

FLEBOTOMÍNEOS - IMPORTÂNCIA, DIVERSIDADE E SUA IMPORTÂNCIA NA TRANSMISSÃO DAS LEISHMANIOSES

Data de aceite: 01/09/2023

Adalberto Alves Pereira Filho

<http://lattes.cnpq.br/9165045834831122>

RESUMO: Os flebotomíneos são pequenos insetos da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, sendo conhecidos como mosquitos-palha. Eles desempenham um papel crucial na saúde pública, pois são vetores de parasitas do gênero *Leishmania*, responsáveis pela transmissão das leishmanioses, um grupo de doenças tropicais negligenciadas. Esses insetos estão amplamente distribuídos em diversas regiões do mundo, sendo mais comuns na Região Neotropical. Existem cerca de 900 espécies conhecidas de flebotomíneos, com os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* sendo os principais envolvidos na transmissão de *Leishmania* do Velho Mundo e do Novo Mundo, respectivamente. Os flebotomíneos possuem hábitos crepusculares e noturnos, sendo atraídos por fontes de calor e umidade. As fêmeas são as responsáveis pela transmissão da doença, alimentando-se do sangue de mamíferos, incluindo humanos, para suprir suas necessidades de reprodução. Os machos, por sua vez, se alimentam de

néctar e sucos de frutas. O ciclo de vida dos flebotomíneos é composto por estágios de ovo, larva, pupa e adulto. As larvas se desenvolvem em locais ricos em matéria orgânica em decomposição, geralmente de origem vegetal. Os adultos possuem uma vida relativamente curta, vivendo em média de 10 a 20 dias. A identificação das fontes alimentares sanguíneas dos flebotomíneos é de grande importância epidemiológica, permitindo compreender sua relação com os hospedeiros reservatórios e a dinâmica de transmissão da doença. Técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), têm sido utilizadas para identificar as fontes alimentares de sangue desses insetos. Além disso, as técnicas de biologia molecular também têm sido aplicadas na detecção e identificação de infecções por *Leishmania* spp. nos flebotomíneos. A PCR-RFLP é uma das técnicas mais utilizadas para esse fim, permitindo a identificação do DNA do parasita no inseto vetor. A diversidade faunística dos flebotomíneos varia de acordo com a região e a interferência humana no meio ambiente. Nesta mini revisão apresentamos alguns aspectos da biologia dos flebotomíneos.

PALAVRAS-CHAVE: Flebotomíneos, Psychodidae, *Phlebotomus*, *Lutzomyia*

ABSTRACT: Phlebotomine sand flies are small insects belonging to the family Psychodidae and subfamily Phlebotominae, known as sandflies. They play a crucial role in public health as they act as vectors for parasites of the genus *Leishmania*, responsible for the transmission of leishmaniasis, a group of neglected tropical diseases. These insects are widely distributed in various regions of the world, being most common in the Neotropical Region. There are about 900 known species of phlebotomine sand flies, with the genera *Phlebotomus* and *Lutzomyia* being the main ones involved in the transmission of *Leishmania* in the Old World and the New World, respectively. Phlebotomine sand flies have crepuscular and nocturnal habits, being attracted to sources of heat and humidity. Females are responsible for disease transmission, feeding on the blood of mammals, including humans, to meet their reproductive needs. Males, on the other hand, feed on nectar and fruit juices. The life cycle of phlebotomine sand flies consists of egg, larva, pupa, and adult stages. Larvae develop in places rich in decomposing organic matter, usually of plant origin. Adults have a relatively short lifespan, living on average from 10 to 20 days. Identifying the blood-feeding sources of phlebotomine sand flies is of great epidemiological importance, allowing us to understand their relationship with reservoir hosts and disease transmission dynamics. Molecular techniques, such as Polymerase Chain Reaction (PCR), have been used to identify the blood-feeding sources of these insects. Additionally, molecular biology techniques have also been applied to detect and identify *Leishmania* spp. infections in phlebotomine sand flies. PCR-RFLP is one of the most commonly used techniques for this purpose, enabling the identification of the parasite's DNA in the vector insect. The faunistic diversity of phlebotomine sand flies varies according to the region and human interference in the environment. In this mini-review, we present some aspects of the biology of phlebotomine sand flies.

KEYWORDS: Phlebotomine sand flies, Psychodidae, *Phlebotomus*, *Lutzomyia*

QUEM SÃO OS FLEBOTOMÍNEOS?

Os flebotomíneos são dípteros hematófagos pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Apresentam vários nomes populares, de acordo com a região, dos quais se pode citar: asa dura, asa branca, tatuquira, birigui, cangalha, cangualhina, arrupiado, pela-égua (Forattini 1973; Camargo & Barcinski 2003). São de grande importância em Saúde Pública, principalmente por transmitirem protozoários do gênero *Leishmania*. Além das leishmânias, algumas espécies de flebotomíneos podem estar envolvidas na transmissão de outros tripanosomatídeos, fungos, bactérias, vírus e até mesmo outros protozoários que não tripanosomatídeos como o *Plasmodium* sp. (Forattini 1973; Shaw 1992; Shaw et al. 2003).

Distribuem-se por quase todas as regiões do mundo, sendo mais abundantes na Região Neotropical, com maior número de espécies e densidade que variam de acordo com a estação climática (Sherlock 2003).

São insetos que apresentam desenvolvimento holometábolo caracterizando por apresentar uma fase de ovo, uma fase larval que compreende quatro estádios, uma fase pupa e então o adulto (Killick-Kendrick 1999; Rebêlo 1999). As formas imaturas têm habitat

terrestre, as larvas são pequenas (<12mm), claras, vermiformes, com cápsula cefálica escura e esclerotizada. Apresentam grande mobilidade ao se deslocarem em busca de alimento, desenvolvendo-se em locais ricos em matéria orgânica em decomposição, especialmente de natureza vegetal. Ainda assim, pouco se sabe a respeito dos criadouros dos flebotomíneos. Os adultos são de cor palha ou castanhos, com cerca de 2 a 4mm de comprimento, possuem vô saltado e quando em repouso mantêm as asas eretas em forma de “V” (Aguiar & Medeiros 2003). A superfície corporal é bastante permeável apresentando um revestimento quitinoso delgado, necessitando assim, abrigar-se em locais onde possam proteger-se das mudanças bruscas que ocorrem no meio ambiente (Aguiar et al. 1987).

Ambos os sexos necessitam de carboidratos como fonte de energia, alimentando-se de néctar de flores, frutos, seiva vegetal e de substâncias excretadas por afídeos (pulgões). Apenas as fêmeas estão adaptadas, com o respectivo aparelho bucal, a picar a pele de mamíferos, realizando o repasto sanguíneo (Sherlock 2003). As fêmeas adultas alimentam-se principalmente durante o período crepuscular e noturno e são atraídas às residências pelo fototropismo positivo (Killick-Kendrick 1999; Sharma & Singh 2008). Algumas espécies possuem um alto grau de antropofilia e endofilia, enquanto que outras são ecléticas e exofílicas.

Com relação ao ciclo de vida completo, este varia conforme a espécie e aos fatores ambientais, sendo constituído em média: fase embrionária (de 7 a 10 dias); fase larvária (de 15 a 60 dias); fase de pupa (de 7 a 14 dias) e adulto, cuja longevidade dura em média 20 dias (de 10 a 20 dias para as fêmeas alimentadas). A longevidade da fêmea está relacionada intimamente com a relação do número de repastos sanguíneos, ou seja, quanto maior o número de repastos sanguíneos, maior sua sobrevivência. Isso parece ser diferente no caso de fecundidade, pois existem evidências que as fêmeas fecundadas vivem menos que as virgens (Forattini 1973).

O desenvolvimento do ovo ao adulto é de aproximadamente um mês em temperaturas médias de 25°C. As temperaturas baixas afetam o crescimento larvário e a atividade do inseto adulto fica diminuída, aumentando o tempo de desenvolvimento do ovo ao adulto. Apresentam pequeno raio de dispersão, cerca de 500 metros (Forattini 1973; Morrison et al. 1993).

Segundo Young & Duncan (1994), no novo mundo a subfamília Phlebotominae é composta pelos gêneros *Lutzomyia* França, 1924, *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 e *Warleyia* Hertig, 1940. Enquanto no velho mundo são conhecidos os gêneros *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840, *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 e *Chinius* Leng, 1987. As espécies de importância médica pertencem aos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*.

Em todo o mundo são conhecidas aproximadamente 900 espécies de flebotomíneos (Galati 2003; Ready 2013), sendo o gênero *Phlebotomus* responsável pela transmissão de espécies de *Leishmania* do Velho Mundo e o gênero *Lutzomyia* espécies do Novo Mundo (Killick-Kendrick 1990; Lainson et al. 1987).

Nas Américas as primeiras espécies registradas de flebotomíneos foram descritas em 1907 por Coquillet, e até 1940, somente 33 espécies eram conhecidas. A partir da descoberta de que algumas espécies de flebotomíneos estariam participando como vetor na transmissão de agentes patogênicos ao homem e a outros animais, os estudos sobre esses insetos aumentaram consideravelmente, visando entre outras coisas conhecer o seu ciclo vital e identificar qual o vetor existente em determinada região, considerando-se as diferentes espécies apontadas como tal (Aragão 1922; Barretto 1943; Forattini 1973).

Atualmente, nas Américas já foram registradas cerca de 510 espécies e 375 no Velho Mundo. Mais de 100 espécies são suspeitas de agirem como vetores de *Leishmania* sp., mas pouco mais de 50 são realmente vetores comprovados (Lainson & Rangel 2005). O gênero *Lutzomyia* é relativamente bem estudado devido, sobretudo, ao papel de várias espécies como vetores de agentes etiológicos das leishmanioses nas Américas (Martins et al. 1977; Young & Duncan 1994).

As principais espécies de flebotomíneos associadas com a transmissão de leishmânias dermatrópicas nos seres humanos são: *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912); *L. (N.) neivai* (Pinto, 1926); *L. (N.) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939); *L. (N.) umbratilis* Ward & Fraiha, 1977; *L. (N.) flaviscutellata* (Mangabeira, 1942); *L. (N.) antunesi* (Coutinho, 1939); *L. (migoniei) migonei* (França, 1920); *L. (Pintomyia) fischeri* (Pinto, 1926); *L. (P.) pessoai* (Coutinho & Barretto, 1940); *L. (P.) wellcomei*; *L. (P.) complexa* (Mangabeira, 1941); *L. (P.) ayrozai* (Barretto & Coutinho, 1940); *L. (P.) paraensis* (Costa Lima, 1941); *L. (P.) amazonensis* (Root, 1934); *L. (P.) hirsuta* *hirsuta* (Mangabeira, 1942); *L. (Trichophoromyia) ubiquitalis* (Mangabeira, 1942); *L. (L.) gomezi*; *L. (Viannamyia) tuberculata* (Mangabeira, 1941) (Rangel & Lainson 2009).

No Brasil a literatura incrimina cientificamente *L. longipalpis* como o principal vetor da LV, pois tem sido frequentemente encontrado naturalmente infectado e, já foi coletado sugando cães e raposas (reservatórios de *L.(L.) infantum*), possuindo um alto grau de antropofilia (Deane 1956; Lainson & Shaw 1979; Lainson & Shaw 2005) e *L. (L.) cruzi* (Mangabeira, 1938) tem sido incriminado como transmissor em alguns municípios da região Centro-Oeste (Santos et al. 1998; Missawa et al. 2011). Alguns pesquisadores, no entanto, discordam desse termo antropofílico e consideram *L. longipalpis* como uma espécie eclética, “catholic feeding habitats” (Sant’Anna 2014, comunicação pessoal).

A distribuição geográfica das espécies de flebotomíneos é influenciada por diversos fatores, como: barreiras físicas, precipitação pluviométrica, vegetação, luminosidade e abundância de hospedeiros vertebrados (Arias et al. 1985). A presença de animais no peridomicílio tem papel fundamental na epidemiologia das leishmanioses, pois possibilita a concentração de um grande número de flebotomíneos nesse ambiente (Teodoro et al. 2001; Teodoro et al. 2007). Essa abundância de animais domésticos (principalmente cães e aves) no peridomicílio promoveria a atração de flebotomíneos, atraídos pelo odor (caioromônios) ou liberação de CO₂ (Gelle-Oliveira et al. 2010).

Os flebotomíneos compreendem insetos tipicamente de matas, porém devido a ação antrópica, que pode afetar a diversidade, a densidade e estratégia de sobrevivência (Azevedo et al. 1991), tem conseguido explorar novos ambientes, aproximando-se cada vez mais do peridomicílio (Forattini et al. 1976). Esse processo de saída do ambiente silvestre e adaptação dos flebotomíneos a novos ambientes, como resultado direto da alteração do meio ambiente provocada pelo homem, tem permitido que os vetores se aproximem cada vez mais do peridomicílio e domicílio, levando a um novo padrão na transmissão de LT, o peridoméstico e mesmo o doméstico (Costa-Simone et al. 2007; Madeira et al. 2003, Queiroz et al. 2012).

No estado do Maranhão foram realizados vários estudos com a finalidade de conhecer a fauna de flebotomíneos em municípios de diferentes fitorregiões. Os espécimes de flebotomíneos foram capturados entre os anos de 1982 a 2005, em ambientes domiciliares e florestais de 47 municípios, com uso de armadilhas luminosas CDC. Foram encontradas 91 espécies, sendo quatro pertencentes ao gênero *Brumptomyia* e 87 ao gênero *Lutzomyia* (Rebêlo et al. 2010b).

Esses estudos mostraram que muitas espécies são encontradas em ambientes florestais preservados, mas a diversidade diminui nas florestas primárias alteradas e nas matas secundárias (Rebêlo et al. 2000a,b; Marinho et al. 2008). Muitas destas espécies têm invadido o ambiente antrópico, sendo encontradas no peridomicílio, onde se associam com animais domésticos, com possibilidade de adentrar ao domicílio e sugar o homem (Dias et al. 2003; Oliveira-Pereira et al. 2006).

O conhecimento da fauna de flebotomíneos é de grande importância devido à capacidade desses insetos de transmitirem *Leishmania* (Andrade-Filho et al. 2001). Soma-se a isso, o fato de que o conhecimento das flutuações das populações de flebotomos permite melhor orientação e planejamento de medidas anti-vetoriais efetivas, principalmente durante os períodos do ano em que esses vetores são mais abundantes, possibilitando assim o controle da transmissão da doença ao homem (Lainson & Shaw 1979; Almeida et al. 2010).

FONTE ALIMENTAR DE FLEBOTOMÍNEOS

O estudo do conteúdo intestinal de insetos hematófagos vetores de patógenos é de grande importância ecológica e epidemiológica, pois permite verificar o grau de relação do vetor para com o hospedeiro reservatório infectado, levando a compreensão dos vários componentes do ciclo de transmissão. Algumas espécies de flebotomíneos, por exemplo, se alimentam exclusivamente em um vertebrado específico, enquanto outros são oportunistas e se alimentam de vários hospedeiros, incluindo espécies que servem como reservatórios de *Leishmania* (Christensen et al. 1982; Meece et al. 2005; Oshaghi et al. 2006a).

Os estudos das fontes sanguíneas de alimentação de flebotomíneos aliados à

pesquisa da infecção natural por *Leishmania* spp., têm sido muito úteis para melhor conhecer a epidemiologia das leishmanioses, aumentando o entendimento sobre os hospedeiros preferenciais na natureza. A identificação da fonte alimentar sanguínea pode indicar os reservatórios potenciais de *Leishmania* spp. (Barata et al. 2005; Haouas et al. 2007), ou até mesmo o papel protetor ou atrativo que certos animais poderiam desempenhar, em relação ao homem, em área de transmissão destes parasitos (Oliveira-Pereira et al. 2008). Tais estudos vêm auxiliar nas atividades de controle e vigilância dessa doença (Dias et al. 2003, Garlapati et al. 2012; Quaresma et al. 2012).

As técnicas de identificação de repasto sanguíneo foram inicialmente baseadas em análises imunológicas (Ngo & Kramer 2003), utilizando nas décadas de 20 e 40 testes de precipitação para identificar hospedeiros vertebrados (Reeves & Hammon 1944), de coloração de anticorpo fluorescente dos eritrócitos para detectar o DNA do hospedeiro, na década de 70 (McKinney et al. 1972) e início dos anos 80 e 90 ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (Hunter & Bayly 1991, Chow et al. 1993) e a difusão em gel de agarose (Srinivasan & Panicker 1992).

Algumas dessas técnicas são até hoje utilizadas, determinando as fontes alimentares sanguíneas de flebotomíneos empregando testes de precipitina como nos trabalhos de Barata et al. (2005) no Estado de Minas Gerais e de Dias et al. (2003); Oliveira-Pereira et al. (2008); Fonteles (2009) no Estado do Maranhão.

Entretanto, estes testes consomem tempo e apresentam baixa sensibilidade (Sant'Anna et al. 2008; Ravasan et al. 2009), além de apresentarem reatividade cruzada entre as espécies, requerem a produção de anticorpos específicos para uma ampla gama de hospedeiros potenciais, e são incapazes de apontar reservatórios imprevisíveis (Haouas et al. 2007).

Recentemente abordagens moleculares, mais sensíveis e precisas, baseadas em técnicas moleculares como a Reação da Cadeia da Polimerase (PCR), têm sido utilizadas na identificação da fonte alimentar sanguínea de flebotomíneos, como o gene prepronociceptin (Haous et al. 2007; Jaouadi et al. 2013) e regiões do citocromo b (Steuber et al. 2005; Sant'anna et al. 2008). A identificação de um conjunto de iniciadores universais dirigidos para as regiões conservadas do gene mitocondrial do citocromo b (cyt b) de vertebrados por Kocher et al. (1989), e alguns protocolos desenvolvidos no trabalho anterior de Irwin et al. (1991) descrevem iniciadores capazes de amplificar o gene do citocromo b de vários mamíferos, permitindo a amplificação de sequências nucleotídicas relevantes para amostras de DNA mitocondrial encontradas no repasto sanguíneo em artrópodes hematófagos (Kent & Noris 2005; Molaei et al. 2008; Steuber et al. 2005). Este gene tem uma comprovada utilidade para a identificação de fontes alimentares sanguíneas de artrópodes, já que um número variável de mitocôndrias pode ocorrer em uma única célula. Embora os eritrócitos maduros não apresentem mitocôndrias, outras células sanguíneas como leucócitos contribuem com um número significativo de mitocôndrias (Tyler 1992).

A PCR seguida pela digestão com enzimas de restrição (PCR-RFLP) tem mostrado ser uma análise fácil, confiável e rápida para a identificação do DNA. A PCR-RFLP se mostra exequível quando comparada com outros métodos de biologia molecular tais como T-RFLP e RFLP-hibridização cujos custos são mais onerosos, e menos usados em países em desenvolvimento (Oshaghi et al. 2006a).

A análise de PCR-RFLP do citocromo b foi usada em trabalhos anteriores na identificação da origem de fontes alimentares sanguíneas em carrapatos *Ixodes ricinus* (Kirstein & Gray 1996), na mosca tsé-tsé (Steuber et al. 2005) em mosquitos do gênero *Anopheles* (Oshaghi et al. 2006a,b) e flebotomíneos (Quaresma et al. 2012; Ravasan et al. 2009) e vem sendo cada vez mais utilizada na pesquisa da origem da fonte alimentar sanguínea de insetos hematófagos. Em flebotomíneos Ravasan et al. (2009) mostraram que esta técnica apresentou ótimos resultados na identificação da alimentação sanguínea desses insetos capturados no campo, sendo capaz de identificar fontes alimentares mistas de alimentação.

A APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR NA DETECÇÃO DA INFECÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS POR *Leishmania* spp.

Anteriormente, a investigação da infecção de flebotomíneos por *Leishmania* spp. era realizada através da dissecação do inseto e observação direta do parasita por microscopia óptica, ou pelo isolamento usando técnicas apropriadas de cultura do parasito ou inoculação do material obtido em animais de laboratório. Entretanto, tais procedimentos consumiam tempo, e requeriam grande habilidade técnica, principalmente devido ao tamanho reduzido dos insetos (Oliveira-Pereira et al. 2006; Carvalho et al. 2008).

As taxas de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp. constituem uma importante ferramenta para estudos epidemiológicos de leishmanioses e de competência vetorial, pois possibilitam informações sobre a distribuição geográfica desses parasitos em vetores potenciais.

A literatura cita alguns registros, em flebotomíneos, de infecções concomitantes por *Leishmania* e *Endotrypanum* (Barbosa et al. 2006). Considerando que a morfologia e o desenvolvimento de *Leishmania* (Viannia) spp. e *Endotrypanum* sp. nos flebotomíneos são muito parecidas (Shaw 1992; Franco et al. 1997), tais métodos de diagnósticos tornam-se inespecíficos na distinção destes organismos, uma vez que baseado na sua morfologia e no seu desenvolvimento estes protozoários não podem ser facilmente diferenciados (Barbosa et al. 2006). Soma-se a isto a dificuldade do processamento de um grande número de amostras, necessário para estudos epidemiológicos (Pita-Pereira et al. 2005).

Diversos autores têm utilizado técnicas de Biologia Molecular em estudos sobre as leishmanioses, sobretudo em trabalhos que visam detectar, identificar e caracterizar estes parasitos em infecções humanas, caninas e em reservatórios Cortes et al. 2004;

Gontijo 2000; Volpini et al. 2004). Em flebotomíneos, as principais vantagens do uso de tais técnicas no estudo da infecção natural, são a sensibilidade e especificidade, independente do número, estágio, e localização dos parasitos no tubo digestório dos flebotomíneos (Perez et al. 1994).

A reação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) permitiu o rápido desenvolvimento do estudo de sequências de ácidos nucleicos (Molina & Tobo 2004), e veio substituir as técnicas de dissecação do inseto e observação direta do parasito, sendo empregada com sucesso na determinação da infecção natural de flebotomíneos com boa especificidade e sensibilidade (Soares et al. 2010).

Para a detecção e identificação de *Leishmania* spp. em amostras, sem a necessidade do cultivo prévio dos parasitos, diversas regiões do DNA têm sido pesquisadas. Entre os vários alvos podemos citar, o gene da pequena subunidade do RNA ribossomal (SSU rRNA) (Van Eys et al. 1992), o gene hsp70 (Garcia et al. 2004), o gene codificador para gp63 (Guerbouj et al. 2001) e o kDNA (Disch et al. 2005; Assis et al. 2009). Outra região bastante estudada é a ITS1 do gene rRNA. Esta região situa-se entre a pequena unidade do rRNA (SSU) e o gene 5.8S rRNA. Sequências do ITS1 têm sido extensivamente estudadas em *Leishmania* spp. (Schonian et al. 2001). A PCR-RFLP baseada na amplificação dessa região pela PCR e a subsequente utilização de enzimas de restrição, capazes de reconhecer e clivar a fita dupla da molécula de DNA em sítios específicos tem possibilitado a determinação de parasitos do gênero *Leishmania* em amostras clínicas, hospedeiros acidentais e potenciais reservatórios (Schonian et al 2003).

A pesquisa por PCR de *Leishmania* spp. em flebotomíneos, seguida pela técnica de polimorfismo dos comprimentos de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) têm-se mostrado de fácil realização, confiável, e rápida na identificação do DNA do parasito no inseto vetor, sendo utilizada em diversos trabalhos (Margonari et al. 2010; El-Beshbishy et al. 2013).

A PCR é uma técnica amplamente utilizada na pesquisa de *Leishmania* em flebotomíneos. A PCR permite a amplificação de sequências específicas de ácidos nucleicos, como o DNA de *Leishmania*, a partir de amostras coletadas de flebotomíneos infectados. Essa técnica molecular tem se mostrado altamente sensível e específica, permitindo a detecção e identificação precisa do parasita.

Na pesquisa de *Leishmania* em flebotomíneos, a PCR é frequentemente utilizada para identificar a presença do DNA do parasita nas amostras dos insetos. Ela pode ser realizada com a utilização de primers específicos que se ligam a regiões conservadas do genoma de *Leishmania*, permitindo a amplificação seletiva do DNA do parasita. Após a amplificação, os produtos de PCR podem ser analisados por técnicas como eletroforese em gel, sequenciamento ou PCR-RFLP (Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição), para identificar a espécie de *Leishmania* presente.

A PCR oferece várias vantagens na pesquisa de *Leishmania* em flebotomíneos. Ela é capaz de detectar a presença do parasita mesmo em baixas concentrações, o que é

especialmente importante quando se trata de amostras com baixa carga parasitária. Além disso, a PCR permite a identificação precisa da espécie de *Leishmania*, o que é essencial para entender a epidemiologia e a transmissão das leishmanioses.

No entanto, é importante ressaltar que a PCR requer cuidados adequados para evitar a contaminação das amostras com DNA de outros organismos. O uso de controles negativos e positivos, além de boas práticas de laboratório, ajuda a garantir a confiabilidade dos resultados. Além disso, é necessário considerar que a PCR é uma técnica de laboratório que exige infraestrutura adequada e expertise técnica para ser realizada corretamente.

CONCLUSÃO

Em resumo, os flebotomíneos são insetos vetores de grande importância médica, transmitindo parasitas do gênero *Leishmania* e causando as leishmanioses. O estudo desses insetos abrange sua diversidade, seus hábitos alimentares, sua ecologia e a detecção de infecções por *Leishmania*. Compreender esses aspectos é fundamental para o controle e prevenção dessas doenças.

Em suma, a PCR desempenha um papel fundamental na pesquisa de *Leishmania* em flebotomíneos, permitindo a detecção sensível e específica do parasita. Essa técnica molecular contribui para o entendimento da epidemiologia das leishmanioses, auxiliando na identificação das espécies de *Leishmania* presentes nos vetores e no estudo da transmissão dessas doenças.

REFERÊNCIAS

- Abbasi I, Cunio R, Warbug A 2009. Identification of Blood Meals Imbibed by Phlebotominae Sand Flies Using Cytochrome B PCR and Reverse Line Blotting. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9(1): 79-86
- Afonso MM, Gomes AC, Meneses CR, Rangel EF 2005. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia* (N.) *intermedia* (Diptera: Psychodidae), vector of cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica* 21: 1816-1820.
- Aguiar GM & Medeiros WM 2003. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In Rangel EF & Lainson R (eds), *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p.207- 255.
- Aguiar GM, ML Vilela, RB Lima. 1987. Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82: 583-4.
- Almeida PS, Nascimento JC, Ferreira AD, Minzão LD, Portes F, Miranda AM, Faccenda O, Andrade Filho JD. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) coletadas em ambiente urbano em municípios com transmissão de Leishmaniose Visceral do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Bras Entomol* 2010; 54: 304-310.
- Andrade-Filho JD, Valente MB, Andrade WA, Brazil RP, Falcão AL 2001. Flebotomíneos do Estado do Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 34(4): 323-329.

Aragão H de B 1922. Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermerdius*. *Bras med* 36: 129-130.

Arias JR, Miles MA, Naiff RD, Povoá MM, De Freitas RA, Biancardi CB, CASTELLON EG 1985. Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg* 34 (6): 1098-1108.

Assis TSM, Caligiorne RB, Romero GAS, Rabello A 2009. Detection of LeishmaniakDNA in human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103 (12): 1269-1272.

Azevedo ACR, Rangel EF 1991. A study of sandfly species (Diptera, Psychodidae; Phlebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Baturité, Ceará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 86: 405-410.

Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES, Fiúza JA, Gonçalves CM, Paula KM, Dias ES 2005. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmanioses visceral, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(5): 421-425.

Barbosa AF, Oliveira SMP, Bertho AL, Franco, AMR, Rangel EF 2006. Single and concomitant experimental infections by *Endotrypanum* spp. and *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:851-856.

Barreto M 1943. Observações sobre a biologia, em condições naturais, dos flebótomos do Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae). Tipografia Rossolito, 162p.

Beier, JC, PV Perkins, RA Wirtz 1988. Bloodmeal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), tested on Anopheles (Diptera: Culicidae) in Kenya. *J Med Entomol* 25: 9-16.

Bull CG, King WV 1923. The identification of the bloodmeal of mosquitoes by means of the precipitin test. *Am J Trop Med Hyg* 3: 491-496.

Burkot TR, WG Goodman, GR DeFoliart 1981. Identification of mosquito blood meals by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 30: 1336-1341.

Camargo LMA, Barcinski MA 2003. Leishmanioses, feridas bravas e Kalazar. *Ciência e cultura* 1: 34-37.

Che Lah EF, Ahamad M, Harin MS, Ming HT 2012. Establishment of a molecular tool for blood meal identification in Malaysia. *Asian Pac J Trop Biomed* 2(3): 223-227.

Chow E, RA Wirtz, TW Scott 1993. Identification of blood meals in *Aedes aegypti* by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Am Mosq Control Assoc* 9: 196-205.

Christensen HA, Arias JR, Vasquez AM, Freitas RA 1982. Host of sandfly vectors of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Central Amazon of Brazil. *Annals of the Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 31:239-242.

Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* L.-specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 98: 12-17.

Costa JC, Lorosa ES, Moraes JLP, Rebêlo JM 2013. Espécies de Culicoides (Diptera; Ceratopogonidae) e hospedeiros potenciais em área de ecoturismo do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde (Online)* 4(3): 11-18.

Costa-Simone M, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF 2007. *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*, 102:149-53. 2007.

Cruz CFR 2010. *Leishmaniose tegumentar americana (LTA) no município de Bandeirantes – Paraná, entre 2000 e 2009*, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 135pp.

Deane LM 1956. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Tese de Livre Docência. Faculdade de Medicina, USP, 162 pg

Dias FOP, Lorosa ES, Rêbello JMM 2003. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Caderno de Saúde Pública* 19: 1373-1380.

Dias FOP, Lorosa ES, Rêbello JMM 2003. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Caderno de Saúde Pública* 19: 1373-1380.

Disch J, Pedras MJ, Orsini M, Pirmez C, De Oliveira MC, Castro M, Rabello A 2005. *Leishmania (Viannia)* subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *DiagnMicrobiol Infect Dis* 51 (3):185-190.

El-Beshbishy HA, Al-Ali KH, El-Badry AA 2013. Molecular characterization of *Leishmania* infection in sand flies from Al-madinahAl-munawarah province, western Saudi Arabia. *ExpParasitol* 134(2):211-215.

Forattini OP 1973. *Entomologia médica*, 4th ed., EDUSP, São Paulo 658 pp.

Forattini OP, Rabello EX, Galati EAB 1976. Novos encontros de flebotomoíneos no Estado de São Paulo, Brasil, com especial referência a *Lutzomyia longipalpis*. *Rev Saúde Públ* 10: 125-128.

Franco AMR, Tesh RB, Guzman H, Deane MP, Grimaldi Jr G 1997. Development of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in experimentally infected phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 34: 189- 192.

Galati EAB 2003. Classificação de Phlebotominae. In Rangel EF & Lainson R (eds), *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p.23-51.

Galati EAB 2008. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) da Província Espeleológica do Vale do Ribeira, PhD Thesis, Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo,

Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanoos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, Tintaya KWQ, Dujardin JC 2004. Culture-Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validations of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. *J ClinMicrobiol* 42: 2294-2297.

Garlapati RB, Abbasi I, Warburg I, Warburg A, Poché D, Poché R 2012. Identification of bloodmeals in wild caught blood fed *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) using cytochrome b PCR and reverse line blotting in Bihar, India. *Journal of Medical Entomology* 107: 515-521.

Gelle-Oliveira GM, Figueiró-Filho EA, Andrade GMC, Araújo LA, Gelle-Oliveira ML, Cunha RV 2010. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Município de Três Lagoas, área de transmissão intensa de leishmaniose visceral, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Pan Amazônica de Saúde* 1: 83-94.

Gontijo CMF 2000. Leishmaniose Tegumentar em Minas Gerais: Estudos Moleculares de amostras de Leishmania isoladas de casos humano. Tese (Doutorado em Parasitologia) –Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 158 pp.

Guerbouj S, Victoir K, Guizani I, Seridi N, Nuwayri-Salti N, Belkaid M, Ismail RB, Le Ray D, Dujardin JC 2001. Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure? *Parasitology* 122: 25-35.

Hajjarian H, Mohebbi M, Alimoradi S, Abaei MR, Edrissian GH 2009. Isolation and characterization of pathogenic *Leishmaniaturanica* from *Nesokia indica* (Rodentia, Muridae) by PCR-RFLP and ITS1 sequencing in Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103(11):1177-1179.

Haouas N, Pesson B, Boudabous R, Dedet JP, Babba H, Ravel C 2007. 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.* 77(6): 1054-1059.

Hunter FF, R Bayly 1991. ELISA for identification of blood meal source in black flies (Diptera: Simuliidae). *J Med Entomol* 28: 527-532.

Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J Mol Evol* 32: 128-144.

Jaouadi K, Haouas N, Chaara D, Boudabous R, Gorcii M, Kidar A, Depaquit J, Pralong F, Dedet JP, Babba H 2013. 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* 106: 79-85

Kent RJ, Coetzee M, Mharakurwa S, Norris DE 2006. Feeding and indoor resting behaviour of the mosquito *Anopheles longipalpis* in an area of hyperendemic malaria transmission in southern Zambia. *Med Vet Entomol* 20(4): 459–463.

Kent RJ, Norris DE 2005. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome b. *American Journal of Medical Hygiene* 73(2): 336-342.

Khanra S, Datta S, Mondal D, Saha P, Bandopadhyay SK, Roy S, Manna M 2012. RFLPs of ITS, ITS1 and hsp70 amplicons and sequencing of ITS1 of recent clinical isolates of Kala-azar from India and Bangladesh confirms the association of *L. tropica* with the disease. *Acta Trop* 124(3): 229-234.

Killick-Kendrick R 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 4 (1):1-24.

Killick-Kendrick R 1999. The biology and control of phlebotominae sand flies. *Clin Dermatol* 17: 279-289

- Kirstein F, Gray JS 1996. 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* 62: 4060-4065.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci* 86:6196–6200
- Lainson R & Rangel EF 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 811-27.
- Lainson R & Shaw JJ 1979. The role of animals in the epidemiology of the South American leishmaniasis. In: *The Biology of the Kinetoplastida*. Lumsden, WHR & Evans, DA (eds), v. 2. Academic Press, London.
- Lainson R & Shaw JJ 2005. New World Leishmaniasis. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD, editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: parasitology*. 10th ed. London: Hodder Arnold ASM Press, p. 313- 49.
- Lainson R, Ryan L, Shaw JJ 1987. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82 (3): 421-424.
- Lorosa ES, Andrade RE, Rebêlo JMM, Vinhaes MC 1998. Estudo das fontes alimentares através da reação de precipitina e grau de infectividade em *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) coletado na Ilha de São Luís - Maranhão. *Entomologia y Vectores* 5 (06): 241-250.
- Machado da Silva AV, Magalhães MAFM, Peçanha Brazil R, Carreira JC 2011. Ecological study and risk mapping of leishmaniasis in an endemic area of Brazil based on a geographical information systems approach. *Geospat Health* 6(1): 33-40.
- Madeira MF, Uchoa CMA, Leal CA, Silva RMM, Duarte R, Magalhães CM, Serra CMB 2003. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 551-555.
- Marassá AM, Consales CA, Galati EAB, Nunes VLB 2006. Identificação do sangue ingerido por *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia (Lutzomyia) almerioi* (Galati & Nunes, 1999) pela técnica imunoenzimática do ELISA de captura no sistema avidina-biotina. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 183-186.
- Margonari C, Soares RP, Andrade-Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL, Silva ME, Borges EC, Sanguinette CC, Melo MN 2010. Phlebotominae Sand Flies (Diptera:Psychodidae) and *Leishmania* Infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. *J Med Entomol* 47(6):1212-1219.
- Marinho RM, Fonteles RS, Vasconcelos GC, Azevêdo PCB, Moraes JLP, Rebêlo JMM 2008. Flebotomíneos (Díptera, Psychodidae) em reservas florestais da área metropolitana de São Luís, Maranhão, Brasil. *Rev Bras Ent* 52: 112-116.
- Martins AV, Silva J, Falcão AL 1977. Estudos sobre os flebótomos do estado de Minas Gerais. XIII: descrição do macho e redescricao de fêmea de *Lutzomyia misionensis* (Castro,1960) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Rev Bras Biol* 96: 75- 79.

McKinney RM, JT Spillane, PHolden 1972. Mosquito blood meals: identification by a fluorescent antibody method. *Am J Trop Med Hyg* 21: 999-1003.

Meece JK, Reynolds CE, Stockwell PJ, Jenson TA, Christensen JE, Reed KD 2005. Identification of Mosquito Bloodmeal Source by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profile Analysis of the Cytochrome B Gene. *J Med Entomol* 42(4):657-667.

Missawa NA, Veloso MAE, Maciel GBML, Michalsky EM, Dias ES 2011. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 76-78.

Molaei G, Andreadis TG, Armstrong PM, Diuk-Wasser M 2008. Host-feeding patterns of potential mosquito vectors in Connecticut, U.S.A.: Molecular analysis of bloodmeals from 23 species of *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquillettidia*, *Psorophora*, and *Uranotaenia*. *J Med Entomol* 45: 1143-1151.

Morrison AC, Ferro C, Morales A, Tesh RB, Wilson ML 1993. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J Med Entomol* 30: 427-435.

Mukabana WR, Takken W, Knols BGJ 2002. Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers. *Trends Parasitol* 18(11): 505-509.

Nery LCR, Lorosa ES, Franco AMR 2004. Feeding preference of the sand flies *Lutzomyia umbratilis* and *L. spathotrichia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in an urban forest patch in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 571-574.

Ngo KA, Kramer LD 2003. Identification of Mosquito Bloodmeals Using Polymerase Chain Reaction (PCR) With Order-Specific Primers. *J Med Entomol* 40(2):215-222

Oliveira-Pereira YN, Moraes JLP, Lorosa ES, Rebêlo JMM 2008. Preferência alimentar sanguínea da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Cad Saude Publica* 24(9):2183-2186.

Oliveira-Pereira YN, Rebêlo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF 2006. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmaniasp* na Amazônia maranhense. *RevSocBrasMed Trop* 39(6): 540-543.

Oliveira-Pereira YNO, Rebêlo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF 2006. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp. na Amazônia maranhense. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 540-543.

Oshaghi MA, Chavshin AR, Vatandoost H 2006a. Analysis of mosquito bloodmeals using RFLP markers. *Exp Parasitol* 114: 259-264.

Oshaghi MA, Chavshin AR, Vatandoost H, Yaaghoobi F, Mohtarami F, Noorjah N 2006b. Effects of post-ingestion and physical conditions on PCR amplification of host blood meal DNA in mosquitoes. *Exp Parasitol* 112: 232-236.

Perez JE, Ogusuku E, Ingá R, Lopez M, Monje J, Paz L, Nieto E, Earevato J, Guerra H 1994. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 16-14.

Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF, Britto CC 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyiamigonei* with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 905-913.

Pita-Pereira D, Souza GD, Zwetsch A, Alves CR, Britto C, Rangel EF 2009. Short Report: first report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. *Am J Trop Med Hyg* 80: 593-595.

Quaresma PF, Carvalho GML, Ramos MCN, Andrade Filho JD 2012. Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107(4): 480-485.

Queiroz MFM, Varjão JR, Moraes SC, Salcedo GE 2012. Analysis of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Barra do Garças, state of Mato Grosso, Brazil, and the influence of environmental variables on the vector density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Rev Soc Bras Med Trop* 45(3): 313-317.

Rangel E, Lainson R 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(7): 937-954.

Ravasan NM, Oshaghi MA, Javadian E, Rassi Y, Sadraei J, Mohtarami F 2009. Blood Meal Identification in Field-Captured Sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA Assays. *J Arthropod Borne Dis* 3(1): 8-18

Ready P 2013. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annual Rev Entomology* 58: 227-250.

Rebêlo JMM, Oliveira ST, Barros VLL. 2000a. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de Lagoas, Município de Buriticupu, Amazônia Maranhense. I - Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização recente. *Rev Soc Bras Med Trop* 33:11-19.

Rebêlo JMM, Oliveira ST, Silva FS 2000b. Flebotomíneos da Amazônia maranhense.IV. Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização antiga. *Entomologia Y Vectores* 7: 61-72.

Rebêlo JMM, Rocha RV, Moraes JLP, Silva CRM, Leonardo FS, Alves GA 2010. The fauna of phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in different phytogeographic regions of the state of Maranhão, Brazil. *Rev Bras entomol* 54: 494-500.

Reeves WC, WM Hammon 1944. Feeding habits of the proven and possible mosquito vectors of western equine and St. Louis Encephalitis in the Yakima Valley, Washington. *Am J Trop Med Hyg* 24: 131-134.

Rossi E, Bongiorno G, Ciolli E, Di Muccio T, Scalone A, Gramiccia M, Gradoni L, Maroli M 2008. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Trop* 105: 158-165.

Sant'Anna MRV, Jones NG, Hindley JA, Mendes-Sousa AF, Dillon RJ, Calvacante RR, Alexander B, Bates PA 2008. Blood meal identification and parasite infection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta Trop* 107: 230-237.

- Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freita RA, Malaco MAF 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector os American Visceral Leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 12: 315-317.
- Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, Jaffe CL 2003. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. *DiagnMicrobiol Infect Dis* 47:349-358.
- Schonian G, Schnur L, el Fari M, Oskam L, Kolesnikov AA, Sokolowska-Kohler W, Presber W 2001. Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 217–224.
- Sharma U, Singh S 2008. Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 45: 255-272.
- Shaw JJ 1992. Endotrypanum, a unique intraerythrocytic flagellate of New World tree sloths. An evolutionary link or an evolutionary backwater? *Cienc Cult* 44: 107-116.
- Shaw JJ 1992. Endotrypanum, a unique intraerythrocytic flagellate of New World tree sloths. An evolutionary link or an evolutionary backwater? *Cien Cult* 44: 107-116.
- Shaw JJ, Rosa AT, Souza A, Cruz AC 2003. Os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In Rangel EF & Lainson R (eds), *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p.337-351.
- Sherlock IA. A importância dos flebotomíneos. In Rangel EF & Lainson R (eds), *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, p.15-21.
- Soares MRA, Carvalho CC, Silva LA, Lima MSC, Barral AMP, Rebêlo JMM, Pereira SRF 2010. Análise molecular da infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* em área endêmica de leishmaniose visceral no Brasil. *Caderno de Saúde Pública* 26 (12): 2409-2413.
- Srinivasan R, Panicker KN 1992. Identification of bloodmeals of phlebotomine sandflies using the agarose gel diffusion method. *Southeast Asian J Trop Med Publ Health* 23: 486–488.
- Steuber S, Abdel-Rady A, Clausen PH 2005. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Parasitol Res* 97: 247-54.
- Svobodová M, Sádlová J, Chang KP, Volf P 2003. Distribution and feeding preference of the sand flies *Phlebotomus sergenti* and *P. papatasi* in a cutaneous leishmaniasis focus in Sanliurfa, Turkey. *Am J Trop Med Hyg* 68: 6-9.
- Tempelis CH 1975. Host-feeding patterns of mosquitoes, with a review of advances in analysis of blood meals by serology. *J Med Entomol* 11: 635-653.
- Teodoro U, Lonardoní MVC, Silveira TGV, Dias AC, Abbas M, Alberton D, Santos DR 2007. Luz e galinhas como fatores de atração de *Nyssomyia whitmani* em ambiente rural, Paraná, Brasil. *Rev Saude Publica* 41: 383-388.
- Teodoro U, Silveira TGV, Santos DR, Santos ES, Santos AR, Oliveira O, Kühl JB 2001. Frequência da fauna de flebotomíneos no domicílio e em abrigos de animais domésticos no peridomicílio, nos municípios de Cianorte e Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. *Rev Patol Trop* 30(2): 209-233.

Tyler DD 1992. Mitochondrion in the cell. In: The mitochondrion in health and disease. VCH Publishers Inc., New York, 95-146

Van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebelin SB 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol* 51: 133-142.

Volpini AC, Passos, VMA, Oliveira GC, Romanha AJ 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing american cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 90: 31-37.

Washino RK, Tempelis CH 1983. Mosquito host bloodmeal identification: methodology and data analysis. *Annu Rev Entomol* 28: 179-201.

Young DC, Duncan MA 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem of Entomol Institute* 54: 881pp.