically very similar to *Sc. sordellii*.

The presence of papilla on the flagellomere III distinguishes *Sc. vattierae* and *Sc. sordellii* from the other species of the genus, in which the papilla is absent. The distinction of males of these two species was based on morphometric characters (lengths of FI and aedeagal ducts) and morphological characteristics for the females (*Sc. vattierae* presents the terminal knob clearly separated from the spermatheca and sessile in *Sc. sordellii*) (Figure 1).

DISCUSSION

Species of the genus *Sciopemyia* are widely distributed in Latin America, most of which are described in Brazil as *Sc. microps*, *Sc. nematoducta*, *Sc. servulolimai* and *Sc. pennyi*. The other species have been described in different countries, such as *Sc. fluviatilis* in French Guiana, *Sc. preclara* in Colombia and Peru, and *Sc. sordelli* in Argentina (Shimabukuro et al. 2017).

Sciopemyia vattierae was described by Le Pont & Desjeux in 1992 from specimens collected in the Bolivian Amazon rainforest of Yucumo (BO), and her female is redescribed by Bejarano et al. (2006) from specimens collected in La Macarena, Meta Department in Colombia. Currently, its distribution is in areas of tropical and humid forests of Bolivia, Peru and Colombia, and according to the localities, in which this species has been registered suggests that its distribution is cis-Andean (Le Pont & Desjeux 1992, Ogusuku et al. 2001, Bejarano et al. 2006, Cabrera et al. 2009, Trujillo et al. 2013).

The feeding habit of the species of this genus is related to amphibians and cold-blooded animals. *Sciopemyia sordellii* has been described naturally infected with *Trypanosoma* spp. of frogs (Ferreira et al., 2008). Regarding to the parasites of the genus *Leishmania*, there are no reports of its natural infection.

In this study, specimens of *Sc. vattierae* were collected in a forest area close to the peridomicile. In the fauna surveys carried out in Brazil, the species of this genus are generally collected in rural/forest and anthropic environments (Gomes et al. 2009, Alves et al. 2012, Ramos et al. 2014), however, are collected in low population density, when compared to other genera and species of sandflies, corroborating the findings of this study and Avila et al. 2018.

Thus with this finding the geographical distribution of *Sc. vattierae* in South America (Figure 2) and the number of species of sandflies in Brazil and Acre state are enlarged.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank to the Municipal Government of Rio Branco, the Service of Entomology and Chemical Control. To Mr. Janis Lunier de Souza for support with field collections. To Mr. Cleilton Sampaio for making the map of the sampling sites. To the Federal Institute of Acre (IFAC) and the Oswaldo Cruz Institute (IOC) through the Cooperation Instrument 004/2012 IFAC / IOC. We also thank to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Acre (FAPAC) (Grant Agreement Number PPSUS N° 001/2015) for the financial support.

LITERATURE CITED

Alves, V. R., Freitas, R. A., Santos, F. L., Oliveira, A. F. J., Barret, T. V. and Shimabukuro, P. H. F. 2012. Sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from Central Amazonia and four new

records for the Amazonas state, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*. 56: 220–227. <http://dx.doi.org/10.1590/S0085-56262012005000020> Accessed on: 2017-12-10.

Avila, M. M., Brilhante, A. F., Souza, C. F., Bevilacqua, P. D., Galati, E. A. B., Brazil, R. P. 2018. Ecology, feeding and natural infection by *Leishmania* spp. of phlebotomine sand flies in an area of high incidence of American tegumentary leishmaniasis in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. *Parasite & Vectors*, 11: 64. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2641-y> Accessed on: 2018-1-30.

Araújo-Pereira, T., Fuzari, A.A., Filho, J. D.A., Pita-Pereira, D., Britto, C. and Brazil, R.P. 2014. Sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in an area of leishmaniasis transmission in the municipality of Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Parasites & Vectors*. 7: 360. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-360> Accessed on: 2017-11-25.

Araújo-Pereira, T., Pita-Pereira, D., Boité, M. C., Melo, M., Costa-Rego, T. A., Fuzari, A. A., Brazil, R. P., and Britto, C. 2017. First description of *Leishmania* (*Viannia*) infection in *Evandromyia saulensis*, *Pressatia* sp. and *Trichophoromyia auraensis* (Psychodidae: Phlebotominae) in a transmission area of cutaneous leishmaniasis in Acre state, Amazon Basin, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 112: 75–78. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160283> Accessed on: 2017-12-10.

Bejarano, E.E., Duque, P. and Vélez, I. D. 2006. Redescrición de la hembra de *Lutzomyia vattierae* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) de la serranía de La Macarena, Colombia. *Biomédica*. 26: 556–561. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120- Accessed on: 2017-10-25.

Brilhante, A. F., Souza, J. F., Medeiros-Sousa, A. R., Sábio, P. B., Paula, M. B., Godoy, R. E., Melchior, L.A.K., Nunes, V.L.B., Oliveira, C. C. and Galati, E.A.B. 2017a. Attractiveness of black and white modified Shannon traps to phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in the Brazilian Amazon Basin, an area of intense transmission of American cutaneous leishmaniasis. *Parasite*, 24: 1–13. doi: <https://doi.org/10.1051/parasite/2017021.41572006000400010&lng=en&nrm=iso> Accessed on: 2017-9-20.

- Brilhante, A. F., Sábio, P. B. and Galati, E. A. B. 2017b. A New Species of Sand Fly, *Psathyromyia elizabethdorvalae* sp. n. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), From Brazil. *Journal of Medical Entomology* 54: 76–81. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/jme/tjw150> Accessed on: 2017-9-20.
- Cabrera, O., Mosquera, L. and Santamaría, E. 2009. Flebótomos (Diptera: Psychodidae) del departamento de Guaviare, Colombia, con nuevos registros para el país. *Biomédica* 29: 73–86. doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v29i1.43> Accessed on: 2017-10-25.
- Ferreira, R. C., Souza, A. A., Freitas, R. A., Campaner, M., Takata, C. S. A., Barrett, T. V., Shaw, J. J., Teixeira, M. M. G. 2008. A Phylogenetic Lineage of Closely Related Trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of Anurans and Sand Flies (Psychodidae, Diptera) Sharing the Same Ecotopes in Brazilian Amazonia¹. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55: 427–435. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00342.x> Accessed on: 2018-1-30.
- Forattini, O. P. 1973. Entomologia Médica. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. São Paulo: Edgard Blücher Ltda. 658 pp. Accessed on 2017-8-12.
- Galati, E. A. B. 2003. Morfologia e taxonomia: morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América; pp. 53–175, in: E.F. Rangel and R. Lainson (eds.). Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. Accessed on 2017-8-12.
- Galati, E. A. B. 2016. Bioecologia e identificação de Phlebotominae. Accessed at http://www.fsp.usp.br/~egalati/ApostilaPhlebotominae_2016_VOL_I.pdf Accessed on 2017-8-12.
- Gomes, L. H. M., Nery, L. C. R., Pinheiro, F. G., Freitas, R. A. and Franco, A. M. R. 2009. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em terra firme e planície fluvial na área de influência do gasoduto Coari-Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 39: 233–239. <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672009000100027> Accessed on 2017-9-20.
- Le Pont, F. and Desjeux, P. 1992. Phlébotomes de Bolivie. Description de *Lutzomyia vattierae* n. sp. et de la femelle de *L. antezanai* Le Pont, Dujardin et Desjeux, 1989 (Diptera, Psychodidae). *Bulletin de la Société entomologique de France* 97:263–268.
- Marcondes, C. B. 2007. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomological News*, 118: 351–

356. [https://doi.org/10.3157/0013-872X\(2007\)118\[351:APOGAS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3157/0013-872X(2007)118[351:APOGAS]2.0.CO;2) Accessed on 2017-8-12.

Ogusuku, E; Guevara, Z.; Revilla, L.; Inga, A. and Perez, J.E. 2001. Descripción de *Lutzomyia pisuquia* sp. n. (Diptera:Psychodidae) y dos registros nuevos de *Lutzomyia* para el Perú. 2001. Revista Peruana de Entomología 42: 21–25.

Ramos, W. R., Medeiros, J. F., Julião, G. R., Ríos-Velásquez, C. M., Marialva, E. F., Desmoulière, S. J., Luz, S. L. and Pessoa, F.A. 2014. Anthropic effects on sand fly (Diptera: Psychodidae) abundance and diversity in an Amazonian rural settlement, Brazil. Acta Tropica, 139: 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.06.017> Accessed on 2018-1-30.

Shimabukuro, P. H. F., Andrade, A. J. and Galati, E. A. B. 2017. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. ZooKeys 660: 67–106: <https://doi.org/10.3897/zookeys.660.10508> Accessed on 2017-8-12.

Teles, C.B.G., Freitas, R.A., Oliveira, A.F.J., Ogawa, G.M., Araújo, E.A.C., Medeiros, J. F. and Camargo, L. M. A. 2013. Description of a new phlebotomine species (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) and new records of sand flies from the State of Acre, northern Brazil. Zootaxa3609(1): 85–90. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3609.1.6> Accessed on 2017-8-20.

Teles, C.B.G., Santos, A.P.A., Freitas, R.A., Oliveira, A. F. J.,Ogawa, G.M., Rodrigues, M. S., Pessoa, F.A.C., Medeiros, Medeiros, J.F. and Camargo, L.M.A. 2016. Phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) diversity and their Leishmania DNA in a hot spot of American Cutaneous Leishmaniasis human cases along the Brazilian border with Peru and Bolivia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz111: 423–432 <https://dx.doi.org/10.1590/0074-02760160054> Accessed on: 2017-8-20.

Tojal da Silva, A. C., Cupolillo, E., Volpini, Â. C., Almeida, R. and Sierra Romero, G. A. 2006. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. Tropical Medicine & International Health 11: 1388–1398. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01695> Accessed on 2017-8-12.

Trujillo, A.V., Reina, A.E.G., Orjuela, A.G., Suarez, E.P., Palomares, J.E. and Alvarez, L.S.B. 2013. Seasonal variation and natural infection of *Lutzomyia antunesi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), an endemic species in the Orinoquia region of Colombia. Memórias do Instituto

Oswaldo Cruz108(4): 463–469. <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-0276108042013011> Accessed on 2017-9-20.

Authors' contributions:

MMA and RPB designed the study. AFB, MMA, ASC and EABG performed the fieldwork. MMA, AFB, RPB and EABG prepared the materials and identified phlebotomine specimens. MMA, AFB and RPB wrote the text.

Figure 1. Specimens of *Sc. vattierae* collected in Rio Branco, Acre state, Brazil. Upper photo: terminalia of the male, 100µm. Lower photo: spermatheca of the female, 10µm.

Figure 2. Map of the geographical distribution of *Sciopemyia vattierae* in South America.