



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Especialização em Entomologia Médica

CONHECIMENTOS SOBRE A FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE), VETORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA, NA LOCALIDADE DE SERRINHA DA TORRE, MUNICÍPIO DE IÚNA, ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL.

Humberto Gripp de Faria

Maurício Luiz Vilela

João Ricardo Carreira Alves

Rio de Janeiro

2018

Humberto Gripp de Faria

**CONHECIMENTOS SOBRE A FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA:
PSYCHODIDAE), VETORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA,
NA LOCALIDADE DE SERRINHA DA TORRE, MUNICÍPIO DE IÚNA, ESTADO
DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL.**

Monografia submetida como requisito final para
obtenção do grau de especialista em Entomologia
Médica, Curso de Especialização em Entomologia
Médica, pelo Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Rio de Janeiro

Data: ___/___/___

Humberto Gripp de Faria

Maurício Luiz Vilela
Orientador

João Ricardo Carreira Alves
Orientador

FARIA, HUMBERTO GRIPP DE.

CONHECIMENTOS SOBRE A FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE), VETORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA, NA LOCALIDADE DE SERRINHA DA TORRE, MUNICÍPIO DE IÚNA, ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL / HUMBERTO GRIPP DE FARIA. - Rio de Janeiro, 2018.

46 f.; il.

Monografia (Especialização) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Entomologia Médica, 2018.

Orientador: MAURÍCIO LUIZ VILELA.

Co-orientador: JOÃO RICARDO CARREIRA ALVES.

Bibliografia: f. 38-46

1. Flebotomíneos. 2. Leishmaniose Tegumentar Americana. 3. Vigilância Epidemiológica. 4. *Migonemyia migonei*. 5. Iúna. I. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me acompanhar, abençoar e proporcionar tantos momentos e experiências boas na vida.

A toda minha família, em especial a minha Mãe, por sempre me ajudar nos meus projetos.

A Isabela, minha companheira, parceira de vida, minha amada, por todo o carinho e atenção, colaborando exaustivamente e me apoiando durante todos os momentos desse trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Maurício Luiz Vilela por confiar no meu trabalho e me proporcionar o apoio e incentivo na execução desse projeto.

Ao meu Co-orientador MSc. João Ricardo Carreira Alves, pelas valiosas aulas práticas em que compartilhou e dividiu comigo seus conhecimentos e experiências sobre a identificação dos flebotomíneos.

Em especial a Prof^a Dr^a Jacenir Reis dos Santos Mallet e ao Prof. Dr. Rubens Pinto de Mello pela total disponibilidade e atenção durante todo o curso, tanto nas atividades teóricas como na realização do projeto.

A todos os professores do curso de Especialização em Entomologia Médica, por todo comprometimento e dedicação ao ensino entomológico durante o curso, compartilhando seus valiosos conhecimentos e experiências.

A todos os colegas do curso de Especialização em Entomologia Médica, pelo compartilhamento e colaboração em todas as atividades do curso.

A Prof^a Dr^a Elizabeth Ferreira Rangel, pela valiosa contribuição no meu projeto, assim como toda a equipe do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, por toda ajuda e auxílio no processamento e identificação dos flebotomíneos.

A Universidade Federal do Espírito Santo, e em especial toda a equipe do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Veterinária.

A toda a equipe de Vigilância Sanitária do município de Iúna.

RESUMO

Apontada como doença negligenciada, a leishmaniose é amplamente distribuída no mundo e apresenta as seguintes formas clínicas: a leishmaniose cutânea, a leishmaniose cutânea mucosa e a leishmaniose visceral. A doença é causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania* sendo transmitida por fêmeas de flebotomíneos. Nas Américas é dividida em leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA). No Brasil é considerada um grande problema de saúde pública. A LTA no Estado do Espírito Santo é endêmica; no período entre 2002 e 2015 foram notificados 2533 casos humanos, apresentando-se em destaque principalmente nas regiões do Caparaó, Serrana e Norte. O presente estudo foi realizado no município de Iúna, situado na região sul do estado, e foi selecionada a localidade Serrinha da Torre (zona rural), área com relatos de casos humanos de LTA, onde foram realizadas capturas de flebotomíneos. O objetivo foi obter uma análise temporal da fauna de flebotomíneos, entre os meses de dezembro de 2015 a abril de 2016, e avaliar a presença de potenciais espécies vetores de LTA na localidade. Utilizou-se armadilhas luminosas do tipo CDC instaladas no peridomicílio das residências. Foram coletados um total de 879 flebotomíneos, pertencentes a oito espécies, incluídas na Tribo Phlebotomini, Subtribos Brumptomyiina e Lutzomyiina e nos Gêneros *Brumptomyia*, *Evandromyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia* e *Trichopygomyia*. A espécie predominante foi *Migonemyia migonei* com 744 (84,64%) exemplares, seguida por *Nyssomyia intermedia* com 96 (10,92%), *Pintomyia fischeri* com 29 (3,3%) as demais espécimes somaram 10 exemplares (1,14%). Os resultados das coletas confirmaram presença de três espécies vetores de leishmanioses dermatrópicas na região: *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia intermedia* e *Pintomyia fischeri*. Por suas características antropofílicas e alta prevalência no peridomicílio das residências, sugere-se que *Migonemyia migonei* possa atuar como vetor do agente etiológico da LTA nessa área.

Palavras-chave: Flebotomíneos, Leishmaniose Tegumentar Americana, Vigilância Epidemiológica, *Migonemyia migonei*, Iúna.

ABSTRACT

Aimed as a neglected disease, leishmaniasis is widely distributed in the world and presents the following clinical forms: cutaneous leishmaniasis, mucocutaneous leishmaniasis and visceral leishmaniasis. The disease is caused by different species of the genus *Leishmania* being transmitted by females of sand flies. In the Americas it is divided into American tegumentary leishmaniasis (ATL) and American visceral leishmaniasis (AVL). In Brazil it is considered a major public health problem. ATL in the state of Espírito Santo is endemic; in the period between 2002 and 2015, 2533 human cases were reported, mainly in the Caparaó, Serrana and Norte regions. The present study was carried out in the municipality of Iúna, located in the southern region of the state, and the locality Serrinha da Torre (rural area) was selected, an area with reports of human cases of ATL, where catches of sandflies were taken. The objective was to obtain a temporal analysis of sandfly fauna, from December 2015 to April 2016, to evaluate the presence of potential vector species of ATL in the locality. Light traps of the type CDC installed in the peridomestic sites of residences were used. A total of 879 phlebotomines belonging to eight species, included in the Phlebotomini Tribe, Subtribos Brumptomyiina and Lutzomyiina and in the genera *Brumptomyia*, *Evandromyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia* and *Trichopygomyia* were collected. The predominant species was *Migonemyia migonei* with 744 (84.64%) specimens, followed by *Nyssomyia intermedia* with 96 (10.92%), *Pintomyia fischeri* with 29 (3.3%) the other specimens added 10 specimens (1.14%). The results of the collections confirmed the presence of three species of dermatotropic leishmaniasis in the region: *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia intermedia* and *Pintomyia fischeri*. Due to its anthropophilic characteristics and high prevalence in the peridomicile of the residences, it is suggested that *Migonemyia migonei* can act as a vector in this area.

Keywords: Phlebotomines, American Tegumentary Leishmaniasis, Epidemiological Surveillance, *Migonemyia migonei*, Iúna

SUMÁRIO

	Página
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Leishmanioses	1
1.2- Leishmaniose Tegumentar Americana	3
1.2.1- Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Espírito Santo.....	5
1.3- Leishmaniose Visceral Americana	6
1.3.1- Leishmaniose Visceral Americana no Estado do Espírito Santo.....	9
2- OS FLEBOTOMÍNEOS	10
3- RELEVÂNCIA	15
4- OBJETIVOS	17
4.1- Objetivo Geral	17
4.2- Objetivos Específicos	17
5- METODOLOGIA	18
5.1- Desenho do estudo	18
5.2- Caracterização do município	18
5.3- Área de estudo	19
5.4- Captura dos flebotomíneos	20
5.5- Preparação dos flebotomíneos	21
5.5.1- Triagem	22
5.5.2- Processamento dos flebotomíneos.....	22
5.5.3- Montagem das lâminas	24
5.5.4- Identificação dos flebotomíneos	25
5.6- Dados do Clima	27
5.7- Análise estatística	27
6- RESULTADOS	28
7- DISCUSSÃO	33
8- CONCLUSÕES	37
9-PERSPECTIVAS	37
10- REFERÊNCIAS	38

LISTA DE ABREVIATURAS

° C- Graus Celsius

µm- Micrômetro

CDC- Centers for Diseases Controls

DNA- Ácido desoxirribonucleico

ELISA- Enzime-Linked Immunosorbent Assay

ES- Espírito Santo

FUNASA- Fundação Nacional de Saúde

GPS- Global Positioning System

HIV- Human Immunodeficiency Virus

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDMR- Intradermorreação de Montenegro

IFI- Imunofluorescência Indireta

INCAPER- Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural

KOH- Hidróxido de Potássio

LTA- Leishmaniose Tegumentar Americana

LVA- Leishmaniose Visceral Americana

MAPA- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MG- Minas Gerais

MS- Mato Grosso do Sul

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

SINAN- Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SP- São Paulo

SUCAM- Superintendência de Campanhas de Saúde Pública

TO-Tocantins

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Ciclo de vida dos flebotomíneos.....	12
Figura 2: Limites administrativos do município de Iúna, Espírito Santo. Os quadrados em destaque na localidade de Serrinha da Torre representam as propriedades pesquisadas.....	19
Figura 3: Locais de captura dos flebotomíneos (estrelas amarelas) na localidade Serrinha da Torre, município de Iúna, Espírito Santo.....	21
Figura 4: Armadilha luminosa CDC utilizada na captura dos flebotomíneos.....	22
Figura 5: Placa acrílica de seis poços SPL Life Sciences [®] usada para realização do processamento dos flebotomíneos. Detalhe das setas indicando a sequência das passagens pelas soluções químicas.....	23
Figura 6: Montagem das lâminas realizadas com auxílio de microscópio estereoscópico, procedimento realizado na capela de exaustão de gases.....	25
Figura 7: Identificação das lâminas dos exemplares de flebotomíneos em microscópio óptico.....	26
Figura 8- Imagens de microscopia óptica: estruturas utilizadas na identificação dos flebotomíneos: A- Genitália da fêmea, B- Tórax, C- Cabeça, D- Genitália do macho.....	26
Figura 9: Dados meteorológicos do município de Iúna, ES. Média mensal da temperatura, umidade relativa do ar e índice pluviométrico no período entre os meses de dezembro de 2015 e abril de 2016.....	28
Figura 10: Número de espécimes de flebotomíneos coletados entre os meses de dezembro de 2015 a abril de 2016 na localidade Serrinha da Torre, Iúna, ES.....	29

Figura 11: Número de espécimes de flebotomíneos coletados entre os meses de dezembro de 2015 a abril de 2016 em duas propriedades na localidade Serrinha da Torre, Iúna, ES.....	30
Figura 12: Espécies de flebotomíneos de interesse médico por local de coleta na localidade Serrinha da Torre, Iúna, ES.....	32

1-INTRODUÇÃO

1.1- Leishmanioses

As leishmanioses são consideradas um importante problema de saúde pública, e se configuram como um grupo de síndromes complexas e multifacetadas causadas por diversas espécies de parasitas do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), protozoários pertencentes ao Reino Protista, Filo Euglenozoa, Classe Kinetoplastea, Subclasse Metakinetoplastina, Ordem Trypanosomatida, Família Trypanosomatidae (Akhoundi et al, 2016). No mundo a doença apresenta três formas clínicas, a leishmaniose visceral que acomete órgãos como fígado e baço, a leishmaniose cutânea, onde o indivíduo desenvolve lesões na pele, e a leishmaniose mucocutânea, quando há o comprometimento da mucosa nasal, da boca e garganta, resultando em lesões graves e deformantes. Os indivíduos afetados por essa forma apresentam problemas decorrentes do estigma, ocasionando dificuldades em sua inclusão no ambiente social (TDR, 2017). Nas Américas, as leishmanioses podem ser divididas em leishmaniose visceral americana (LVA) e a leishmaniose tegumentar americana (LTA).

A leishmaniose é transmitida através da picada da fêmea infectada de pequenos dipteros, os flebotomíneos, pertencentes à Família Psychodidae, e é uma doença que acomete humanos, animais domésticos e silvestres, e esta associada à diferentes aspectos, socio-ambientais e o estado imunológico das pessoas (WHO, 2017).

No Novo Mundo é considerada primariamente uma zoonose, podendo o homem se infectar e adoecer ao entrar em contato com o ciclo enzoótico do parasita, principalmente ao adentrar nos ambientes de floresta. No Velho Mundo em situações específicas é considerada uma antroponose (Brasil, 2003).

A distribuição geográfica da leishmaniose abrange 98 países, em quatro continentes, onde 77 encontram-se na África, Ásia e Europa e 21 nas Américas; em 34 países são registrados casos de coinfeccção *Leishmania*-HIV. Por sua morbidade e letalidade, é classificada como uma das doenças mais negligenciadas do mundo. Dados indicam que aproximadamente 350 milhões de pessoas vivem em área de risco e estima-se que 700.000 a 1 milhão de novos casos são registrados ao ano, e a mortalidade variando entre 20.000 e 30.000 por ano em relação à leishmaniose visceral (Alvar et al, 2012; WHO, 2017). As leishmanioses encontram-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo. O Continente Americano possui relatos do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, não sendo registrada nas ilhas do Caribe, Chile e Uruguai (PAHO, 2017; Portal da Saúde, 2014). Dos 18 países com transmissão endêmica, em 17 desses a doença é reconhecida como sendo de notificação obrigatória individual ou agregada (OPAS-OMS, 2016).

Hospedeiros vertebrados (mamíferos) de várias ordens: Carnívora, Rodentia, Marsupialia, Edentata, Primata e Artiodactyla, são responsáveis pela manutenção do ciclo silvestre da leishmaniose (Lainson & Shaw, 1998), enquanto algumas espécies domésticas como os cães (*Canis familiares*) e equinos (*Equus caballus*), podem estar envolvidas na manutenção dos ciclos peridomésticos e urbanos (Rangel & Lainson, 2003).

Existem duas formas celulares do parasita, as promastigotas que são encontradas nos hospedeiros invertebrados (flebotomíneos de várias espécies), e a forma amastigota, no interior das células do sistema mononuclear fagocitário (macrófagos) dos mamíferos. As formas promastigotas do parasita são flageladas e bioquimicamente distintas das amastigotas (Gontijo & Carvalho, 2003). As amastigotas são parasitas arredondados, imóveis, intracelulares que se instalam e se multiplicam por divisão binária no interior dos fagolisossomas dos macrófagos.

No flebotomíneo vetor, o ciclo biológico da *Leishmania* spp. ocorre em torno de 72 horas; as fêmeas dos flebotomíneos se infectam ao sugarem o sangue de mamíferos infectados contendo macrófagos parasitados com as formas amastigotas. As amastigotas no trato digestivo anterior do vetor rompem os macrófagos e começam a se multiplicar por divisão binária, se diferenciam em formas promastigotas flageladas mantendo a mesma forma de divisão. As promastigotas colonizam o esôfago e a faringe do flebotomíneo, mantendo-se aderida ao epitélio através de seu flagelo, terminando então por se diferenciar nas formas infectantes promastigotas metacíclicas. Ao realizar um segundo repasto sanguíneo, a fêmea infectada do flebotomíneo inocula junto com sua saliva as formas promastigotas metacíclicas do parasita na epiderme do hospedeiro, que são fagocitadas por macrófagos do hospedeiro. Em seu interior, dentro do vacúolo parasitóforo, elas sofrem diferenciação se tornando amastigotas, que por sua vez, reproduzem por divisão binária resultando em rompimento da sua membrana, liberando amastigotas no meio extracelular, sendo então fagocitadas por outros macrófagos (Brasil, 2003).

1.2- Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose cutânea constitui-se em problema de saúde pública em 88 países, distribuídos por quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos humanos (Brasil, 2007; PAHO, 2014b).

No Continente Americano existem 15 espécies de leishmanias causadoras da doença em humanos, divididas em dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*. As três espécies mais importantes do subgênero *Leishmania* causadoras da leishmaniose tegumentar americana (LTA) são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) venezuelensis*, enquanto as principais do subgênero *Viannia* são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L.(V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) guyanensis* (PAHO, 2014b).

No Brasil, Gaspar Vianna nomeou os parasitas como *Leishmania* em 1911, Aragão em 1922, no bairro das Laranjeiras, na cidade do Rio de Janeiro, demonstrou a transmissão vetorial pelos flebotomíneos e Forattini em 1958 conseguiu identificar *Leishmania* em roedores silvestres habitantes de florestas no estado de São Paulo (Brasil, 2007).

Em média no Brasil, são registrados cerca de 21.000 casos/ano de LTA, com coeficiente de incidência de 11,3 casos/100.000 habitantes nos últimos cinco anos. A região Norte apresenta o maior coeficiente sendo 54,4 casos/100.000 habitantes, seguida das regiões Centro-Oeste com 22,9 casos/100.000 habitantes e Nordeste com 14,2 casos/100.000 habitantes (Portal da Saúde, 2014).

As três principais espécies que ocorrem no Brasil são: *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*, sendo a primeira registrada em todos os estados federativos. A doença pode acometer animais silvestres, sinantrópicos e domésticos. Os roedores, gambás, tamanduás, tatus, canídeos, preguiças e primatas podem ser designados como hospedeiros e reservatórios naturais silvestres do parasita. Os animais domésticos, cão (*Canis familiares*), gato (*Felis catus*) e equinos (*Equus caballus*), apesar de apresentarem a doença, sua função na manutenção do ciclo do parasita no meio ambiente ainda não está bem estabelecida, podendo ser considerados como hospedeiros acidentais (Brasil, 2007).

A LTA ocorre em todas as regiões do Brasil, e tem sua transmissão associada a diversas espécies de flebotomíneos (Tabela 1).

Tabela 1- Espécies de flebotomíneos transmissores de leishmaniose tegumentar no Brasil e suas respectivas regiões de ocorrência, adaptada de Aguiar & Medeiros, 2003.

Espécies	Regiões
<u>Leishmaniose Tegumentar Americana</u>	
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i> (Mangabeira, 1942)	N, NE, CO, SE
<i>Migonemyia (Migonemyia) migonei</i> (França, 1920)	N, NE, CO, SE, S
<i>Nyssomyia intermedia</i> (Lutz & Neiva, 1912)	N, NE, CO, SE, S
<i>Nyssomyia neivai</i> (Pinto, 1926)	SE, S
<i>Nyssomyia umbratilis</i> (Ward & Fraiha, 1977)	N, NE, CO
<i>Nyssomyia whitmani</i> (Antunes & Coutinho, 1939)	N, NE, CO, SE, S
<i>Pintomyia (Pintomyia) fischeri</i> (Pinto, 1926)	NE, CO, SE, S
<i>Pintomyia (Pintomyia) pessoai</i> (Coutinho & Barreto, 1940)	NE, CO, SE, S
<i>Psychodopygus paraensis</i> (Costa Lima, 1941)	N
<i>Psychodopygus ayrozai</i> (Coutinho & Barreto, 1940)	N, NE, CO, SE
<i>Psychodopygus complexus</i> (Mangabeira, 1941)	N, CO
<i>Psychodopygus hirsutus hirsutus</i> (Mangabeira, 1942)	N, NE, CO, SE, S
<i>Psychodopygus wellcomei</i> (Fraiha, Shaw & Lainson, 1971)	N, NE
<i>Trichophoromyia ubiquitalis</i> (Mangabeira, 1942)	N, NE, CO, SE

A diversidade de agentes, reservatórios e vetores da LTA, aliada ao conhecimento ainda insuficiente sobre vários aspectos, evidencia a complexidade em relação ao controle desta endemia, o que resulta em enormes desafios para a saúde pública (Brasil, 2007).

1.2.1- Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Espírito Santo

Registrada pela primeira vez, no estado do Espírito Santo em 1912 por Cunha e Carini, e posteriormente por Terra em 1913, e por Silva em 1915, a LTA passou por um período grande de ausência de referencial bibliográfico apesar de permanecer conhecida pelos profissionais médicos, segundo então a Superintendência de Campanhas de Saúde Pública, Ministério da Saúde - Regional do Espírito Santo, SUCAM-ES, os relatos de casos continuavam sendo registrados (Barros et al., 1985; Sessa et al., 1985).

No final de 1977, houve um aumento dos casos positivos no exame de Intradermorreação de Montenegro (IDRM) nos pacientes do hospital Cassiano Antônio Moraes, hospital pertencente à Universidade Federal do Espírito Santo. Entre janeiro de 1973 a abril de 1978, dados da SUCAM-ES apontam 39 casos diagnosticados e os pacientes oriundos de localidades dos municípios de Viana e Cariacica (Barros et al., 1985).

Informações fornecidas pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), do total de 45.527 casos relatados da doença na região sudeste do Brasil, entre os anos de 1980 a 2000, o estado do Espírito Santo foi responsável por 8.889 das ocorrências (Falqueto, 2003). A LTA é endêmica e amplamente distribuída por todo o estado do Espírito Santo (Rocha et al., 2010b), tendo o SINAN registrado entre o ano de 1986 a 2015, um total de 1067 casos confirmados da doença (Ministério da Saúde/SVS, 2017).

A região norte do estado até meados do século XX apresentava vegetação de Mata Atlântica, nesse período não ocorreram registros de casos da LTA entre os colonizadores originais. No início dos anos 80 do século passado, a suspensão do uso de inseticidas visando o controle da malária pode ter influenciado a adaptação dos flebotomíneos ao ambiente peridomiciliar, o que pode estar relacionado à ocorrência do primeiro caso humano da LTA no norte do Espírito Santo. Estudos foram realizados na área com o intuito de obter dados epidemiológicos consistentes sobre os casos humanos e entre os anos de 1986 a 2003, a Secretaria de Saúde do Estado do Espírito Santo notificou 2132 casos (Virgens, 2008).

1.3- Leishmaniose Visceral Americana

Doença considerada endêmica em 12 países nas Américas, a leishmaniose visceral americana (LVA) apresenta três perfis distintos de transmissão: países com transmissão esporádicas (Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Bolívia, Guiana e México), com

transmissão estável (Colômbia e Venezuela) e países com transmissão em expansão (Brasil, Argentina e Paraguai) (PAHO, 2014a).

No Brasil a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios, de todas as regiões geográficas. Casos confirmados com transmissão autóctone de LVA somaram 3453 pessoas no ano de 2014, sendo registrados em 21 das 27 Unidades da Federação (SINAN, 2014).

Os índices de letalidade podem alcançar entre 10% e 98% quando se analisa falhas de tratamento e pessoas não medicadas (Desjeux, 2004). A ocorrência da doença em brasileiros no período entre os anos de 1990 a 2015 totalizou 81.722 casos, entre os anos de 2000 a 2015 ocorreram 3.690 óbitos (SINAN, 2014).

A posição taxonômica do agente causador da LVA foi por muito tempo referido como *Leishmania (Leishmania) chagasi*, entretanto, análises mais extensas do DNA (Mauricio et al.,1999) indicaram que a *L. (L.) infantum* e a *L.(L.) chagasi* apresentam tanta semelhança que só poderiam ser separadas em nível subespecífico. Considerando toda a eco-epidemiologia da *L. (L.) chagasi* na Amazônia brasileira, e neste contexto, os hábitos silvestres do vetor *Lu. longipalpis*, e do reservatório vertebrado, a raposa do mato (*Cerdocyon thous*), alguns autores preferem enquadrar como sendo no mínimo *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (Silveira & Corbett, 2010).

Nas Américas a principal espécie de flebotomíneo transmissora da doença é a *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva 1912), sendo a *Pintomyia (Pifanomyia) evansi* (Nuñez-Tovar 1924) um importante vetor na área cafeeira na Colômbia e *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* (Mangabeira 1938), nos estados de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso e na região de fronteira entre o Brasil e Bolívia (PAHO, 2014a). Estudos realizados em La Banda, Santiago del Estero, Argentina e em São Vicente Férrer, Pernambuco, Brasil, sugeriram que *Migonemyia migonei* (França 1920) pudesse atuar como vetor em áreas com

casos humanos e caninos da doença (Salomon et al., 2010; Carvalho et al., 2010). Recentemente, estudos experimentais indicaram que a espécie possa ser vetor competente do parasita (Guimarães et al., 2016).

Devido a vários fatores a doença tem apresentado mudanças no seu padrão de transmissão, inicialmente a ocorrência da doença em solo brasileiro se restringia a ambientes rurais e periurbanos, recentemente vem alcançando os centros urbanos como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), entre outros (Brasil, 2003). A adaptação do vetor ao ambiente urbano associado ao grande número de reservatórios caninos nas cidades pode estar contribuindo para esse novo padrão de transmissão da LVA.

O período de incubação da doença é bastante variável sendo para o homem de 10 dias a 24 meses com média entre 2 e 6 meses e no cão de 3 meses a vários anos com média de 3 a 7 meses (Brasil, 2003; PAHO, 2014a).

A LVA é uma doença de notificação compulsória, portanto todo caso suspeito em território nacional deve ser notificado e investigado pelos serviços de saúde através da ficha de investigação padronizada pelo SINAN (Brasil, 2003).

Em virtude das características epidemiológicas e do conhecimento ainda insuficiente sobre os vários elementos que compõem a cadeia de transmissão da LVA, as estratégias de controle desta endemia ainda são pouco efetivas e estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos, redução da população de flebotomíneos através de produtos químicos, eliminação dos reservatórios e atividades de educação em saúde (Brasil, 2003).

Os cães são considerados os principais reservatórios domésticos em áreas urbanas e rurais (PAHO, 2014a), são hospedeiros da *L. infantum* e fonte de infecção para o vetor *Lu. longipalpis* Recentemente por meio da Nota Técnica Conjunta n° 001/2016 MAPA/MS,

assinada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e pelo Ministério da Saúde, foi autorizado o registro do Milteroram®, medicamento de uso veterinário com princípio ativo a base de miltefosina para o tratamento clínico da Leishmaniose Visceral Canina, a nota por sua vez ressalta o tratamento como medida individual e optativa por parte de proprietários de cães, não sendo recomendada como ação de saúde pública (MAPA, 2016).

Como formas de prevenção da doença e controle, o mercado apresenta diversos produtos de uso veterinário autorizados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Esses produtos visam impedir a contaminação canina e possuem em suas fórmulas químicas, substâncias inseticidas e repelentes, sendo essas disponíveis em várias apresentações comerciais. No mercado ainda existe uma vacina aprovada (Leishtec®) com eficácia de 71,3% que visa estimular uma resposta imune eficiente capaz de proteger os animais contra a eventual infecção.

1.3.1- Leishmaniose Visceral Americana no Estado do Espírito Santo

A LVA no estado foi registrada pela primeira vez em 1966, sendo quatro casos provenientes do município de Baixo Guandu e um caso do município de Colatina. Acometendo a região noroeste e centro-oeste do estado, 110 casos foram notificados pela Secretaria Estadual de Saúde do Espírito Santo nas décadas de 80 e 90, sendo estes provenientes de dez municípios: Pancas, Águia Branca, São Gabriel da Palha, Nova Venécia, Governador Lindemberg, Baixo Guandu, Itaguaçu, Itarana, São Roque do Canaã e Água Doce do Norte (Pinto, 2012; Pires, 2015). Dados epidemiológicos apontam o registro de 60 casos confirmados notificados no estado entre os anos de 2001 a 2015, sendo um total de seis óbitos (SINAN, 2017).

2- OS FLEBOTOMÍNEOS

Os flebotomíneos são insetos dípteros da ordem Nematocera, Família Psychodidae (Brazil & Brazil, 2003), são transmissores naturais das leishmanioses, de outros tripanossomatídeos, de arboviroses e da bartonelose. Apresentam ampla distribuição mundial podendo ser encontrados em quase todas as regiões do planeta, sua fauna é diversa e apresenta-se em maior número na região neotropical (Sherlock, 2003).

Originados no período cretáceo inferior (Lewis, 1982) foram descritos pela primeira vez na Itália em 1786, por Scopoli; *Bibio papatasi*, sendo posteriormente alterada a sua nomenclatura para *Phlebotomus papatasi* (Dedet, 2003; Galati, 2003).

Coquillett em 1907 fez a primeira descrição dos flebotomíneos nas Américas, em 1912, Adolfo Lutz e Arthur Neiva fizeram no Brasil (Sherlock, 2003).

A metodologia taxonômica proposta por Young & Ducan (1994) dividem os flebotomíneos em seis gêneros: três (*Lutzomyia* França, 1924; *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 e *Warileya* Hertig, 1948) habitantes do Novo Mundo e três habitam o Velho Mundo (*Phlebotomus* Rondani & Bethe, 1840; *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 e *Chinus* Leng, 1987). Nesta perspectiva os gêneros de interesse entomológico médico, especialmente relacionados à vetoração de *Leishmania spp.*, e por tanto, transmissores das leishmanioses são os *Phlebotomus* (Velho mundo) e o *Lutzomyia* (Novo Mundo).

São descritas no mundo, mais de 900 espécies de flebotomíneos sendo aproximadamente 500 na região neotropicais (Shimabukuro et al., 2011). A metodologia de classificação dos flebotomíneos, proposta por Galati (2003) divide a subfamília Phlebotominae em duas tribos: Hertigini e Phlebotomini e nove subtribos: *Sergentomyiina*, *Lutzomyiina*, *Psychodopygina*, *Hertigiina*, *Idiophlebotomina*, *Phlebotomina*, *Australophlebotomina*, *Brumptomyiina* e *Spelaeomyiina*, desse total, três apresentam

destaque por sua importância médica: *Sergentomyiina*, *Lutzomyiina* e *Psychodopygina* abrangendo vários gêneros, subgêneros e séries de espécies (Galati, 2003). Atualmente existem 1002 táxons do grupo das espécies (espécies ou subespécies) descritos, dos quais, 973 atuais e 29 fósseis descritos no mundo, Nas Américas conhecem-se 537, dos quais, 520 atuais e 17 fósseis (Galati, 2016).

O Brasil apresenta uma das mais ricas biodiversidade de espécies de flebotomíneos, talvez a maior. Em 1912, Arthur Neiva e Adolpho Lutz descreveram as três primeiras espécies de flebotomíneos, assim relatadas: *Phlebotomus squamiventris*, *Ph. longipalpis* e *Ph. intermedius*. Com o avanço nos estudos entomológicos, alguns pesquisadores atentaram para a importância e utilidade do uso das estruturas espermatecas e o cibário das fêmeas na taxonomia desse díptero, a partir daí, entre 1930 a 1960, várias novas espécies de flebotomíneos neotropicais foram descritas ao mesmo tempo em que as suas características de vetor foram sendo descobertas (Sherlock, 2003).

Os flebotomíneos são insetos frequentemente encontrados em abrigos naturais, tais como: troncos de árvores, abrigos de animais, folhas caídas, buracos entre rochas e cavernas (Galati et al.,2003). Seus hábitos são crepusculares e noturnos, os machos e as fêmeas procuram ficar em locais dissociados dos seus criadouros naturais (Brazil & Brazil, 2003). Os flebotomíneos apresentam comprimento variando entre 1 e 3 mm sendo sua superfície corporal composta de intensa densidade pilosa (Brasil, 2003), são holometábolos realizando em seu ciclo de vida uma fase de ovo, uma fase de larva com 4 estádios, uma fase de pupa e adulto. (Figura 1)

Os criadouros naturais dos flebotomíneos são difíceis de serem identificados, acredita-se ser pela mobilidade de suas formas larvais que apresentam um comportamento muito ativo em busca de alimento (Sherlock, 2003), porém investigações efetuadas a respeito dos criadouros relacionam a dificuldade de extração das formas imaturas nas amostras de solo

e matéria orgânica como sendo a razão dos baixos índices de insetos coletados (Feliciangeli, 2004).

Informações sobre o local onde os flebotomíneos se criam são de grande valia para estudos epidemiológicos (Alencar, 2007). Os criadouros naturais da maioria das espécies ainda não foram descobertos necessitando de maiores estudos (Brazil & Brazil, 2003). Essa característica resulta em dificuldade de estabelecer estratégias de controle baseadas nas formas imaturas e conseqüentemente interrupção do ciclo de transmissão da *Leishmania spp.* e outros patógenos. Ainda assim, o incremento de estudos sobre os criadouros é necessário para se realizar estratégias de controle na fonte de criação (Feliciangeli, 2004).

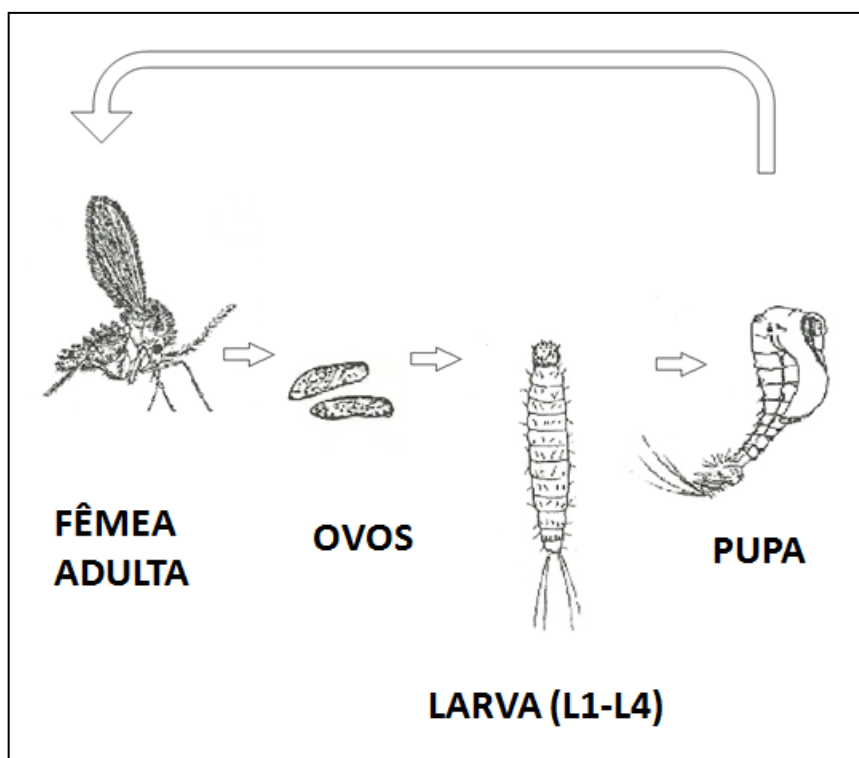


Figura 1: Ciclo de vida dos flebotomíneos adaptada de Brazil & Brazil, 2003.

As fêmeas dos flebotomíneos, em laboratório, realizam em média a postura de 40 ovos, podendo variar de acordo com a espécie. Os ovos são ovóides ou elipsóides, apresentam-se na coloração castanho escuro e variam de 300 a 500 μm de comprimento por

70 a 150µm de largura. A postura pode ser feita isolada ou em grupos, os ovos se aderem ao substrato devido as substancias produzidas pelas glândulas acessórias (Brazil & Brazil, 2003).

Quanto às formas imaturas, as larvas dos flebotomíneos têm tamanho reduzido, aspecto vermiforme, coloração branca apresentando 12 segmentos, sendo três torácicos e nove abdominais. A cabeça é bem desenvolvida possuindo antenas dependendo do estágio larvar, ela é de coloração mais escura quando comparadas com o resto do corpo, apresentando se coberta por espinhos que variam em relação à espécie (Brazil & Brazil, 2003).

O desenvolvimento larval ocorre em solo úmido com pouca luminosidade e adequado incremento de matéria orgânica, elas possuem as peças bucais do tipo triturador e se alimentam com muita intensidade. As larvas passam por quatro estádios onde as mesmas são muito parecidas, elas se diferenciam pelo tamanho e pela presença de um par de filamentos caudais na primeira fase e dois pares nas demais fases. As larvas possuem o corpo coberto por cerdas, sendo um total de 160 a 210 distribuídas ao longo de todo ele (Barreto, 1941). O número de cerdas dispostas no segmento torácico é usado como um caráter taxonômico importante para diferenciação entre espécies (Brazil & Brazil, 2003). O abdômen apresenta-se com nove segmentos iguais com exceção dos dois últimos, sendo o nono apresentando a função de fixação das larvas no período de muda (Leite & Williams, 1997).

A fase de pupa dos flebotomíneos apresenta a duração média de 7 a 12 dias, variando de acordo com a espécie. As pupas são brancas ou amarelas, sua coloração tende a se escurecer a medida que o inseto se aproxima do evento da eclosão. Ela é formada por 13 segmentos dividindo-se em cefalotórax e abdômen. Como característica as pupas permanecem imóveis, ou seja, ficam aderidas ao substrato através da exúvia larvar sem se locomover (Brazil & Brazil, 2003).

Os flebotomíneos adultos possuem dimorfismo sexual não relacionado apenas aos aspectos morfológicos, mas também em relação ao tipo de alimentação, seus hábitos são crepusculares e noturnos e seu desenvolvimento ocorre em matéria orgânica em decomposição (Brazil & Brazil, 2003).

A duração do ciclo de vida irá variar de acordo com a espécie, as condições climáticas e do tipo de alimentação (Sherlock, 2003). Criados em laboratórios adultos tem um tempo médio de vida de 30 a 40 dias, os machos e as fêmeas alimentam-se de seiva vegetal e secreções açucaradas, necessitando de carboidratos como fonte de energia (Brazil & Brazil, 2003). As fêmeas além de fitófagas, desempenham a hematofagia, aspecto fundamental para a transmissão de patógenos, necessitando de sangue para a maturação de seus ovários, excluindo raríssimas exceções de algumas espécies que são autógenas (Sherlock, 2003).

Algumas espécies de flebotomíneos apresentam hábitos alimentares seletivos, alimentando-se em uma determinada espécie de vertebrado, outras já são mais ecléticas podendo picar indiferentemente várias espécies de mamíferos sendo isso um dado importante em relação à capacidade vetorial do inseto, tanto para os homens como para outros vertebrados (Brazil & Brazil, 2003). O estudo dos hábitos alimentares e do conteúdo intestinal dos flebotomíneos permite a identificação dos hospedeiros, indicando os potenciais reservatórios das leishmanias (Missawa et al., 2008). Algumas espécies de flebotomíneos são consideradas importantes vetores, baseado no grau de antropofilia, na capacidade de se infectar naturalmente em reservatórios naturais do parasita, e no solapamento da distribuição geográfica com as localidades em que há registros de casos humanos da doença (Rangel & Lainson, 2003).

3- RELEVÂNCIA

Situado na região sudeste do Brasil, o Estado do Espírito Santo apresenta-se endêmico para a transmissão de *L.(V.) braziliensis* (Gaspar Vianna, 1911). O estado alberga a ocorrência de vários casos de LTA tanto em humanos quanto em animais. O município de Iúna, Região do Caparaó, se encontra na parte sul do estado sendo também considerado área de transmissão, Sessa e colaboradores (1985) relatou o encontro de seis pacientes portadores da doença entre os anos de 1978 a 1982. Entre os anos de 2001 a 2015, 107 casos da doença foram confirmados (SINAN, 2017).

Considerando a amplitude e complexidade do agravo, os fatores que se relacionam com o mesmo, merecem ser estudados para que possamos ter um melhor entendimento das variáveis que interferem no ciclo da doença, bem como, as formas como elas se expressam nos ambientes. O conhecimento sobre os potenciais vetores da doença na região se configuram como um dado relevante neste contexto. Os resultados obtidos enriquecem o aprendizado e poderão auxiliar nas decisões das ações de promoção à saúde visando o combate à doença. Assim, objetiva-se com essas medidas, diminuir a transmissão do agente etiológico, reduzir o número de doentes, reduzir os custos com enfermos e prejuízos advindo do afastamento dos trabalhadores, além de minimizar os danos físicos e psicológicos causados pela doença.

O acompanhamento dos casos clínicos humanos e nos animais em áreas endêmicas para a transmissão da LTA, assim como o trabalho de pesquisa e vigilância entomológicas objetivando o monitoramento das espécies transmissoras, são pilares de base para a compreensão do comportamento da doença na população. Diante do exposto o estudo dos flebotomíneos é de suma importância para o entendimento do ciclo de transmissão das leishmanioses.

A necessidade de se conhecer a composição faunística e os estudos relacionados aos aspectos bioecológicos dos flebotomíneos apresentam grande relevância, considerando o impacto causado pelas leishmanioses nas populações humanas e animais, e também pelo papel que desempenham como vetor desse agravo e de outros agentes por eles transmitidos.

4- OBJETIVOS

4.1- Objetivo Geral

Realizar uma análise temporal no período entre dezembro de 2015 a abril de 2016, e contribuir para o conhecimento da fauna de flebotomíneos da localidade de Serrinha da Torre, município de Iúna, Estado do Espírito Santo, área endêmica para transmissão da LTA.

4.2- Objetivos Específicos

Avaliar a frequência relativa e absoluta dos flebotomíneos;

Identificar potenciais espécies vetores de LTA na região de estudo.

5- METODOLOGIA

5.1- Desenho do estudo

Estudo empírico descritivo como forma de avaliar um corte sazonal ao longo do verão e outono para detectar a presença de flebotomíneos de importância médica e veterinária, no município de Iúna, localizado na região sul do Estado do Espírito Santo, Brasil.

5.2- Caracterização do município

Apresentando uma população de aproximadamente 29.743 habitantes (IBGE, 2016), o município de Iúna, está a uma altitude média de 661 metros, ocupando território de 460,586 Km², a densidade demográfica é 59,27hab./km² (IBGE, 2017). As temperaturas médias registradas entre 7 e 30°C, o clima é tropical de altitude e a vegetação característica e predominante é a Mata Atlântica. Está situado na região do Caparaó e faz divisa com os municípios de Muniz Freire ao leste, Ibitirama ao sul, Irupi e Ibatiba ao norte e o Estado de Minas Gerais a oeste (Iúna/ES, 2017) (Figura 2).

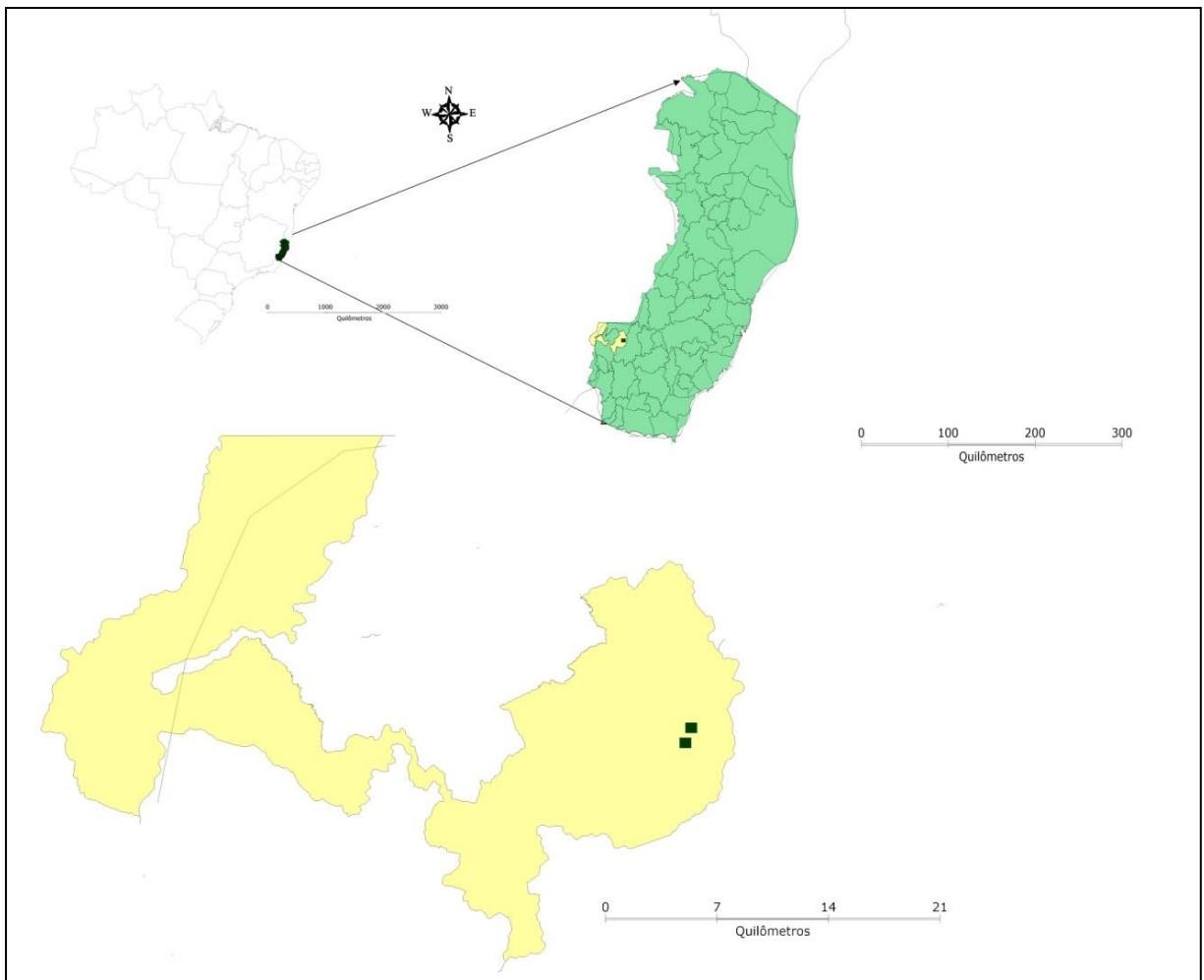


Figura 2: Limites administrativos do município de Iúna, Espírito Santo. Os quadrados em destaque na localidade de Serrinha da Torre representam as propriedades pesquisadas.

5.3-Área de estudo

A área de estudo selecionada foi a localidade rural Serrinha da Torre. Os critérios adotados para a escolha da área basearam-se na presença de cães (*Canis familiaris*) apresentando sinais clínicos condizentes com a LTA e em relatos por parte dos agentes da equipe de Vigilância Sanitária municipal que confirmaram a presença de casos humanos de LTA nessa localidade. Com base nesses indícios de transmissão, foram selecionadas duas propriedades para a realização das coletas dos flebotomíneos, ambas apresentando as mesmas características ambientais, sendo suas coordenadas marcadas com auxílio do Sistema de

Posicionamento Global (GPS). Os locais da instalação das armadilhas variaram dentro das propriedades e foram realizadas sempre no peridomicílio das residências dos moradores não se distanciando mais que 30 metros da casa sede. A localidade Serrinha da Torre, assim como as regiões próximas, integra o ambiente rural com intensa alteração antrópica. Nas propriedades onde foram realizadas as coletas assim como em seus arredores é comum à presença de lavouras de café, além de áreas com resquícios de vegetações de mata, essas normalmente fazem divisa ou são mantidas como áreas de reservas legalmente protegidas. A colonização dessa região foi sendo estabelecida ao longo do tempo e com ela alterações ambientais foram ocorrendo resultando em substituição da vegetação original pela instalação de propriedades rurais. Nessas áreas são comuns práticas de várias atividades agrárias: cafeicultura de cunho econômico, agricultura em geral e pecuária, dentre outras; com destaque para a criação de animais domésticos: como aves de várias espécies, cães (*Canis familiaris*), gatos (*Felis catus*) e cavalos (*Equus caballus*), esse último também utilizado como animal de trabalho, realizando atividades de tração, transporte de carga e pessoas.

5.4- Captura dos flebotomíneos

As capturas foram realizadas mensalmente nas propriedades, levando-se em consideração os aspectos ambientais para a possível presença de flebotomíneos, o primeiro local foi denominado como Ponto I, e o segundo local denominado Ponto II (Figura 3). Os flebotomíneos foram capturados com auxílio de armadilhas luminosas do tipo CDC (Centers for Diseases Control and Prevention) (Figura 4).

Foram instaladas duas armadilhas em cada ponto de coleta. As armadilhas eram ligadas às 18:00h e desligadas às 06:00h da manhã do dia seguinte, 12h de coletas por armadilha, 24 horas por ponto de captura, resultando em um total de 240 horas nos 5 meses de coleta.

5.5- Preparação dos flebotomíneos

Os flebotomíneos foram acondicionados e transportados de acordo com os protocolos técnicos seguidos pelo Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológicas em Diptera e Hemiptera (LIVEDIH) do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ (POP-LIVEDIH). A identificação das espécies foi realizada segundo metodologia proposta por Galati (2003) e as abreviações dos nomes dos gêneros e subgêneros por Marcondes (2007).



Figura 3: Locais de captura dos flebotomíneos (estrelas amarelas) na localidade Serrinha da Torre, município de Iúna, Espírito Santo. Fonte: Google Maps 2017 adaptada pelo autor.



Figura 4: Armadilha luminosa CDC utilizada na captura dos flebotomíneos. Fonte: Autor

5.5.1-Triagem

Após as coletas os insetos foram anestesiados e eutanasiados por resfriamento, e posteriormente foi realizada a etapa de triagem, com a finalidade de separar os flebotomíneos dos demais insetos. Após essa separação o material foi acondicionado em frascos do tipo Falcon de 15ml, previamente identificados, contendo uma solução de álcool 70 % com a finalidade de conservação do material até o processamento no LIVEDIH.

5.5.2- Processamento dos flebotomíneos

O procedimento para diafanização foi executado em capela de exaustão de gases QUIMIS[®], o material foi posteriormente montado entre lâmina e lâminula para posterior identificação. Com o auxílio de uma placa de seis poços de poliestireno SPL Life Sciences[®]

(Figura 5) e de estiletos para transferência dos flebotomíneos dos diferentes poços contendo as substâncias utilizadas, assim, o procedimento de diafanização das amostras foi feito nas seguintes etapas:

1ª Imersão dos flebotomíneos no poço da placa contendo hidróxido de potássio a 10% (KOH 10%) por 2 a 3 horas.

2ª Transferência dos flebotomíneos para o poço da placa contendo solução de ácido acético permanecendo aproximadamente por 20 minutos.

3ª Transferência dos flebotomíneos para o poço da placa contendo água tipo II permanecendo os mesmo por 20 minutos.

4ª Transferência dos flebotomíneos para o poço da placa contendo solução de Lactofenol permanecendo por um tempo mínimo de 24 horas.

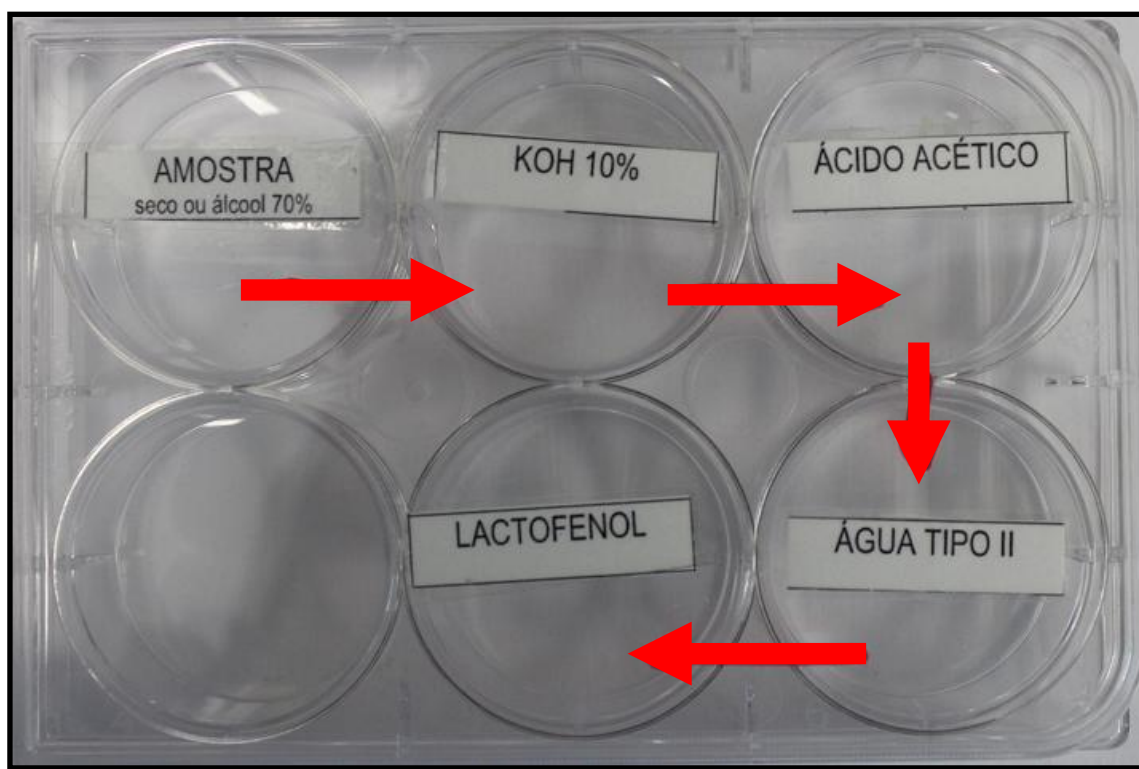


Figura 5: Placa acrílica de seis poços SPL Life Sciences® usada para realização do processamento dos flebotomíneos. Detalhe das setas indicando a sequência das passagens pelas soluções químicas. Fonte: Autor.

5.5.3- Montagem das lâminas

As montagens das lâminas foram executadas com auxílio de um microscópio estereoscópico modelo Stemi DV4, da marca Zeiss, esse procedimento realizou-se em capela de exaustão de gases da marca QUIMIS[®] (Figura 6). O processo de montagem consistiu de adicionar uma pequena gota de solução de Berlesse na lâmina de vidro, posicionar adequadamente o flebotomíneo e cobrir cuidadosamente com uma lamínula o exemplar a ser identificado. Os machos eram seccionados a cabeça com os segmentos antenais e palpais visíveis, o restante do corpo era mantido inteiro. As fêmeas foram seccionadas em três partes, cabeça, tórax e abdômen, e a cabeça posicionada ventralmente com o intuito de se observar o cibário, no tórax as asas eram mantidas abertas, enquanto o abdômen era virado e colocado na posição ventral para a observação das espermatecas.



Figura 6: Montagem das lâminas realizadas com auxílio de microscópio estereoscópico, procedimento realizado na capela de exaustão de gases. Fonte: Vilela

5.5.4- Identificação dos flebotomíneos

Etapa realizada com auxílio de microscópio óptico modelo Primo Star, marca ZEISS®, onde foram observados os caracteres morfológicos das espécies preconizados na chave dicotômica adotada por Galati (2003) e a abreviações dos gêneros e subgêneros proposta por Marcondes (2007) (Figura 7).



Figura 7: Identificação das lâminas dos exemplares de flebotomíneos em microscópio óptico. Fonte: Vilela



Figura 8: Imagens de microscopia óptica: estruturas utilizadas na identificação dos flebotomíneos: A- Genitália da fêmea, B- Tórax, C- Cabeça, D- Genitália do macho. Fonte: Autor

5.6- Dados do clima

Os dados climáticos tais como: temperatura, umidade relativa do ar e índice pluviométrico, referentes ao período de estudo, foram obtidos junto ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER).

5.7- Análise estatística

Para as análises dos dados utilizou-se a estatística descritiva, sendo a diversidade entre as espécies de flebotomíneos coletados calculada através do Índice de Diversidade de Simpson. Esse índice mede a probabilidade de dois indivíduos retirados aleatoriamente de uma comunidade pertencerem a uma mesma espécie, sendo calculado pela fórmula:

$$D = \sum_{i=1}^S \left[\frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)} \right]$$

Onde: n_i é o número de indivíduos na espécie i , e N é o número total de indivíduos.

6- RESULTADOS

Os valores médios de temperatura variaram entre 25°C e 30°C, a umidade relativa do ar média entre 70 e 75%, e o índice de pluviométrico entre 0 e 9 mm (Figura 9).

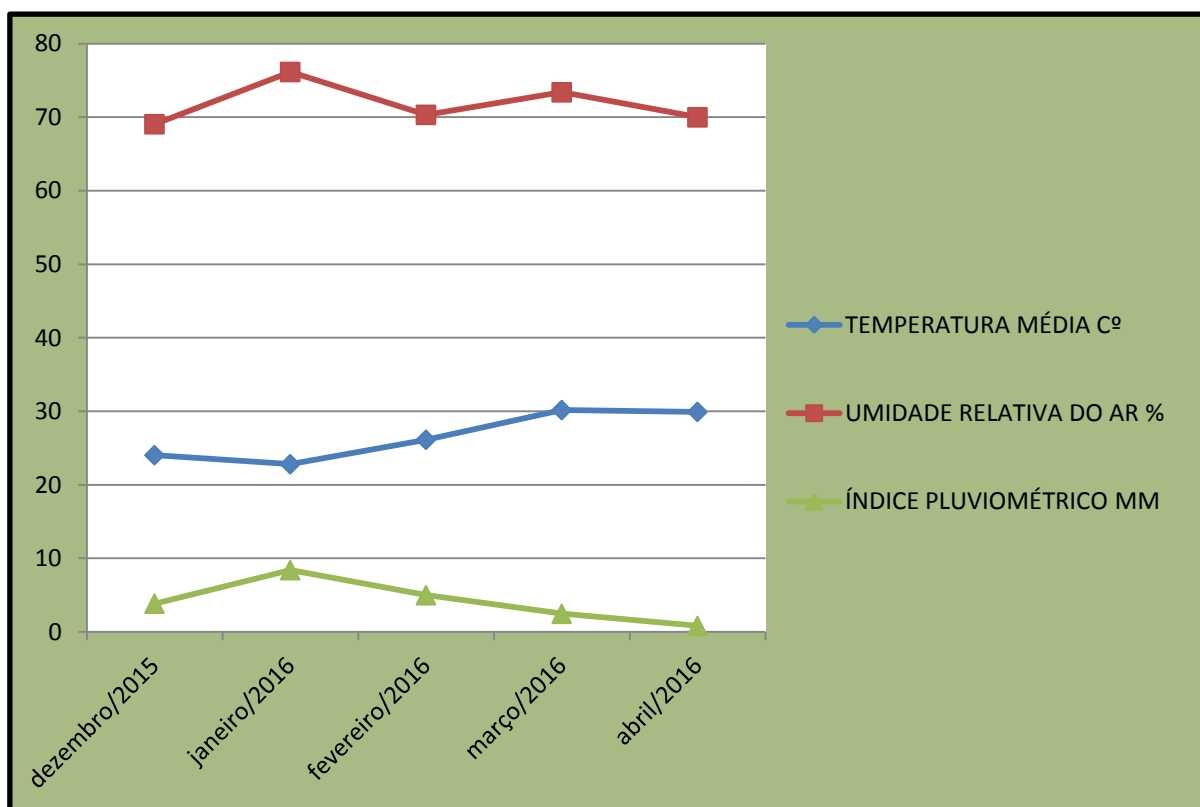


Figura 9: Dados meteorológicos do município de Iúna, ES. Média mensal da temperatura, umidade relativa do ar e índice pluviométrico no período entre os meses de dezembro de 2015 e abril de 2016.

Os espécimes coletados perfizeram o total de 879 flebotomíneos, sendo 513 machos e 366 fêmeas, a razão macho e fêmea foi 1,4. O resultado da captura com as armadilhas luminosas CDC foi de 0,91 flebotomíneos/hora/armadilha. Foram coletados flebotomíneos pertencentes a seis gêneros e oito espécies. Dentre as espécies coletadas *Migonemyia migonei* foi a que apresentou a maior prevalência no período, com o número total de 744 espécimes (84,65%), sendo 464 machos e 280 fêmeas (62,36% e 37,63%, respectivamente). *Nyssomyia intermedia* com 96 exemplares (10,92%), 48 machos (50%) e 48 fêmeas (50%). *Pintomyia fischeri* foi a terceira espécie mais coletada no período, com 29 espécimes (3,3%), sendo

somente um macho (3,44%) e 28 fêmeas (96,56%). As demais espécies coletadas apresentaram baixa prevalência no período onde *Brumphyomyia cunhai* teve cinco exemplares (0,57%), e todas fêmeas; *Evandromyia (Barretomyia) Série cortelezzii* espécie *sallei* ou *cortelezzii* (fêmeas indistinguíveis) dois espécimes fêmeas (0,23%). *Evandromyia (Bar.) Série tupymambai* (espécie não diagnosticada fêmeas indistinguíveis), *Evandromyia lenti* e *Trichopygomyia longispina* tiveram um espécime fêmea (0,11%) de cada espécie capturados. As espécies *Mg. migonei*, *Ny.intermedia*, *Pi. fischeri* e *Ev. (Bar.) sallesi/ cortelezzii* ocorreram nos dois pontos de captura, enquanto, *Ev. (Bar.) Série tupymambai*, ocorreram no Ponto de Coleta I e *B. cunhai*, *Ev. lenti*, *Ty. longispina* no Ponto de Coleta II (Tabela 2; Figura 10).

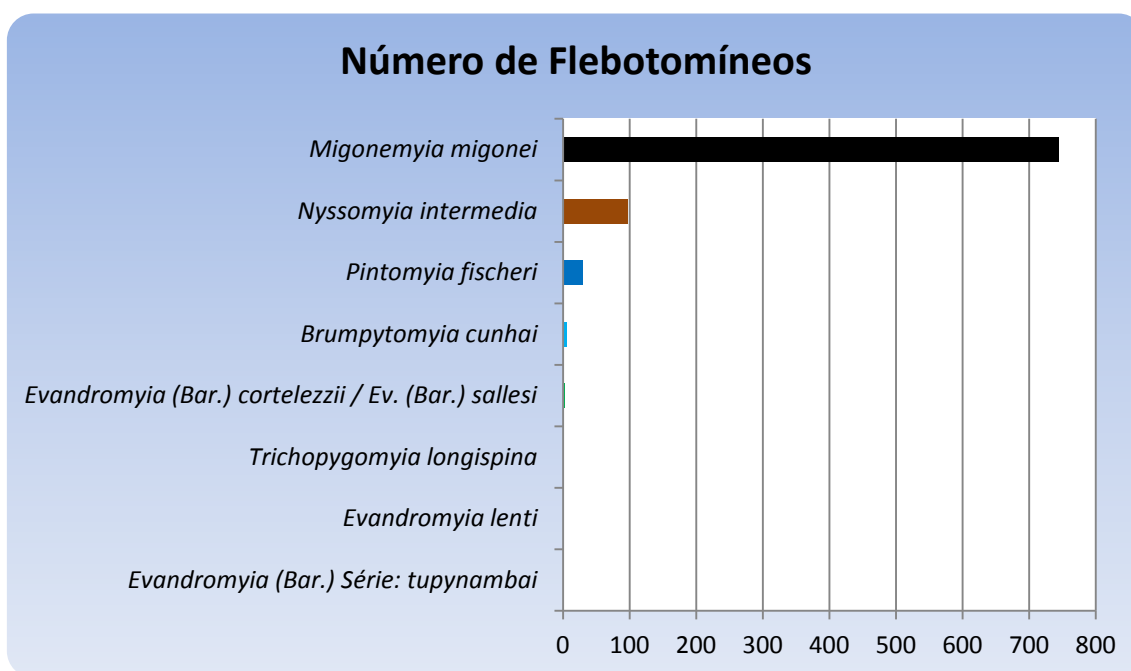


Figura 10: Número de espécimes de flebotomíneos coletados entre os meses de dezembro de 2015 a abril de 2016 na localidade Serrinha da Torre, Iúna, ES.

O Ponto de coleta I apresentou maior quantitativo de flebotomíneos capturados, totalizando 518 espécimes, divididos em 287 machos (55,40%) e 231 fêmeas (44,60%). A espécie *Mg. migonei* foi responsável por 450 dos flebotomíneos representando 86,88% do total de flebotomíneos coletados, sendo 260 machos e 190 fêmeas. A segunda espécie mais

abundante encontrada foi a *Ny. intermedia* sendo capturados 56 exemplares representando 10,81% da amostra sendo 27 machos e 29 fêmeas. A terceira espécie encontrada foi a *Pi. fischeri* com um total de 10 exemplares fêmeas, correspondendo a 1,93% do total de flebotomos capturados. *Ev. (Bar.) Série tupyumbai* e *Ev. (Bar.) cortezzii / sallesi* apresentaram um exemplar fêmea (0,19%) de cada espécie (Figura 11; Tabela 2).

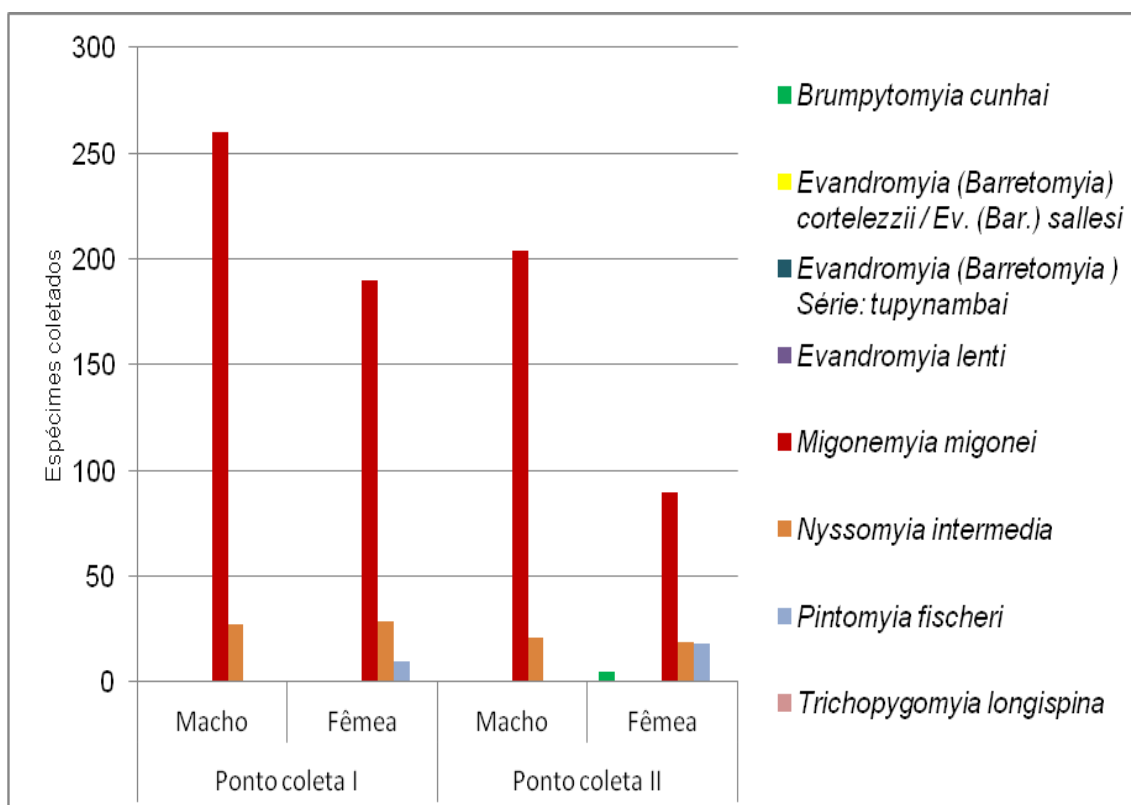


Figura 11: Número de espécimes de flebotomíneos coletados entre os meses de dezembro de 2015 a abril de 2016 em duas propriedades na localidade Serrinha da Torre, Iúna, ES.

Tabela 2: Resultado das coletas realizadas na localidade Serrinha da Torre em Iúna, Espírito Santo, frequência relativa e absoluta por local de captura e total geral.

ESPÉCIES	NÚMERO DE FLEBOTOMÍNEOS								
	PONTO I			PONTO II			♂—♀	TOTAL%	GERAL
	♂—♀	%	TOTAL	♂—♀	%	TOTAL			
<i>Brumphyomyia cunhai</i>	—	—	—	0—5	1,38	5	0—5	0,57	5
<i>Evandromyia (Barretomyia) cortelezii / Ev. (Bar.) sallesi</i>	0—1	0,19	1	0—1	0,28	1	0—2	0,23	2
<i>Evandromyia (Barretomyia) Série: tupyumbai</i>	0—1	0,19	1	—	—	—	0—1	0,11	1
<i>Evandromyia lenti</i>	—	—	—	0—1	0,28	1	0—1	0,11	1
<i>Migonemyia migonei</i>	260—190	86,88	450	204—90	81,44	294	464—280	84,65	744
<i>Nyssomyia intermedia</i>	27—29	10,81	56	21—19	11,08	40	48—48	10,92	96
<i>Pintomyia fischeri</i>	0—10	1,93	10	1—18	5,26	19	1—28	3,3	29
<i>Trichopygomyia longispina</i>	—	—	—	0—1	0,28	1	0—1	0,11	1
TOTAL	287—231	100%	518	226—135	100%	361	513—366	100%	879
Razão macho e fêmea			1,24			1,67			1,40
Flebotomíneos/hora/armadilha			2,16			1,50			0,91
Índice de Dominância			0,76			0,68			0,73
Índice de Diversidade de Simpson			0,24			0,32			0,27

O Ponto de coleta II registrou o encontro de 361 flebotomíneos, sendo 226 machos (59,94%) e 135 fêmeas (40,06%). A espécie *Mg. migonei* assim como no Ponto de coleta I, foi a mais prevalente com um total de 294 flebotomíneos (81,44%) sendo 204 machos (69,38%) e 90 fêmeas (30,62%). Em seguida, *Ny. intermedia* apresentando 40 espécimes capturados (11,08%) sendo 21 machos (52,5%) e 19 fêmeas (47,5%). *Pi. fischeri* foi a terceira espécie de maior prevalência, 19 espécimes (5,26%), 1 macho (5,26%) e 18 fêmeas (94,74%). *Br.cunhai*, não apresentou nenhum exemplar macho, apenas cinco fêmeas (100%). *Ev. lenti* (0,28%), *Ev. (Bar.) sallesi/cortelezzii* (0,28%), e *Ty. longispina* (0,28%), apresentaram um indivíduo fêmea de cada espécie (Figura 11; Tabela 2).

As espécies de flebotomíneos consideradas vetores de LTA somaram 98,86% dos espécimes coletados no peridomicílio em Serrinha da Torre (Figura 12).

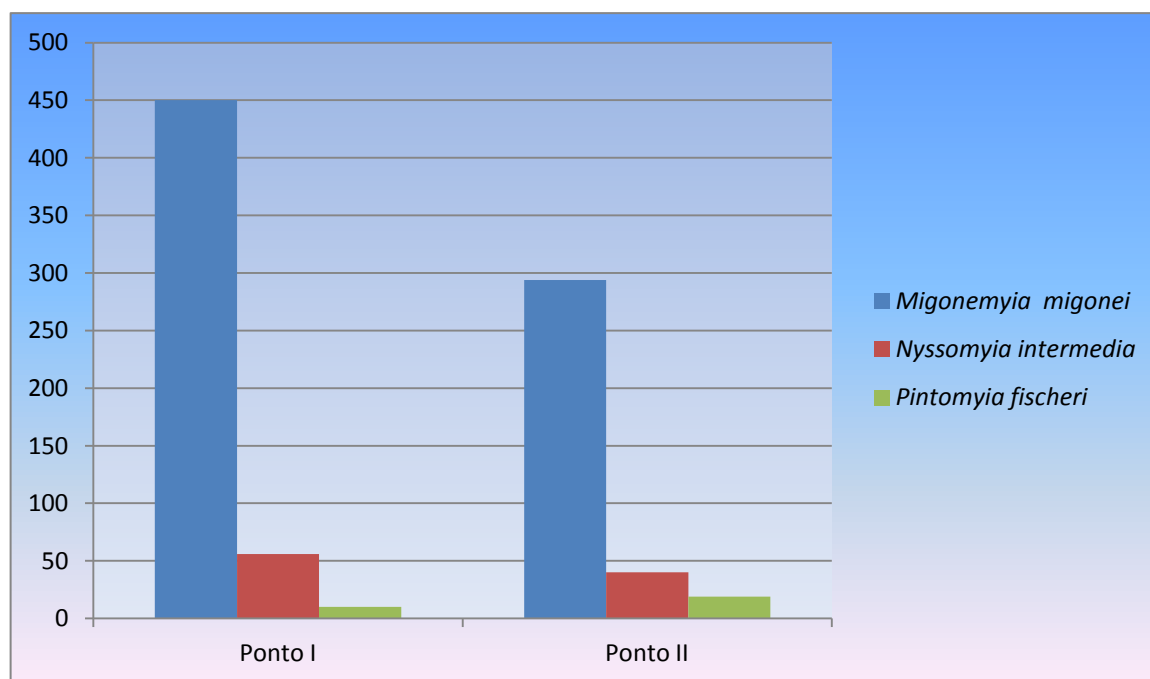


Figura 12: Espécies de flebotomíneos de interesse médico por local de coleta na localidade Serrinha da Torre, Iúna, ES.

7- DISCUSSÃO

O controle da LTA continua como um desafio a ser enfrentado pelos profissionais de saúde em diferentes países, e no Brasil, esse problema revela dificuldades em escala de maior gravidade pela ocorrência de diversidade de espécies de flebotomíneos vetores, associadas com diferentes espécies de parasitas e reservatórios naturais (Lainson & Shaw, 2005).

Os locais de ocorrência da LTA são influenciados por fatores geográficos e climáticos pouco conhecidos que determinam a distribuição de diferentes flebotomíneos vetores, parasitas e reservatórios (Ferreira et al., 2001). A complexidade da interação entre os parasitas, vetores e hospedeiros nos vários ciclos de transmissão contribui para um controle não eficiente da doença. As dificuldades de estrutura de saúde, principalmente nas regiões socioeconomicamente carentes contribuem para o agravamento do processo de expansão da LTA, e resulta em última análise, no aumento do número de casos humanos. Por outro lado, os aspectos socioambientais também se revestem de relevância, uma vez que em algumas áreas a ocupação desordenada do ambiente amplifica a situação. Em áreas endêmicas a taxa de infecção natural dos vetores, assim como a identificação correta das espécies de *Leishmania* nesses dípteros, são de grande importância na epidemiologia da doença (Pirajá & Lucheis, 2014).

A fauna de flebotomíneos registrada no Estado do Espírito Santo até o momento registra aproximadamente 59 espécies (Meneguzzi et al., 2016).

No período de estudo, os valores médios de temperatura e umidade do ar registrados em Iúna, mantiveram-se dentro da faixa de ocorrência da maioria das espécies de flebotomíneos neotropicais (Brazil & Brazil, 2003).

Todas as espécies de interesse entomológico médico coletadas nesse estudo já haviam sido relatadas no estado, sendo que do total das oito espécies encontradas, três delas:

Ny. intermedia, *Mg. migonei* e *Pi. fischeri* são consideradas espécies transmissoras da *Leishmania (V.) braziliensis*, principal agente causador da LTA (Brasil, 2007; Rangel & Lainson, 2009). Estas três foram coletadas nas duas áreas de estudo. Entretanto observou-se que entre as três, *Pi. fischeri* teve um maior número de espécimes coletados no ponto II. (Figura 12).

A espécie *Ny. intermedia* é a principal espécie relacionada com a transmissão da doença no sudeste do Brasil (Rangel et al., 1986; Rocha et al., 2010a; Meneguzzi et al., 2016), devido a sua alta prevalência, alguns autores a apontam como a espécie mais envolvida na transmissão em ambientes modificados no estado do Espírito Santo (Virgens et al., 2008; Virgens et al., 2015), sendo também a mais representativa em ambiente domiciliar no município de Viana (Falqueto, 1997).

No presente estudo, *Mg. migonei* foi a espécie que apresentou maior frequência relativa, influenciando diretamente o baixo índice de diversidade de Simpson. Dada a sua alta prevalência nessa região de estudo, é possível sugerir que em Serrinha da Torre, *Mg. migonei* possa atuar como vetor primário da LTA, em virtude de sua adaptação aos ambientes modificados pela atividade agrícola e pelo seu notável grau de antropofilia, como assinalado em diferentes estudos (Rangel & Lainson, 2003; Moya, 2015). Ferreira et al. (2013) no município de Pancas, também no estado do Espírito Santo, realizaram coletas peridomiciliares em três localidades e encontraram taxas de prevalência no período de 3,64%, 26,56% e 54,10% para *Mg. migonei*, essa grande variação de ocorrência da espécie dentro de uma mesma região, nos leva a sugerir que possa haver outros fatores inerentes, em nível mais específico nos locais das coletas, que poderiam interferir na sua ocorrência. Ainda neste estudo, as duas maiores frequências de ocorrência de *Mg. migonei*, ou seja 26,56% e 54,10%, foram em localidades nas quais a presença da espécie *Lu. longipalpis* não se confirmou, a menor frequência de *Mg. migonei*, ou seja 3,64%, ocorreu quando a *Lu. longipalpis* apresentou

a prevalência de 87%, com esses indicadores, dessa forma, é possível sugerir que a presença da *Lu. longipalpis* possa influenciar na ocorrência de *Mg. migonei*, bem como também nas outras espécies de flebotomíneos.

Até o presente momento, um caso autóctone de leishmaniose visceral americana em humanos foi notificado no município de Iúna no ano de 2009, não sendo ainda registrada a presença do principal vetor nas Américas, *Lu. longipalpis*. Assim, diante dos registros entomológicos de *Mg. migonei* no presente estudo, acreditamos que seja fundamental o desenvolvimento de ações de vigilância epidemiológica que resultem no monitoramento da espécie. Estudos realizados em La Banda, Argentina, sugerem que *Mg. migonei* seja um possível vetor na área, em virtude dos casos humanos e caninos da doença, sem a presença de *Lu. longipalpis* (Salomón et al., 2010). Em São Viscente Férrer, Pernambuco, área endêmica para LVA, a espécie foi registrada em áreas do peridomicílio e duas fêmeas de 50 analisadas por ensaio de PCR multiplex, foram encontradas infectadas naturalmente por *L. infantum*, sugerindo que *Mg. migonei* possa ser o vetor do parasita na área, uma vez que *Lu. longipalpis* não foi coletado (Carvalho et al., 2010).

Em nosso estudo, a espécie *Pi. fischeri*, contrariamente ao observado em áreas de cafezais no Estado de Minas Gerais por Alexander et al. (2002) e em Cariacica, Estado do Espírito Santo, onde esta foi a segunda espécie mais abundante (Farias, 2014), tiveram poucos espécimes coletados, fato que não possibilitou uma análise mais detalhada. Entretanto, a espécie já foi reconhecida por apresentar hábitos antropofílicos e acrodendrófilos, (Aguiar et al., 1985) e, também, por ser endófila e eclética quanto ao local de hematofagia, sugerindo que *Pi. fischeri* possa atuar como coadjuvante na transmissão do parasita em ciclo enzoótico, em virtude de sua frequência no ambiente florestal (Aguiar et al., 1996, 2014). Foi considerada vetor secundário de *L. (V.) braziliensis*, no Estado do Rio Grande do Sul, reforçando sua importância epidemiológica em relação à LTA (Pita-Pereira et al., 2011).

Considerando a frequência relativa das espécies vetores de LTA na localidade Serrinha da Torre, a mesma merece ser acompanhada e monitorada com extrema atenção pelos órgãos públicos de saúde, uma vez que pode se configurar como uma potencial área de risco para a ocorrência de casos da doença.

Diante dos impactos causados pela LTA, objetiva-se reduzir a morbidade do agravo, as deformidades e os óbitos nos pacientes. Mais recursos e incentivos devem ser destinados para melhorar o diagnóstico e o tratamento dos doentes, para o sistema de vigilância e monitoramento epidemiológico, bem como para ações de educação em saúde e mobilização social. É importante que se reduza o contato dos hospedeiros susceptíveis aos vetores assim como o aumento das pesquisas visando o melhor entendimento sobre as variáveis que influenciam os diferentes ciclos da doença. O aumento do conhecimento favorece as decisões nas ações de saúde, medidas profiláticas podem ser adotadas diminuindo os custos com os serviços de atenção à saúde.

8- CONCLUSÕES

- Foram confirmadas a presença de três espécies vetores de leishmanioses dermatópicas na região: *Mg. migonei*, *Ny. intermedia* e *Pi. fischeri*, sendo essas responsáveis por 98% dos flebotomíneos coletados.

- O predomínio de *Mg. migonei* na localidade de Serrinha da Torre, no período estudado, sugere que essa espécie possa atuar de forma primária na transmissão como vetor de LTA na região.

9- PERSPECTIVAS

- O aumento dos números de coletas de flebotomíneos em um período maior de meses, ou até anos, poderiam reduzir eventuais variações sazonais na distribuição das espécies da localidade estudada.

- A ampliação dos pontos de coletas de flebotomíneos no município, e neste contexto a inserção de outras localidades no estudo, outras formas de coletas (busca direta com capturadores manuais) e ambientes de captura (abrigos de animais, mata, cafezal), assim como a ampliação do período de coletas, certamente contribuiria para a obtenção de resultados mais consistentes sobre a composição da fauna local de flebotomíneos em Iúna.

- Estudos relacionados à infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania spp.*, bem como sobre as fontes alimentares desses insetos, seriam de grande valia no monitoramento e avaliação dos potenciais riscos de transmissão de LTA na região.

10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D, 2016. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *Plos Neglected Tropical Diseases*| DOI:10.1371/journal.pntd.0004349.

Aguiar GM, Schuback PA, Vilela ML, Azevedo ACR 1985. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro. II – Distribuição vertical (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 80:187-194.

Aguiar GM, Medeiros WM. Distribuição Regional e Hábitats das Espécies de Flebotomíneos do Brasil. *In: EF Rangel, R Lainson, Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro 2003: 207-255.

Aguiar GM, Medeiros WM, De Marco TS, Santos SC, Gambardella S 1996. Ecologia dos flebotomíneos da Serra do Mar, Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. I. A fauna flebotomínica e prevalência pelo local e tipo de captura (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Cad Saude Publica* 12:195-206.

Aguiar GM, Azevedo ACR, Medeiros WM, Alves JRC, Rendeiro V 2014. Aspects of the ecology of phlebotomines (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the area of cutaneous leishmaniasis occurrence, municipality of Angra dos Reis, coast of Rio de Janeiro state, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 56(2):143-149, doi: 10.1590/S0036-46652014000200010.

Alencar RB. Emergência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em chão de floresta de terra firme na Amazônia Central do Brasil: uso de um modelo modificado de armadilha de emergência. *Acta Amazonica Manaus* June 2007; v.37, nº 2.

Alexander B, Oliveira EB, Haigh E, Almeida LL. Transmission of *Leishmania* in coffee plantations of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 627- 630, 2002.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. Plos One 2012, 7(5): e35671.doi:10.1371/journal.pone.0035671.

Barreto MP. Observações sobre a biologia do *Phlebotomus whitmani* Antunes e Coutinho, 1939 (Diptera, Psychodidae) em condições experimentais. Papéis Avulsos Zool 1941, v.1: 87-100.

Barros GC, Sessa PA, Mattos EA de, Carias VRD, Mayrink W, Alencar JTA de, Falqueto A, Jesus AC de. Foco de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Viana e Cariacica, Estado do Espírito Santo, Brasil. Rev. Saúde Pública. São Paulo 1985, 19: 146-53.

Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ed. Ministério da Saúde, Brasília 2003.

Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª ed. Ed. Ministério da Saúde, Brasília 2007.

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

Carvalho MR de, Valença HF, Silva FJ da, Pita-Pereira D de, Pereira T de A, Britto C, Brazil RP, Brandão Filho SP. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. Acta Tropica 116, 2010, 108–110.

Dedet JP, Vignes R, Rangel EF. Morfologia e Taxonomia: Grupo Cipa. In: EF Rangel, R Lainson. Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro 2003: 177-184.

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

Falqueto A, Sessa PA, Ferreira AL, Vieira VP, Santos CB, Varejão JBM, Cupolillo E, Porrozzi R, Carvalho-Paes LE, Grimaldi Jr G. Epidemiological and Clinical Features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2003, 98(8): 1003-1010.

Falqueto A. Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no estado do Espírito Santo. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 1997, 30(6): 531-532.

Farias PCG. Análise de fatores geográficos e climáticos relacionados à distribuição de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) em área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana no estado do Espírito Santo, Brasil. [Dissertação de Mestrado] Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, 2014.

Feliciangeli MD. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. Medical and Veterinary Entomology 2004, 18: 71-80.

Ferreira AL, Falqueto A, Grimaldi Jr G, Peixoto AA, Pinto I de S. Sand Fly Fauna in Southeastern Brazil. Ecological and Epidemiological Aspects of the Sand Fly (Diptera, Psychodidae) Fauna of the National Monument of Pontões Capixabas, State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. Entomological Society of America. 2013, 50(6):1215-1223.

Ferreira AL, Sessa, PA, Varejão JBM, Falqueto A. Distribution of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) at Different Altitudes in Endemic Region of American Cutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2001,96(8): 1061-1067.

Galati EAB, Nunes VLB, Boggiani PC, Dorval MEC, Cristaldo G, Rocha HC, Oshiro ET, Andrade RMG, Naufel Gl. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in caves of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. Revista Brasileira de Entomologia 2003; (47) 2: 283-296.

Galati EAB. Morfologia e Taxonomia. *In*: EF Rangel, R Lainson. Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro 2003; 23-175.

Galati EAB. 2016. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): Classificação, morfologia, terminologia e identificação de Adultos, Apostila – Disciplina PSP5127-1 Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. Escola de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, www.fsp.usp.br/~egalati.

Gontijo B, Carvalho M de LR de. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2003; 36(1): 71-80.

Guimarães VCFV, Pruzinova K, Sadlova J, Volfova V, Myskova J, Brandão Filho SP, Volf P. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. *Parasites & Vectors* 2016, 9:159. DOI 10.1186/s13071-016-1444-2

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-. Acessado em 19 de janeiro de 2017. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=320300&search=espírito-santo|iuna|infograficos:-informacoes-completas>.

Iúna/ES. História do Município. Acessado em 14 de março de 2017. Disponível em: <http://www.iuna.es.gov.br/pagina/localizacao.html>.

Lainson R, Shaw JJ. New World leishmaniasis - the Neotropical *Leishmania* species. *In*: FE Cox, JP Kreier, D Wakelin. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9th ed. London 1998; 241- 66.

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

Leite ACR, William SP. The First Instar Larva of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotomidae) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1997; 92(2): 197-203.

Lewis DF. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). Bulletin of the British Museum (Natural History) - Entomology, London 1982; (45) 2: 121-209.

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários- DFIP-SDA – CPV. Nota Técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA

Marcondes CB. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. Entomol News 2007, 118: 351–356.

Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. Parasitology 1999; (119) 3: 237-246.

Meneguzzi VC, Santos CB dos, Leite GR, Fux B, Falqueto A. Environmental Niche Modelling of Phlebotomine Sand Flies and Cutaneous Leishmaniasis Identifies *Lutzomyia intermedia* as the Main Vector Species in Southeastern Brazil. Plos One 2016; 1-16.

Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos Confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Espírito Santo. Acessado em 19 de janeiro de 2017. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltaes.def>.

Missawa NA, Lorosa ES, Dias ES. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2008, 41(4): 365-368.

Moya SL, Giuliana MG, Acosta MM, Salomón OD, Liotta DJ. First description of *Migonemyia migonei* (França) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Psychodidae: Phlebotominae) natural infected by *Leishmania infantum* in Argentina- Acta Tropica 152 (2015) 181–184.

Organização Pan-Americana da Saúde - Organização Mundial da Saúde- OPAS-OMS. Informe Epidemiológico das Américas. Informe Leishmanioses nº4, julho 2016.

Pan American Health Organization- PAHO. Distribution of *Leishmania* species in the Americas, 2009. Acessado em 24 de julho de 2017. Disponível em: http://new.paho.org/hq/images/stories/AD/HSD/CD/Neglected_diseases/distribucion_leishmania_americas_2009_eng.jpg.

Pan American Health Organization- PAHO. Visceral Leishmaniasis. Atualizada em 31 de março de 2014a, acesso em 27 de outubro 2016. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420&Itemid=39347&lang=en.

Pan American Health Organization- PAHO. Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis. Atualizado em 17 de maio de 2014b, acessada 02 de abril de 2017. Disponível em: http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417&Itemid=39345&lang=en.

Pan American Health Organization- PAHO. General Information: Leishmaniasis. Atualizada 17 de março de 2017, acesso em 03 de abril de 2017. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417&Itemid=40250&lang=en.

Pinto I de S, Ferreira AL, Valim V, Carvalho F dos S, Silva GM da, Falcão AL, Dietze R, Falqueto A. Sand fly vectors (Diptera, Psychodidae) of American visceral leishmaniasis areas in the Atlantic Forest, State of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Journal of Vector Ecology* 2012; (37) 1: 90- 96.

Pirajá GV, Lucheis SB. A Vigilância Epidemiológica de Flebotomíneos no Planejamento de Ações de Controle nas Leishmanioses. *Vet. e Zootec.* 2014; 21(4): 503-515.

Pires SP de C. Investigação da expansão geográfica da leishmaniose visceral americana por meio de inquérito de infecção canina em áreas receptivas no estado do Espírito Santo, Brasil. [Dissertação de Mestrado]: Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde Vitória, 2015.

Pita-Pereira D de; Souza GD; Pereira T de A, Zwetsch A, Britto C, Rangel EF. *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American Cutaneous Leishmaniasis: Detection of natural infection by *Leishmania (Viannia)* DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay D.d. Acta Tropica 120 (2011) 273– 275.

Portal da Saúde - SUS. Descrição da Doença. Criado em 27 de março de 2014, acesso em 27 de abril de 2017. Disponível em:

<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/723-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-tegumentar-americana-lta/11324-descricao-da-doenca>.

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

Rangel EF, Lainson R. Ecologia das Leishmanioses. *In: Flebotomíneos do Brasil*. Ed. Fiocruz 2003; 291-336.

Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Azevedo ACR, Barbosa AF, Andrade CA. Flebótomos de Vargem Grande, Foco de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1986; 81: 347- 349.

Rocha L de S, Santos CB dos, Falqueto A, Grimaldi Jr G, Cupolillo E. Molecular biological identification of monoxenous trypanosomatids and *Leishmania* from antropophilic sand flies (Diptera: Psychodidae) in Southeast Brazil. Parasitology Research 2010a; 107: 465-468.

Rocha LS, Falqueto A, Santos CB dos, Ferreira AL, Graça GC da, Grimaldi Jr G, Cupolillo E. Survey of natural infection by *Leishmania* in sandfly species collected in southeastern Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 104, 2010b; 461–466.

Salomón OD, Quintana MG, Bezzi G, Morán ML, Betbeder E, Valdéz DV. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. Acta Trop. 2010 Jan;113(1):84-7. doi: 10.1016

Sessa PA, Barros GC, Mattos EA de, Carias VRD, Alencar JTA de, Delmaestro D, Coelho CC, Falqueto A. Distribuição Geográfica da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Espírito Santo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1985; 18(4): 237- 241.

Sherlock IA. Importância Médico-Veterinária. *In*: EF Rangel, R Lainson. *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz. Rio de Janeiro 2003; 15-22.

Shimabukuro PHF et al. Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia* 2011; 51(27).

Silveira FT, Corbett CEP. *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937: nativa ou introduzida? Uma breve revisão. *Rev Pan-Amaz Saude* 2010; 1(2):143-147.

SINAN- Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Criado em 27 de março de 2014. Acesso em 19 de janeiro de 2017. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados>.

TDR- Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Acesso em: 21 de julho de 2017. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/>.

Virgens TM das, Santos CB dos, Pinto I de S, Silva KS da, Leal FC, Falqueto A. Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) in an American tegumentary leishmaniasis transmission area in northern Espírito Santo State, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro 2008; 24(12): 2969-2978.

Virgens TM das, Rezende HR, Pinto I de S, Falqueto A. Sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) from the Goytacazes National Forest and surrounding areas of southeastern Brazil. *Journal of Vector Ecology* 2015; (40)1.

World Health Organization- WHO. Leishmaniasis. Acesso em: 27 de abril de 2017.
Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.

Young DC, Duncan MA. Guide to the Identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera, Psychodidae).
Mem Amer Entomol Inst 1994; 54: 1-881.