

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETICIA CRISTINA MORELLI

SAZONALIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PHLEBOTOMINAE) E
DETECÇÃO DE *Leishmania* spp. (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE)
EM ESPÉCIES VETORAS NO MUNICÍPIO DE ITAPERUÇU, PARANÁ

CURITIBA

2020

LETICIA CRISTINA MORELLI

SAZONALIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PHLEBOTOMINAE) E
DETECÇÃO DE *Leishmania* spp (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE)
EM ESPÉCIES VETORES NO MUNICÍPIO DE ITAPERUÇU, PARANÁ

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr Andrey José de Andrade.

Coorientadora: Profa. Dra Magda Clara Vieira da Costa-Ribeiro.

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Morelli, Leticia Cristina

Sazonalidade de flebotomíneos (Diptera: Phlebotominae) e detecção de *Leishmania* spp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em espécies vetores no município de Itaperuçu, Paraná. / Leticia Cristina Morelli. – Curitiba, 2020.

115 p.: il.

Orientador: Andrey José de Andrade.

Coorientadora: Magda Clara Vieira da Costa-Ribeiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Flebotomíneo. 2. Leishmaniose cutânea. 3. Variação (Biologia). I. Título. II. Andrade, Andrey José de, 1978-. III. Costa-Ribeiro, Magda Clara Vieira da, 1969-. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 595.772

TERMO DE APROVAÇÃO

LETICIA CRISTINA MORELLI

No dia vinte e seis de agosto de dois mil e vinte às 14:00 horas, na sala Google Meets, Defesa Remota, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestrandia **LETICIA CRISTINA MORELLI**, intitulada: **SAZONALIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PHLEBOTOMINAE) E DETECÇÃO DE *Leishmania* spp. (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) EM ESPÉCIES VETORAS NO MUNICÍPIO DE ITAPERUÇU, PARANÁ**, sob orientação do Prof. Dr. ANDREY JOSE DE ANDRADE. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: ANDREY JOSE DE ANDRADE (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), RAFAELLA ALBUQUERQUE E SILVA (MINISTÉRIO DA SAÚDE), MARA CRISTINA PINTO (UNESP), DANIELA DE PITA PEREIRA (IOC - FIOCRUZ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, ANDREY JOSE DE ANDRADE, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

Assinatura Eletrônica 27/08/2020 20:12:44.0

Prof. Dr. Andrey José de Andrade

Orientador – Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná.

Assinatura Eletrônica 30/08/2020 11:51:01.0

Dra. Mara Cristina Pinto

Membro Titular – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (Campus Araraquara).

Assinatura Eletrônica 29/08/2020 15:06:16.0

Dra. Rafaella Albuquerque e Silva

Membro Titular – Programa de Vigilância e Controle das Leishmanioses, Ministério da Saúde do Brasil.

Assinatura Eletrônica 02/09/2020 08:58:00.0

Dra. Daniela de Pita Pereira

Membro Titular – Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz/Rio de Janeiro)

Curitiba, 26 de agosto de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me abençoar e em nenhum momento de minha vida me abandonar, pelas oportunidades e pelas pessoas que ele coloca em minha vida, e por todo o seu amor.

Agradeço aos meus pais, Elaine Cristina A. B. Reis e Sergio Morelli, pelo apoio e incentivo, por todo o esforço que desde muito pequena, fizeram para que eu pudesse estudar e chegar onde estou. Por todo amor e carinho que sempre fizeram transbordar em nossas vidas e por nunca me deixarem desistir.

Agradeço também a meus irmãos, Vinicius Morelli, o mais velho que sempre me incentivou e demonstrou sua admiração e amor por mim; a Stephany S. Morelli minha irmã do meio que sempre me cobre de amor e faz com que meus dias sejam mais felizes mesmo que a distância e a minha pequena Louyse S. Morelli, minha caçula, que mesmo sem entender ainda faz com que eu entenda que o amor não se divide e apenas se multiplica.

Agradeço ao J. Miguel Reis esposo de minha mãe, que como um pai ama e se preocupa sempre comigo.

Agradeço também a Gisele S. Morelli esposa de meu pai, por todo incentivo e carinho que tem por mim.

Agradeço ao meu amor Guilherme Selonk que aturou todas as minhas crises, que me incentivou desde sempre, que esteve ao meu lado todos os dias e que vai estar do meu lado a cada nova conquista, assim como faz hoje. Nosso futuro nos espera e a cada novo passo que damos juntos sendo incentivados um pelo outro faz com que ele fique ainda mais lindo.

Agradeço à todos os meus familiares pelo incentivo e torcida para que eu alcançasse o sucesso, em principal minha Avó Antônia e minha Tia Sandra.

Carolina Toledo, gratidão por ter você como minha Soror que com seu amor e carinho nunca desistiu de mim, mesmo eu não tendo tempo para nossos cafés, obrigada por todos os abraços e por todas as vezes que me animou com seu jeito impar de ser.

Tenho muita gratidão pela pessoa responsável em florescer em mim o amor pela parasitologia, com sua dedicação e entusiasmo únicos, obrigada Prof Lúcia Amorim, por me acompanhar e me impulsionar, por dar sua palavra e indicação para que eu fizesse o mestrado, obrigada por acreditar em mim.

Gratidão ao professor Andrey José Andrade que com uma enorme paciência me ensinou e me aceitou mesmo eu não tendo disponibilidades de horários por trabalhar; prof. muito obrigada por ter sido tão atencioso e por todo conhecimento transmitido, obrigada por sempre prezar pelo bem estar no laboratório e por demonstrar seu amor pela entomologia de modo a contagiar a todos.

Tenho muito a agradecer a Professora Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro, que não desistiu de mim mesmo quando tudo parecia dar errado, que me incentivou a continuar e que me ensinou muito sobre Biologia Molecular, e sobre se manter perseverante mesmo quando as bandas não aparecem, obrigada prof.

Agradeço aos meus amigos de laboratório Irineu Romero uma pessoa única e cheia de luz que sabe transmitir calma e aconchego para todos, obrigada Mi por todas as palavras e por tantas vezes que você me fez rir. Agradeço também a esse mini gênio Juliana Miranda que além da sua amizade compartilhou seu conhecimento tantas vezes, além de ser o mestre do mal mais divertido do mundo. Gratidão a super Silvia Jaqueline que como eu trabalhava duro pra conseguir os resultados das reações, obrigada por me ouvir sempre e por dividir comigo suas alegrias e suas angustias. Muita gratidão a Thayane Magalhães que chegou por último, mas que trasbordando bom humor e um carinho sarcástico ganhou minha amizade para sempre.

Gratidão ao colega de mestrado e amigo Salvador P. Chaves-Júnior, que contribuiu com a formulação dos mapas para a finalização deste trabalho, além de sempre transmitir paz e tranquilidade com sua presença no laboratório.

Gostaria de agradecer aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Parasitologia Molecular da UFPR envolvidos diretamente ao trabalho com os flebotomíneos, Leticia Kochi, Beatriz Maioli, Caroline Miachiro e Gustavo March, obrigada por toda a dedicação e atenção que tiveram comigo e com nosso trabalho, sem vocês não seria possível realizar essa pesquisa.

Agradeço também aos alunos iniciação científica do laboratório de parasitologia molecular da UFPR, Marcos Napoleão, Luani Klutchcouski e João Luiz M. Pietsch que sempre me ajudaram e esclareciam minhas dúvidas com muito bom grado, gratidão.

Gratidão a Dra. Daniela Pita Pereira (Fiocruz/IOC) e sua equipe, que gentilmente contribuiu com toda a parte de biologia molecular, sempre disposta a ajudar e tirar todas as dúvidas possíveis.

Agradeço ainda a Francielly Gós, Eliana Leite, Leticia Lambida e Lorena C. Pena, que auxiliaram muito com todos os processos do laboratório, preparação dos materiais, sendo sempre muito solícitas ao tirar minhas dúvidas e contribuir com o trabalho em um todo.

Agradeço à Dra. Rafaella Albuquerque e Silva do Programa de Vigilância e Controle das Leishmanioses do Ministério da Saúde por sua contribuição com pela doação das armadilhas de Shannon utilizada no presente estudo e informações valiosas para conclusão de nosso trabalho.

Agradeço a Dra. Débora do Rocio e a Dra. Lúcia Amorim, pelas dicas e comentários na qualificação do projeto que ajudaram na execução do mesmo.

Agradeço a Secretaria de Saúde e Secretaria de Vigilância Sanitária do município de Itaperuçu, em particular a Paulo Castro, Odinei Cordeiro, Sônia Bitencourt, Raquel Miranda, Keite Camargo e Fabíola Mazur por todo auxílio nos trabalhos de campo e coletas dos espécimes de flebotomíneos ao longo desses 2 anos.

Gratidão aos Moradores das localidades trabalhadas, pela disponibilidade e acolhimento com nossa equipe.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná, representado pela coordenadora Profa. Dra. Juliana Ferreira de Moura. Agradeço também ao secretário Alexandre e ao corpo de Docentes do programa pelos ensinamentos teórico-prático e metodológicos.

Jeremias 29:11 – ‘Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês,
diz o Senhor, ‘planos de fazê-los prosperar e não de causar dano, planos de
dar a vocês esperança e um futuro’.

RESUMO

A distribuição de flebotomíneos em um determinado local está ligada a diversos fatores, incluindo ações antrópicas, que permitem que espécies, primariamente de hábitos silvestres, se direcionem para peridomicílio, no ambiente rural e urbano. O registro destas, ao longo dos anos, ligado a fatores abióticos os quais influenciam na densidade populacional e na consequente transmissão de *Leishmania* spp. para o ser humano e outros animais são descritos em estudos relacionados ao tema. No Paraná, a região do Vale do Ribeira é endêmica para leishmaniose tegumentar americana (LTA) e dentre os municípios que a compõe está Itaperuçu. Com o objetivo de estudar a fauna de flebotomíneos na área rural do município foram: 1) identificadas as espécies; 2) observadas suas frequências mensais; 3) e se a densidade populacional está relacionada com fatores abióticos; 4) detectada infecção natural por *Leishmania* spp. As coletas foram realizadas por dois anos (julho 2016-julho 2018) utilizando dez armadilhas luminosas do tipo CDC (três noites consecutivas em peridomicílio) e uma armadilha de Shannon (uma noite, em área de mata) com um esforço amostral de 8.640 horas e 72 horas de captura, respectivamente. Os flebotomíneos foram triados, sexados e acondicionados para posterior identificação específica e análise molecular. A densidade dos espécimes foi correlacionada a fatores abióticos com base nos dados fornecidos pelo Sistema Meteorológico do Paraná (SIMEPAR) e para as análises estatísticas utilizou-se o BioEstat v. 5.3. A fauna foi composta por 3.784 espécimes, sendo 2.559 (67,6%) fêmeas e 1.225 (32,4%) machos (F/M = 2:1) (Teste t, $p > 0,05$), distribuídos entre 13 espécies sendo as mais frequentes *Nyssomyia neivai* (93,9%), *Pintomyia fischeri* (3,75%), *Migonemyia migonei* (0,95%) as quais são incriminadas como vetores de *Leishmania* spp. causadoras de LTA. As demais corresponderam a 1,4% do total. Foi observada diferença estatística significativa na coleta de *Ny. neivai* ($n = 3.556$) quando comparada às demais espécies (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). O gênero *Brumptomyia* foi o mais diverso com seis espécies, sendo *Br. bragai* registrada pela primeira vez no Paraná, aumentando sua distribuição geográfica e a fauna flebotomínica para do estado para 50 espécies. Os flebotomíneos estiveram presentes durante todo ano na área de estudo, independente dos fatores abióticos e a partir do mês de agosto observou-se maior frequência, com decréscimo da fauna a partir do mês de maio. Das fêmeas capturadas, 1.186 foram dissecadas (totalizando 176 pools) para detecção de DNA de *Leishmania*. Das espécies analisadas, *Ny. neivai* foi a mais abundante (88,62%), seguida por *Pi. fischeri* (9,2%) e *Mg. migonei* (1,18); *Br. troglodytes* e *Ex. firmatoi* somaram juntas 1,01 % do total. Três (3) pools de *Ny. neivai* foram positivos para a presença de DNA de *Leishmania* spp. Após o cálculo para infecção natural de flebotomíneos foi obtido a taxa de infecção de 0,25%. Inventariamos a fauna de flebotomíneos em uma região endêmica e que possui poucos estudos direcionados para prováveis vetores das espécies de *Leishmania* (*Viannia*) spp. Com os resultados apresentados poderemos oferecer a Secretaria de Saúde dados sobre a distribuição e sazonalidade das espécies presentes na área, mitigando ações de controle e vigilância da LTA na região como preconizado pelo Ministério da Saúde.

Palavras chave: Psychodidae, *Nyssomyia neivai*, variação sazonal, Leishmaniose Tegumentar Americana, Vale do Ribeira.

ABSTRACT

Sand flies distribution in a place is closed with several factors, such as antropic actions that provide silvester species to approach of the peridomicile in rural and urban enviroments. During different years the records of sand flies present relationships with biotic factors that influence in the faunistic density and consequently *Leishmania* spp. transmission to human and animals as described in previous study. In Paraná state, the Ribeira Valley region is endemic to American Tegumentar Leishmaniasis (ATL) and between it municipalities is included Itaperuçu. Aimed to investigate the sand fly fauna in a rural area located in the municipality, 1) species were identified; 2) observing their mensal frequency; 3) and if sand fly density present some relation with abiotic factors; 4) including natural infection by *Leishmania* spp. Collections were carried out for two years (July 2016 to July 2018) using 10 CDC light traps (during three consecutive nights in peridomicile) and one Shannon trap (during one night in forested area), totaling a amostral effort of 8,640 hours e 72 hours of capture, respectively. Sand flies were segregated of other insects, sexed and stored for specific identification and methods of molecular analysis procedures. Specimens density was correlated with abiotic factors based on data of the “Sistema Meteorológico do Paraná” (SIMEPAR); for statistical analysis was used the program BioEstat v. 5.3. Sand fly fauna was composed by 3,784 specimens, being 2,559 (67.6%) females and 1,225 (32.4%) males (F/M = 2:1) (T test, $p > 0,05$), belonged 13 species. *Nyssomyia neivai* (93.9%), *Pintomyia fischeri* (3.75%), *Migonemyia migonei* (0.95%) were more frequently and they are incriminated as vectors of *Leishmania* spp. causative agent of ATL. The others sum 1.45 of the total. Significant difference was found to *Ny. neivai* ($n = 3,556$) in relation to the others 12 species (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). *Brumptomyia* genus did present more diversity belonged to six species and *Br. bragai* was recorded at first time to the Paraná, increasing its geographical distribution and the flebotominic fauna of the state for 50 species. The phlebotomine were present all years regardless of the climatic variables being more frequently after August and less after May. 1,186 specimens were dissected (totaling 176 pools) for *Leishmania* DNA detection. Of these *Ny. neivai* was more abundant (88.62%), followed by *Pi. fischeri* (9.2%) and *Mg. migonei* (1.18); *Br. troglodytes* and *Ex. firmatoi* represented 1.01 % of the total. Three pools of *Ny. neivai* were positive for *Leishmania* (*Viannia*) spp. DNA providing an infection rate of 0.25%. Here we inventoried the sand fly fauna in an endemic area for ATL that present few studies with suspect vectors of *Leishmania* spp. After results we will be able to provide data for the Health Secretary about the distribution and sazonality of the species that occur in the area. Yet, a tool to be applied in the control and monitoring of ATL cases in the rural area of Itaperuçu municipality as preconized by the Ministry of Health of Brazil.

Keywords: Psychodidae, *Nyssomyia neivai*, seasonal variation, American Tegumentary Leishmaniasis, Ribeira Valley.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Mapa do Brasil mostrando a distribuição geográfica das espécies de Phlebotominae transmissoras de espécies de <i>Leishmanias</i> sp., causadoras de Leishmaniose Tegumentar Americana	19
FIGURA 2: Municípios do estado de Santa Catarina com registro de flebotomíneos.....	31
FIGURA 3: Municípios do estado do Rio Grande do Sul com registro de flebotomíneos.....	31
FIGURA 4: Municípios do estado do Paraná com registro de flebotomíneos.....	31
FIGURA 5: Municípios que compõem o Vale do Ribeira, estado do Paraná, Brasil.....	33
FIGURA 6: Fluxograma ilustrando as etapas de desenvolvimento da presente pesquisa até os resultados finais.....	44
FIGURA 7: Mapa do Brasil apontando o estado do Paraná com destaque para o município de Itaperuçu	45
FIGURA 8: Armadilhas luminosas CDC (A) e Shannon (B) dispostas em peridomicílio e área de mata, respectivamente, para a coleta de flebotomíneos.....	47
FIGURA 9: Pontos de coleta (P1 a P10) em peridomicílio no município de Itaperuçu, Paraná.	47
FIGURA 10: Bateria de clarificação para identificação dos flebotomíneos.....	50

FIGURA 11: Estrutura de um minicírculo do kDNA de <i>Leishmania</i> spp (~800 pb), demonstrando o local de anelamento dos primers A e B e o sentido da amplificação pela PCR.....	52
FIGURA 12: Machos e fêmeas de flebotomíneos capturados em área de peridomicílio e área de mata, município de Itaperuçu	57
FIGURA 13: Flutuação populacional de flebotomíneos capturados em área de peridomicílio e área de mata, município de Itaperuçu	57
FIGURA 14: Machos e fêmeas de flebotomíneos capturados em área de peridomicílio e área de mata, respectivamente, município de Itaperuçu Mann-Whitney, $p > 0,05$).....	58
FIGURA 15: Riqueza mensal de flebotomíneos capturados em área de peridomicílio e área de mata, município de Itaperuçu.....	58
FIGURA 16: Espécimes de flebotomíneos coletados em relação às variáveis de temperatura média (a), Precipitação média (b) e Umidade relativa (c), entre junho de 2016 a julho de 2018, município de Itaperuçu, Paraná	63
FIGURA 17; Espécimes de <i>Nyssomyia neivai</i> coletados em relação à variáveis de temperatura média (a), Precipitação média (b) e Umidade relativa (c), entre junho de 2016 a julho de 2018 no município de Itaperuçu, Paraná.....	66
FIGURA 18: Espécimes de <i>Pintomyia fischeri</i> coletados em relação à variáveis de temperatura média (a), Precipitação média (b) e Umidade relativa (c), entre junho de 2016 a julho de 2018 no município de Itaperuçu, Paraná.....	67

FIGURA 19: Espécimes de *Migonemyia migonei* coletados em relação à variáveis de temperatura média (a), Precipitação média (b) e Umidade relativa (c), entre junho de 2016 a julho de 2018 no município de Itaperuçu, Paraná68

FIGURA 20: Espécimes de flebotomíneos coletados (armadilhas CDC) em relação à variáveis de temperatura média (a), Precipitação média (b) e Umidade relativa (c), entre junho de 2016 a julho de 2018 no município de Itaperuçu, Paraná.....69

FIGURA 21: Espécimes de flebotomíneos coletados (armadilhas do tipo Shannon) em relação à variáveis de temperatura média (a), Precipitação média (b) e Umidade relativa (c), entre junho de 2016 a julho de 2018 no município de Itaperuçu, Paraná.....70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Estudos que inventariam a fauna de flebotomíneos em municípios da região do Vale do Ribeira no estado do Paraná.....	35
TABELA 2: Iniciadores utilizados para a detecção de infecção natural em flebotomíneos utilizando o método de PCR.....	42
TABELA 3: Pontos de coleta utilizando armadilhas CDC's com suas coordenadas geográficas, a distância entre as armadilhas e a elevação do ponto escolhido no município de Itaperuçu, Paraná.....	48
TABELA 4: Total de Flebotomíneos coletados no período de junho de 2016 a julho de 2018- Itaperuçu –PR.....	56
TABELA 5: Total de flebotomíneos coletados em armadilhas de CDC e Shannon durante junho de 2016 a julho de 2018- Itaperuçu –PR.....	60
TABELA 6: Número de flebotomíneos coletados em armadilhas CDC e Shannon por ponto de coleta (P) no município de Itaperuçu no período de julho de 2016 a junho de 2018.....	62
TABELA 7: Número total de fêmeas coletadas agrupadas em “pools” de até 10 espécimes (Itaperuçu, Paraná, Brasil).....	71
TABELA 8: Espécies de flebotomíneos analisados por ponto, para a presença de DNA de <i>Leishmania</i> spp., coletados entre maio de 2017 a julho de 2018 no município de Itaperuçu, PR.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

BL/UFPR- Setor de ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná
CD- coeficiente de detecção
CDC- Center for Disease Control and Prevention
CO₂- Dióxido de Carbono
DAB – Diaminobenzidina
DNA- Ácido desoxirribonucleico
dNTPs - desoxirribonucleotideo trifosfatos
DO- densidade ótica
EDTA - ácido etilenodiamino tetracético
FIOCRUZ- fundação Oswaldo Cruz
ICLc- Índice composto de Leishmania cutânea
h - horas
kb – Quilobase
kDNA - ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto
KOH- Hidróxido de Potássio
LC - Leishmaniose Cutânea
LV - Leishmaniose Visceral
LT - Leishmaniose Tegumentar
LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana
mm – milímetro
mM - milimolar
MS – Ministério da Saúde
ng – nanogramas
OPAS- Organização pan-americana de Saúde
rpm - rotações por minuto
SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIMEPAR- Sistema Meteorológico do Paraná
SMS – Secretaria Municipal de Saúde
SP- São Paulo
Spp. Não especificado
pb - pares de bases
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PR- Paraná

TE- tampão Tris EDTA

UFPR- universidade

ul – microlitro

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	JUSTIFICATIVA.....	20
1.2	OBJETIVOS.....	22
1.2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
1.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	A SUBFAMÍLIA PHLEBOTOMINAE: BIOLOGIA, ECOLOGIA E COMPORTAMENTO.....	22
2.2	OS FLEBOTOMÍNEOS E AS LEISHMANIOSES	25
2.3	ESTUDOS DE FAUNA E SAZONALIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS EM ÁREAS ENDÊMICAS PARA LTA NO BRASIL	27
2.4	FLEBOTOMÍNEOS E A LTA NO VALE DO RIBEIRA, PARANÁ.....	32
2.5	INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS	34
2.6	INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS: TÉCNICAS DE DETECÇÃO.....	37
3	MATERIAIS E METODOS	43
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	43
3.2	ÁREA DE ESTUDO	43
3.3	COLETA, ACONDICIONAMENTO E MONTAGEM DOS FLEBOTOMÍENOS.....	46
3.4	MONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS.....	49
3.5	INFECÇÃO NATURAL	49
3.5.1	EXTRAÇÃO DE MATERIAL GENÔMICO DOS FLEBOTOMÍNEOS	49
3.5.2	DETECÇÃO DA PRESENÇA DE DNA DE <i>Leishmania</i> spp.....	51
3.5.3	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	53
3.6	DADOS CLIMÁTICOS	53
3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	53
3.8	VARIÁVEIS DE ESTUDO	54
4	RESULTADOS	55
4.1	ASPECTOS GERAIS DA FAUNA FLEBOTOMÍNICA DO MUNICÍPIO DE ITAPERUÇU.....	55

4.2	ANÁLISE DA FAUNA FLEBOTOMÍNICA DO MUNICÍPIO DE ITAPERUÇU POR ARMADILHA.....	59
4.3	ANÁLISE DA FAUNA FLEBOTOMÍNICA DO MUNICÍPIO DE ITAPERUÇU POR SÍTIO AMOSTRAL (PONTO DE COLETA).....	61
4.4	SAZONALIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS NO MUNICÍPIO DE ITAPERUÇU.....	61
4.5	DETECÇÃO DE DNA DE <i>Leishmania</i> spp.....	71
5	DISCUSSÃO	73
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
7	PESPECTIVAS	83
8	REFERÊNCIAS	83
	APÊNCICE I	105
	APÊNCICE II	108
	APÊNCICE III	109
	APÊNCICE IV	114

1 INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos (Diptera: Phlebotominae) são insetos com ampla distribuição geográfica, representados por 1.026 espécies descritas, dentre as quais 277 ocorrem no Brasil (SHIMABUKURO *et al.* 2017, GALATI 2018, ANDRADE *et al.* 2020). Estes dípteros são vetores de diversos patógenos para animais e humanos, entre eles espécies de protozoários do gênero *Leishmania* spp., causadoras das leishmanioses as quais são antropozoonoses negligenciadas que colocam sob risco de infecção 350 milhões de pessoas no mundo, gerando mais de dois milhões de novos casos todos os anos (OMS 2018). A classificação das leishmanioses é dada por suas formas clínicas sendo descritas como leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) também descrita como leishmaniose cutânea (LC), cujas sintomatologias estão ligadas ao tropismo parasito-célula, que é diferente entre as espécies (OMS 2018).

Nas Américas a LT, dada algumas particularidades da parasitose como, espécies de *Leishmania* e de flebotomíneos somados a sua eco-epidemiologia é nominada como leishmaniose tegumentar americana (LTA), sendo que o Brasil apresenta o maior número de casos registrados, com 72,6% (17.526) do total, quando comparado aos 18 países de ocorrência da doença (OPAS 2017). O Índice Composto de Leishmaniose cutânea (ICLC) para o Brasil, no triênio (2015 a 2017), foi considerado intenso, representado por 17,7 casos para cada 100.000 habitantes (OPAS/MS, 2017). Em 2014 o coeficiente de detecção (CD) de LTA foi de 10,01/100 mil habitantes, sendo que o mesmo indicador epidemiológico observado para os estados do Norte e Nordeste somaram 69,12/ 100 mil habitantes, no mesmo período, demonstrando a alta prevalência de casos de LTA nessas regiões. A região Sul por sua vez apresentou CD de 1,29/100 mil habitantes. Nesse mesmo ano o estado do Paraná apresentou a maior prevalência de casos com CD (3,16/ 100 mil habitantes), totalizando 222 casos dos 253 registrados nos estados da região. Entre os anos de 2015 a 2018 foram notificados como autóctones para a doença 289 dos 399 municípios no estado (MS 2017, SINAN 2018). Recentemente, Melo *et al.* (2018) analisaram 217 municípios do Paraná com casos de LTA, obtendo um CD de 28,81, levando em conta dados do SINAN de 2012 a 2016.

Dados fornecidos pelo Ministério da Saúde (2020), relativos a 2018, ilustram que houve um decréscimo no CD para LTA no Brasil para 7,88, quando comparado a 2014 (10,01). Naquele ano a região Norte ainda apresentou o maior CD (41,4), porém a região Centro-Oeste (13), ultrapassou a região Nordeste (6,5), sendo que a três somadas tiveram um CD de 60,9, menor também que aquele de 2014, quando somadas as regiões Norte e Nordeste. Ainda, em

2018, as regiões Sudeste e Sul apresentaram os menores CD para LTA, de 1,9 e 0,5, respectivamente, sendo que na região Sul, o estado do Paraná foi responsável, em 2018, por 150 casos com CD de 1,3, sendo o maior da região Sul (158 casos), o que chama a atenção para o caráter endêmico da doença no estado do Paraná quando comparado aos estados do Sul do Brasil. Sabidamente, essa ampla distribuição da LTA no Brasil está ligada a diversidade e frequência de insetos da subfamília Phlebotominae (flebotomíneos), correlacionada aos fatores socioeconômicos, ambientais e climáticos (BENNAI *et al.* 2018). Essa diversidade é heterogênea para as diferentes regiões do Brasil (SHIMABUKURO *et al.* 2017). A região Sul do Brasil, que compreende os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, está representada, atualmente, por 54 (19%) do total (277) de espécies de flebotomíneos conhecidas para o Brasil. Essa diversidade é inferior quando comparada àquela da região Norte (159 spp.) (CASTELLÓN-BERMÚDEZ 2009) e Centro-Oeste (127 spp.) (ALMEIDA *et al.* 2010) ou mesmo a estados, como Minas Gerais (93 spp.) (ANDRADE e DANTAS-TORRES 2010) e Tocantins (MACHADO *et al.* 2017). Por outro lado, das espécies registradas na região Sul, 49 (18% do total) já foram encontradas no estado do Paraná (SHIMABUKURO *et al.* 2017), diversidade mais elevada que dos estados de Pernambuco (ANDRADE e DANTAS-TORRES *et al.* 2010) e de Goiás e Distrito Federal (NASCIMENTO *et al.* 2018).

Estudos realizados no Paraná demonstraram que essa distribuição compreende pouco mais de 70 municípios (18% do total) sendo que *Nyssomyia neivai*, *Nyssomyia whitmani* e *Migonemyia migonei* são encontradas em maior número e, de modo geral, associadas a ambientes antropizados de áreas endêmicas para a LTA (SILVA *et al.* 2008, OLIVEIRA *et al.* 2010). Além destas, soma-se a ocorrência de *Ny. intermedia* (SANTOS *et al.* 2009), sendo que esse conjunto de espécies tem sido implicado como vetores de *Leishmania* do subgênero *Viannia* tanto em ambiente silvestre como em áreas periurbanas (RANGEL *et al.* 2018) (Figura 1). Porém, para se incriminar, de fato, alguma espécie de flebotomíneo como transmissora de *Leishmania* alguns critérios, ainda hoje, direcionam os estudos de capacidade e competência vetorial (KILLICK-KENDRIK 1990). Critérios, considerados essenciais, referem-se à comprovação do comportamento antropofílico, o isolamento repetitivo e a identificação da mesma espécie de *Leishmania* spp. em flebotomíneos, associados a casos humanos. Os demais complementam a incriminação, como: 1) verificar se a referida espécie de flebotomíneo se alimenta frequentemente em outros mamíferos; 2) distribuição coincidente com os casos de leishmanioses; 3) se a espécie permite o desenvolvimento do parasito e se este flebotomíneo é capaz de transmitir o parasito através de picada.

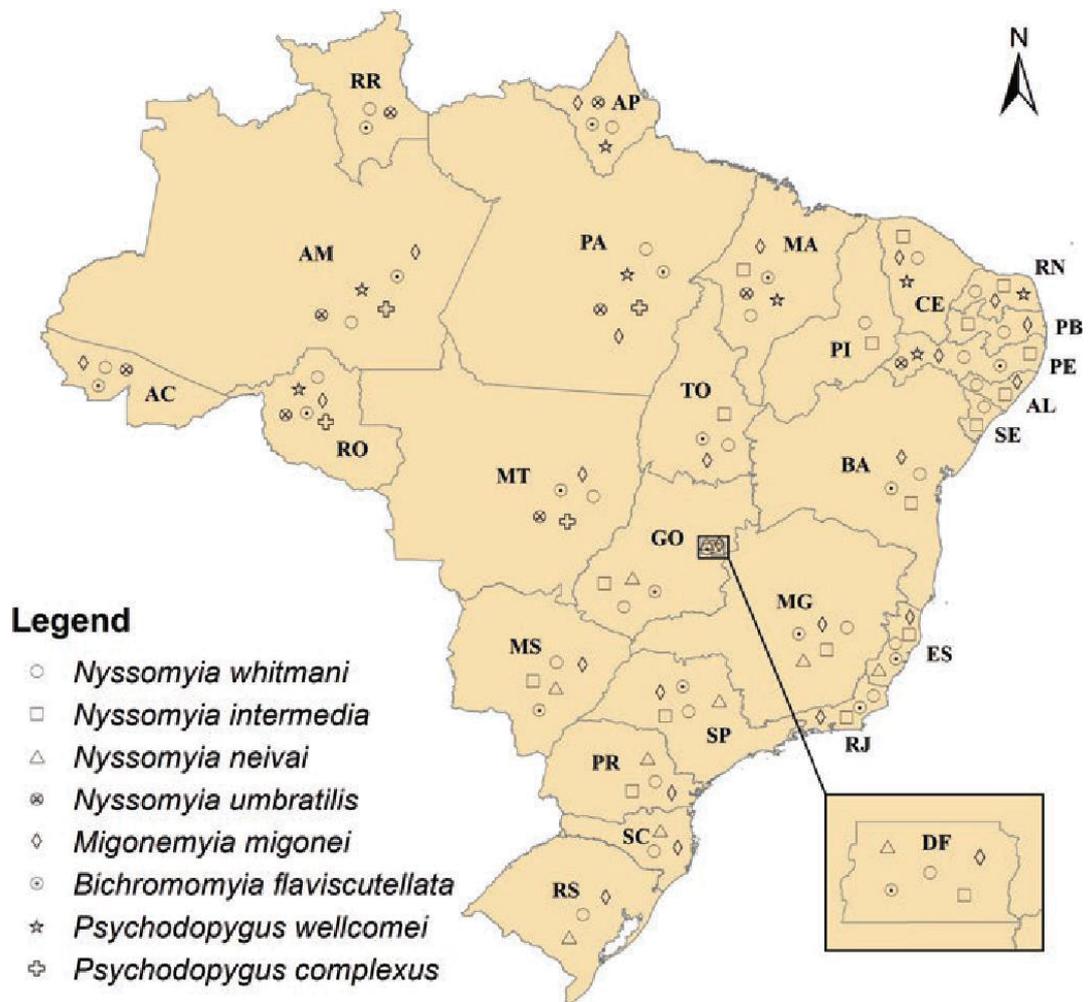


Figura 1: Mapa do Brasil mostrando a distribuição geográfica das espécies de Phlebotominae transmissoras de espécies de *Leishmania*, causadoras de Leishmaniose Tegumentar Americana [Fonte: Rangel *et al.* (2018)]

Recentemente Ready (2013) incluiu mais três critérios levando em conta modelos matemáticos que, associados, poderiam ajudar na elucidação do papel de espécies incriminadas como vetoras.

Dentre as espécies implicadas na transmissão do parasito na região Sul, *Ny. neivai* apresenta maior distribuição geográfica (SILVA *et al.* 2008). Desde 2002, casos autóctones de LTA por *Leishmania braziliensis* já haviam sido registrados nos arredores da cidade de Porto Alegre (Rio Grande do Sul), em áreas de vegetação. Assim como, a infecção natural por *Leishmania (Viannia) spp.*, implicaram *Ny. neivai* como principal transmissora de *Le. braziliensis* no Paraná (PITA-PEREIRA *et al.* 2009; SANTOS *et al.* 2016).

1.1 JUSTIFICATIVA

O levantamento da fauna de flebotomíneos é o primeiro passo para se ampliar o conhecimento das áreas de ocorrência das espécies e para compreensão da sua flutuação populacional, o que pode subsidiar projetos na área de conservação e biodiversidade, além de direcionar políticas públicas de vigilância e controle, por meio da presença e reconhecimento de possíveis espécies vetoras. Tendo em vista que o Paraná é estado mais acometido por novos casos da doença (MS 2017, SINAN 2018), dentre os estados do Sul do Brasil, se faz necessária a constante investigação da fauna de flebotomíneos, caracterização de infecção natural dos potenciais vetores e conhecimento das espécies de *Leishmania* circulantes.

Particularmente na região do Vale do Ribeira, a bioecologia dos flebotomíneos e as espécies de *Leishmania*, que circulam nesses insetos, permanecem pobremente caracterizadas e pouco se sabe sobre o papel vetorial de algumas na manutenção do ciclo silvestre, rural e urbano da LTA (CASTRO *et al.* 2005, SILVA *et al.* 2008, SANTOS *et al.* 2009, BAUM *et al.* 2013, 2015, GONÇALVES *et al.* 2019). A região possui áreas remanescentes de Mata Atlântica, ambiente que favorece a presença de flebotomíneos (SILVA *et al.* 2010), além do número elevado de habitações próximas a área de mata, que facilitam a interação entre os vetores e a população humana no peridomicílio. A adaptação a ambientes modificados, onde há existência da ação antrópica é uma das características da espécie de maior distribuição geográfica da região Sul, *Ny. neivai*, onde a mesma já foi detectada com a presença de *Leishmania (Viannia) spp.*, sendo esse um dos critérios para se incriminar uma espécie como vetor (SILVA *et al.* 2008). Dentre os municípios que fazem parte da região está Itaperuçu que é endêmico para LTA (MELO *et al.* 2018) e sua descrição de fauna flebotomínica ainda é

desconhecida, assim como na maioria dos municípios limítrofes pertencentes ao Vale do Ribeira.

Segundo o Programa Nacional de Vigilância e Controle das Leishmanioses, a forma para levantamento dessa fauna é uso de armadilhas luminosas (tipo CDC: *Center for Disease Control*), quer seja em peri ou em intradomicílio, cuja instalação é direcionada para onde há casos das doenças (MS 2017). Essa metodologia é a preconizada em área urbana quando detectados casos caninos e humanos de Leishmaniose Visceral. Para a busca de possíveis vetores ligados a eco-epidemiologia da LTA, a mesma pode ser adaptada acrescida da armadilha luminosa de Shannon instalada em área de mata, visto que a maioria das espécies envolvidas na eco-epidemiologia da LTA ainda conservam hábitos silvestres (RANGEL *et al.* 2018).

A investigação de espécies naturalmente infectadas por *Leishmania*, utilizando técnicas de biologia molecular vem sendo empregadas de modo a investigar a presença do DNA do parasito em flebotomíneos capturados (RÊGO *et al.* 2020). Dentre essas técnicas destaca-se a PCR multiplex, pois permite a utilização de dois pares de iniciadores que identificam o DNA da espécie de *Leishmania* e também a confirmação do DNA do inseto, atribuindo ao experimento um controle de extração desses insetos. Como resultado da utilização desta técnica visa-se encontrar as espécies de *Leishmania* circulantes assim como seus possíveis vetores na região de estudo (PITA-PEREIRA *et al.* 2009, NEITZKE-ABREU *et al.* 2014).

Somado a essas duas variáveis (fauna + infecção), para que seja possível o entendimento da dinâmica da transmissão do parasito em regiões endêmicas para LTA, se fez necessário, inicialmente, o conhecimento da flutuação sazonal (MS 2017) das espécies flebotomíneas encontradas, correlacionando a variações dos fatores climáticos que pode, por exemplo, demonstrar se há ou não períodos de maior contato dos hospedeiros e reservatórios com o inseto e, conseqüentemente, com o parasito. Assim, fica claro que, a investigação sobre a infecção por espécies de *Leishmania* e a composição da fauna flebotomínica associadas aos fatores abióticos são prerrogativas importantes para a vigilância e controle dos casos da doença em uma determinada área. Com esses dados o presente estudo poderá direcionar ações pontuais de prevenção e controle de forma a otimizar os recursos disponíveis e aumentar a sua efetividade, como preconizado pelo Manual de Controle das Leishmanioses do Ministério da Saúde (MS 2017).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a sazonalidade de flebotomíneos em região endêmica para a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) como estratégia para implementação de medidas de vigilância e controle.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Inventariar a fauna de flebotomíneos dessa área por meio de capturas em peridomicílio e área de mata;
- B) Determinar a sazonalidade e o índice de constância das espécies coletadas na área de estudo;
- C) Investigar a presença de DNA de *Leishmania* spp. nas espécies de flebotomíneos capturadas;
- D) Correlacionar os dados de fauna flebotomínica, os fatores abióticos e os achados do parasito, para propor possíveis medidas de controle da doença no município;
- E) Relatar o primeiro registro das espécies de flebotomíneos para o estado do Paraná, com impacto direto na biodiversidade do grupo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A SUBFAMÍLIA PHLEBOTOMINAE: BIOLOGIA, ECOLOGIA E COMPORTAMENTO

A família Psychodidae (do grego *psyche*- borboleta; *oda*- picando) está dividida em seis subfamílias: Bruchomyiinae, Trichomyiinae, Horaiellinae e Psychodinae, que não apresentam importância médica ou veterinária; Sycoracinae, composta por 36 espécies (incluindo três fósseis) onde há relatos de indivíduos se alimentando de animais de sangue frio; e Phlebotominae, cujas fêmeas praticam hematofagia em diversos animais, inclusive em seres humanos (YOUNG 1979). A subfamília Phlebotominae, recebeu nome a partir do gênero *Phlebotomus* (que só ocorre no Velho Mundo) (grego *phlebus*- veia; *tomus*- cortar), devido ao hábito hematofágico das fêmeas que é quando ocorre a transmissão de patógenos, incluindo espécies de *Endotrypanum*, *Bartonella*, *Plasmodium*, *Trypanosoma*, arbovírus, e

principalmente *Leishmania*, agentes etiológicos das leishmanioses visceral (LV) e tegumentar (LT) (MUNSTERMANN *et al.* 2004).

Em todo o mundo são conhecidas 1.026 espécies de Phlebotominae, sendo que, 54% (539 espécies) já foram registradas nas Américas (Novo Mundo) e 277 (51%) delas ocorrem no Brasil (SHIMABUKURO *et al.* 2017, GALATI 2018, ANDRADE *et al.* 2020), as quais estão incluídas em 23 gêneros, dos quais *Bichromomyia*, *Lutzomyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Psychodopygus* e *Trichophoromyia* apresentam importância na transmissão de *Leishmania* spp. para mamíferos (GALATI, 2018). No Brasil são conhecidos, vulgarmente, como flebotomíneos ou flebótomos e esses nomes podem variar de região para região (ex. freboti, tatuquira, aleijadinho, asa-dura, cangalhinha, mosquito-palha) (MARTINS *et al.* 1978).

As pesquisas sobre flebotomíneos foram impulsionadas após a suspeita de algumas espécies destes insetos serem transmissores de patógenos, principalmente, dos protozoários do gênero *Leishmania* spp. (SHERLOCK 2003). A captura desses insetos pode ser realizada no interior de matas, peri e intradomicílios por meio de armadilhas que contenham uma fonte luminosa (para espécies fototrópicas) ou iscas animais (para espécies zoofílicas) e são direcionadas, na maioria das vezes, para onde ocorrem casos das doenças (MAROLI *et al.* 1997).

Como todo díptero, são insetos que apresentam uma metamorfose completa, ou seja, ovo, larva, pupa e adulto. Sabe-se que o ovo é depositado em solo úmido e rico em matéria orgânica, mas não encharcado. Essa matéria orgânica serve de alimento para as larvas, que passam por quatro estádios até o desenvolvimento da pupa. As larvas são ativas e movimentam-se do local de oviposição, sendo esse um dos possíveis problemas em se conhecer seus locais de desenvolvimento. Já as pupas são imóveis e se fixam no substrato até a emergência do adulto. Já nessa fase pode-se diferenciar uma pupa de macho de uma de fêmea, porém a certeza nessa sexagem é mais precisa quando observados os adultos. Alguns locais onde têm sido encontradas formas imaturas de flebotomíneos como tocas de animais no solo, fendas de rochas, troncos e buracos de árvores, cupinzeiros e guano que são geralmente locais úmidos, ricos em matéria orgânica e protegidos da luz solar (FELICIANGELI, 2004). Porém a biologia desses insetos varia de acordo com diversos fatores, como temperatura, umidade relativa do ar, disponibilidade de alimento e o ambiente. A exemplo, o regime de chuvas ao longo da estação chuvosa, quando em níveis moderados pode beneficiar o desenvolvimento dos flebotomíneos, mas os prejudica quando encharca o chão, eliminando as formas imaturas naquele local (MACEDO *et al.* 2008).

As espécies de flebotomíneos podem ser divididas em quatro categorias, de acordo com seu habitat a qual foi proposta na década de 40 e, passados mais de 60 anos, esse cenário não é muito diferente (TEODORO *et al.* 1993, 2007). Aquelas chamadas exclusivamente silvestres vivem em áreas de mata fechada e não são encontradas associadas ao homem ou a animais domésticos. As espécies silvestres vivem em florestas ou bordas de mata e só acidentalmente, podem ser encontradas associadas ao ser humano ou aos animais domésticos, quando estes invadem essas áreas. As chamadas espécies semidomésticas vivem fora das habitações humanas e de animais domésticos, somente procurando-as para realizar o repasto sanguíneo. São espécies exofílicas, que repousam de dia ou de noite fora das habitações humanas e exofágicas alimentando-se no peridomicílio. As espécies classificadas como domésticas vivem associados ao ser humano e aos animais domésticos, no interior de habitações ou próximo delas (RANGEL e LAINSON 2003). São classificadas como espécies endofílicas cujo comportamento leva a invadir casas e endofágicas, pois ao invadir o interior de casas ou locais fechados, picam mais frequentemente nesses locais (BARRETTO 1943).

Somente as fêmeas são hematófagas, cuja atividade é crepuscular e noturna, porém em área de mata esses insetos podem se alimentar durante o dia. São atraídas por uma diversidade de substâncias emitidas pelos hospedeiros vertebrados através do suor e respiração, denominadas cairomônios (kairo- oportunista, hormon- estimular). Dentre estes, o dióxido de carbono (CO₂) e o ácido lático são relatados como importantes no processo de atração para insetos hematófagos, assim como ácidos graxos, aldeídos, álcoois e cetonas provenientes da respiração e da pele dos hospedeiros, as fêmeas quando vão alimentar se guiam por uma pluma de odor produzida por esses cairomônios (ANDRADE *et al.* 2008, PINTO *et al.* 2012). Além dessas substâncias, a luz é outro fator que potencializa a atratividade de flebotomíneos (MAROLI *et al.* 1997). Encontra-se na literatura, trabalhos demonstrando que quando se retira a luz de um anexo peridomiciliar, menos flebotomíneos são capturados no intradomicílio, assim como se afastar esses anexos de uma casa, praticamente a fauna torna-se inexistente no interior das mesmas (XIMENES *et al.* 1999). Já a capacidade de dispersão dos flebotomíneos é pouco conhecida e há muito tempo discute-se sobre esse comportamento, sendo incomum o encontro de flebotomíneos que se deslocam mais de 200 m por noite (FORATTINI 1973). Isso se deve, possivelmente, ao fato de serem insetos que apresentam pouca tendência em se afastar de seus abrigos e voarem em saltos. Porém alguns estudos de recaptura os flebotomíneos que são marcados com “pó fluorescente” têm permitido observar que algumas espécies podem ser capturadas de um a dois quilômetros do seu local de soltura (CASANOVA *et al.* 2005, GALVIS-OVALLOS *et al.* 2018). Os movimentos silenciosos dos

flebotomíneos propiciam uma aproximação de seus hospedeiros, sem serem notados, garantindo sucesso na hematofagia e manutenção do ciclo de transmissão dos patógenos por eles transmitidos (KILLICK-KENDRICK, 1990).

Uma única fêmea pode fazer mais de um repasto sanguíneo sobre um mesmo hospedeiro ou, ainda, sobre hospedeiros distintos. Esse comportamento vem sendo demonstrado por meio da identificação da fonte alimentar quer seja por métodos sorológicos (AFONSO *et al.* 2005) ou moleculares (SALES *et al.* 2015). Os animais domésticos mais comumente identificados em estudos de preferência alimentares são galinhas, cães, gatos, porcos, cavalos e coelhos (AFONSO *et al.* 2005, BAUM *et al.* 2015). Entre os animais silvestres/sinantrópicos estão gambás, ratos, morcegos, pombos, guaxinins, raposas, serpentes e sapos (DIAS *et al.* 2003, MUNIZ *et al.* 2006, SALES *et al.* 2015), em alguns casos identificados a nível específico (PEREIRA-JÚNIOR *et al.* 2019, COSTA *et al.* no prelo). Mamíferos silvestres em áreas de floresta servem como fonte alimentar para flebotomíneos e são considerados reservatórios para diferentes espécies de *Leishmania* (ROQUE e JANSEN 2014). Contudo, ações antrópicas, podem levar a uma alteração do ambiente natural desses insetos e, conseqüentemente, de suas fontes alimentares. Isso favorece a dispersão dos flebotomíneos que irão colonizar novos ecótopos se alimentando sobre hospedeiros mamíferos remanescentes em matas residuais e peridomicílio de residências, entrando em contato com o ser humano e/ou animais domésticos (PAES 1991).

2.2 OS FLEBOTOMÍNEOS E AS LEISHMANIOSES

O conhecimento, seja taxonômico, biológico, ecológico e comportamental, sobre a subfamília de Phlebotominae, está, como dito anteriormente, intimamente associado a implicação das espécies como transmissoras de patógenos ao ser humano e outros animais (SHERLOCK 2003), dentre os quais destacam-se as espécies de *Leishmania*, causadoras das leishmanioses, como revisado por Roque e Jansen (2014). As leishmanioses são um crescente problema de Saúde Pública e são classificadas como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Estão associadas a pobreza e desvantagens sociais, acometem população com pouca visibilidade, negligenciadas na área de Pesquisa e Desenvolvimento, não se difundem amplamente por grandes extensões territoriais de forma rápida e podem ser controladas e possivelmente evitadas (OMS 2017).

No mundo 350 milhões de pessoas estão sob ameaça de se infectarem, onde 102 países possuem registro para as leishmanioses, sendo 50 deles endêmicos para leishmaniose visceral (LV) e 52 para leishmaniose tegumentar (LT). A OMS compilou dados de 25 países

endêmicos tanto para LV, quanto para LT, durante os anos de 2015 e 2016 e os resultados mostraram que o Brasil é o único país que apresenta elevada taxa de infecção para ambas as leishmanioses (OMS 2018). Essas doenças são causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e são transmitidas pela picada das fêmeas infectadas de flebotomíneos (FORATTINI 1973). No Brasil são conhecidas 8 (oito) espécies com comprovada importância em Saúde Pública com destaque para *Leishmania infantum* (sin. *L. chagasi*), parasito causador da LV, *Le. braziliensis* causadora da LC e *Leishmania amazonensis* que pode causar a leishmaniose cutânea difusa (GONTIJO *et al.* 2003), estas últimas também conhecidas como leishmaniose tegumentar americana (LTA).

Anteriormente as leishmanioses eram tidas como zoonoses, contudo com o desequilíbrio ambiental criado pela invasão do ser humano às florestas, forçou uma adaptação dos vetores e reservatórios silvestres do parasito a um ambiente peridomiciliar ou mesmo domiciliar, caracterizando-as atualmente como antropozoonose (OMS 2018). A degradação do meio ambiente, o movimento migratório rural urbano, a desorganização do espaço urbano, o aumento da densidade demográfica (gerando maior produção de resíduos sólidos e destino inadequado destes) e a convivência com animais domésticos, são fatores de risco que contribuem para a urbanização da LV e LTA (MS 2017). A exemplo, na região Sul do país foram notificados 13.384 casos humanos de LTA no período de 1980 a 2005, sendo que 98,7% ocorreram no estado do Paraná e destes 94% estavam presentes nas regiões norte e oeste do Estado. Em 25 dos 27 estados brasileiros já foram registrados casos autóctones de LV, mais de 3.500 casos reportados entre 1996 a 2001 (MS 2017).

Sabe-se que os principais vetores das espécies de *Leishmania* são os dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (GALATI 2018). A espécie *Lutzomyia longipalpis* é considerado o principal vetor da *Le. infantum*, nos países da América Latina. No Brasil *Lu. longipalpis* foi detectado com infecção natural, quer seja por métodos moleculares ou por dissecação em estados das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (LIDANI *et al.* 2017). Na região Sul, os primeiros registros de *Lu. longipalpis* foram feitos no estado do Rio Grande do Sul em 2009 (SOUZA *et al.* 2009) e em 2012 no Paraná (SANTOS *et al.* 2012), sendo que os mesmos precederam os casos da doença. Contudo, há relatos de que a espécie *Ny. neivai* poderia estar envolvida na veiculação deste parasito (DIAS *et al.* 2003, SARAIVA *et al.* 2009). Recentemente *Lu. cruzi* foi comprovado como vetor do parasito na região Centro-Oeste do Brasil (FALCÃO *et al.* 2017) e *Pintomyia fischeri* tem sido incriminado como vetor suspeito (GALVIS OVALOS *et al.* 2017). Rêgo *et al.* (2018) detectaram DNA de *Le. infantum* em *Pi. fischeri* no Rio Grande do Sul. Carvalho *et al.* (2010) demonstraram a

infecção natural de *Mg. migonei* por *Le. infantum* em estudo realizado no município de São Vicente Férrer (Pernambuco) onde *Migonemyia migonei* foi a espécie mais prevalente e abundante durante as coletas em uma área de comprovada transmissão de LV onde não havia a presença de *Lu. longipalpis*. Mais tarde, Guimarães *et al.* (2016) observaram, em Baturité (Ceará), que havia casos de LV humana em ambientes onde comprovadamente, não havia o vetor principal *Lu. longipalpis*. Dentre as espécies capturadas foi avaliada, em condições de laboratório, a capacidade vetorial de *Mg. migonei* que se mostrou permissiva para a infecção com *Le. infantum*. Já em 2016, Santos conseguiu comprovar que a espécie foi capaz de transmitir o parasito, em condições experimentais. Segundo Pasquali *et al.* (2019) a dispersão da LV na região Sul do Brasil é recente, onde os primeiros registros de casos caninos e humanos foram registrados em 2006 e 2008, respectivamente, para o estado do Rio Grande do Sul, em 2011 para Santa Catarina e em 2012 no estado do Paraná.

Entre os vetores envolvidos na transmissão do agente etiológico da LTA no Brasil, destacam-se as espécies *Bichromomyia flaviscutellata*, *Ny. whitmani*, *Ny. intermedia*, *Ny. umbratilis*, *Mg. migonei* e *Psychodopygus wellcomei* (FRAIHA *et al.* 1971) e esse cenário não é muito diferente atualmente (RANGEL *et al.* 2018). Dentre os gêneros que incluem espécies de flebotomíneos implicadas na transmissão de alguma espécie de *Leishmania* (RANGEL *et al.* 2018), nos estados do sul do Brasil, estão *Lutzomyia*, *Nyssomyia*, *Psychodopygus*, *Migonemyia* e *Pintomyia*, com destaque para a espécie *Ny. neivai*. Embora haja evidências de mais de uma espécie de flebotomíneo envolvida na eco-epidemiologia da LTA na região Sul, para Gonçalves *et al.* (2019) a ampla distribuição de *Ny. intermedia* [sic] *Ny. neivai* (**ver item 2.5**) nos ecótopos estudados sugere que essa seja a principal espécie envolvida na transmissão de *Le. (Viannia)* spp. e mantenedora dos casos de LTA na região.

2.3 ESTUDOS DE FAUNA E SAZONALIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS EM ÁREAS ENDÊMICAS PARA LTA NO BRASIL.

Estudos de fauna flebotomínica são realizados, na maioria das vezes, para observação e controle de possíveis espécies vetorais como preconizado pelo Programa Nacional de Vigilância Controle das Leishmanioses do Ministério da Saúde (MS 2017, 2018). Uma das variáveis observadas em alguns destes trabalhos trata-se da flutuação populacional e da sua correlação com fatores abióticos como temperatura, precipitação e umidade relativa, que em um período de dois anos ou mais é chamado de sazonalidade, o que permite entender a interação entre as espécies e seus diferentes habitats (MACEDO *et al.* 2008). Estudos prévios demonstraram que a precipitação beneficia a dispersão dos flebotomíneos quando em níveis

moderados ao longo da estação chuvosa, mas os prejudica quando inunda o chão, destruindo os criadouros e carreando ou matando as formas imaturas. Quando as variáveis observadas são temperatura e umidade relativa já foi demonstrado que, pequenas variações interferem na presença desses insetos já que os mesmos são muito sensíveis à dessecação (DIAS *et al.* 2007) e podem variar entre as regiões do Brasil.

No Norte do Brasil, Barbosa *et al.* (2008), em estudo realizado na área periurbana de Manaus, estado do Amazonas, coletaram 49 espécies de flebotomíneos, sendo 4 (quatro) delas, *Ny. umbratilis*, *Ny. anduzei*, *Bi. olmeca nociva* e *Bi. flaviscutellata* incriminadas como transmissoras do agente etiológico da LTA na região. Estas espécies ocorreram durante todos os meses do ano e estiveram presentes em períodos secos e chuvosos, mas com predomínio naqueles com maior índice pluviométrico. No município de Paragominas, estado do Pará, Rebêlo *et al.* (2001) detectaram 32 espécies de flebotomíneos em áreas várzea e “terra firme”, destacando a presença das espécies *Psychodopygus complexus*, *Ps. wellcomei*, *Bi. flaviscutellata*, *Ny. umbratilis*, *Trichophoromyia ubiquitalis*, *Ny. whitmani* e *Ps. paraenses*. O domínio das espécies em geral ocorreu em ambos os períodos (seco e chuvoso), mas com maior abundância de espécimes no período seco. Chagas *et al.* (2016) demonstraram que a endemicidade das leishmanioses (LV e LTA), que ocorre no estado do Pará, é justificada não só pela abundância de espécies de flebotomíneos no bioma Amazônia, mas também pela interação entre os fatores climáticos e ambiente antrópico entre os vetores e a população dos municípios acometidos. Neste estudo os autores descreveram que ações antrópicas alteraram a composição, os hábitos, comportamento e capacidade vetorial das espécies de flebotomíneos. No que se refere à distribuição sazonal foi visto que a maior abundância dos espécimes ocorre no período chuvoso, mas a ocorrência destes insetos pode ser observada em todas as épocas do ano.

Semelhante ao estudo de Chagas *et al.* (2016) a prevalência de flebotomíneos no período chuvoso também foi observada por Marinho *et al.* (2008) na região Nordeste do Brasil. As coletas foram realizadas em duas reservas florestais remanescentes da floresta Amazônica, na periferia da área metropolitana de São Luís (Maranhão). Durante o período de 1 (um) ano foram capturadas 23 espécies. Não foi observada correlação entre a variação mensal dos valores médios de umidade relativa do ar e temperatura, e a variação da fauna desses insetos. No mesmo estado, no município do Paço do Lumiar, Barros *et al.* (2000) observaram a relação entre a frequência sazonal dos flebotomíneos e os índices pluviométricos da região. Como resultados foram obtidos 60% dos espécimes capturados na estação chuvosa (janeiro/junho) e, 40% espécimes na estação seca (julho/dezembro). Os

autores relataram uma fauna de flebotomíneos composta por 10 espécies, sendo *Ny. whitmani* a mais prevalente dentre os 489 flebotomíneos capturados durante o período de coleta (um ano). A espécie *Ny. whitmani*, juntamente com *Pi. fischeri*, também foi encontrada em maior número durante as coletas realizadas por Carvalho *et al.* (2010a), em ambientes rurais e urbanos no município de Ilhéus, estado da Bahia, onde foram capturados 3.384 espécimes flebotomíneos pertencentes às 16 espécies. Já em estudo realizado no município de Palmeira dos Índios, estado de Alagoas, Andrade Filho e Brazil (2009) observaram a predominância da espécie *Mg. migonei* dentre os 563 flebotomíneos coletados. Tanto para os resultados de Carvalho *et al.* (2010a) e Andrade Filho e Brazil (2009) não foi observada a correlação da fauna de flebotomíneos com fatores climáticos.

No Centro-Oeste, Missawa *et al.* (2008) reuniram relatórios de pesquisa entomológica de coletas realizadas em 83 dos 139 municípios do estado do Mato Grosso, onde foi observada maior prevalência de *Ny. whitmani*, sendo esta presente em 70 municípios, o que segundo os autores evidencia a ampla distribuição da espécie. Carvalho *et al.* (2010b) em coletas realizadas no Distrito Federal, capturaram 17.737 espécimes de flebotomíneos, dentre os quais, foram, identificadas 27 espécies, sendo *Ny. whitmani* a espécie mais frequente, seguida de *Lu. longipalpis*, *Ny. neivai* e *Ps. davisii*. Galati *et al.* (1996) realizaram coletas no município de Corguinho, estado do Mato Grosso do Sul, onde foram capturadas 26 espécies de flebotomíneos, sendo que *Ny. whitmani* a mais abundante. Conforme as observações dos estudos realizados na região Centro-Oeste, os picos de coletas de flebotomíneos foram associados às épocas mais secas e frias. Bastos *et al.* (2016) em Goiânia, estado de Goiás, realizaram as capturas de flebotomíneos durante 1 (um) ano, os pesquisadores observaram as médias de temperatura e umidade relativa, juntamente a fauna presente na região. Nesse período mesmo com a fraca correlação obtida entre as variáveis observadas, foi descrito que a menor taxa de captura de flebotomíneos ocorreu no primeiro semestre do estudo (setembro a fevereiro), período coincide com o aumento da precipitação. Em contrapartida, o pico de captura ocorreu em abril, com picos secundários em maio e julho, quando a precipitação reduz e a umidade atinge valores entre 40 e 60%.

Na região Sudeste, Pita-Pereira *et al.* (2005) observaram que a espécie *Ny. intermedia* foi uma das espécies mais frequente durante as coletas realizadas no município Rio de Janeiro, em um total de 16.415 espécimes, além da presença de *Mg. migonei*, *Lu. longipalpis* e *Evandromyia cortelezii*. Em área endêmica para LTA nos municípios de Caparaó e Alto Caparaó, no estado de Minas Gerais, que fazem divisa com o estado do Espírito Santo, Saraiva *et al.* (2006) coletaram 1.793 espécimes com predomínio das espécies *Ny. intermedia*,

seguida por *Ny. whitmani*, *Pi. fischeri*, *Mg. migonei* e *Evandromyia lenti*. Durante o estudo, os autores verificaram a distribuição sazonal dos flebotomíneos, e puderam observar que o maior número de insetos coletados foi durante o mês de dezembro e entre os meses março e julho. Observou-se correlação positiva com o número e o aumento da temperatura com os flebotomíneos coletados, sendo em meses quentes e úmidos ou meses quentes e secos. Os mesmos autores defendem a influência positiva, do aumento da temperatura no desenvolvimento destes vetores. Em contrapartida Odorizzi e Galati (2007) observaram que não houve correlação da variação da fauna de flebotomíneos com as médias de temperatura, mas evidenciaram a correlação com menores índices pluviométricos. O estudo foi realizado no município de Mirandópolis, estado de São Paulo com 35.995 flebotomíneos capturados, com picos de coleta nos meses de junho, agosto e setembro, sendo a espécie *Ny neivai* (63,4%) a mais prevalente. Souza *et al.* (2015) em estudo realizado no Parque Estadual do Rio Doce, localizado no estado de Minas Gerais, coletaram 1.993 espécimes distribuídas em 30 espécies sendo as mais abundantes *Pressatia choti*, *Ps. davisi* e *Ny. intermedia*. Durante o estudo verificaram que não houve um padrão sazonal de flebotomíneos coletados, tampouco uma correlação estatística entre a fauna de flebotomíneos e os fatores climáticos observados, mas que durante os meses de março e abril, onde as médias de temperatura e umidade estiveram mais elevadas e o número de insetos capturados foi maior.

A Região Sul, atualmente, possui 13 gêneros de flebotomíneos relatados, cuja maior diversidade encontra-se em *Brumptomysia* (13 spp.), seguido de *Psathyromyia* (10 spp.) e *Evandromyia* (8 spp), onde três espécies são endêmicas, *Lu. gaminarai*, *Br. angelae* e *Ev. gaucha*, sendo as duas últimas descritas de material-tipo coletado na região Sul, juntamente com *Br. ortizi* e *Ev. correalimai*. No estado de Santa Catarina, 16 espécies de flebotomíneos já foram relatadas em 7 (sete) municípios daqueles 295 que compõe o estado (**Figura 2**). Alguns estudos relatam a prevalência das espécies *Ny. neivai* e *Pi. fischeri*, ambas encontradas em ambientes modificados e de interação antrópica, fatores que podem contribuir para o aparecimento de novos casos de LTA na região (MARCONDES *et al.* 2005, GROTT *et al.* 2014). No estado do Rio Grande do Sul, há 24 espécies de flebotomíneos conhecidas, distribuídas em 10 dos 497 municípios gaúchos (**Figura 3**) (PITA PEREIRA *et al.* 2009).

O estado do Paraná está composto, atualmente, por 49 espécies de flebotomíneos das quais três, *Br. angelae*, *Br. ortizi* e *Ev. correalimai* foram descritas de espécimes coletados no território (GALATI 2018). Desde então, diversos trabalhos vêm sendo realizados com diferentes objetivos, sendo que pouco mais de 70 (18%) municípios, dos 399 possuem fauna flebotomínica conhecida (**Figura 4**). As variáveis climáticas mais associadas com flutuação

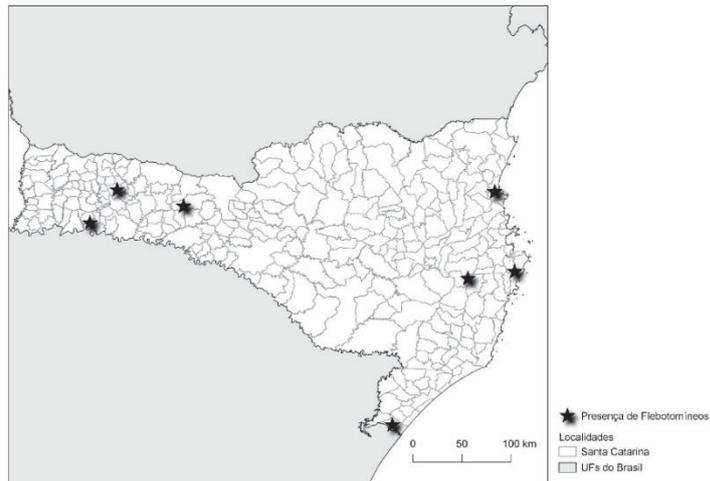


Figura 2: Municípios do estado de Santa Catarina com registro de flebotomíneos. (Elaboração: Salvador P. Chaves-Júnior).

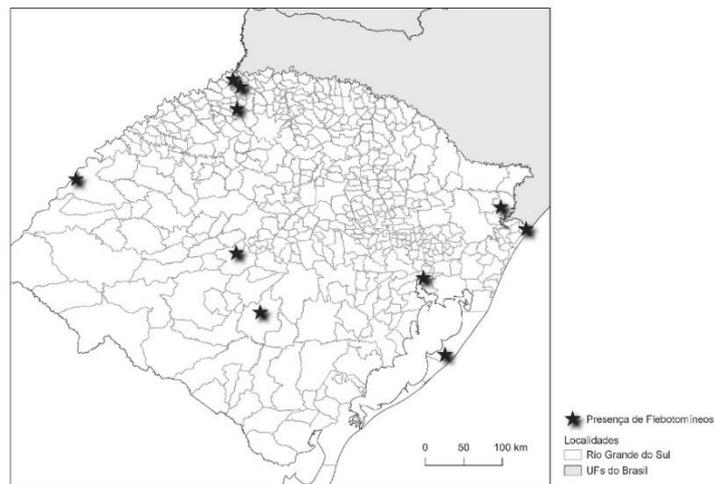


Figura 3: Municípios do estado do Rio Grande do Sul com registro de flebotomíneos. (Elaboração: Salvador P. Chaves-Júnior).

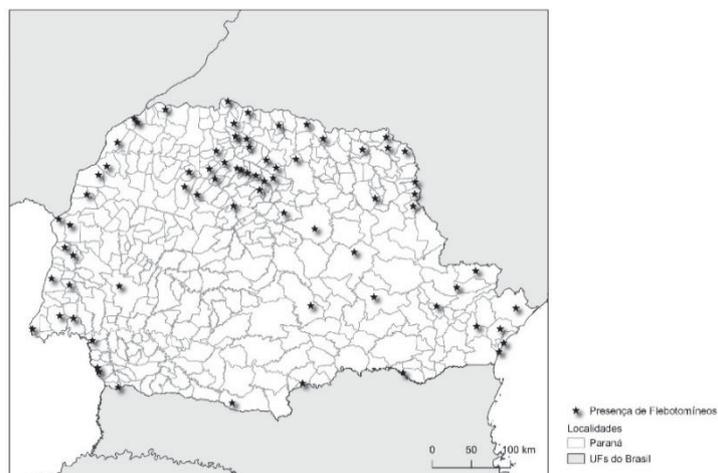


Figura 4: Municípios do estado do Paraná com registro de flebotomíneos. (Elaboração: Salvador P. Chaves-Júnior).

populacional de flebotomíneos no estado é a temperatura e precipitação (MELO *et al.* 2018). Em um estudo de Cerino *et al.* (2009) foi avaliada a fauna, frequência e sazonalidade de flebotomíneos na área urbana do município de Cianorte (Paraná) (CERINO *et al.* 2009). Os mesmos autores detectaram a presença de flebotomíneos de forma mais numerosa em abrigos de animais domésticos e peridomicílio, nos meses mais quentes e úmidos. As mesmas observações foram feitas nos municípios de Bandeirantes (MASSAFERA *et al.* 2005) e Japurá (CELLA *et al.* 2011), destacando-se as espécies *Ny. neivai* e *Ny. whitmani*.

Como observado nos diferentes estudos conduzidos nas diferentes regiões do país, as variações dos níveis de precipitação e médias de temperatura e umidade, parecem influenciar na distribuição das espécies de flebotomíneos e por consequência na maior ou menor observação de casos de leishmanioses (CARVALHO *et al.* 2017). Fica claro, também, que essa interação e distribuição das espécies em associação com fatores abióticos variam, não só entre as diferentes regiões do Brasil bem como, de local para local ou mesmo em diferentes períodos de realização do estudo e de ambientes alvos (antropizados ou preservados). Ainda assim, nota-se que em determinados estudos não são reportados correlação entre a distribuição dos espécimes e/ou espécies em função dos fatores abióticos analisados.

2.4 FLEBOTOMÍNEOS E A LTA NO VALE DO RIBEIRA, PARANÁ

A região do Vale do Ribeira (**Figura 5**) compreende os estados de São Paulo (SP) e Paraná (PR) e estrutura-se a partir da Bacia Hidrográfica do Ribeira do Iguape, estendendo-se desde o litoral sul de São Paulo até o litoral norte do Paraná, compondo a microrregião de Paranaguá (IPARDES 2003). O Vale é composto por 32 municípios, sendo 25 e 07, de SP e PR, respectivamente. No Paraná, o Vale é composto pelos municípios de Adrianópolis, Bocaiúva do Sul, Cerro Azul, Doutor Ulysses, Itaperuçu, Rio Branco do Sul e Tunas do Paraná (**Figura 5**), totalizando uma área de 6.093, 54 Km² com uma população de 100.821 habitantes dos quais 57.718 vivem em área urbana e 34.103 em área rural (MDA, 2015).

Segundo Melo *et al.* (2018) durante o período de 2012 a 2016 foram notificados 1.600 casos de LTA em 217 municípios do Paraná. Dentre os municípios que compõem o Vale do Ribeira, Adrianópolis e Cerro Azul, apresentou um Coeficiente de Detecção (CD) de 117,29 e 72,94, respectivamente, sendo caracterizados com áreas com alto índice de transmissão de LTA. Em Itaperuçu foram notificados 6 (seis) casos da doença, sendo que o CD foi de 4,58 (≤ 10), o qual é considerado com baixo potencial de transmissão da doença. Os demais municípios que compõe a região, Bocaiúva do Sul, Doutor Ulysses, Rio Branco do Sul e Tunas do Paraná, não possuem casos de LTA notificados. Ainda segundo os autores, além da

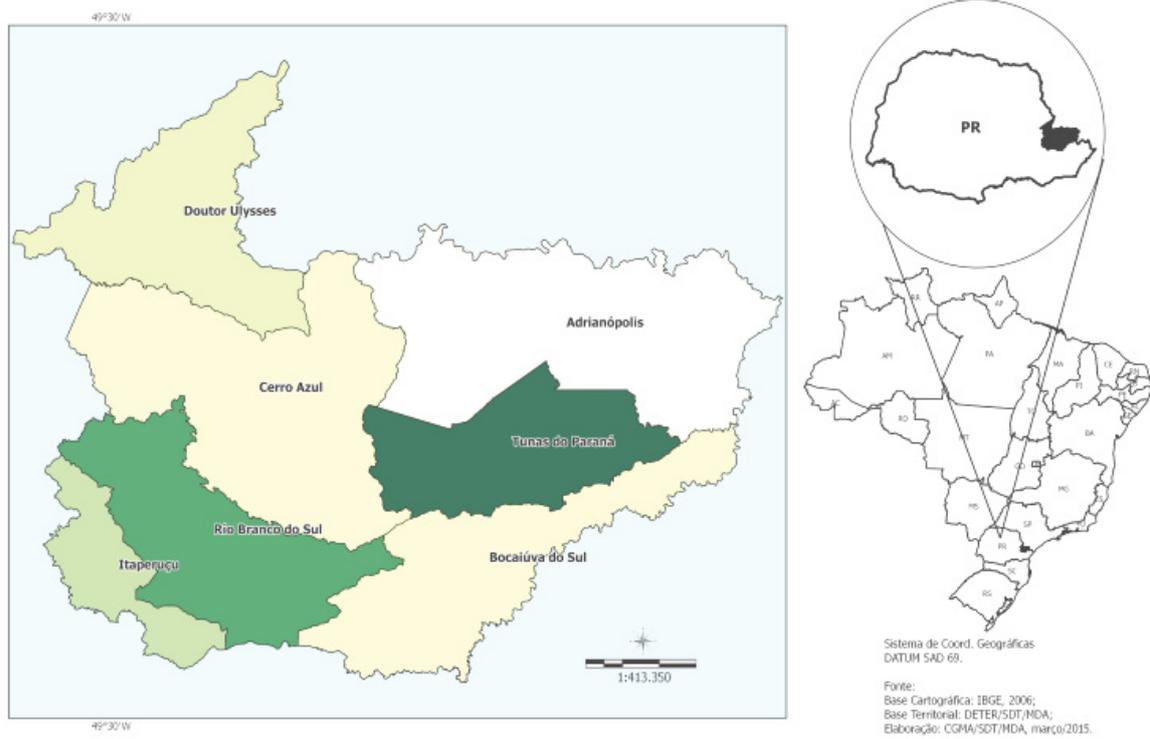


Figura 5: Municípios que compõem o Vale do Ribeira, estado do Paraná, Brasil. [Fonte: Ministério do Desenvolvimento Agrário (2015)].

vegetação fatores climáticos como temperatura, precipitação e flutuação populacional interferem na prevalência da doença. Em relação à fauna dos flebotomíneos (**Tabela 1**), alguns estudos foram realizando nestes municípios (CASTRO *et al.* 2005, SILVA *et al.* 2008, SANTOS *et al.* 2009, BAUM *et al.* 2013, 2015, GONÇALVES *et al.* 2019), em particular Adrianópolis e Cerro Azul. A fauna de flebotomíneos do Vale do Ribeira está composta por 15 espécies, que totaliza 31% das espécies de flebotomíneos já registradas no Paraná, com maior diversidade do gênero *Brumptomyia* (6 spp.) e maior frequência relatada para a espécie *Ny. intermedia* “*sensu lato*”.

2.5 INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS

A observação da infecção natural em espécies de flebotomíneos é de grande importância, uma vez que pode auxiliar na inferência sobre sua participação no ciclo da transmissão de *Leishmania* spp.. A presença de *Leishmania* spp. contribui como evidência preliminar para sugerir uma espécie como provável vetor na eco-epidemiologia das leishmanioses (CABRERA *et al.* 2002, PAIVA *et al.* 2010). Contudo, há vários motivos pelos quais o encontro seja do parasito ou de fragmentos de DNA deste, não possa ser a única prerrogativa para incriminar determinada espécie de flebotomíneo como transmissor. Nesse sentido, a presença de flagelados por meio de dissecação de fêmeas, pode não se tratar de *Leishmania* spp., uma vez que outras formas flageladas como *Endotrypanum* e *Trypanosoma* já foram observadas no trato digestório dos flebotomíneos (MUNSTERMANN *et al.* 2004). Ainda, a detecção de DNA de *Leishmania* spp. pode ser advinda de repastos em animais positivos e não necessariamente de *Leishmania* spp. que se desenvolveram no inseto (MISSAWA *et al.* 2010).

Em função disso, Killick-Kendrick (1990) definiu critérios para a comprovação da competência vetorial de espécies de flebotomíneos e mais tarde Ready (2013) atribuiu modificações e incluiu mais dois critérios, de modo que atualmente são utilizados sete critérios: 1) a observação em mais de uma ocasião de promastigotas isoladas a partir de várias fêmeas de flebotomíneos silvestres que não contêm repastos de sangue recentes, anteriores a 36 h; 2) apresentar crescimento significativo de promastigotas de *Leishmania* dentro do intestino das fêmeas naturalmente infectadas ou observar os parasitos em colônias após xenodiagnóstico (infecção experimental); 3) ter comportamento antropofílico e zoofílico (alimentar-se em hospedeiros reservatórios); 4) demonstrar forte associação ecológica, incluindo a sazonalidade, entre a espécie de flebotomíneo, e a infecção dos seres humanos e

Tabela 1: Estudos que inventariam a fauna de flebotomíneos em municípios da região do Vale do Ribeira no estado do Paraná.

Municípios	Espécies de Flebotomíneos	Armadilhas Utilizadas ¹	Locais de captura ²	Objetivo dos estudos	Autores	Ano
Adrianópolis	<i>Nyssomyia intermedia s.l.</i> ³	CDC	Interior de residências	Estudar a eco-epidemiologia das leishmanioses	Castro <i>et al.</i>	2000
	<i>Nyssomyia whitmani</i>	Shannon	Anexos domiciliares			
	<i>Migonemyia migonei</i>	Damasceno	Área de Mata			
	<i>Pintomyia fischeri</i>					
	<i>Psathyromyia lutziana</i>					
	<i>Brumptomyia mangabeirai</i>					
	<i>Brumptomyia nitizulescui</i>					
	<i>Brumptomyia togloydites</i>					
Adrianópolis	<i>Nyssomyia neivai</i>	Falcão	Interior de residências	Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos	Silva <i>et al.</i>	2000
			Anexos domiciliares Área de Mata			
Adrianópolis	<i>Nyssomyia intermedia s.l.</i>	Falcão	Interior de residências	Confirmar a presença de <i>Ny. intermedia</i> no Paraná	Santos <i>et al.</i>	2000
	<i>Nyssomyia neivai</i>	Shannon	Anexos domiciliares			
	<i>Migonemyia migonei</i>		Área de Mata			
	<i>Pintomyia fischeri</i>					
	<i>Psathyromyia lanei</i>					
	<i>Brumptomyia angelae</i>					
	<i>Brumptomyia cunhai</i>					
	<i>Brumptomyia nitizulescui</i>					
<i>Evandromyia firmatoi</i>						
<i>Evandromyia edwardsi</i>						
Adrianópolis	<i>Nyssomyia intermedia s.l.</i>	CDC	Anexos domiciliares	Investigação de fonte alimentar (métodos sorológicos)	Baum <i>et al.</i>	2000
			Área de Mata			
Adrianópolis	<i>Nyssomyia intermedia s.l.</i>	CDC	Interior de residências	Investigação de fonte alimentar (métodos moleculares)	Baum <i>et al.</i>	2000
		Shannon	Anexos domiciliares			

		Área de Mata			
Adrianópolis	<i>Nyssomyia intermedia s.l.</i>	CDC	Interior de residências	Abundância e diversidade de flebotomíneos	Gonçalves <i>et al.</i> 2019
	<i>Pintomyia fischeri</i>		Anexos domiciliares		
<i>Continua...</i>					
Cerro Azul	<i>Nyssomyia intermedia</i> <i>Pintomyia fischeri</i> <i>Pintomyia pessoai</i> <i>Migonemyia migonei</i>		Área de Mata		

^{1.} Métodos de coleta: armadilha luminosa Center for Disease Control (CDC), armadilha luminosa de Falcão; armadilha luminosa de Shannon, armadilha de Damasceno.

^{2.} Locais de captura: Interior de residências (quarto, salas, cozinhas); anexos domiciliares (galinheiros, chiqueiros, canis, currais); área de mata (mata ciliar, mata fechada, próximos a rochas e tocas de animais). Florestas compostas por vegetação de Mata Atlântica.

^{3.} *Nyssomyia intermedia s.l. (sensu lato)* (YOUNG e DUNCAN 1994)

reservatórios; 5) transmitir a *Leishmania*, após infecção experimental para hospedeiros naturais ou modelo laboratorial equivalente; 6) demonstrar, por modelo matemático, e usando dados retrospectivos, que a espécie é essencial para manter a transmissão com ou sem o envolvimento de outros vetores; 7) demonstrar, por modelo matemático, com base em um programa de controle planejado, que a incidência da doença diminui significativamente com a diminuição significativa da densidade do vetor específico.

Pela análise molecular, a relação entre a fauna de flebotomíneos e o número de fêmeas infectadas é obtida através da observação de dados de infecção natural. A taxa de infecção é calculada a partir do número de *pools* ou número de flebotomíneos dissecados positivos/número total de flebotomíneos X 100 (VASCONCELOS *et al.* 2019). As taxas estimadas de infecção natural encontradas em estudos anteriores variam entre 0,2 e 2% (PITA PEREIRA *et al.* 2005). Esse dado é primordial para o entendimento da cadeia de transmissão e controle das leishmanioses, para a determinação das espécies de flebotomíneos vetores, sobretudo em ambientes antrópicos (OLIVEIRA-PEREIRA *et al.* 2006).

Pesquisas sobre competência vetorial são escassas, compilando todos os requisitos descritos para incriminar uma espécie como vetora, apenas duas espécies de flebotomíneos atenderam, para LTA no Brasil: i) *Ps. wellcomei* comprovada como vetora de *L. braziliensis*; ii) *Lu. cruzi* como transmissora das espécies *Le. braziliensis* e *Le. amazonensis* (LAVITSCHKA 2017). Somado a estas, entre as espécies suspeitas estão *Ny. neivai*, *Ny. intermedia*, *Ny. whitmani*, *Ny. umbratilis*, *Ny. anduzei*, *Ny. antunesi*, *Mi. migonei*, *Bi. flaviscutellata*, *Ps. aryozei*, *Ps. complexus*, *Ps. davisii*, *Ps. paraensis*, *Tr. ubiquitalis* *Pi. fischeri*, *Pi. pessoai* e (BRAZIL *et al.* 2015). Visando contribuir com a eco-epidemiologia das leishmanioses e ampliar o registro de comprovação de potenciais vetores, estudos sobre infecção natural norteiam pesquisas com este intuito.

2.6 INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS: TÉCNICAS DE DETECÇÃO.

Há várias técnicas descritas na literatura para se avaliar a infecção natural em flebotomíneos. O método clássico, amplamente utilizado, é a pesquisa direta do parasito no trato digestório dos espécimes por meio de dissecação e análise microscópica (ARAGÃO *et al.* 1922) o qual permitiu, desde a década de 20, demonstrar o papel dos flebotomíneos na transmissão de *Le. braziliensis* onde estava ocorrendo um surto de LTA no estado do Rio de Janeiro. Os autores evidenciaram a presença dos flagelados na espécie *Phlebotomus intermedius* (= *Ny. intermedia*). Posteriormente a essa constatação, foi realizada a descrição

de um cão com a presença de uma úlcera com as formas amastigotas do parasito. Em pesquisa, realizada no ano de 1952, Forattini e Santos observaram a presença de infecção natural nessa mesma espécie de flebotomíneo no estado do Paraná. Forattini *et al.* (1972), desta vez no estado de São Paulo, detectaram flebotomíneos da espécie *Ny. intermedia s.l.* com a presença de protozoários em seu trato digestório que posteriormente foram inoculados em hamsters e os mesmos apresentaram lesões características para a forma tegumentar da leishmaniose (FORATTINI 1973). Juntamente com a dissecação de espécimes vivos, alguns estudos avaliaram a taxa de infecção de flebotomíneos, em regiões endêmicas para LTA. Em estudo realizado em 1996, no município de Corguinho (Mato Grosso do Sul), Galati *et al.* observaram uma taxa de infecção natural de 0,15% por *Leishmania* spp.. Pinheiro *et al.* (2008) no estado do Amazonas, avaliaram que dentre a fauna de flebotomíneos registrada, a taxa de infecção natural foi de 1,04%. A dissecação e observação microscópica das formas flageladas do parasito ainda são comumente empregadas, porém a mesma pode ser pouco efetiva quando o número de flebotomíneos é baixo, visto que a busca de promastigotas de *Leishmania* é muito laboriosa e necessita de grande habilidade técnica, além do método apresentar algumas restrições (PITA-PEREIRA *et al.* 2009).

Com os avanços da ciência e de modo a garantir resultados mais sensíveis e em menor tempo, abordagens moleculares vêm sendo empregadas para a detecção e identificação de *Leishmania* spp., principalmente em pesquisas epidemiológicas (PAIVA *et al.* 2007). Durante anos de estudo ferramentas como anticorpos monoclonais específicos em radioimunoensaio e em ensaios de imunofluorescência indireta, o método de hibridização para a detecção e identificação de parasitos em flebotomíneos e o método da reação da cadeia polimerase para identificação do DNA do parasito presente em potenciais espécies vetoras (READY *et al.*, 1988, DE BRUIJN e BARKER 1992, ADINI *et al.* 1998), ao passar dos anos a reação de cadeia polimerase (PCR) tornou-se o método mais utilizado para a avaliação das taxas de infecção tanto experimental (em laboratório), quanto para infecção natural (campo) (PITA-PEREIRA *et al.* 2011).

Um dos primeiros estudos que utilizaram essa técnica foi realizado por Bruijn e Barker (1992), onde os autores descreveram os *primers* B1: (GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG), B2: (CTAATTGTGCACGGGGAGG) os quais são específicos para *Leishmania* do subgênero *Viannia* e utilizados ainda hoje em diferentes estudos para identificação genérica. Os autores utilizaram espécimes de *Lu. longipalpis* infectadas e não infectadas, demonstrando que seria possível identificar o DNA de *Leishmania* presente nessas amostras, concluindo que o método permitiria identificar possíveis vetores do parasito, bem como no estabelecimento da

frequência de infecções presentes nas populações de flebotomíneos. Rodriguez *et al.* (1999) observaram em área endêmica de LTA na Venezuela, a positividade de *Leishmania* em flebotomíneos provenientes de campo, por meio da técnica de hibridação por PCR com os iniciadores J1 e J2. Esses iniciadores são derivados de uma sequência de DNA nuclear repetitiva, sendo preparados para um alvo de 500pb presente no DNA nuclear de *Le. braziliensis*. Durante o estudo foi possível identificar as espécies *Lu. gomezi* e *Ps. panamensis* como possíveis vetores nesta região.

Aransay *et al.* (2000), em estudo realizado em Atenas, Grécia, demonstraram que a PCR permite o processamento de um grande número de amostras. Cabrera *et al.* (2002) em Cundinamarca, Colômbia, concluíram que o método de PCR é um grande aliado para estudos epidemiológicos e programas de controle das leishmanioses, identificação taxonômica dos agentes etiológicos das doenças e das espécies de vetores. Acrescentou a essa investigação o fato de que o armazenamento das amostras preconizadas no seu estudo, não interferiu no sucesso da amplificação por PCR. Ainda, segundo os autores o método mais econômico, etanol a 70% à temperatura ambiente, foi uma opção recomendada para o armazenamento de amostras entomológicas em estudos de incriminação vetorial. Essa mesma observação foi feita recentemente por Sales *et al.* (2020).

A incriminação espécies de flebotomíneos na transmissão de *Leishmania* spp. contribui para a elucidação de lacunas sobre ciclos de transmissão do parasito em diversas regiões. Em 2002 Miranda *et al.* observaram em área endêmica para LTA no estado da Bahia a presença de DNA de *Leishmania* por PCR, onde as espécies *Ny. whitmani* e *Ny. intermedia*, apresentaram resultados positivos para 30 dos 335 *pools* formados pelo gênero *Nyssomyia* sp. (os autores não separam as espécies), o que gerou uma taxa de infecção de 0,4% para a região de estudo. Em 2006 Lanus *et al.* realizaram o primeiro relato de infecção natural de *Ny. neivai* por *Leishmania* sp., no noroeste da Argentina. Por meio da PCR avaliaram 440 fêmeas de *Ny. neivai* capturadas nas províncias de Tucuman e Salta entre os anos de 1999 e 2003. Como resultado os autores observaram a detecção de DNA do subgênero *Leishmania* (*Viannia*) em 40 das fêmeas capturadas, gerando uma taxa de infecção natural de 0,91%.

No Brasil a primeira observação de *Ny. neivai* naturalmente infectada por *Leishmania* sp. foi realizada por Pita-Pereira *et al.* (2009) utilizando PCR multiplex. Durante o estudo foram analisadas 270 fêmeas, coletadas em área periurbana e endêmica para LTA, no município de Porto Alegre, estado do Rio Grande do Sul. Como resultado os autores identificaram 3 *pools* de fêmeas positivos para a presença de DNA de *Le. braziliensis* com taxa de infecção de 1,1%. Considerando que a taxa de infecção natural de flebotomíneo na

natureza é baixo, a PCR multiplex possibilita o controle da extração e da PCR. O iniciador direcionado ao gene de cacofonia dos flebotomíneos é observado como um aliado para observação de falhas na extração ou possível contaminação durante a técnica de PCR Pita-Pereira *et al.* (2009) utilizaram o mesmo como controle para a reação, durante o estudo todos os ensaios de PCR multiplex onde amplificaram a banda controle de 220 pb correspondente ao gene, encontrando uma boa qualidade do DNA extraído e ausência de inibidores da reação de PCR (PITA-PEREIRA *et al.* 2011). Aliado à esse controle, a não utilização de fêmeas ingurgitadas para os ensaios diagnósticos, minimiza a possibilidade de detecção do DNA de *Leishmania* presentes no sangue recém ingerido, proveniente da fonte alimentar (PITA-PEREIRA *et al.* 2011, BRITTO e PITA-PEREIRA 2014).

No estado do Paraná a primeira observação da espécie *Ny. neivai* naturalmente infectada foi descrita por Oliveira *et al.* (2011), no município de Doutor Camargo, que resultou em 1.803 fêmeas de flebotomíneos coletadas, sendo 1.755 de *Ny. neivai*. Para a análise molecular foi realizado o método de PCR multiplex, que teve como resultado a presença de DNA de *Leishmania (Viannia) spp.* em 4 *pools*, gerando uma taxa mínima de infecção de 0,22 para a região estudada.

A modificação da técnica de PCR visou melhorar sua eficiência e diminuir o tempo das reações, onde além da PCR multiplex outras como a PCR-RFLP (PCR-polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição e RAPD PCR (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) também podem ser utilizadas (LIMA JUNIOR *et al.* 2009).

A PCR multiplex, técnica derivada do método tradicional, faz com que seja possível economizar tempo e esforço de formas consideráveis, amplificando simultaneamente diferentes sequências em uma única reação. A PCR multiplex requer que os iniciadores levem à amplificação de regiões únicas do DNA, tanto em pares individuais quanto em combinações de muitos iniciadores, sob um único conjunto de condições de reação (MARKOULATOS *et al.* 2002). Em pesquisa realizada nos municípios de Doutor Camargo, Fênix e Mandaguari no estado do Paraná, fêmeas de flebotomíneos foram submetidas a PCR multiplex para a detecção de DNA de *Leishmania (Viannia) sp.* utilizando *primers* específicos para o gene da cacofonia (IVS6 dos flebotomíneos) e para o subgênero *Viannia* [gene da região do mini círculo do cinetoplasto (kDNA)]. A PCR foi realizada em fêmeas de exemplares eram *Ny. neivai* (N=1000/100 *pools*), *Ny. whitmani* (N=220/22 *pools*) e *Pi. fischeri* (N=1/1 *pool*). Das 123 amostras todas foram negativas para *Leishmania (Viannia)* (NEITZKE ABREU *et al.* 2008). Utilizando o método de PCR multiplex e dissecação Neitzke Abreu *et al.* (2014) utilizaram *primers* específicos para *Leishmania sp.* e para o gene da cacofonia dos

flebotomíneos. Como resultado obtiveram um total de 510 flebotomíneos (52 *pools*) sendo estes distribuídos entre *Mg. migonei* (N=9/1 *pool*), *Pi. fischeri* (N=17/2 *pools*), *Ny. neivai* (N=216/22 *pools*) e *Ny. whitmani* (N=268/27 *pools*). Dentre os 52 *pools* de flebotomíneos testados todos continham o fragmento de 220 pb do IVS6 região do gene de cacofonia e quatro *pools* (7,7%) apresentaram o fragmento de 70 pb do mini-círculo kDNA de *Leishmania* (*Viannia*), sendo positivas amostras de *Ny. neivai* (1/22) e *Ny. whitmani* (3/27). Durante as reações de PCR multiplex, primers específicos foram utilizados para amplificar a região conservada do DNA do minicírculo do cinetoplasto (kDna) de *Leishmania* spp. (PASSOS et al. 1996), além do gene da cacofonia IVS6 de flebotomíneos (LINS et al. 2002) (**Tabela 2**). Por meio desta técnica é possível amplificar simultaneamente um fragmento de 120 pb das regiões conservadas em kDNA de *Leishmania* sp. e um fragmento de 220 pb referente a região desejada do gene de cacofonia dos flebotomíneos.

Jorquera *et al.* (2005) utilizaram o método de PCR multiplex para observar a infecção natural de flebotomíneos por dois subgêneros diferentes do parasito, *Leishmania* e *Viannia*, em focos endêmicos para leishmanioses, no departamento de Sucre, Venezuela. Durante o estudo 549 flebotomíneos (51 *pools*) foram analisados, sendo compostos pelas espécies *Lu. ovallesi* (N=461/38) e *Lu. gomezi* (N=88/13). Como resultado os autores obtiveram um total de 8 *pools* positivos, sendo três para *Leishmania* (*Viannia*) e cinco *Leishmania* (*Leishmania*), onde o índice geral estimado de infecção natural para a região estudada foi de 0,62.

Os iniciadores direcionados ao minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA), dos parasitos dos gêneros *Leishmania* e *Viannia*, assim como para o gene *cacofony* dos flebotomíneos, são utilizados de forma ampla para a identificação do DNA de *Leishmania* sp. O amplo uso destes primers para a detecção de *Leishmania* em flebotomíneos, nos diversos métodos de PCR, ocorre pelo fato dessas moléculas estarem presentes em múltiplas cópias no genoma mitocondrial (cerca de 10.000), aliado a presença de uma região de seqüência conservada evolutivamente nas diferentes espécies do gênero *Leishmania*. (Britto & Pita-Pereira 2014).

A técnica de PCR-RFLP, com digestão de produto amplificado a partir de PCR gênero-específica, permite a identificação de *Leishmania* e análise de infecção natural em flebotomíneos. Quaresma *et al.* (2012) utilizando o método PCR-RFLP no município de Uberlândia, Minas Gerais, descreveram a infecção natural por *Leishmania* sp., em duas espécies de flebotomíneos gerando uma taxa de infecção estimada de 5,26%. Utilizando o mesmo método de identificação para infecção natural Fonteles *et al.* (2017) observaram que das 2.776 fêmeas testadas, 48 foram positivas para a presença de DNA de *Leishmania* spp.,

Tabela 2. Iniciadores utilizados para detecção de infecção natural por espécies de *Leishmania* e taxa de infecção de flebotomíneos pelo método de PCR realizados no Brasil.

Autores	Ano	Primer	Alvo	Taxa de Infecção	Tipo de reação
Jorquera <i>et al.</i>	2005	LU-5A LM-3A LB-3C	<i>Leishmania sp.</i> <i>Leishmania (Leishmania)</i> <i>Leishmania (Viannia)</i>	0,62	PCR multiplex
Pita Pereira <i>et al.</i>	2005	A, B 5Llcac 3Llcac	(kDNA) de <i>Leishmania sp.</i> 120pb Gene de cacofonia IVS6 de flebotomíneos 220pb	2	PCR multiplex
Lanús <i>et al.</i>	2006	JP1, JP3 5Llcac 3Llcac	<i>Leishmania spp.</i> Gene de cacofonia IVS6 de flebotomíneos 220pb	0,91	PCR
Oliveira Pereira <i>et al.</i>	2006	A, B	(kDNA) de <i>Leishmania sp.</i> 120pb	0,4	PCR
kato <i>et al.</i>	2007	LMC-1S LMC-1R	(kDNA) de <i>Leishmania sp.</i> 700pb	1,56	PCR
Neitzke HC <i>et al.</i>	2008	MP1L, MP3H 5Llcac 3Llcac	(kDNA) de <i>Leishmania (Viannia)</i> 70pb Gene de cacofonia IVS6 de flebotomíneos 220pb	0	PCR multiplex
Pita Pereira <i>et al.</i>	2009	A, B 5Llcac 3Llcac	(kDNA) de <i>Leishmania sp.</i> 120pb Gene de cacofonia IVS6 de flebotomíneos 220pb	1,1	PCR multiplex
Pita Pereira <i>et al.</i>	2010	A, B 5Llcac 3Llcac	(kDNA) de <i>Leishmania sp.</i> 120pb Gene de cacofonia IVS6 de flebotomíneos 220pb	4	PCR multiplex
Quaresma <i>et al.</i>	2012	HSP70-F, HSP70-R LIT-1S, L58S	Gene da proteína de choque térmico (hsp70) Gene do Espaçador transcrito interno de <i>Leishmania spp.</i> (ITS1)	5,26	RFLP-PCR
Neitzke HC <i>et al.</i>	2014	MP1L, MP3H 5Llcac 3Llcac	(kDNA) de <i>Leishmania (Viannia)</i> 70pb Gene de cacofonia IVS6 de flebotomíneos 220pb	0,8	PCR multiplex
Fonteles <i>et al.</i>	2017	LIT-1S, L58S	Gene do Espaçador transcrito interno de <i>Leishmania spp.</i> (ITS1)	0,17	RFLP-PCR
de Avila <i>et al.</i>	2018	HSP70-F, HSP70-R LIT-1S, L58S	Gene da proteína de choque térmico (hsp70) Gene do Espaçador transcrito interno de <i>Leishmania spp.</i> (ITS1)	0,83	PCR

resultando em uma taxa de infecção natural estimada em 0,17%. Ambos os estudos tiveram como alvo o gene ITS1 (Espaçador transcrito interno de *Leishmania* spp.), utilizando os primers LIT-1S, L58S e o gene da proteína de choque térmico (hsp70), utilizando os *primers* HSP70-F e HSP70-R.

Já a utilização da amplificação aleatória por RAPD-PCR é descrita como uma técnica rápida e bem estabelecida para gerar padrões específicos de bandas de genomas complexos usando iniciadores curtos e únicos de uma sequência de interesse (WILLIAMS *et al.* 1990). Mesmo que em menor número a técnica vem sendo utilizada para a determinação de taxas de infecção natural por *Leishmania* spp. Rassi *et al.* (2008) realizaram a análise pelo método de RAPD-PCR em 1.700 flebotomíneos capturados no distrito de Shahrood, Irã, durante os anos de 2005-2006. Como resultado os pesquisadores descreveram que 14,2% estavam naturalmente infectados com *Leishmania major*, sendo a taxa de infecção natural estimado de 0,83% para a região. Mesmo com observações positivas em estudos que utilizaram a RAPD-PCR, a técnica caiu em desuso, devido a uma subjetividade da análise e aos problemas com a reprodutibilidade dos resultados. Além disso, a utilização do sequenciamento, que com o passar do tempo teve seu custo reduzido, agregou mais um motivo para que a técnica fosse substituída por outras metodologias (GALVÃO *et al.* 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental, incluindo as fases de campo e laboratório, encontra-se resumidos no fluxograma ilustrado na **Figura 6** e será descrito em detalhes na metodologia abaixo.

3.2 ÁREA DE ESTUDO

O município de Itaperuçu (25° 13' 12" S; 49° 20' 52" W), localizado no Vale do Ribeira, Estado do Paraná (**Figura 7**), possui população estimada em 23.887 habitantes (IBGE 2019). O Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM) é de 0,637, considerado bom, sendo que o Paraná apresenta o 5º melhor índice do Brasil, com valor de 0,749. O bioma é do tipo Mata Atlântica e áreas com resquícios da mesma, sendo que o Vale da Ribeira é composto por formação vegetal de Floresta Ombrófila Densa e Mista, em conjunto com Floresta de Araucária, além de Campos Naturais formados por estepes de gramíneas (MAACK 1968). A zona rural, alvo do presente estudo, é composta por 3.931 habitantes, o que corresponde a 16% da população do município. Itaperuçu é considerada área endêmica para a LTA tendo sido notificado no período de 2012 a 2016, seis casos da doença no município, sendo que o Coeficiente de Detecção (CD) foi de 25,11, o qual inclui o município como considerado com baixo potencial de transmissão da doença, embora possa haver subnotificação. Por outro lado, Adrianópolis e Cerro Azul, localizados na mesma região, nesse período, apresentou CD de 117,29 e 72,94, respectivamente, sendo caracterizados com áreas com alto índice de transmissão de LTA. Os demais municípios que compõe a região, Bocaiúva do Sul, Doutor Ulysses, Rio Branco do Sul e Tunas do Paraná, não possuem casos de LTA registrados (MELO *et al.* 2018).

Na área rural do município, as coletas dos flebotomíneos foram realizadas nas localidades de Caçador, São Domingos e Rancharia, as quais, segundo dados da Secretaria Municipal de Saúde (SMS), apresentaram 6 casos de LTA entre os anos de 2012 e 2016 estando presente em uma região endêmica por anos para esta parasitose. (MELO *et al.* 2018)

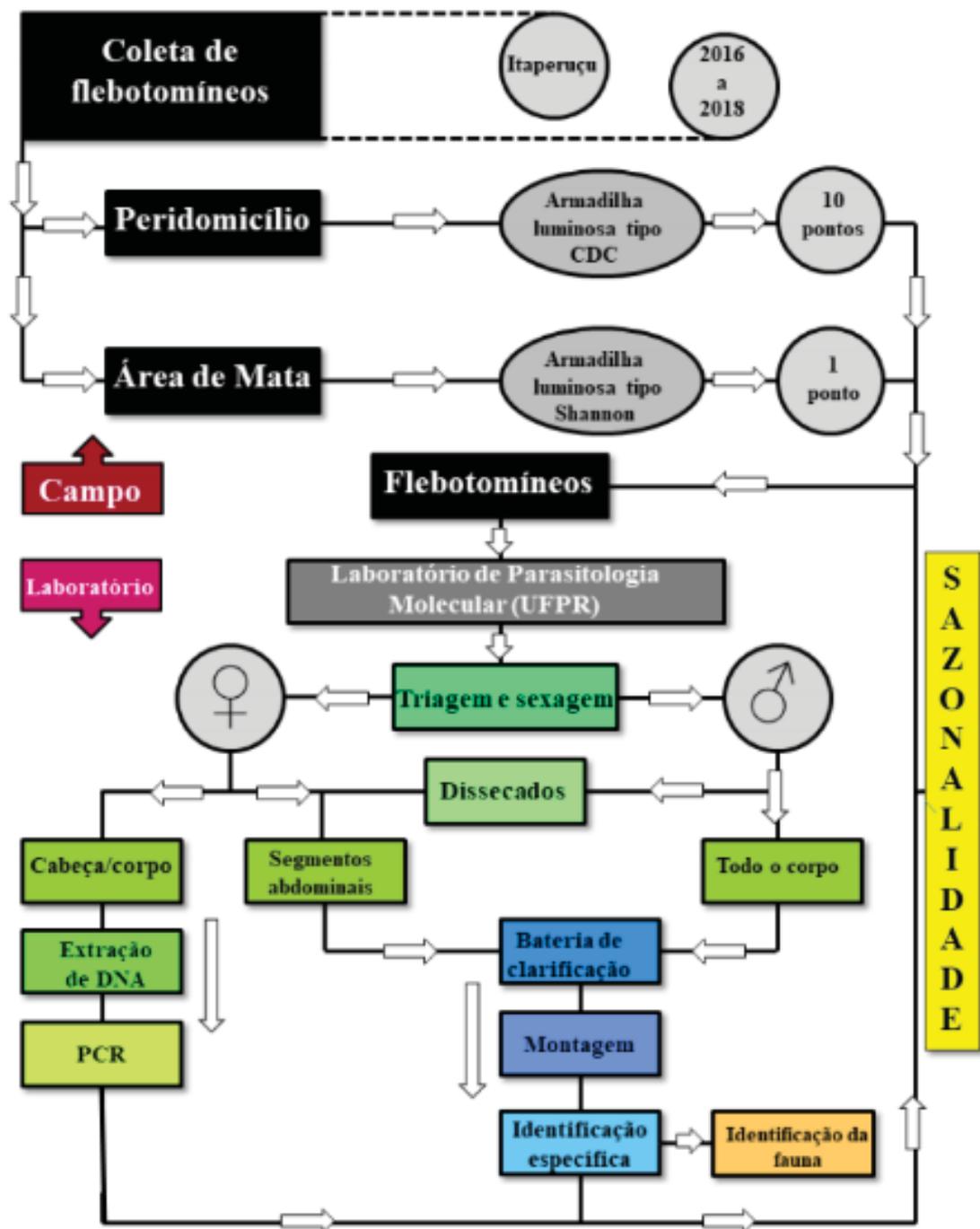


Figura 6: Fluxograma ilustrando as etapas de desenvolvimento da presente pesquisa até os resultados finais.



Figura 7: Mapa do Brasil apontando o estado do Paraná com destaque para o município de Itaperuçu (Elaboração: Salvador P. Chaves-Júnior)

3.3 COLETA, ACONDICIONAMENTO E MONTAGEM DOS FLEBOTOMÍNEOS

As coletas foram realizadas utilizando armadilhas luminosas do tipo CDC modificada (<http://www.horstarmadilhas.com.br/>) e armadilha de Shannon (SHANNON 1939) (**Figura 8**), no período de 2 (dois) anos (junho/ 2016 a junho/ 2018) para sazonalidade. Para análise de infecção natural, considerou-se os espécimens do período de maio de 2017 a julho de 2018. As armadilhas CDCs foram instaladas durante três dias consecutivos, por 24 meses no peridomicílio de 10 residências a 1m ou 1,5m do solo (altura entre a base da armadilha e o solo). As mesmas permaneceram ligadas por 12 horas (18:00 - 06:00) gerando um esforço amostral de 8.016 horas de captura (excluindo 624 horas ou 52 armadilhas que estavam desligadas). As coletas com armadilha de Shannon foram realizadas uma vez ao mês em área de mata, durante três horas gerando um esforço amostral de 60 horas de captura (excluindo 12 horas ou 4 armadilhas). Para instalação das armadilhas priorizou-se residências notificadas com casos humanos de LTA. A descrição dos pontos de coleta (P1 a P10) encontra-se no **APÊNDICE I** e algumas fotos dos mesmos podem ser observadas no **APÊNDICE II**. A instalação das armadilhas seguiu o preconizado pelo Programa Nacional de Controle das Leishmanioses do Ministério da Saúde do Brasil.

De cada ponto de coleta foi retirada a coordenada geográfica (latitude e longitude), a distância (em metros) entre os mesmos e entre as armadilhas tipo CDC (metros) (**Figura 9, Tabela 3**) utilizando uma GPS marca Garmim[®], modelo eTrex 10. Os espécimes coletados foram devidamente identificados e armazenados em álcool 70%. Foram organizados considerando: o ambiente (peridomicílio/mata); tipo de armadilha (shannon/CDC), ponto; ano/mês/dia de coleta (Tabela 2). Foram transportados para o Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (DPAT/BL/UFPR).

Os flebotomíneos foram triados (morfologia externa) e sexados observando a porção final do abdômen sob microscópio estereoscópico e posteriormente, acondicionados em tubos (1,5mL) contendo álcool 70%, com as etiquetas de identificação correspondentes àquelas informações de campo. Os mesmos foram mantidos a -20°C até o momento de dissecação e identificação em nível de espécie.



Figura 8: Armadilhas luminosas do tipo CDC modificada (A) e de Shannon (B) dispostas em peridomicílio e área de mata, respectivamente, para a coleta de flebotomíneos. (Foto: Andrey Andrade)



Figura 9: Pontos de coleta (P1 a P10) em peridomicílio no município de Itaperuçu, Paraná. (Elaboração: Salvador P. Chaves-Júnior).

Tabela 3: Pontos de coleta utilizando armadilhas tipo CDC, com suas coordenadas geográficas, a distância entre as armadilhas e a elevação do ponto escolhido no município de Itaperuçu, Paraná.

Ponto	Coordenadas Geográficas		Distância entre as armadilhas	Elevação	
	(P)	Latitude (S)			Longitude (W)
P1		25° 03' 22,2"	49° 33' 11,8"	0	432
P2		25° 03' 16,5"	49° 33' 09,7"	300	463
P3		25° 03' 09,8"	49° 33' 13,3"	200	461
P4		25° 03' 04,0"	49° 33' 39,1"	200	433
P5		25° 03' 35,1"	49° 33' 40,6"	2.300	437
P6		25° 04' 07,9"	49° 34' 02,4"	2.400	550
P7		25° 04' 13,1"	49° 34' 09,4"	200	584
P8		25° 04' 21,6"	49° 34' 24,2"	700	614
P9		25° 04' 52,6"	49° 34' 43,1"	1.600	707
P10		25° 05' 09,4"	49° 34' 32,0"	700	707

* Distância P1-P2: 300m; P2-P3: 200 m; P3-P4: 200 m; P4-P5: 2.300 m; P5-P6: 2.400 m; P6-P7: 200; P7-P8: 700; P8-P9: 1.600; P9-P10: 700.

3.4 MONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS

Para identificação específica, todos os machos, coletados durante os 2 (dois) anos, foram clarificados conforme Forattini (1973), como descrito: 1) permaneceram 24 horas em Hidróxido de Potássio (KOH); 2) lavados em ácido acético 10% por 5 segundos; 3) imersos por 10 minutos em ácido acético 100%; 4) em seguida foi realizada a imersão em progressivas concentrações de álcool (70%, 80%, 90% e 100%) por 10 minutos, cada; 5) para clarificação foram acondicionados em Eugenol (MERCK®) por 24 horas (**Figura 10**). Parte das fêmeas coletadas (04/2016 a 04/2017) seguiu o mesmo procedimento de clarificação dos machos, para identificação específica, as quais não foram utilizadas para biologia molecular. Esse procedimento foi importante para se conhecer a fauna do município.. As fêmeas coletadas no período de 05/2017 a 07/2018 foram dissecadas onde os três últimos seguimentos do abdômen foram retirados e o restante do corpo (cabeça, tórax, asas, pernas e parte do abdômen) foi acondicionado em tubos contendo álcool 70% e estocado a -20°C para realização das análises moleculares (**ver item 3.5**).

Os flebotomíneos foram identificados utilizando a proposta de Galati (2018) e a abreviação dos gêneros segue o proposto por Marcondes (2007).

3.5. INFECÇÃO NATURAL

3.5.1. EXTRAÇÃO DE MATERIAL GENÔMICO DOS FLEBOTOMÍNEOS

Para a extração do material genômico foram utilizadas somente fêmeas coletadas entre os meses de maio de 2017 a julho de 2018 (**ver item 3.4**). Os flebotomíneos (fêmeas) foram separados de 1 a 10 espécimes por *pool* em relação ao ponto, armadilha, espécie e data da coleta. As fêmeas, já separadas em *pools*, foram maceradas em tubo (1,5mL) com tampão de lise (TE - 10 mM Tris-HCl pH 9,2 contendo 10 mM de ácido etileno diamina tetra acético (EDTA) e 100 µg/mL de proteinase K (INVITROGEN®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) com auxílio de ponteira e incubadas por 3 horas a 56°C. Na sequência as amostras foram submetidas à centrifugação de 13.500 rpm por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante recuperado foi aquecido a 95°C por 15 minutos para inativação da proteinase e, armazenado a -20C° até o momento da extração do DNA total (PITA-PEREIRA *et al.* 2005).

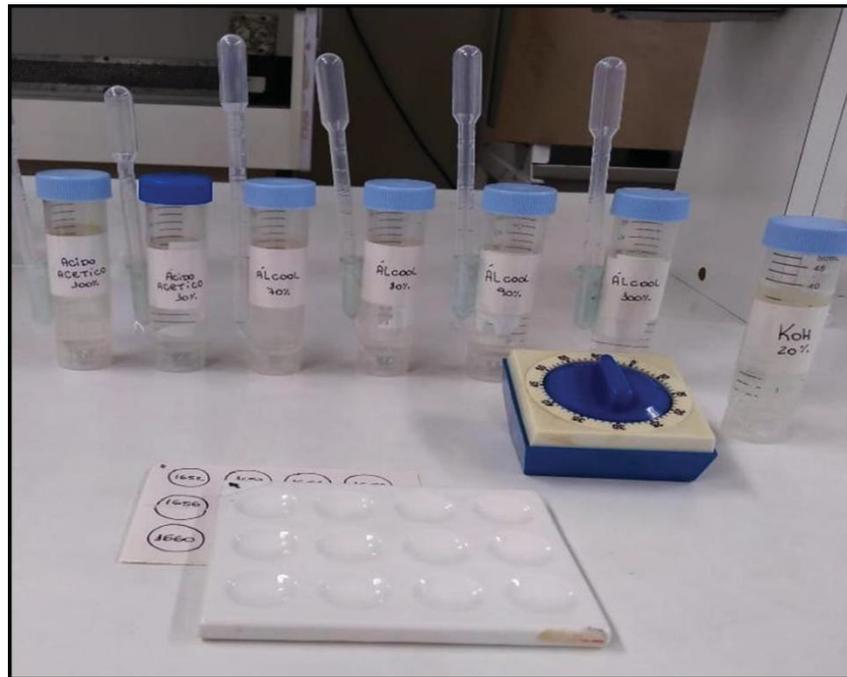


FIGURA 10 -Bateria de clarificação para identificação dos flebotomíneos. (Foto: a autora).

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit comercial Wizard SV Genomic DNA Purification System (PROMEGA[®], Madison, WI, EUA), seguindo as especificações do fabricante. Um volume correspondente a 100 µL do sobrenadante de cada *pool* foi submetido à extração do DNA o qual foi eluído em 50µL de água *DNase free* aquecida a 72°C, conforme indicação do fabricante. Em seguida foi mensurada sua concentração por densidade ótica (DO) a 260nm (A260) e 280nm (A280) e pureza pela relação A260/A280 e A260/A230 segundo Sambrook *et al.* (1989) em espectrofotômetro NanoDrop (TM. 1000).

Após essa etapa, foram feitas duas alíquotas (estoque e de trabalho) e ambas foram armazenadas a -20° C. A extração de DNA foi realizada no laboratório NB2 do Departamento de Patologia Básica da UFPR, devidamente adequado, com a bancada descontaminada com hipoclorito de sódio (5%), álcool 70% e sem amplificação de DNA no mesmo ambiente. Todo material utilizado foi autoclavado e exposto à exposição a raios ultravioleta em Fluxo Laminar com UV (VECOTM).

3.5.2. DETECÇÃO DA PRESENÇA DE DNA DE *Leishmania* spp.

Após a extração do DNA, para investigar a infecção natural por *Leishmania* spp., as amostras foram submetidas à PCR Multiplex. Para a amplificação da região constante no minicírculo do kDNA do gênero *Leishmania* foi utilizado o par de “primer” A: 5’ (G/C)(G/C)(C/G) CC(A/C) CTA T(A/T)T TAC ACC AAC CCC 3’ e “primer” B: 5’ GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA 3’(PASSOS *et al.*1996) (**Figura 11**). O segundo par de “primers” 5Llac: 5’GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3’e 3Llac: 5’CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC 3’ (LINS *et al.* 2002) é direcionado ao gene constitutivo “*Cacophony*” que é específico para flebotomíneos, sendo este utilizado como controle endógeno da extração (PITA-PEREIRA *et al.* 2009). A inclusão deste segundo par de iniciadores (gene *cacophony*) é para controle do DNA extraído (qualidade, pureza) e da PCR, evitando possíveis resultados falso negativos, pois todas as amostras (machos e fêmeas) de flebotomíneos devem amplificar o produto referente a esse alvo.

As reações ocorreram em um volume final de 50 µL, consistindo de GoTaq Hot Start Master Mix 1 X (Promega), 5 µM de cada primer, 5 µL de DNA e H₂O (ultrapura e estéril, grau Biologia Molecular) para completar o volume. A ciclagem térmica consistiu de 36 ciclos sendo realizada no aparelho modelo Gene Amp[®] PCR System 9700, com a seguinte programação, por ciclo: desnaturação (30 s, 94° C), anelamento (30 s, 55° C) e extensão (30 s, 72° C). Este programa foi precedido de uma etapa (12 min, 94° C) para ativação da

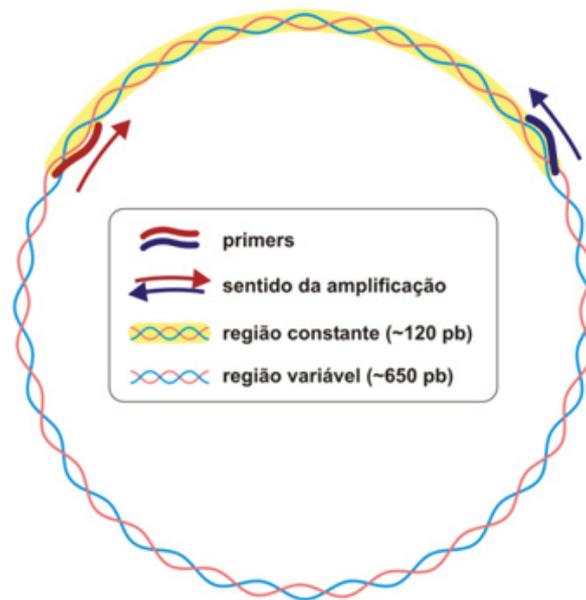


Figura 11: Representação esquemática estrutura de um minicírculo do kDNA de *Leishmania* spp (~800 pb), demonstrando o local de anelamento dos primers A e B e o sentido da amplificação pela PCR (Fonte: Dr. Daniela de Pita Pereira).

enzima (Hot Start) e após os 36 ciclos foi incluído um passo de extensão final (10 min, 72° C).

3.5.3. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os ensaios de eletroforese foram realizados em cuba horizontal, em géis de agarose (Seakem e NuSieve, FMC Bioproducts, Rockland, USA) a 2,0%, com dimensões de 12,5 x 20 cm, preparados em TBE (0,89 M Tris-HCl; 0,89 M ácido bórico; 0,024M EDTA, pH 8,3 - TBE 10X). Após a imersão do gel solidificado em tampão TBE, alíquotas contendo 10 µL do produto da PCR foram misturadas a 1 µL do tampão de aplicação de amostra (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol) e aplicadas no gel. A eletroforese foi conduzida por 2 h à 70 V. O peso molecular dos amplicons foi determinado pela inclusão do marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder – Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). O gel foi corado com Nancy-520 DNA Gel Stain (Sigma®) e após a corrida, os resultados foram registrados através de um sistema fotográfico de documentação em gel – UVP Bioimaging Systems (Upland, CA, USA) no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular do Departamento de Patologia Básica da UFPR.

3.6. DADOS CLIMÁTICOS

Os dados climáticos pluviosidade (mm), umidade relativa (%), temperatura (°C) do município de Itaperuçu/Cerro Azul durante os dois anos de coletas (2016-2018) foram obtidos mensalmente do SIMEPAR (Sistema Meteorológico do Paraná). Como não há dados para Itaperuçu, foi utilizado aqueles fornecidos para o município de Cerro Azul. Para aferir a interferência desses fatores abióticos na fauna flebotômica foram calculadas as médias de cada dado.

3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após verificar a normalidade dos dados e para critério de decisão foram aplicados o Teste t de Student (distribuição normal) ou Mann-Whitney (distribuição não-normal) quando comparadas duas variáveis. Acima de duas, após análise da Normalidade aplicou-se o ANOVA ou Kruskal-Wallis para amostras paramétricas e não paramétricas, respectivamente. Para avaliar a interferência dos fatores abióticos na distribuição da fauna e cada uma das

espécies mais abundantes, também após análise da Normalidade dos dados, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman (r_s). Para todas as análises os dados foram considerados significativos levando em conta o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Foi utilizado o pacote estatístico BIOESTAT Versão 5.0 (AYRES *et al.* 2007). Os meses em que não foram capturados flebotomíneos foram excluídos das análises.

3.8. VARIÁVEIS DE ESTUDO

Os dados analisados foram: i) abundância (quantidade de espécimes e/ou espécies por mês); ii) variação sazonal (distribuição dos espécimes e/ou espécies em relação aos fatores abióticos); iii) sexo (macho ou fêmea); iv) armadilhas utilizadas (CDC e Shannon); v) pontos de coleta (peridomicílio ou área de mata); vi) fêmeas com presença de DNA de *Leishmania*.

A taxa de infecção natural (detecção de DNA de *Leishmania* spp.) de flebotomíneos foi dada a partir do cálculo do número de *pools* ou número de flebotomíneos dissecados positivos/ número total de flebotomíneos x 100, onde é pressuposto que ao menos uma fêmea dentre as que compõe o *pool* observado contenha DNA de *Leishmania* spp.(VASCONCELOS *et al.* 2019).

Aplicou-se ainda, o índice de constância dos flebotomíneos que foi calculado à partir da fórmula: $C = P \cdot 100 / N$ (SILVEIRA NETO *et al.* 1976) (P = número de coletas com a espécie estudada e N = número total de coletas efetuadas) classificando as espécies em constantes, acessórias ou acidentais em relação a presença das mesmas nas armadilhas/ locais de captura, sendo que as espécies foram consideradas como constantes uma vez que estivessem presentes em mas de 50% das coletas, acessórias com presença de 50 % nas coletas e acidentais quando observadas em menos de 50% das capturas realizadas.

4. RESULTADOS

4.1 ASPECTOS GERAIS DA FAUNA FLEBOTOMÍNICA DO MUNICÍPIO DE ITAPERUÇU

Durante o período de estudos (2 anos) foram coletados um total de 3.784 flebotomíneos distribuídos em 7 (sete) gêneros e 13 espécies (**Tabela 4**). O número de machos capturados, independente da armadilha utilizada, foi de 1.225 (34% do total) (**Figura 12**). A razão sexual entre fêmeas e machos (F/M) foi de 2:1 (Mann-Whitney, $p > 0,05$) sendo que para as três espécies mais abundantes o número de fêmeas foi superior ao número de machos, somados todo o período de coleta. Apenas em outubro, novembro, dezembro de 2016 e fevereiro de 2017 o número de machos superou o número de fêmeas (**Tabela 4**). Por outro lado, entre as 13 espécies capturadas, os machos apresentaram maior riqueza ($n = 12$ spp.) do que as fêmeas ($n = 8$ spp.). Interessante notar que a flutuação populacional quando observada por sexo foi a mesma (**Figura 13**), ou seja, se havia o aumento de fêmeas, havia também o de machos; o mesmo vale para diminuição, o que demonstrou um comportamento semelhante da fauna independente da armadilha utilizada e dos fatores abióticos associados. Não foi observada diferença significativa quando comparada a captura mensal de flebotomíneos (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

Analisando as coletas por ano observa-se que não houve interferência das capturas mensais sucessivas na fauna estudada. No ano de 2016 (junho-dezembro) foram obtidos 1.387 espécimes, em 2017 (janeiro-dezembro) 1.717 espécimes e 2018 (janeiro-julho) 680 espécimes (Kruskal-Wallis $p > 0,05$) (**Figura 14**). A maior riqueza de espécies foi observada nos meses de dezembro/2017 (8 espécies) e novembro/2016 e fevereiro/2018 com 5 (cinco) espécies cada. Nos demais meses a presença variou de 1 (uma) a 4 (quatro) espécies (**Figura 15**). O gênero *Brumptomyia* teve maior riqueza, com 6 (seis) espécies, seguido pelo gênero *Psathyromyia*, com 2 (duas) espécies. Todos os demais somaram 1 (uma) espécie cada. *Brumptomyia bragai* foi registrada pela primeira vez no Vale do Ribeira e no estado do Paraná.

Nyssomyia neivai foi a espécie mais frequente totalizando 3.556 espécimes ou 93% dos espécimes de flebotomíneos coletados durante o período; seguido por *Pi. fischeri* e *Mg. migonei* com 142 (4%) e 36 espécimes (1%), respectivamente. *Expapillata firmatoi*, *Psathyromyia pascalei*, *Pa. pelsoni*, *Br. troglodytes*, *Br. bragai*, *Br. avellari*, *Br. brumpti*,

Tabela 4: Total de Flebotomíneos coletados no período de 2016 a 2018, município de Itaperuçu, Paraná.

Anos	Meses	Ny. nysomyia		Pi. pintomyia		Mg. migonemyia		Ex. expapillata		Br. brumptomyia		Ps. psychodopygus		Pa. psathyromyia				
		Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	
2016	Junho	4	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Julho	9	171	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Agosto	86	208	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Setembro	113	499	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Outubro	7	4	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Novembro	58	39	1	1	2	4	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Dezembro	78	59	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Janerio	23	18	-	-	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Fevereiro	133	108	1	1	1	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Março	56	67	-	-	10	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Abril	125	127	-	-	5	3	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2017	Maio	1	91	-	-	8	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Junho		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Julho		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Agosto		61	101	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Setembro		125	262	2	3	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Outubro		7	11	-	-	5	-	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	
Novembro		27	21	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dezembro		110	138	-	-	10	1	-	1	7	10	1	-	-	-	-	-	
Janerio		1	4	-	-	1	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
Fevereiro		122	273	5	73	-	9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Março		2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2018		Abril	17	79	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Maiio	16	60	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	
	Junho	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Julho	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Total	1182	2374	9	133	11	25	8	9	8	11	1	0	1	0	1	0	1

Legenda - Ny: Nyssomyia; Pi: Pintomyia; Mg: Migonemyia; Ex: Expapillata; Br: Brumptomyia; Pa: Psathyromyia; Ps: Psychodopygus.

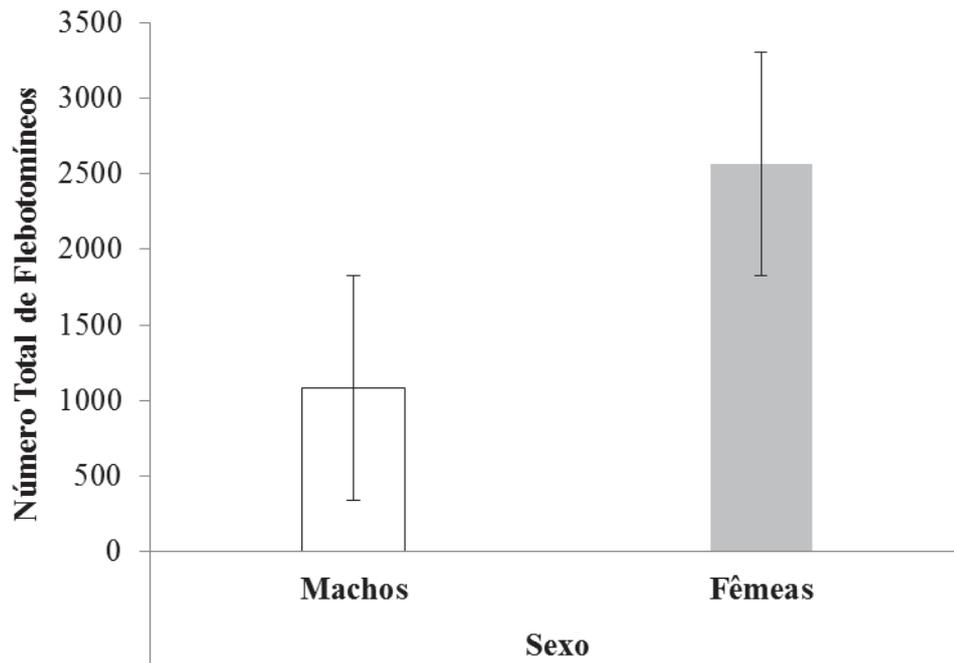


Figura 12: Machos e fêmeas de flebotomíneos capturados em área de peridomicílio e área de mata, município de Itaperuçu, Paraná (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

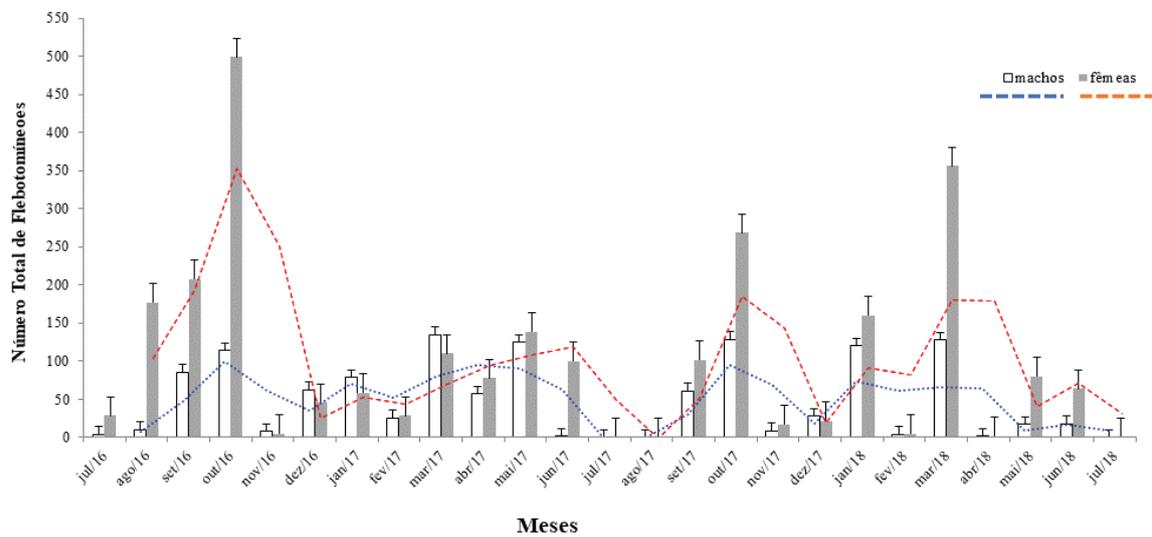


Figura 13: Flutuação populacional de flebotomíneos capturados em área de peridomicílio e área de mata, município de Itaperuçu, Paraná (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

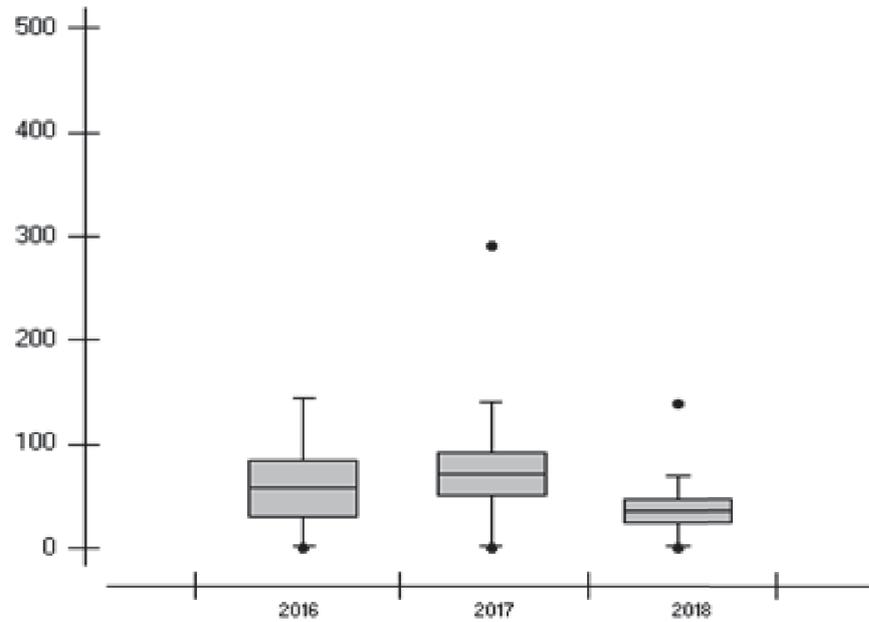


Figura 14: Machos e fêmeas de flebotomíneos capturados em área de peridomicílio e área de mata, município de Itaperuçu, Paraná (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

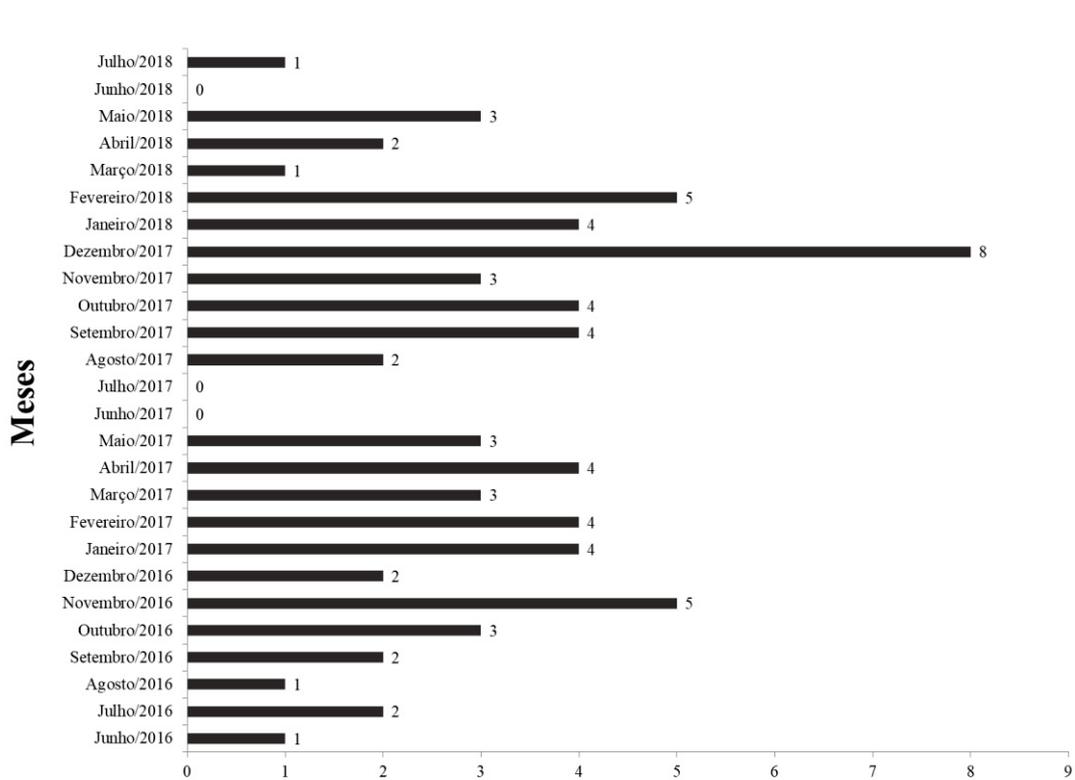


Figura 15: Riquezamensal de flebotomíneos capturados em área de peridomicílio e área de mata município de Itaperuçu, Paraná.

Br. cunhai, *Br. nitzulescui* e *Ps. ayrozai* somaram as outras espécies em um total de 51 indivíduos (1%). Ainda, *Ny. neivai* foi a única espécie entre as demais que esteve presente em todos os meses de coleta. Quando observado os meses de agosto e setembro, de ambos os anos, a mesma representou 40% do total de espécimes coletados. A espécie *Pi. fischeri* esteve presente durante 15 dos 24 meses de estudo, sendo que 78 espécimes foram capturados em fevereiro de 2018, perfazendo 50,6% do total de flebotomíneos coletados desta espécie. No mesmo período, foi observado o maior número de espécimes de *Mg. migonei*, que esteve presente em 13 meses durante o estudo (**Tabela 4**).

Através do índice de constância (C) as espécies foram classificadas em constantes, acessórias ou acidentais. Assim, analisando a **Tabela 4** observa-se que duas espécies foram encontradas em mais de 50% das coletas, sendo consideradas constantes, foram elas: *Ny. neivai* (C=88,46) e *Pi. fischeri* (C = 57,69). A espécie *Mg. migonei*, por ter (C = 50) foi considerada acessória, as outras 10 espécies capturadas durante o tempo de estudo foram consideradas acidentais

4.2 ANÁLISE DA FAUNA FLEBOTOMÍNICA DO MUNICÍPIO DE ITAPERUÇU POR ARMADILHA.

Quando comparado o total de flebotomíneos por armadilha, observou-se que as CDCs, em conjunto, coletaram 3.156 espécimes e as armadilhas de Shannon foi de 628 espécimes, sendo que aquela apresentou um número de capturas 6 (seis) vezes maior que esta (Mann-Whitney, $p < 0,05$) (**Tabela 5**). Cabe destacar que dez (10) CDCs permaneceram ligadas por 12 horas (18:00 - 06:00), gerando um esforço amostral de 8.016 horas de captura. As coletas com armadilha de Shannon, durante três horas, geraram um esforço amostral de 60 horas de captura (ver item 3.3).

As capturas realizadas com armadilhas do tipo Shannon foram mais abundantes durante o primeiro ano de coleta (2016), o mesmo padrão não foi observado para as armadilhas CDCs, que capturaram mais espécimes no ano de 2017. As espécies mais abundantes e frequentes (*Ny. neivai*, *Pi. fischeri*, *Mg. migonei* e *Ex. firmatoi*) foram coletadas por ambas as técnicas e nota-se nítida concentração dessas no ambiente peridomiciliar, embora as mesmas ocorram em área de mata, como registrado. As espécies *Br. avellari*, *Br. nitzulescui* e *Ps. ayrozai* foram coletadas somente na armadilha de Shannon e *Br. troglodytes*, *Br. brumpti*, *Br. bragai*, *Br. cunhai*, *Pa. pascalei* e *Pa. pelli* pelas CDCs, reforçando o uso de distintas armadilhas para se investigar a fauna desses insetos, em acréscimo é visto que pela proximidade com as

habitações humanas, as espécies que foram coletadas pelas armadilhas CDC mesmo não sendo incriminadas como vetoras. merecem em termo de serviço, destaque

Tabela 5- Total de flebotomíneos coletados em armadilhas de CDC e Shannon durante junho de 2016 a julho de 2018- Itaperuçu –PR.

Ano	Mês	Espécie												Total	
		<i>Ny. neivai</i>	<i>Pi. fischeri</i>	<i>Mg. migonei</i>	<i>Ev. firmatoi</i>	<i>Br. troglodytes</i>	<i>Br. brumpti</i>	<i>Br. avellari</i>	<i>Br. bragai</i>	<i>Br. cunhai</i>	<i>Br. nitulescui</i>	<i>Pa. pascali</i>	<i>Ps. pelloni</i>		<i>Ps. ayroozai</i>
CDC	2016	Junho	31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31
	Julho	55	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	62	
	Agosto	294	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	294	
	Setembro	239	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	239	
	Outubro	11	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	13	
	Novembro	83	2	6	3	-	-	-	-	-	-	-	-	94	
	Dezembro	129	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	130	
	2017	Janeiro	35	9	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	49
	Fevereiro	241	1	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	245
	Março	107	9	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	118
	Abril	252	5	3	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	264
	Maio	92	8	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	101
Junho	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
Julho	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
Agosto	159	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	160	
Setembro	387	5	5	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	398	
Outubro	16	4	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	22	
Novembro	43	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	45	
Dezembro	247	9	1	-	17	1	-	1	-	-	-	-	-	276	
2018	Janeiro	4	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	7	
Fevereiro	391	70	9	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	472	
Março	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	
Abril	58	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	59	
Maio	68	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	73	
Junho	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Julho	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Total		2946	130	35	15	19	1	1	1	1	7	1	1	3156	
SHANNON	2016	Junho	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	Julho	125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	125
	Agosto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Setembro	373	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	374
	Outubro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Novembro	14	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	15
	Dezembro	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
	2017	Janeiro	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
	Fevereiro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Março	16	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17
	Abril	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Maio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Junho	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Julho	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Agosto	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	Setembro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	Outubro	2	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
	Novembro	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
	Dezembro	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	4
	2018	Janeiro	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	Fevereiro	4	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12
	Março	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Abril	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	38
	Maio	8	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	9
Junho	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Julho	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	
Total		610	12	1	2	0	0	1	0	0	1	0	0	628	

Legenda - *Ny*: Nyssomyia; *Pi*: Pintomyia; *Mg*: Mignonemyia; *Ex*: Expapillata; *Br*: Brumptomyia; *Pa*: Psathyromyia; *Ps*: Psychodopygus.

4.3 ANÁLISE DA FAUNA FLEBOTOMÍNICA DO MUNICÍPIO DE ITAPERUÇU POR SÍTIO AMOSTRAL (PONTO DE COLETA).

Com relação aos pontos de captura com CDC em peridomicílio (**APÊNDICE I**), o ponto P2 foi o que durante o estudo teve o maior número de flebotomíneos coletados (897), seguido pelo P1 (719), P4 (435) totalizando 2.051 (64,9%) espécimes. A somatória de capturas dos outros 7 (sete) pontos foi de 1.111(35,1%). Os pontos de coleta P4 (519) e P5 (70) em área de mata utilizando armadilhas do tipo Shannon totalizaram 589 (94,5%) espécimes capturados, os outros oito (8) pontos somaram juntos 33 espécimes, resultando 5,5% do total coletado (**Tabela 6**).

Em peridomicílio a espécie *Ny. neivai* foi capturada em todos os pontos de coleta, sendo 778 espécimes coletados no ponto P2 durante os anos 2016 e 2017, totalizando 32,1% do total de flebotomíneos desta espécie coletados durante o mesmo período, em relação ao ano de 2018. O ponto de maior número de capturas de *Ny. neivai* (257) foi P1 em peridomicílio. Ao observar o total de espécimes coletados em área de mata, destaca-se a prevalência desta espécie em P4 (513) totalizando 84,1% do total de *Ny. neivai* durante os dois anos de estudo.

Em 2018, durante o mês de fevereiro, o ponto de coleta P6 obteve um total de 85 flebotomíneos coletados, sendo 91,8% destes *Pi. fischeri*, perfazendo 55% do total de espécimes coletados durante os dois anos de estudo. No mesmo mês e ano, a espécie *Mg. migonei* foi coletada em maior número no ponto P9 (13,9%), a mesma demonstrou uma distribuição mais homogênea entre os pontos, de modo diferente da observada para *Pi. fischeri*.

Durante os dois anos de captura observou-se que o ponto de maior quantidade de espécies em peridomicílio foi o P10 com 7 (sete) espécies, sendo quatro delas, capturadas exclusivamente neste ponto (*Br. troglodytes*, *Br. brumpti*, *Br. bragai* e *Br. cunhai*). A exclusividade de espécies capturadas por ponto também foi observada para *Pa. pelloni* (P2), *Br. avellari* (P2), *Br. nitzulescui* (P10) e *Psychodopygus ayrozai* (P10 em área de mata).

4.4 SAZONALIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS NO MUNICÍPIO DE ITAPERUÇU

As associações entre a frequência dos espécimes de flebotomíneos capturados, independente de sítios de capturas e armadilhas, com a variação da temperatura, pluviosidade e umidade relativa encontram-se representadas na **Figura 16**. Nos meses que compreendem o ano de 2016 (junho-dezembro) nitidamente observa-se que com o aumento mensal da

Tabela 6. Número de flebotomíneos coletados em armadilhas CDC e Shannon por ponto de coleta (P) no município de Itaperuçu no período de julho de 2016 a junho de 2018.

	Espécies	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	Total
CDC	<i>Ny. neivai</i>	707	867	316	430	181	81	137	119	71	41	2950
	<i>Pi. fischeri</i>	1	7	4	3	2	1	15	2	85	10	130
	<i>Mg. migonei</i>	4	8	7	2	-	-	2	2	8	2	35
	<i>Ev. firmatoi</i>	-	12	3	-	-	-	-	-	-	-	15
	<i>Br. troglodytes</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	18	19
	<i>Br. brumpti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
	<i>Br. bragai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
	<i>Br. cunhai</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>Br. avellari</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>Br. nitzulescui</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
	<i>Pa. pascalei</i>	6	-	1	-	-	-	-	-	-	-	7
	<i>Pa. pellowi</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	<i>Ps. ayrozai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Total-CDC	719	897	331	435	183	82	155	123	164	73	3162
	SHANNON	<i>Ny. neivai</i>	2	16	-	518	64	-	-	-	-	6
<i>Pi. fischeri</i>		-	1	-	-	6	-	-	-	-	5	12
<i>Mg. migonei</i>		-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>Ev. firmatoi</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
<i>Br. troglodytes</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Br. brumpti</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Br. bragai</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Br. cunhai</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Br. avellari</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Br. nitzulescui</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pa. pascalei</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pa. pellowi</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ps. ayrozai</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Total-Shannon		2	17	-	519	70	-	-	-	-	14	622

Legenda: *Ny*: *Nyssomyia*; *Pi*: *Pintomyia*; *Mg*: *Migonemyia*; *Ex*: *Expapillata*; *Br*: *Brumptomyia*; *Pa*: *Psathyromyia*; *Ps*: *Psychodopygus*.

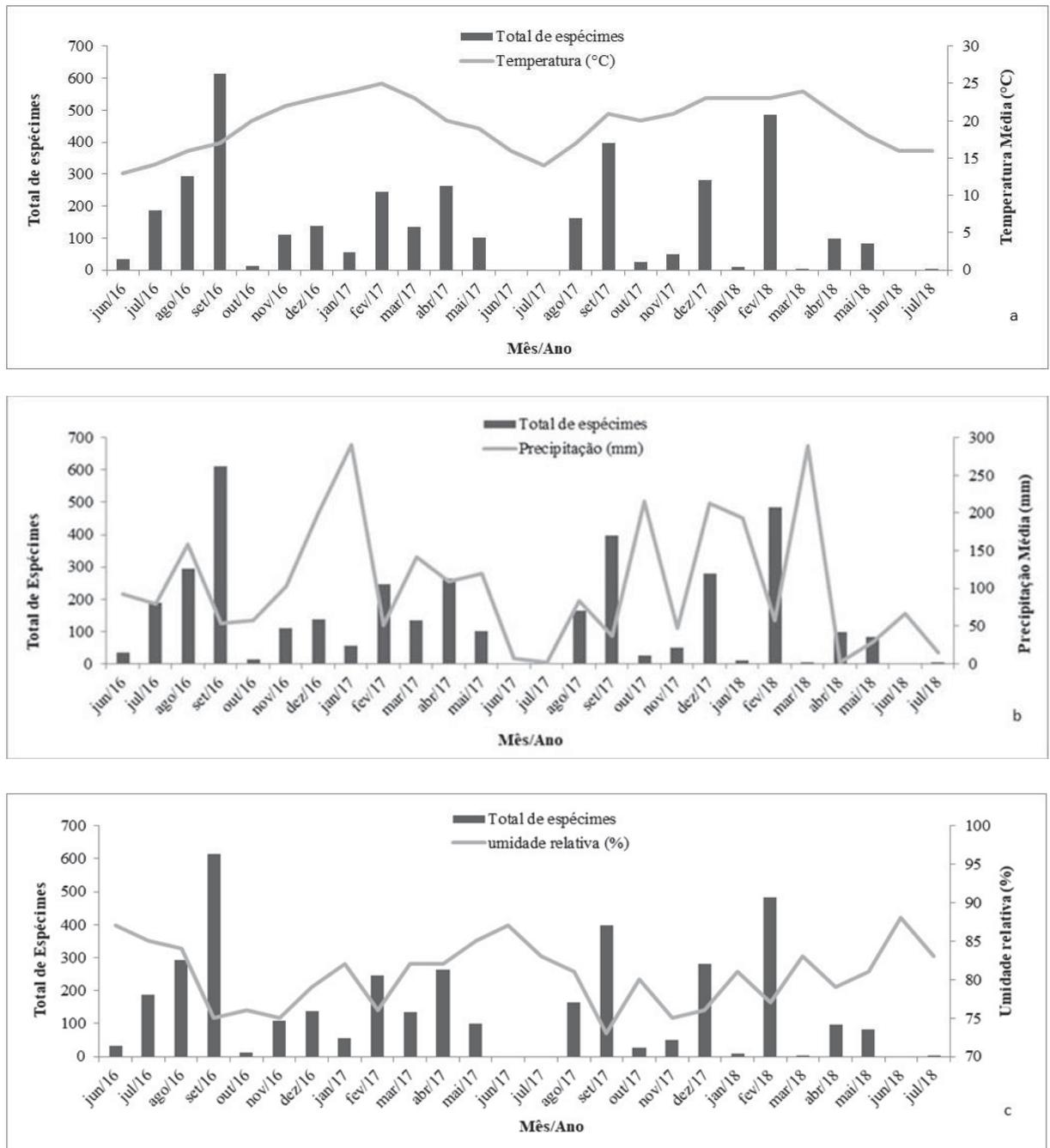


Figura 16: Espécimes de flebotômíneos coletados em relação às variáveis de temperatura média (a), Precipitação média (b) e Umidade relativa (c), entre junho de 2016 a julho de 2018, município de Itaperuçu, Paraná (Coeficiente de correlação de Spearman, $p > 0,05$).

temperatura que foi de 13°C (junho) a 17°C (setembro) obteve-se um aumento também no número de flebotomíneos coletados, de 33 a 613 espécimes, respectivamente.

Em contrapartida esse acréscimo de fauna esteve relacionado com a diminuição da umidade relativa do ar de 87% (junho) a 75% (setembro). Essas mesmas observações podem ser feitas para os meses de agosto e setembro do ano de 2017. Quando observada a precipitação nota-se que a flutuação populacional nesses meses aumentou em função da diminuição do volume de chuva no mês anterior. Os meses de junho (0 spp.) e, julho de 2018 (4 spp.), não foram possíveis analisar, visto que não houve número suficiente de flebotomíneos coletados.

Ainda no ano de 2016, considerando os meses de outubro, novembro e dezembro, observa-se, mesmo sendo menor, um aumento gradual no número de flebotomíneos coletados e com uma relação direta com aumento da temperatura, aumento na precipitação e com uma umidade relativa mais estável. De setembro a outubro, a temperatura chegou a 3°C, indo a 20°C e aumentando de 1 a 2°C nos meses seguintes; a precipitação chegou a 200 mm no mês de dezembro, valor muito superior ao mês de setembro (53mm). Quando se observa esses mesmos três meses finais do ano de 2017, a flutuação populacional foi semelhante, com aumento gradativo de outubro a dezembro, em função do aumento da temperatura (média de 22°C), aumento da precipitação nos meses anteriores que precediam a coleta e umidade relativa estável com média de 75%, igual a dos meses do ano precedente.

Tomando como referência os meses de janeiro a maio de 2017 (5 meses), o número de flebotomíneos foi maior nos meses de fevereiro (484 spp.) e, abril (97 spp.). Observando esses períodos e, comparando-os, tem-se a mesma flutuação dos espécimes, em um comportamento que oscila, mensalmente, entre queda e aumento na fauna.

Analisando a densidade populacional de flebotomíneos no mês de fevereiro de 2017, vê-se a relação desta com uma das temperaturas mais altas dos anos de trabalho (25°C), com uma queda de 6% na umidade relativa em relação ao mês de janeiro e, também, uma queda muito elevada na precipitação. Em janeiro, o volume de chuvas foi de 291 mm e, chegou a 51 mm, em fevereiro de 2017. O padrão dessas mesmas variáveis climáticas foi observado em fevereiro de 2018 onde o número de flebotomíneos coletados foi elevado (484 spp), sendo inferior, apenas, para aquele de setembro de 2016 (613 spp.).

No conjunto tem-se uma nítida sazonalidade da fauna flebotomínica no município de Itaperuçu, onde o aumento da fauna está relacionado com o aumento da temperatura, diminuição da umidade relativa do ar e da precipitação, nesse caso, no mês que antecede a esse aumento da fauna.

Quando observada a interferência das variáveis climáticas em relação às espécies mais abundantes, pode-se dizer que, essa flutuação populacional da fauna (**Figura 16**) é a mesma da espécie *Ny. neivai* (**Figura 17**). Essa afirmativa é corroborada por essa espécie representar 93% dos espécimes coletados. A sazonalidade de *Pi. fischeri* (**Figura 18**) foi marcada por elevadas temperaturas, baixos índices de umidade relativa e queda na precipitação, com destaque para o mês de fevereiro de 2018 onde 78 espécimes foram capturados. A presença de *Mg. migonei* (**Figura 19**) nas armadilhas parece estar associada ao aumento da temperatura, diminuição da umidade e baixa precipitação. No entanto, dado ao baixo número de espécimes capturados (36 spp.) trata-se apenas de uma hipótese.

A mesma observação feita para *Ny. neivai* aplica-se a possível influência dos fatores abióticos na eficácia das armadilhas CDCs (**Figura 20**). Em relação à armadilha de Shannon (**Figura 21**), julho e setembro de 2016 foram os meses com mais capturas, 125 e 374 espécimes, respectivamente. De novembro a dezembro de 2016, enquanto as variáveis climáticas mostravam um aumento na fauna, na armadilha de Shannon houve decréscimo de captura; o mesmo foi observado para janeiro de 2017. Nota-se ainda que, independente das variáveis climáticas, aparentemente a fauna em ambiente de mata é mais constante durante o segundo semestre dos anos estudados, ligada, principalmente ao aumento da temperatura. Não foi observada diferença estatística significativa entre a distribuição dos espécimes em relação aos fatores abióticos: temperatura ($r_s = 0,297$, $p = 0,2185$), precipitação ($r_s = -0,189$, $p = 0,353$) e umidade relativa ($r_s = -0,358$, $p = 0,072$).

Para *N. neivai* não foi observada interferência da temperatura, da precipitação e umidade relativa em relação a sazonalidade da espécie (Correlação de Spearman, $p > 0,05$). Por outro lado, a sazonalidade de *Mg. migonei* ($r_s = 0,549$, $p = 0,003$) e *Pi. fischeri* ($r_s = 0,547$, $p = 0,003$) foi dependente da temperatura, porém parece não sofrer com a influência das demais variáveis (Correlação de Spearman, $p > 0,05$).

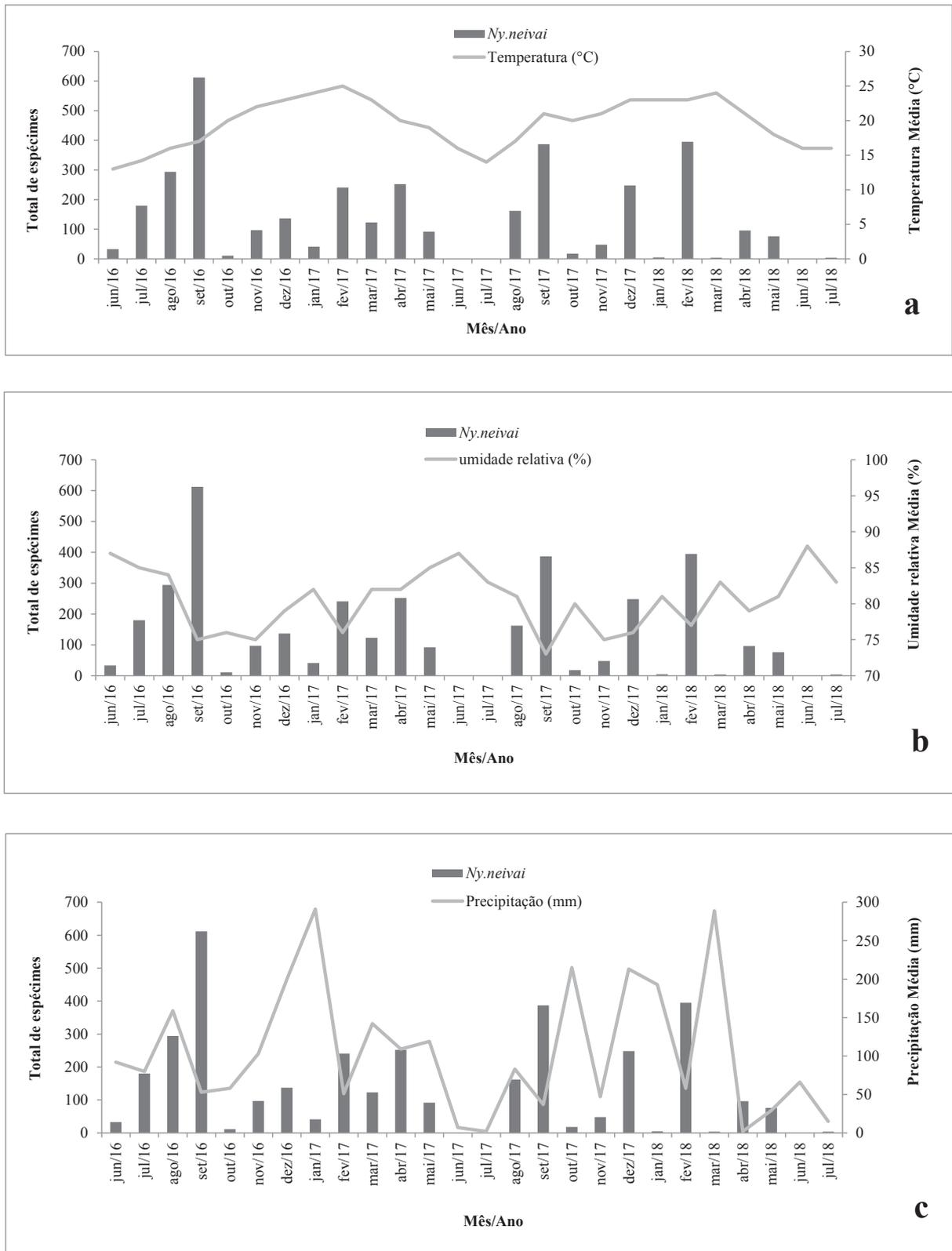


Figura 17: Espécimes de *Nyssomyia neivai* coletados em relação à variáveis de temperatura média (a), Precipitação média (b) e Umidade relativa (c), entre junho de 2016 a julho de 2018 no município de Itaperuçu, Paraná.



Figura 18: Espécimes de *Pintomyia fischeri* coletados em relação à variáveis de temperatura média (a), Precipitação média (b) e Umidade relativa (c), entre junho de 2016 a julho de 2018 no município de Itaperuçu, Paraná.



Figura 19: Espécimes de *Migonemyia migonei* coletados em relação à variáveis de temperatura média (a), Precipitação média (b) e Umidade relativa (c), entre junho de 2016 a julho de 2018 no município de Itaperuçu, Paraná.

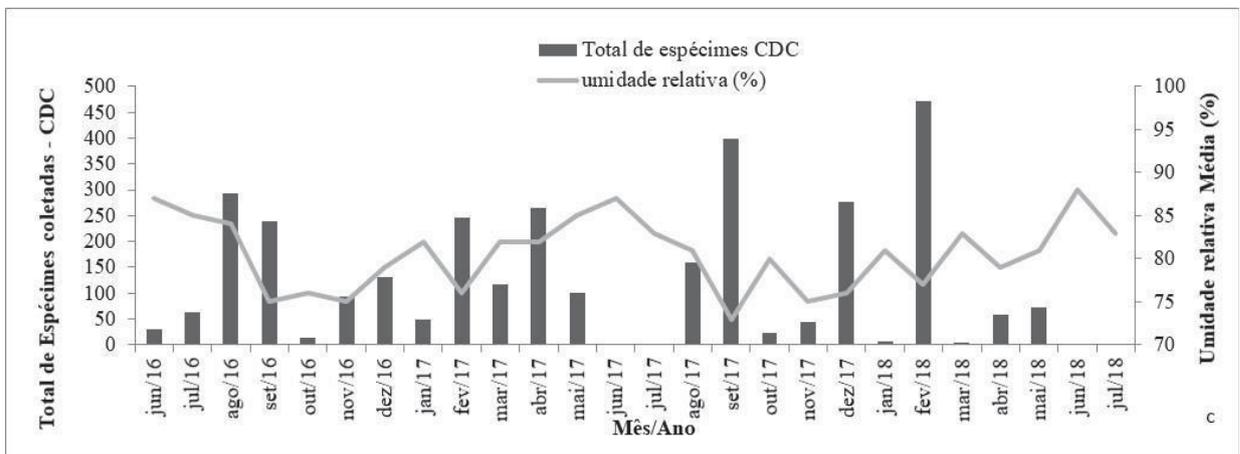
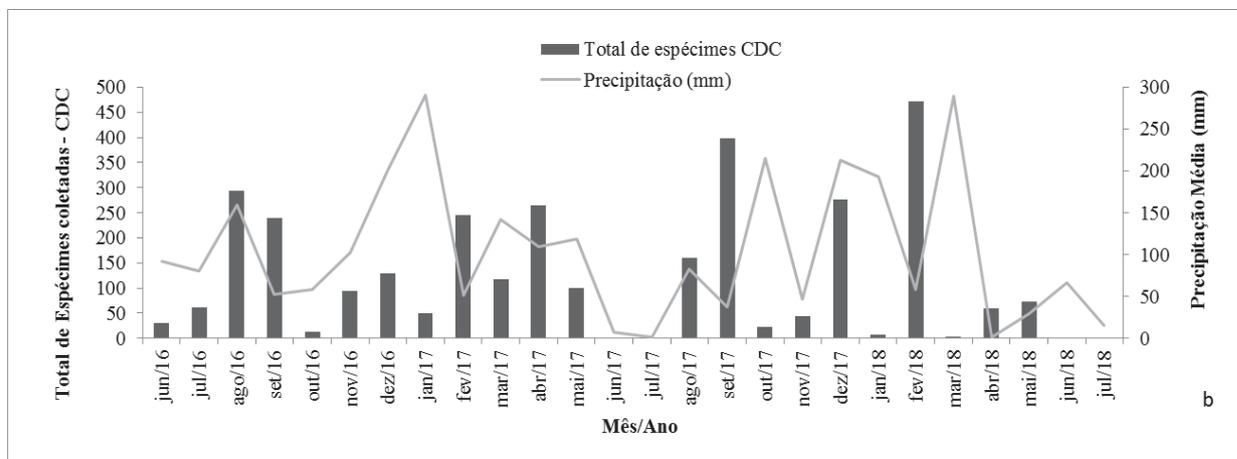
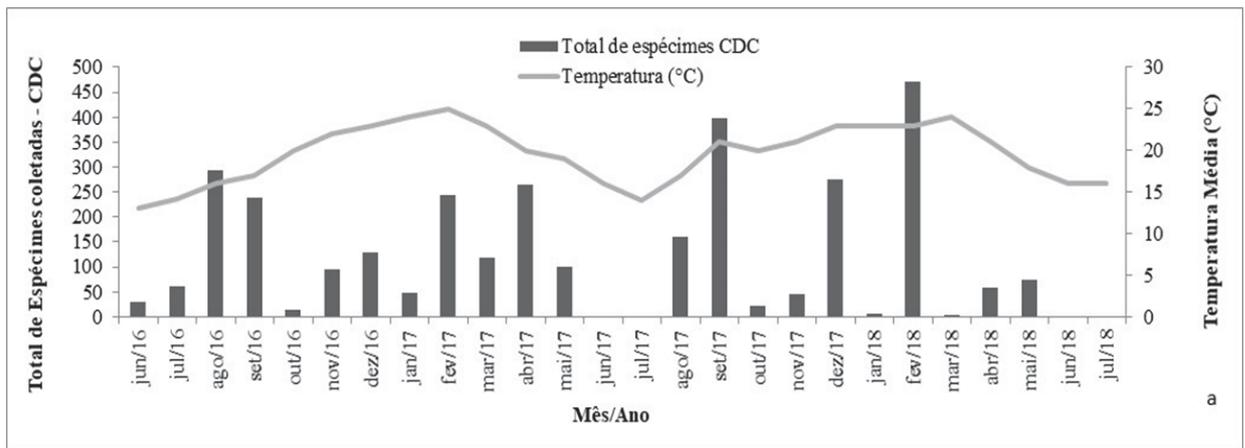


Figura 20: Espécimes de flebotômios coletados (armadilhas do tipo CDC) em relação à variáveis de temperatura média (a), Precipitação média (b) e Umidade relativa (c), entre junho de 2016 a julho de 2018 no município de Itaperuçu, Paraná.

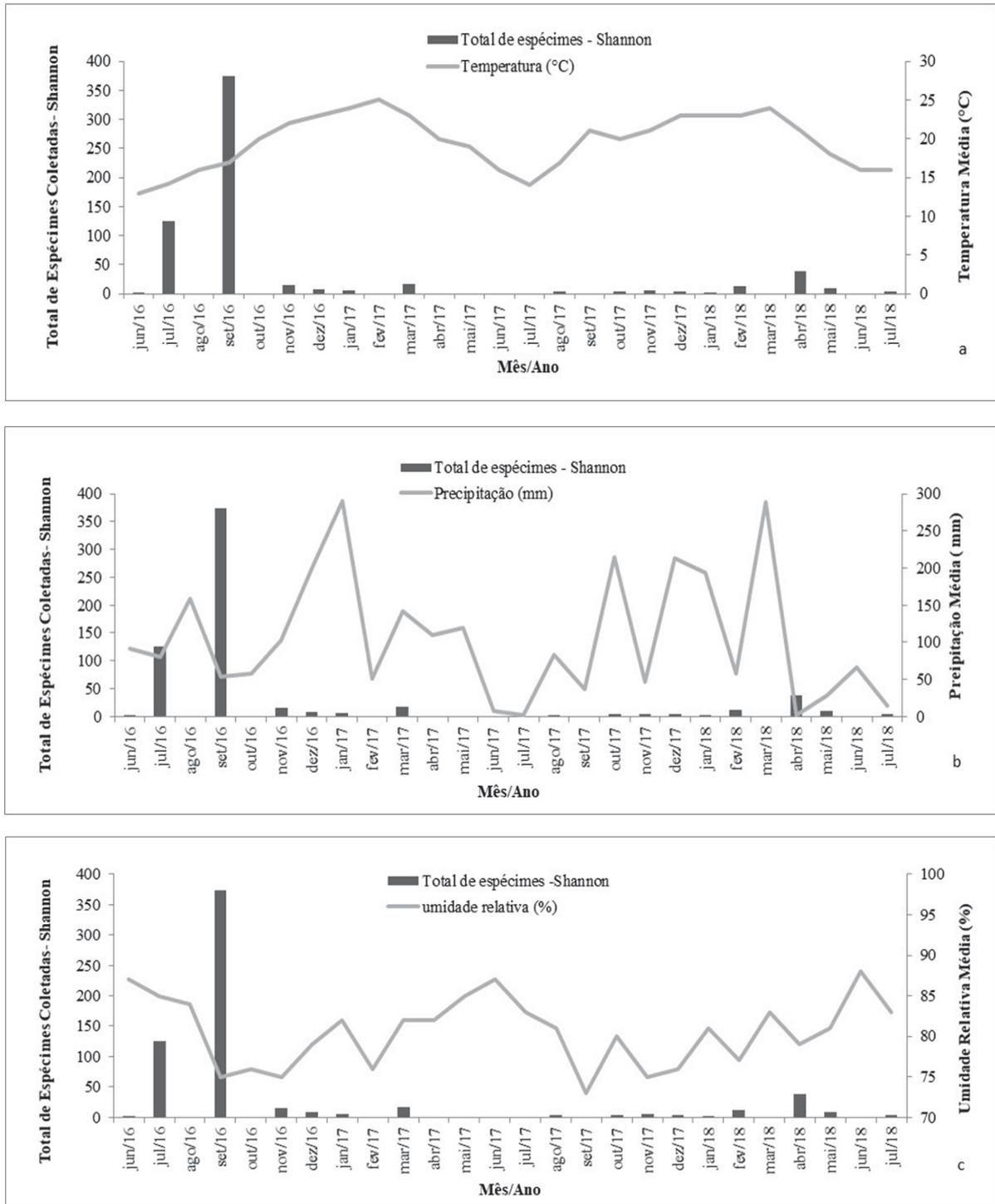


Figura 21: Espécimes de flebotomíneos coletados (armadilhas do tipo Shannon) em relação à variáveis de temperatura média (a), Precipitação média (b) e Umidade relativa (c), entre junho de 2016 a julho de 2018 no município de Itaperuçu, Paraná.

4.5. DETECÇÃO DE DNA DE *Leishmania*

Do total de espécimes obtidos nos meses de maio de 2017 a julho de 2018, um total de 176 *pools* de flebotomíneos (APÊNDICE III) foram utilizados para a pesquisa de infecção natural (Tabela 7). Das espécies analisadas, a espécie *Ny neivai* foi a mais abundante (88,62%), seguida por *Pi. fischeri* (9,2%), *Mg. migonei* (1,18), sendo que *Br. troglodytes* e *Ex. firmatoi* somaram juntas 1,01 % do total de fêmeas coletadas .

Tabela 7: Número total de fêmeas coletadas nos meses de maio de 2017 a julho de 2018 agrupadas em “*pools*” de até 10 espécimes Itaperuçu, Paraná, Brasil.

Espécies	Total de fêmeas (%)	Total de pools (%)
<i>Nyssomyia neivai</i>	1.051 (88,62)	143 (81,25)
<i>Pintomyia fischeri</i>	109 (9,2)	26 (14,77)
<i>Migonemyia migonei</i>	14 (1,18)	4 (2,27)
<i>Brumptomyia troglodytes</i>	11 (0,93)	2 (1,14)
<i>Expapillata firmatoi</i>	1 (0,08)	1 (0,56)
TOTAL (%):	1.186 (100)	176 (100)

Dentre as seis espécies analisadas, três (3) *pools* de *Ny. neivai* provenientes dos pontos de coleta P3 (1 *pool*, fêmeas capturadas durante o mês de dezembro/2017) e P4 (2 *pools*fêmeas capturadas durante o mês de abril/2018), foram positivos para a presença de DNA de *Leishmania* spp. Após o cálculo para infecção natural de flebotomíneos (VASCONCELOS *et al*, 2019), foi obtido a taxa de infecção de 0,25%. Em todos os ensaios de PCR multiplex conduzidos foi possível visualizar o produto de 220 pb, (APÊNDICE IV) correspondente ao gene constitutivo *cacophony*, o que constata que a forma de conservação e de extração de DNA foram adequadas.

Tabela 8: Espécies de flebotomíneos analisadas, por ponto, para presença de DNA de *Leishmania* spp. coletados entre maio de 2017 a julho de 2018 no município de Itaperuçu, Paraná.

Espécies	Pontos de Coleta												Total										
	P1		P2		P3		P4		P5		P6			P7		P8		P9		P10		Total	
	Nº	Nº +	Nº	Nº +	Nº	Nº +	Nº	Nº +	Nº	Nº +	Nº	Nº +		Nº	Nº +	Nº	Nº +	Nº	Nº +	Nº	Nº +	Nº	Nº +
<i>Ny. neivai</i>	31	0	29	-	20	1	14	2	20	4	4	-	11	-	3	-	4	4	-	6	-	142	3
<i>Pi. fischeri</i>	1	0	4	-	2	-	-	-	3	-	-	-	3	-	-	-	8	8	-	4	-	25	0
<i>Mg. migonei</i>	1	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2	-	-	-	-	-	5	0
<i>Ev. firmatoti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0
<i>Br. itrogodytes</i>	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	2	0
<i>Ps. apozai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	0
TOTAL	34	0	34	0	22	0	14	0	23	0	4	0	15	0	3	0	14	0	13	0	176	3	

Legenda: Nº= número de *pools* por espécie de flebotomíneos e ponto de captura; Nº += Número de *pools* positivos para a presença de DNA de *Leishmania* spp. P1 a P10= Pontos de captura, independente da armadilha, localizados no município de Itaperuçu, Paraná.

5. DISCUSSÃO

No município de Itaperuçu, 3.784 espécimes de flebotomíneos foram coletados durante dois anos, sendo possível observar que a fauna registrada (13 espécies) apresentou uma riqueza semelhante à de outros municípios do Vale do Ribeira. Castro *et al.* (2005) no município de Adrianópolis relataram, na ocasião, fauna composta de 9 (nove) espécies de flebotomíneos, dado muito próximo, (10 espécies) ao observado por Santos *et al.* (2009) no mesmo município. Em outras regiões do Paraná esse número também foi semelhante, como observado por Cella *et al.* (2011) no município de Japurá com fauna composta de oito (8) espécies, durante um ano de estudo. Castro *et al.* (2008) no município de Doutor Camargo, norte central do Paraná, registraram 15 espécies de flebotomíneos. Com o mesmo período de captura do presente estudo um número próximo de espécies foi registrado no leste do estado em uma reserva florestal no município de Morretes por Marcondes *et al.* (2001), onde foram capturadas nove (9) espécies. Essa baixa diversidade pode ser explicada pelo tipo de cobertura vegetal, majoritário no estado, que é o de Mata Atlântica (SILVA *et al.* 2010), sendo que a fauna de flebotomíneos é mais diversa, quanto mais diverso for o bioma (ALMEIDA *et al.* 2015).

A razão sexual entre fêmeas e machos (2:1) observada no presente estudo foi semelhante a de Castro *et al.* (2008) no município de Doutor Camargo. Da mesma forma Cerino *et al.* (2009) no município de Cianorte, região Norte do Paraná, relataram que a proporção de fêmeas capturadas em relação aos machos foi significativamente maior. A observação dessa predominância pode ser indicativa do alto grau de antropofilia observado nas espécies encontradas na região (GALATI *et al.* 1996) ou mesmo em relação às armadilhas utilizadas. Dentre as 13 espécies capturadas, os machos apresentaram maior riqueza (n= 12 spp.) do que as fêmeas (n= 8 spp.), assim como observado por Galati *et al.* (1996) no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul. Destaca-se que, considerando o total de flebotomíneos coletados por ano em Itaperuçu, observou-se que não houve interferência das capturas mensais na fauna estudada, diferente do observado por Andrade *et al.* (2008). Este dado torna-se relevante uma vez que a quantidade de flebotomíneos presentes nos diferentes ecótopos (mata e peridomicílio) na região estudada, em geral, se manteve a mesma, excluindo-se a possibilidade de alguma interferência na sazonalidade destes que será discutida abaixo.

O gênero *Brumptomyia* foi o que apresentou o maior número de espécie, seis (6) no total. De acordo com FORATTINI (1973) e AGUIAR e VIEIRA (2018), o mesmo está estreitamente associado a tocas de tatus e animais silvestres, não apresentando hábito

antropofílico. *Brumptomyia bragai* foi registrada pela primeira vez no Vale do Ribeira e no estado do Paraná, sendo que a ocorrência da espécie já era descrita nos estados de São Paulo e Santa Catarina (GALATI *et al.* 2018), estados limítrofes ao estado do Paraná. O achado de *B. bragai* durante as capturas realizadas no município de Itaperuçu, fecha uma lacuna de distribuição da mesma entre a região Sudeste e Sul do Brasil.

A espécie mais frequente durante os dois anos de captura foi *Ny. neivai*, totalizando 3.556 espécimes ou 93% dos espécimes de flebotomíneos obtidos. Essa frequência mais elevada em comparação a outras espécies já foi observada em outros estudos no estado do Paraná. Teodoro *et al.* (2003) capturaram 12 espécies flebotomíneas, pelo mesmo período, das quais *Ny. neivai* representou 88,4%. Silva *et al.* (2008) obtiveram alta incidência de *Ny. neivai* em 37 municípios do Paraná, onde 75,6% de todos os espécimes coletados eram desta espécie, cuja predominância foi seguida por *Pi. fischeri* e *Mg. migonei*, assim como também observado no presente estudo. Ainda, *Ny. neivai* foi a única espécie que esteve presente em todos os meses de coleta, entretanto, os meses de agosto e setembro, de ambos os anos, representou 40% do total de espécimes. Embora Massafera *et al.* (2005) tenham descrito que *Ny. neivai* esteve presente em todos os meses da coleta, com a variação do pico de capturas, os autores observaram que no mês de abril obtiveram 45% do total de espécimes capturados. Teodoro *et al.* (2003) relataram que *Ny. neivai* foi predominante em todo o período de coletas, contudo, em maior quantidade nos meses de janeiro, fevereiro, março e abril, período que se relaciona ao pico secundário de coletas observado no município de Itaperuçu.

Todos os espécimes coletados em Itaperuçu, do gênero *Nyssomyia*, pertenciam à espécie *Ny. neivai*. Cabe destacar que a mesma é morfológicamente muito semelhante a *Ny. intermedia*, o que durante muito tempo gerou registros errôneos de ambas na região Sul. *Nyssomyia intermedia* foi descrita a partir de espécimes coletados na Fazenda Ouro Fino, localizada no município de Além Paraíba, estado de Minas Gerais (LUTZ e NEIVA 1912) e *Ny. neivai* de machos coletados no Instituto Butantan na cidade de São Paulo (PINTO 1926), sendo que 4 (quatro) anos após sua descrição o mesmo autor a colocou em sinonímia de *Ny. intermedia* (PINTO 1930). Até 1994 essas espécies eram então identificadas como *Ny. intermedia* (YOUNG e DUNCAN 1994). Marcondes (1996), no entanto, redescreveu e revalidou a fêmea de *Ny. neivai* por meio de espécimes coletados na Bolívia e holótipos (material utilizado na descrição) de ambas as espécies. A redescricao do macho deu-se em seguida (MARCONDES e BORGES 2000). Ainda assim, dada a dificuldade de distinção entre as duas espécies, as mesmas foram agrupadas em um complexo de espécies crípticas denominado, complexo *intermedia*, cuja distribuição geográfica foi apresentada por

Marcondes *et al.* (1999), na qual as espécies em diferentes estados, incluindo o Paraná, foram denominadas *Ny. intermedia s.l.* (sensu lato), sem incluir os municípios dos Vale do Ribeira (PR), visto que o primeiro foi realizado em 2005 (CASTRO *et al.* 2005). Em 2003 Andrade Filho *et al.*, redescreveram os sexos de ambas as espécies, e desde então chaves taxonômicas permitem diferenciá-las (GALATI 2003, 2018). Em 2007, esses autores atualizaram a distribuição geográfica das mesmas nas Américas e constataram que, levando em conta espécimes depositados em diferentes coleções, *Ny. intermedia*, embora pudesse ocorrer em simpatria com *Ny. neivai*, não ocorria na região Sul do Brasil (ANDRADE FILHO *et al.* 2007). Dois anos mais tarde, visando a detecção de *Ny. intermedia* no Paraná, Santos *et al.* (2009) em um estudo faunístico mais abrangente no estado, mostraram que *Ny. intermedia* poderia ocorrer desde regiões mais altas do primeiro planalto, Serra do Mar até a faixa litorânea do Paraná, respectivamente nos municípios de Adrianópolis (Vale do Ribeira), Morretes (Serra do Mar) e Pontal do Paraná (orla marinha). Porém cabe destacar que, nesse estudo, 4.649 espécimes eram *Ny. neivai* e apenas 1 (um) *Ny. intermedia*.

Marcondes (2014) levantou questões sobre a correta identificação das espécies, bem como de biologia e comportamento, que direcionariam os programas de controle da LTA, frente ao trabalho de Baum *et al.* (2013) que referiram às espécies coletadas em Adrianópolis *Ny. intermedia s.l.* (complexo). Em resposta, Baum e Castro (2014) justificaram a utilização da chave taxonômica de Young e Duncan (1994). Cabe dizer que, segundo Andrade-Filho e Brazil (2003) a presença de espécies crípticas, como *Ny. intermedia* e *Ny. neivai*, é resultado de alopatria, que no caso destas deve ter ocorrido cerca de 250.000 anos atrás, indicando que a separação das espécies é recente.

A diferenciação correta destas espécies é essencial, uma vez que *Ny. intermedia s. str.* (Lutz e Neiva, 1912) e *Ny. neivai* são apontadas como as possíveis espécies mantenedoras de circulação de *Leishmania* no Vale do Ribeira, incluindo o estado de São Paulo, e provavelmente, assumam um papel vetorial relevante para *Leishmania (Viannia) braziliensis* na região do Vale (SILVA *et al.* 2012).

Silva *et al.* (2010) descrevem que a simples detecção de uma das espécies de flebotomíneos de importância epidemiológica, já configura fator de risco para a LTA, não sendo este risco potencializado pela detecção de mais de uma espécie. Dado este fato as ações de vigilância e prevenção sugeridas pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) tem como primeira ação a implementação de estudos bioecológicos das espécies apontadas como vetoras, seguida da realização da pesquisa entomológica nos focos e o monitoramento entomológico por meio de capturas sistemáticas (BEPA 2010). Em relação a pesquisa

entomológica, as capturas sistemáticas realizadas no município de Itaperuçu resultaram em dados condizentes ao esforço amostral de cada uma das armadilhas, sendo as armadilhas do tipo CDC responsáveis pela coleta de 3.156 espécimes e, as armadilhas de Shannon, de 628 espécimes. As armadilhas CDC apresentaram um número de flebotomíneos coletados seis vezes maior que as armadilhas Shannon, dados que condizem com estudo realizado por Galati *et al.* (1996) no Município de Corguinho, Mato Grosso do Sul.

Pinto *et al.* (2010) observaram que durante o estudo realizado na Reserva Biológica de Duas Bocas estado do Espírito Santo, houve maior riqueza e diversidade de flebotomíneos em armadilhas de tipo CDC. No presente estudo, em relação ao ecótopo, foi registrado número maior de espécies no peridomicílio (12 spp.), enquanto que em área de mata foram identificadas cinco espécies. Este fato possivelmente esteja aliado ao esforço amostral das armadilhas CDCs, sendo 134 vezes superior à da Shannon. Deve-se levar em conta, ainda, os elementos que compõem o ambiente de peridomicílio, como a proximidade de riachos, locais com formações rochosas, que contribuem para um ambiente mais propício para o desenvolvimento destes dípteros, assim como observado por Massafera *et al.* (2005) e Teodoro *et al.* (2004) em estudos realizados no Estado do Paraná onde registraram um maior número de espécimes no peridomicílio em relação à mata. No peridomicílio das áreas de estudo, além da ocorrência de animais domésticos como cães, ou de criação como galinhas e porcos, observou-se também a presença de animais silvestres (i.e. tatus), que funcionam como fonte alimentar para esses insetos (SALES *et al.* 2015). As unidades domiciliares presentes nesses locais servem ainda como abrigo para algumas espécies de flebotomíneos (AGUIAR e VIEIRA 2018). Isso pode ser notado no mês de dezembro de 2017 no qual a armadilha CDC capturou um elevado número de espécies de *Brumptomyia*, a qual está associada com a presença desses animais silvestres conforme relatado por Aguiar e Vieira (2018). Somado a presença de fontes alimentares, as residências selecionadas ao mesmo tempo possuíam em seus anexos domiciliares fatores de risco, como galinheiros que, sabidamente, contribuem para o desenvolvimento e permanência dos flebotomíneos, como o acúmulo de matéria orgânica (DIAS *et al.* 2007, CASANOVA *et al.* 2013). Locais com essas características podem apresentar um aumento do número de espécies que se adaptam aos ambientes com interação antrópica.

Durante as coletas no município de Itaperuçu, os pontos de maior número de capturas em peridomicílio foram, em ordem crescente, os P2, P1 e P4 os quais apresentavam características estruturais semelhantes (APÊNDICE I).

As condições propícias para a manutenção do ciclo de vida dos flebotomíneos como o abrigo de animais domésticos que configura maior disponibilidade de fonte alimentar, assim como árvores e vegetação em geral muito próximas às residências, provavelmente contribuiu para a presença dos criadouros e maior número de flebotomíneos nestes pontos (CERINO *et al.* 2009, CELLA *et al.* 2011, ÁVILA *et al.* 2018). Contribuindo com estes fatores, no município de estudo há áreas residenciais dentro de regiões florestais, o que tem impacto direto na ecoepidemiologia das leishmanioses, fato esse observado em várias cidades brasileiras (MS 2017). As transformações ambientais contribuem para a mudança comportamental dos hospedeiros que albergam agentes etiológicos de diversas doenças e, dos vetores.

Com a crescente antropização de regiões de mata nativa, pontos que anteriormente eram preservados se tornam áreas de peridomicílio e local de moradia de populações, em geral, mais desfavorecidas e vulneráveis (TEODORO *et al.* 1993, MUNIZ *et al.* 2006, OMS 2018). Como exemplo, em estudos conduzidos por ARAÚJO-PEREIRA *et al.* (2014) no estado do Acre, no município de Rio Branco, foi observado em um ano de coleta, mudanças nas condições ambientais causadas pela destruição de habitats, desmatamento e processos de urbanização associados, que influenciaram na estrutura populacional de insetos vetores e, conseqüentemente, na transmissão de determinadas parasitoses.

Com relação às espécies predominantes durante o estudo, *Ny. neivai* foi capturada em todos os pontos de coleta, sendo que em peridomicílio P1 foi o ponto de maior número de capturas. Em estudo de Pereira *et al.* (2020) a predominância de uma espécie está relacionada à sua adaptação ao meio ambiente, a disponibilidade, recursos para manutenção de seu ciclo de vida e a interação competitiva com outras espécies. Estudos apontam que *Ny. neivai*, em decorrência das alterações introduzidas no ambiente, apresenta melhor adaptação do que as demais espécies, demonstrando maior grau de antropofilia (TEODORO *et al.* 2003). Andrade Filho *et al.* (2004) descreveram que *Ny. neivai* se alimenta principalmente de sangue humano em áreas de peridomicílio, mas que é considerada uma espécie oportunista e não exclusivamente antropofílica, pois possui alternância dos seus hábitos alimentares, variando com a disponibilidade do hospedeiro.

Em estudo realizado por Massafera *et al.* (2005), os pesquisadores observaram durante as coletas realizadas no município de Bandeirantes, Paraná, que *Ny. neivai* foi dominante e muito frequente no peridomicílio durante as capturas, assim como observado em outras regiões endêmicas para LTA no estado do Paraná. Os autores relataram que no município de estudo havia a proximidade de abrigos de animais domésticos ao domicílio, acúmulo de

matéria orgânica, umidade do solo provocada pelo descarte de águas de uso doméstico e pelo sombreado das árvores, elementos que provavelmente favoreceram a formação de criadouros de flebotomíneos no peridomicílio.

A segunda espécie de maior número no peridomicílio foi *Pi. fischeri*, sendo o ponto de coleta P6 (peridomicílio) em 2018 (fevereiro) responsável por 55% do total de espécimes desta espécie capturadas durante os dois anos. Muniz *et al.* (2006) destacaram que *Pi. fischeri* tem como característica a flexibilidade alimentar, de modo a ajustar seus hábitos à disponibilidade de hospedeiros, mesmo em ambientes antrópicos. Esse fato pode ser correlacionado a presença e maior abundância da mesma em áreas específicas de modo pontual. Aqui supõe-se que havia um aumento de fonte alimentar de interesse para esta espécie neste ponto durante um período específico. O ponto P9 em peridomicílio, foi responsável pelo maior número de capturas de espécimes de *Mg. migonei* (terceira espécie em número total de flebotomíneos coletados) de modo diferente do observado para a espécie *Pi. fischeri*. *Migonemyia migonei* apresentou distribuição mais homogênea entre os 10 pontos. Azevedo e Rangel *et al.* (1991), relataram a possibilidade desta espécie invadir os habitats peridomésticos em estudo conduzido no município de Baturité, Ceará. Camargo-Neves *et al.* (2002) descreveram que *Mg. migonei* pode ser encontrada em ambientes alterados ou do tipo mata residual, fato que se correlaciona a seu comportamento tanto zoofílico quanto antropofílico.

Os pontos P4 e P5 foram os de maior número de flebotomíneos coletados, em área de mata, sendo que ao observarmos os pontos de captura em geral nesta área a espécie *Ny neivai* foi a de maior abundância assim como em peridomicílio, seguida por *Pi. fischeri* e *Mg. migonei*.

Durante os dois anos de captura observou-se que o ponto de maior quantidade de espécies foi P10, tanto em área de mata como em peridomicílio. A distribuição de diferentes espécies, sendo em sua maioria, espécies não correlacionadas a LTA, tão pouco de hábito antropofílico, pode ser devido a menor modificação estrutural do ambiente natural onde este ponto se encontrava, além da baixa adaptação destas espécies para os ambientes dos demais pontos de coleta

Determinados fatores externos (**APÊNDICE II**). exercem influência tanto no aumento do número de flebotomíneos quanto na sua diminuição (TEODORO *et al.* 2003). Como observado durante as capturas realizadas nos pontos de P6 e P10, aos quais foram responsáveis por 4,9%, dos exemplares coletados, menor percentual dentre todos os pontos, nos dois anos de capturas. Fatores que não foram avaliados no presente estudo como a

limpeza dos terrenos (peridomicílio), o microclima em decorrência de condições físicas específicas, como a topografia e a vegetação dos locais de coleta, além da possibilidade de menor oferta de fontes alimentares nestes pontos, poderiam ser responsáveis pelos resultados obtidos. Ressalta-se que a descrição das diferenças pontuais dos dados de cada ponto de captura não foi levada em consideração durante a metodologia deste estudo, pois a vegetação e o clima em geral eram os mesmos, embora saiba-se que pequenas variações podem contribuir para um maior ou menor número de flebotomíneos capturados.

As observações realizadas no município de Itaperuçu em relação ao número de flebotomíneos coletados e, a variação dos fatores climáticos, mostraram que o aumento da fauna foi diretamente proporcional ao aumento da temperatura e diminuição dos índices pluviométricos, assim como com a manutenção das médias de umidade relativa. Com relação à precipitação o mesmo foi observado em estudo realizado por Rebêlo *et al.* (2001) no município de Buriticupu no estado do Maranhão, onde o número de flebotomíneos foi maior nos períodos mais secos do ano. Os autores descrevem que períodos chuvosos ou chuvosos de longo prazo agem negativamente sobre a população de flebotomíneos, fazendo com que os mesmos busquem abrigo durante esse período, diminuindo desta forma o número de flebotomíneos capturados. Essas observações corroboram os dados apresentados para o município de Itaperuçu, assim como a descrição feita por Gomes e Galati (1977) em estudo realizado no município de Londrina, Paraná. Os autores observaram que durante as capturas a densidade de flebotomíneos sofreu influência negativa dos níveis de precipitação. Níveis pluviométricos elevados podem destruir os criadouros ou "varrer" os ovos e/ou demais formas imaturas (DIAS *et al.* 2007), o que afeta diretamente na densidade desses insetos. Cabe relatar que os flebotomíneos são muito sensíveis à dessecação e, uma pequena variação climática nos microhabitats seria suficiente para alterar a dinâmica de suas populações (DIAS *et al.* 2007). Essa observação se faz importante, uma vez que durante o estudo a densidade populacional foi mais elevada em função das maiores médias de umidade relativa e precipitação nos meses que antecediam os meses de capturas.

As coletas com menor número de flebotomíneos apresentaram precipitação média de 6 mm, 7 mm, 66 mm e 15 mm, já a temperatura média variou de 14 a 16 °C com umidade relativa entre 83% e 88%, dados próximos aos relatados por Condino *et al.* (1998).

Perez *et al.* (2014) observaram que as capturas foram influenciadas por fatores climáticos, e descreveram que a abundância de flebotomíneos estaria correlacionada positivamente com a temperatura e a umidade relativa do ar e, negativamente com a precipitação. O número de flebotomíneos capturados diminuiu à medida que a temperatura

também diminuiu. Durante as capturas realizadas no município de Japurá-Paraná CELLA *et al.* (2011) encontraram oito (8) espécies de flebotomíneos, com predomínio de *Ny. neivai*, a qual esteve presente em todos os meses de coleta, com elevação do número de espécimes nos meses mais quentes e úmidos do ano. O mesmo padrão foi descrito por Massafera *et al.* (2005) no município de Bandeirantes e no presente estudo, no município de Itaperuçu.

Com relação a sazonalidade de *Pi. fischeri*, a mesma foi marcada por elevadas temperaturas, baixos índices de umidade relativa e queda na precipitação. Moschin *et al.* (2013) relataram que esta espécie se adapta melhor em temperaturas e média de umidade relativa próximas a 20°C e 70-80%, respectivamente. Dado que corrobora com as observações do mês de pico de capturas desta espécie, no município de Itaperuçu, que apresentou temperatura média de 20°C. Do mesmo modo a presença de *Mg. migonei* parece estar associada ao aumento da temperatura, diminuição da umidade e baixa precipitação, assim como observado em estudo de Teodoro *et al.* (1993) em que os maiores números desta espécie foram durante os meses mais quentes e úmidos. No estudo realizado por Colla-Jacques *et al.* (2010) *Ny. neivai*, *Pi. fischeri* e *Mg. migonei* foram caracterizadas como espécies acidentais em áreas periurbanas em um município de São Paulo, sendo que esta última foi tida como constante no ambiente rural, diferindo do observado no presente estudo. No município de Água Clara, estado do Mato Grosso do Sul, *Ny. neivai* foi caracterizada como acidental tanto no intra como no peridomicílio (ALMEIDA *et al.* 2019), demonstrando que essa constância está ligada com a área de estudo e com a sazonalidade das espécies.

Os achados positivos para DNA de *Leishmania (Viannia)* spp. nos espécimes capturados em Itaperuçu, reforçam a ideia de que capturas entomológicas direcionadas às áreas que apresentaram casos recentes de leishmaniose e endêmicas para LTA são mais propensas ao encontro de flebotomíneos naturalmente infectados (PITA-PEREIRA *et al.* 2005), sugerindo um possível efeito deste achado com o número de casos desta parasitose .

Dentre as espécies analisadas *Ny. neivai*, foi a única positiva para o DNA de *Leishmania* spp., atribuindo para os espécimes capturados em Itaperuçu uma taxa de infecção natural 0,25%. A infecção natural para esta espécie também foi descrita por diferentes autores (LANUS *et al.* 2006, OLIVEIRA *et al.*, 2011, PITA-PEREIRA *et al.* 2011) com taxas de infecção de 1,1%, 0,22% e 0,9%, respectivamente. A taxa de infecção natural observada no presente estudo é consideravelmente baixa em relação aos dados citados por Lanus *et al.* (2006) e Pita Pereira *et al.* (2011).

A determinação das taxas de infecção natural constitui uma ferramenta importante para os estudos eco-epidemiológicos sobre as leishmanioses e de competência vetorial, ainda que as mesmas pareçam não significativas. Soares *et al.* (2010) e Miranda *et al.* (2002) descreveram que a taxa de infecção baixa pode ser decorrente da distribuição não homogênea de flebotomíneos infectados. Segundo estudos sobre infecção natural, os fatores de relações ecológicas, como habitat, comportamento intraespecífico, ciclo, hábitos alimentares e população de reservatórios de cada região, podem também influenciar nas taxas de infecção natural observadas (MIRANDA *et al.* 2002, SOARES *et al.* 2010).

A infecção natural por *Leishmania* spp. em *Ny. neivai*, utilizando PCR, já foi relatada nos estados de Minas Gerais (SARAIVA *et al.* 2009, MARGONARI *et al.* 2010) Santa Catarina (MARCONDES *et al.*, 2009), Rio Grande do Sul (PITA-PEREIRA *et al.* 2009) e Paraná (OLIVEIRA *et al.* 2011, ABREU *et al.* 2014). *Nyssomyia neivai* também foi descrita naturalmente infectada em Tucuman, Argentina (LANÚS *et al.* 2006). DNA de *Le. infantum chagasi* (SARAIVA *et al.* 2009) e *Le. braziliensis* (PITA-PEREIRA *et al.* 2009, ABREU *et al.* 2014) já foram identificados em espécimes *Ny. neivai*. Embora, no presente estudo, não se saiba qual a espécie de *Leishmania* (*Viannia*) spp. detectada, considerando os dados de outros autores (OLIVEIRA *et al.* 2011, ABREU *et al.* 2014) dada a distribuição dos casos de LTA na forma cutânea única e localizada na região, acredita-se que seja *Le. braziliensis*, uma vez que outras espécies do subgênero *Viannia* tem distribuição primária nos estados da região norte do Brasil (MS 2017). Mesmo em números reduzidos, acredita-se que *Mg. migonei* e *Pi. fischeri* poderiam atuar como vetores secundários de *Leishmania* no município de Itaperuçu. Mesmo sem *pools* positivos para infecção natural para as espécies *Mg. migonei* e *Pi. fischeri*, sua possível participação no ciclo do parasito deve ser destacada. *Migonemyia migonei* foi descrita naturalmente infectada por *Leishmania* spp. em Pernambuco (CARVALHO *et al.* 2010), Rio de Janeiro (PITA-PEREIRA *et al.* 2005) e Ceará (AZEVEDO *et al.* 1991). A espécie é considerada um vetor suspeito de espécies de *Leishmania* no Brasil e também na Venezuela e Argentina (BRAZIL *et al.* 2015). A espécie *Pi. fischeri* foi observada naturalmente infectada por *Leishmania* spp. no estado do Rio Grande do Sul (PITA-PEREIRA *et al.* 2011), Espírito Santo (ROCHA *et al.* 2010) e Minas Gerais (MARGONARI *et al.* 2010). Rangel e Lainson *et al.* (2003) sugeriram que *Pi. fischeri* teria potencial para adaptar-se a ambientes alterados e capacidade de transmitir *Le. braziliensis* no ciclo silvestre da LTA.

No município de Itaperuçu, admitimos que (i) devido a densidade muito baixa de outros vetores suspeitos (RANGEL e LAINSON 2003, RANGEL *et al.* 2018) somada a sua (ii)

elevada densidade populacional, (iii) coincidente com os casos de LTA, (iv) sua frequência mensal constante aliada a (v) uma marcante sazonalidade, (vi) com nítida adaptação as ambientes antropizados, (vii) que apresentam condições ambientais favoráveis à persistência do ciclo enzoótico de *Leishmania* e (viii) a detecção de DNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, esses são fatores que evidenciam o seu possível papel vetorial de *Ny. neivai* no município (KILLICK-KENDRIK 1990, READY *et al.* 2013).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A fauna flebotomínica do município de Itaperuçu está composta por 13 espécies, com maior riqueza detectada em peridomicílio quando comparado a área de mata;
- As espécies apresentaram marcante sazonalidade com picos nos meses de agosto e setembro, sendo o mesmo padrão observado para *Ny. neivai*;
- A taxa de infecção foi de 0,25%, sendo que a única espécie positiva para *Leishmania* (*Viannia*) sp. foi *Ny. neivai*;
- Nos meses que antecedem (maio a julho) e que precedem (outubro a dezembro) o pico da espécie *Ny. neivai* são aqueles que a Secretaria de Saúde deverá priorizar para orientações à população quanto a Educação em Saúde e Vigilância Sanitária;
- *Brumptomyia bragai* foi registrada pela primeira vez no Paraná, aumentando sua distribuição geográfica para o Brasil e a fauna do estado para 50 espécies;
- Levando em conta que *Ny. neivai* foi a espécie mais frequente, mais abundante, constante com distribuição coincidente com casos de LTA humana, capturada tanto em área de mata e peridomicílio, com presença de DNA de *Leishmania* spp. e com picos mensais característicos, hipotetizamos que a mesma seja o elo de ligação na eco-epidemiologia da LTA no município de Itaperuçu;

7 PERSPECTIVAS

- Os resultados apresentados nesta dissertação somam-se a outros estudos para demonstrar a importância da observação da fauna de flebotômíneos nos municípios que são endêmicos para LTA e que compõe o Vale do Ribeira. Desta forma novas pesquisas devem ser realizadas de modo a abranger a totalidade destes, contribuindo para o desenvolvimento das ações em vigilância e controle na região como preconizado pelo Programa de Vigilância e Controle das Leishmanioses. Recomenda-se tornar os estudos de sazonalidade dos flebotômíneos, levando em conta as regiões endêmicas ou mesmo não endêmicas, mais frequentes.
- Em relação a utilização dos métodos de biologia molecular, se faz necessária ainda o sequenciamento das amostras obtidas, para concluir a espécie de *Leishmania (Viannia)* presente no município de Itaperuçu.
- A comprovação da espécie *Ny neivai* como vetora é de real importância, sendo necessários estudos com seu desenvolvimento e sua participação na transmissão de espécies de *Leishmania* sp. em laboratório, acompanhando seu ciclo biológico, devido a necessidade de concluir os requisitos para se incriminar *Ny neivai* como transmissora de espécies de *Leishmanias* sp. .

8 REFERÊNCIAS

- ADINI, I; JACOBSON R.L; KASAP, M; SCHLEIN Y; JAFFE C. Species-specific detection of *Leishmania* in sandflies using an enzymed-linked immunosorbent assay. Revista do Instituto de Medicina Tropical. v. 92,p. 35-37,1998.
- AFONSO M.M.S;GOMES A.C e MENESES C.R.V. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (N.) intermedia* (Diptera, Psychodidae), vector of cutaneous Leishmaniasis in Brazil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.21, p.1816-1820, 2005.
- AGUIAR G.M e VIEIRA V.R. Regional distribution and habitats of Brazilian Phlebotomine Species. In: Rangel, EF e Shaw, JJ. Brazilian Sand Flies. 1ed.: Springer International Publishing, 2018.

ALMEIDA P.S; ANDRADE A.J; SCIAMARELLI A; RAIZER J; MENEGATTI J.A MOREIRA HERMES S.C.N.M; DE CARVALHO M.S.L e GURGEL-GONÇALVES R. Geographic distribution of phlebotomine sandfly species (Diptera: Psychodidae) in Central-West Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.110, p.551-559, 2015.

ALMEIDA PS, MINZÃO ER, MINZÃO LD, SILVA S R, FERREIRA AD e FACCENDA O. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2010. v. 43, p. 723-727, 2010.

ALMEIDA, P.; SILVA, T.M; MOREIRA, R.F; FUKUDA, V.M; OLIVEIRA NETO, M.P; AQUINO, D.V; NEITZKE-ABREU, H.C; CARVALHO, G.M; ANDRADE FILHO, JD. The sand fly species (Diptera: Psychodidae) in an urban environment of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista de Patologia Tropical*, v. 48, n. 3, p. 179-186, 2019.

ANDRADE A J e DANTAS-TORRES F. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the state of Minas Gerais, Brazil. *Neotropical. Entomology*, 2010.v. 39,p. 115-123,2010.

ANDRADE A.J, CHAVES-JÚNIOR S.P.; MORELLI L.C; CONCEIÇÃO M.S e SHIMABUKURO P.H.F. Taxonomia e Sistemática de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) no Brasil e seus impactos na saúde pública- Capítulo 8 do livro “Atualidades em Medicina Tropical no Brasil” – Rio Branco : Stricto Sensu, p.137-154, 2020.

ANDRADE A.J, ANDRADE M.R, DIAS E.S, PINTO M.C e EIRAS A.E. Are light traps baited with kairomones effective in the capture of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia intermedia*? An evaluation of synthetic human odor as an attractant for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.103, p. 337-343, 2008.

ANDRADE FILHO J.D e BRAZIL R.P. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of Alagoas state, northeast of Brazil. *Neotropical Entomology*, v. 38, p. 688-690,2009

ANDRADE FILHO J.D; GALATI E.A.B e FALCÃO A.L. *Nyssomyia intermedia* (Lutz e Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 102, p. 481-487,2007.

ANDRADE FILHO J.D; GALATI E.A.B e FALCÃO A.L. Biology of the first generation of a laboratory colony of *Nyssomyia intermedia* (Lutz e Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae) Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 99, p. 597-607, 2004.

ANDRADE FILHO J.D e BRAZIL R.P. Relationships of new world Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) based on fossil evidence. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 98, p. 145-149, 2003.

ARAGÃO M.B. Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. Brasil-med., Rio de Janeiro, v. 36, p.129-30,1922.

ARANSAY A.M; SCOULICA E e TSELENTIS Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by Seminested PCR on ninicircle Kinetoplatic DNA applied and environmental microbiology, v. 66,p 1933–1938, 2000.

ÁVILA M.M; BRILHANTE A.F; DE SOUZA C.F; BEVILACQUA P.D; GALATI E.A.B; e BRAZIL R.P. Ecology, feeding and natural infection by *Leishmania* spp. of phlebotomine sand flies in an area of high incidence of American tegumentary leishmaniasis in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. Parasit Vectors, v.11,p.64, 2018.

AYRES M; AYRES JUNIOR M; AYRES D.L e SANTOS A.S. BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: MCT; IDSM; CNPq, 2007.

AZEVEDO A.C.R e RANGEL E.F. A study of sandfly species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in focus of cutaneous Leishmaniasis in the municipality of Baturité, Ceará, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 86, p. 405-410,1991.

BARBOSA M.G.V; FÉ N.F; MARCIÃO A.H.R; SILVA A.P.T; MONTEIRO W.M e OLIVEIRA G.J.A. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um foco de leishmaniose tegumentar americana na área periurbana de Manaus, Estado do Amazonas. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 41, p. 485-491. 2008.

BARRETTO M.P. Observações sobre a biologia em condições naturais dos flebotomos do estado de São Paulo (Diptera: Psychodidae). Tese de Livre-Docência, Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, 1943

BARROS V.L; REBÊLO J.M.M e SILVA F.S. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de capoeira do município do Paço do Lumiar, Estado do Maranhão, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. Cadernos de Saúde Pública, v. 16, p. 265-270, 2000.

BASTOS T.S.A; LINHARES G.F.C e CARVALHO D.M. Identificação morfológica de flebotomíneos capturados em área Urbana Revista de Medicina Veterinária, v.17, p. 395-401, 2016.

BAUM M; DE CASTRO E.A; PINTO M.C; GOULART T.M;BAURA W; KLISIOWICZ D.R e COSTA-RIBEIRA M.C.V. Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous Leishmaniasis, Paraná State, Brazil. Acta Tropica, v.100, p. 45-48, 2015.

BAUM, M e DE CASTRO E.A, Authors reply: defense of taxonomy, a Sisyphus task?. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.47,p..539, 2014

BAUM M; DA COSTA RIBEIRO M.C.V; LOROSA E.S; DAMASIO G.A.C e DE CASTRO E.A. Eclectic feeding behavior of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the transmission area of American cutaneous leishmaniasis, State of Paraná, Brazil Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 46,p. 560–565, 2013.

BERMÚDEZ, E. G.C. *Lutzomyia* sand flies in Brazilian amazon basin (Diptera: Psychodidae), Editora INPA, Manaus – AM, p.202,2009.

BRAZIL R.P; RODRIGUES A.A.F eFILHO J.D.A. Sand fly vectors of leishmania in the Americas - A Mini Review. Entomol Ornithol Herpetol, v.4, p.1- 4, 2015.

BRITTO C. e PITA-PEREIRA D. Diagnóstico Molecular de *Leishmania* spp. em flebotomos provenientes de áreas de ocorrência de leishmanioses. In: Fátima Conceição – Silva e Carlos Roberto Alves (Org.). Leishmanioses do continente americano. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 217-231, 2014.

BENNAI K. TAHIR D, LAFRI S eBENDJABALLAH-LALIAM A e PAROLA I.B.P. Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA and host blood meal identification in *Phlebotomus* in a hypoendemic focus of human *Leishmania* sis in northern Algeria. PLOS Neglected Tropical Disease, v.12,p.1-13, 2018.

(BEPA) -Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública. Boletim Eletronico Epidemiológico, v.10, p. 13-15, 2010.

BRUIJN M.H.L e BARKER D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta Tropica,v.52, p. 45-52,1992.

CABRERA O.L; MUNSTERMAN L.E; CARDENAS R; GUTIERREZ ReFERRO C. Definition of appropriate temperature and storage conditions in the detection of *Leishmania* DNA with PCR in phlebotomine flies. Biomédica (Bogotá). v, 22, p.296-302,2002.

CAMARGO-NEVES V.L.F; CASTRO G.A e FERREIRA A.J.L. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2002.v. 35, p. 299-306, 2002.

CASANOVA C; ANDRIGHETTI M.T.M; SAMPAIO S.M.P; MARCORIS M.L.G; COLLA-JACQUES FE. Larval breeding sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Visceral Leishmaniasis endemic urban areas in Southeastern Brazil. PLOS Neglected Tropical Diseases, v.7, p.2443, 2013.

CARVALHO G.M; BRAZIL R.P; RÊGO F.D;RAMOS M.C; ZENÓBIO A.Pe ANDRADE FILHO J.D. Molecular detection of Leishmania DNA in wild-caught Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cave in the State of Minas Gerais, Brazil. Journal of Medical Entomology, v.54,p.196-203,2017.

CARVALHO M.S.M; BREDT A; MENEGHIN E.R.S e OLIVEIRA C .Epidemiol Phlebotominae Fauna (Diptera: Psychodidae) in Areas of Transmission of American Cutaneous Leishmaniasis in the Federal District, Brazil,. Serviço de Saúde, Brasília, v.19,p.227-237,2010a.

CARVALHO M.R; VALENCA H.F; SILVA F.J; PITA-PEREIRA D ; PEREIRA T.A ,BRITTO C ; BRAZIL R.P ; BRANDÃO FILHO S.P e CARVALHO M.R. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (Franca, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. Acta Tropica , v.116, p.108-110, 2010b.

CARVALHO, G.M.L; FILHO, J.D.A; FALCÃO, A.L; ROCHA LIMA, A.C.V.M; e GONTIJO, C.M.F. Naturally Infected *Lutzomyia* Sand Flies in a *Leishmania*-Endemic Area of Brazil. Vector-Borne and Zoonotic Diseases,v.8, p.407-414, 2008.

CASANOVA C; COSTA A.I.P e NATAL D. Dispersal pattern of the sand fly *Lutzomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous *Leishmania* sis endemic rural area in Southeastern Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.100,p. 719-724,2005.

CASTRO K.R.R;SCODRO R.B.L; DIAS-SVERSUTTI A.C; COETO NEITZKE H, ROSSI R.M; KÜHL J.B ; SILVEIRA T.G.V e TEODORO U. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.38,p 269-276,2008.

CASTRO E.A; LUZ E; TELLES F.Q; PANDEYD A; BISETO A; DINAISKIB M; SBALQUEIROE I e SOCCOLA V.T. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Parana State, Brazil. Acta Tropica,v.93, 141-149,2005.

CELLA W; MELO S.C.C; LEGRIFON S; OLIVEIRA C.M; KUHL F.J.S; BALDUINO J; TEODORO U e ROSSI RM. Flebotomíneos de localidades rurais no noroeste do Estado do Paraná, Brasil. Cadernos de Saúde Pública,v.27,p. 2461-2648, 2011.

CERINO D.A; TEODORO U e SILVEIRA T.G.V. Sand flies (Diptera: Psychodidae) in the urban area of the municipality of Cianorte, Paraná State, Brazil. Neotropical Entomology, v.38, p.853-858, 2009.

CHAGAS A.P; SOARES D.C; SOUSA G.C.R; VIANA R.B;REBELO J.M.M; JOSÉ MANUEL MACÁRIO e GARCEZ L.M. Aspectos ecológicos da fauna de flebotomíneos em focos de leishmaniose na Amazônia Oriental, Estado do Pará, Brasil. Revista Pan-Amazônica de Saúde, v.7,p.123-1322016.

COLLA-JACQUES, FE; CASANOVA, C; PRADO, AP. Study of sand fly fauna in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis and canine visceral leishmaniasis in the municipality of Espírito Santo do Pinhal, São Paulo, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 105, n. 2, p. 208-215, 2010.

CONDINO M.L.F; SAMPAIO S.M.P; HENRIQUES L.F; GALATI E.A.B; WANDERLEY D.M.V e CORRÊA F.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão no município de Teodoro Sampaio, região sudoeste do Estado de São Paulo, Brasil Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.v.31,p. 355-360,1998.

DIAS A.C.S;SCODRO R.B.L; CASTRO K.R.R; NEITZKE H.C e TEODORO U.Estudo Preliminar da Preferência Alimentar de *Nyssomyia neivai* (Pinto) e *Nyssomyia whitmani* (Antunes e Coutinho) (Diptera: Psychodidae) em Área Rural do Paraná. Neotropical Entomology,v.36,p.953-959,2007.

DIAS F.O.P; LOROSA E.S e REBÊLO J.M.M. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). Cadernos de Saúde Pública, v.19 ,p.1373-1380, 2003.

FALCÃO O.E; OSHIRO E.T; FERNANDES W.S; MURAT P.G; DE MEDEIROS M.J, SOUZA A.I; DE OLIVEIRA A.G e GALATI E.A.B. Experimental infection and transmission

of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. PLOS Neglected Tropical Disease, v.11, 2017.

FELICIANGELI M.D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. Medical and Veterinary Entomology, v.18,p.71-80. 2004

FORATTINI O. Entomologia Médica. Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. São Paulo: Editora Edgar Blucher Ltda. e Editora da Universidade de São Paulo, 1973.

FORATTINI, O. P. Notas sobre criadouros naturais de flebótomos em dependências peridomiciliares, no Estado de São Paulo. Arquivos de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo, v.7,p.157-165, 1953.

FRAIHA H; SHAW J.J e LAINSON R. Phlebotominae Brasileiros II. *Psychodopygus wellcomei*, nova espécie antropófila de flebótomo do grupo squamiventris, do sul do estado do Pará, Brasil (Diptera: Psychodidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.69, p.489-500,1971.

GALATI E.A.B. Apostila de Bioecologia e Identificação de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) – Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, Brasil, v.1, p.132, 2018.

GALATI E.A.B. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF, Lainson R. (Eds.). Flebotomíneos do Brasil. Fiocruz, p.53-175,2003.

GALATI E.A.B, NUNES V.L.B, DORVAL M.E.C, OSHIRO E.T, GEUCIRA C, ESPÍNDOLA M.A, ROCHA H.C e GARCIA W.B. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Revista de Saúde Pública,v. 30, p. 115-128,1996.

GALVIS-OVALLOS F.; CASANOVA C; BERGAMSCHI D.PeGALATI E.A.B. A field study of the survival and dispersal pattern of *Lutzomyia longipalpis* in an endemic area of visceral *Leishmania* sis in Brazil. PLOS Neglected Tropical Disease, v. 12, p.14, 2018.

GALVIS-OVALLOS F; DA SILVA M.D; BISPO G.B, *et al.* Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. Leishmaniose viscéral canine dans la région métropolitaine de São Paulo : *Pintomyia fischeri* comme vecteur potentiel de *Leishmania infantum*. Parasite, v.24. p.2, 2017.

GALVÃO C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014.

GROTT S.C;GREINERT-GOULART J.A; RODRIGUES C.M; STEINDEL M;SCHAEFER M e BRISOLA M.C .Epidemiology And Distribution of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Phlebotominae) In Blumenau, SC, Brazil, An Area of Transmission of American Cutaneous Leishmaniasis . Revista de Patologia Tropical,v.43,p.483-491, 2014.

GONÇALVES AL, LUZ AC, KLISIEWICZ D R, GAZDA TL, ALMEIDA MELO AL e THOMAZ-SOCCOL V. Abundancia y diversidad de vectores (Diptera: Psychodidae) en área de transmisión antigua de Leishmaniasis Cutánea en el nuevo mundo después de la construcción del gasoducto Bolivia-Brasil. Memorias del Instituto de Investigaciones. Em Ciencias de la Salud.v. 17,p. 16-23, 2019.

GONTIJO B; CARVALHO L.B. Leishmaniose tegumentar americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.1.36, p.71-80,2003.

GOMES AC e GALATI EAB. Flebotomíneos de Londrina, Paraná (Brasil) e observações ecológicas sobre algumas espécies. Rev. Saúde Pública, v.11,p.284-287,1977.

GUIMARÃES V.C.F.V; PRUZINOVA K; SADLOVA J ; VOLFOVA V ; MYSKOVA J; BRANDÃO FILHO S.P e VOLF P. *Lutzomyia Migonei* Is A Permissive Vector Competent For *Leishmania Infantum*,. Parasites e Vectors, v.9, p.159, 2016.

IPARDES- Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social, 2003.

JORQUERA A; GONZÁLEZ R; MARCHÁN-MARCANO E; OVIEDO M e MATOS M. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an

endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 100, p.45-48,2005.

KILLICK-KENDRICK R. Phlebotomine vectors of *Leishmania* spp.: a review. Medical and Veterinary Entomology, v.4, p.1-24, 1990.

LANUS E.C; GROSSO M.L ;PINERO J.E; VALLADARES B e SALOMON O.D. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern argentina Acta Tropica, v.98,p.1-5,2006.

LAVITSCHKA CO. Competência vetora de (*Nyssomyia intermedia* e *Nyssomyia neivai* (Diptera, Psychididae, Phlebotominae) para *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, São Paulo ,2017.

LIDANI K.C.F; ANDRADE F.A; TIZZOT M.R.P.A; COSTA-RIBEIRO M.C.V; BELTRAME M.H e MESSIAS-REASON I.J. Visceral Leishmaniasis and Natural Infection Rates of *Leishmania* in *Lutzomyia longipalpis* in Latin America, The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis, Capítulo. 4, p. 60-77, 2017.

LINS R;OLIVEIRA S; SOUZA N.A;QUEIROZ R;JUSTINIANO S;WARD R; KYRIACOU C; PEIXOTO A.A. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies, v.11,p.117-122,2002.

LIMA JUNIOR M.S; ANDREOTTI R; DORVAL M.E.M.C; OSHIRO E.T; OLIVEIRA A.G D.E e MATOS M.D.F.C. Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 42, p. 303-308,2009.

LUTZ A. e NEIVA A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. Memórias do Instituto. Oswaldo Cruz,v. 4, p. 84-95,1912.

LUZ E, MEMBRIVE N; CASTRO E.A; DEREURE J; PRATLONG J; DEDET A; PANDEY A e THOMAZ-SOCCOL V. *Lutzomyia whitmani* (diptera: psychodidae) as vector

of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná State, southern Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.94,p. 623-631, 2000.

MAACK R. Geografia física do estado do Paraná. Curitiba: Banco de Desenvolvimento do Paraná; 2.ed, p.450,1968.

MACEDO I.T.F; BEVILAQUA C.M.L; MORAIS N.B; SOUSA L.C; LINHARES F.E, AMÓRA S.S.A e OLIVEIRA L.M.B. Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de Leishmaniose Visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. *Revista de Ciência Animal*, v.18,p.67-74, 2008.

MACHADO T.O.D.O; MINUZZI-SOUZA T.T.C; FERREIRA T.A; FREIRE L.P; TIMBÓ R.V e VITAL T.E. The role of gallery forests in maintaining Phlebotominae populations: potential *Leishmania* spp. vectors in the Brazilian savanna. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.112,p.681-691,2017.

MARCONDES C.D. Defense of taxonomy, a Sisyphus task? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.47,p. 538, 2014 .

MARCONDES C.B; SANTOS-NETO L.G e LOZOVEI A.L. Ecology of Phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in Brazilian Atlantic Forest *Ecologia de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) na Floresta Atlântica do Brasil*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.39,p.51-55, 2011.

MARCONDES C.B. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomology News*,v.118,p.351-356,2007.

MARCONDES C.B; SANTOS-NETO L.G e LOZOVEI A.L. Ecology of Phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in Brazilian Atlantic Forest. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34,p. 255-260, 2001.

MARCONDES C.B e BORGES P.S.S .Distinction of males of *Lutzomyia intermedia* (Lutz e Neiva, 1912) complex by ratios between dimensions and by an artificial neural network

(Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 95, p. 685-688, 2000.

MARCONDES C.B. Anomalies of *Lutzomyia intermedia* (Lutz e Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.94, p. 365-366, 1999.

MARCONDES C.B. Redescription of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz e Neiva, 1912), and resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 91, p. 457-462, 1996.

MARGONARI C; SOARES R.P E ANDRADE-FILHO J.D. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and Leishmania infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. Journal of Medical Entomology v.47, p.1212-1219, 2010.

MARINHO R.M; FONTELES R.S; VASCONCELOS G.C; AZEVÊDO P.C.B; MORAES J.L. Pe REBÊLO J.M.M. Flebotomínes (Diptera, Psychodidae) em reservas florestais da área metropolitana de São Luís, Maranhão, Brasil. Revista Brasileira de Entomologia, v. 52, p. 112-116, 2008.

MARKOULATOS P.; SIAFAKAS N. e MONCANY M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. Journal Of Clinical Laboratory Analysis, v.16, p.47-51, 2002.

MAROLI M; FELICIANGLI M.D e ARIAS J. Métodos de captura, Conservacion y Montaje de los Flebotomos (Diptera: Psychodidae). OPS/OMS/HCP/HCT/95/97, Washington, 1997.

MARTINS A.V; WILLIAMS P e FALCÃO A.L. American sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Academia Brasileira de Ciências, v.43, p. 733-736, 1978.

MASSAFERA R; SILVA A.M; CARVALHO A.P; SANTOS D.R; GALATI E.A.B e TEODORO U. Fauna de flebotomíneos do município de Bandeirantes, no Estado do Paraná. Revista Saúde Pública, v. 39, p.571-577, 2005.

MELO H.A; ROSSONI D.F e TEODORO U. Effect of vegetation on cutaneous Leishmaniasis in Paraná, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo, v.113, p.113-116, 2018.

MDA (Ministerio do Desenvolvimento Agrario)- <http://sit.mda.gov.br>, 2015.

MIRANDA J.C; REIS E; SCHRIEFER A; GONÇALVES M; REIS M.G .e CARVALHO L. Frequency of Infection of *Lutzomyia* Phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian Endemic Area as Assessed by Pinpoint Capture and Polymerase Chain Reaction. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.97, p.185-188, 2002 .

MISSAWA N.A; MICHALSKY E.M; DIAS F; LATORRE C e DIAS E.S. *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania (L.) chagasi* in Várzea Grande, Mato Grosso State, Brazil, an area of intense transmission of visceral *Leishmania* sis. Cadernos de Saúde Pública, v. 26, p. 2414-2419, 2010.

MISSAWA N.A, LIMA M.G.B.M e HILDA R. Distribuição geográfica de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes e Coutinho, 1939) no Estado de Mato Grosso. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.40, p.49-52, 2008.

MS - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. –Ministério da Saúde, 2017.

MOSCHIN J.C; OVALLOS, F.G; SEI I.A; e GALATI E.A.B. Ecological aspects of phlebotomine fauna (Diptera, Psychodidae) of Serra da Cantareira, Greater São Paulo Metropolitan region, state of São Paulo, Brazil. Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 16, p. 190-201, 2013.

MUNSTERMANN L.E; MARQUARDT WC; BLACK WC; FREIER J; HAGEDORN H; HEMINGWAY J; HIGGS S; JAMES A.A e KONDRATIEFF B. Phlebotomine sand flies, the Psychodidae. (Ed.) Biology of Disease Vectors, 2nd Edition, Elsevier Science, San Diego, 2004.

MUNIZ L.H.G; ROSSI R.M; NIETZKE H.C; MONTEIRO M.W e TEODORO U. Host feeding preferences of sandflies in rural area, Southern Brazil. *Revista de Saúde Pública*, v.40,p.1087-1093, 2006.

ODORIZZI R.M.F.N e GALATI E.A.B. Flebotomíneos de várzea do rio Aguapeí, região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*,v.41,p.645-652, 2007.

OLIVEIRA-PEREIRA Y.N; REBÊLO J.M.M; MORAES J.L.P e PEREIRA S.R.F. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, Lutzomyia) por *Leishmania* sp na Amazônia maranhense *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.39, p.540-543, 2006

OLIVEIRA G.M.G; FILHO E.A.F; ANDRADE G.M.C; DE ARAÚJO L.A; OLIVEIRA M.L.G e CUNHA R.V. 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*,v.1,p.83-94, 2010.

OLIVEIRA D.M; REINHOLD-CASTRO K.R; BERNAL M.V.Z; OLIVEIRA LEGRIFON C.M; CAMPANA LONARDONI M.V.C; TEODORO U, e SILVEIRA T.V. Natural Infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania (Viannia)* spp. in the State of Parana', Southern Brazil, Detected by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases*, v.11, p.137-143.2011.

OPAS- Organização Pan-Americana de Saúde, 2017. Disponível em: <http://www.paho.org>. Acessado em 06 de março, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS)- Organização Mundial da Saúde, 2016: Disponível em: <http://www.who.int/en>. Acessado em 05 de março, 2018.

PAES M.G. Estudo de quatro espécies de *Lutzomyia* França, 1924 (Diptera: Psychodidae), em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar Americana na periferia de Manaus (Amazonas – Brasil). [Dissertação de Mestrado]. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, 1991.

PAIVA B.R; OLIVEIRA A.G; DORVAL M.E; GALATI E.A.B e MALAFRONTA R.S. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Actatropica*, v.2, p.132010.

PAIVA B.R; SECUNDINO N.F.C; PIMENTA P.F.P; GALATI E.A.B; ANDRADE JUNIOR H.F e MALAFRONTA R.S. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. *Caderno de Saúde Pública*, v.23,p.87-94, 2007.

PASSOS V.M.A; LASMAR E.B; GONTIJO C.M.F; FERNANDES O e DEGRAVE W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, p. 19-20, 1996.

PASQUALI A.K.S; BAGGIO R.A; BOEGER W.A; GONZÁLEZ-BRITEZ N; GUEDES D.C e CHAVES E.C. Dispersion of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in central-southern Brazil: Evidence from an integrative approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.13,p.1-20,2019.

PEREIRA N.C.L; MICHALS.K.Y; LARA-SILVA F.O; LANA R.S; PAULA A.J.V; PEREIRA D.M; LOPES J.V; FORTES-DIAS C.L e DIAS E.S. Ecology of phlebotomine sand flies in a Brazilian area with recent leishmaniasis transmission (Itaúna, in Minas Gerais state) *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*,v.53, 2020.

PEREIRA JÚNIOR A.M; RESADORE F; RODRIGUES A.N; FERREIRA G.E.M; JULIÃO G.R e MEDEIROS J.F. New record of four sand fly species (Diptera, Psychodidae) in Rondônia State, Western Amazon, Brazil. *Brazilian Journal of Biology Brazilian*, v. 80, p. 206-208,2019.

PINHEIRO F.G; LUZ S.L.B e FRANCO A..MR. Infecção natural por tripanossomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) em áreas de leishmaniose tegumentar americana no Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica*, v. 38, p. 165-172,2008.

PINTO M.C; BRAY D.P e EIRAS A.E. Attraction of the cutaneous leishmaniasis vector *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to host odour components in a wind tunnel. *Parasites Vectors* v.5, p.210, 2012.

PINTO I.S; SANTOS C.B; FERREIRA A.L e FALQUETO A. Richness and diversity of sand flies (Diptera, Psychodidae) in an Atlantic rainforest reserve in southeastern Brazil. *Journal of Vector Ecology*, v.35, p.325-32,2010.

PINTO C. Arthropodos parasitos e transmissores de Doenças. Tomo II, Phlebotomos. *Bibliotheca Scientifica Brasileira, Collecção Medico-Cirurgica*, v.117,p.491-538,1930.

PINTO C .“*Phlebotomus neivai*” e “*Phl. fischeri*” N. SP. SP– Sobre o aparelho espicular dos phlebotomos e seu valor especifico. *Sociedade de Medicina*, v.4, p. 369-375, 1926.

PITA-PEREIRA D; SOUZA G.D; PEREIRA T.A; ZWETSCH A; BRITTO C e RANGEL E.F . *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. *Acta Tropica*, v. 120,p.273-275, 2011.

PITA-PEREIRA D; SOUZA G.D; ZWETSCH A; ALVES C.R; BRITTO C e RANGEL E.F. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) brasiliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. *American Journal of Tropical Medicine and Higyene*, v.80,p.593-595, 2009.

PITA-PEREIRA D;ALVES C.R ; SOUZA M.M; BRAZIL R.P; BERTHO A.L ; BARBOSA A.F e BRITTO C.C. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.12,p.905-913, 2005.

QUARESMA P.F; CARVALHO G.M.L; RAMOS M.C.N.F; e ANDRADE FILHO J.D. Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in

Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 107, p. 480-485, 2012.

RANGEL E.F.; LAINSON R.; COSTA S.M.; SHAW J.J e CARVALHO B.M. Sand fly vectors of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. In: Rangel, E.F e Shaw, J.J. (eds). 141 Brazilian sand flies: Biology, taxonomy, medical importance and control. Rio de Janeiro, Brazilian Ministry of Health Fundação Oswaldo Cruz .v.141,p. 341-380, 2018.

RANGEL E.F e LAINSON R. Proven and putative vectors of American cutaneous Leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v,4, p. 937-954,2003.

RASSI Y; ABAI M.R; JAVADIAN E ; RAFIZADEH S; IMAMIAN H;MOHEBALI M, FATEH M; HAJJARAN H e ISMAILI K. Molecular data on vectors and reservoir hosts of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. Entomologie Médicale, v.101, p.425-428,2008.

READY P.D; SMITHDE e KILLICK-KENDRICK R. DNA hybridations on squash-blotted sandflies to identify both I *Phlebotomus papatasi* and infecting *Leishmania major*. Medical and veterinary Entomology, v,2, p. 109-116,1988.

READY P.D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. The Annual Review of Entomology ,v.58, p.227-250,2013.

REBÊLO J.M.M; OLIVEIRA S.T; SILVA F.S. e COSTA J.M.L. Sandflies (Diptera, Psychodidae) of the amazonia of Maranhão. V. Seasonal occurrence in ancient colonization area and endemic for cutaneous leishmaniasis. Revista Brasileira de Biologia, v.61,p. 107-115,2001.

RÊGO F.D; SOUZA G.D; MIRANDA J;B, PEIXOTO L.V e ANDRADE-FILHO J.D. Potential Vectors of Leishmania Parasites in a Recent Focus of Visceral Leishmaniasis in Neighborhoods of Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil, Journal of Medical Entomology,v.57,p.312-317, 2020.

RÊGO F.D; SOUZA GD, DORNELLES L.F. Pe ANDRADE FILHO J.D. Ecology And Molecular Detection Of *Leishmania Infantum* Nicolle, 1908 (Kinetoplastida: Trypanosomatida) In Wild-Caught Sand Flies (Psychodidae: Phlebotominae) Collected In Porto Alegre, Rio Grande Do Sul: A New Focus Of Visceral Leishmaniasis In Brazil. Journal Of Medical Entomology, v.56, p.519–525, 2019

ROCHA L.S.; FALQUETO A; DOS SANTOS, C.B ; FERREIRA, A.L; GRAC A.G.C; GRIMALDI J.R.G e CUPOLILLO E. Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. Revista Sociedade Tropical Medicina v.104,p. 461–466, 2010.

RODRÍGUEZ N;AGUILAR C.M BARRIOS Ae BARRER D.C. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sand flies by the polymerase chain reaction. Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene,v.93, p.47-49, 1999.

ROQUE A.L.R e JANSEN A.M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, v.29,p.251-262, 2014.

SALES K.G.S; COSTA P.L; MORAIS R.C.S; OTRANTO D; BRANDÃO-FILHO S.P;CAVALCANTI M.P e DANTAS-TORRES F. Identification of phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR. Parasites and Vectors, v.8,p.230, 2015.

SALES K.G.S; MIRANDA D.E.O; SILVA F.J.; OTRANTO D; FIGUEREDO L.A. e DANTAS-TORRES F. valuation of different storage yimes and preservation methods on phlebotomine sand fly DNA concentration and purity. Parasites and Vectors, v.13,p.399, 2020.

SAMBROOK J, FRITSCH EF e MANIATIS T. Molecular clonig; a laboratory manual 2. ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS B.A; REINHOLD-CASTRO K.R; CRISTÓVÃO E.C; SILVEIRA T.G e TEODORO U. Sand flies on Paraná River Islands and natural infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania* in Southern Brazil. Journal of Vector Ecology, v.41, p.186-189, 2016.

SANTOS D.R, FERREIRA A.C e BISETTO JUNIOR A. The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Paraná, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.45,p.643-645,2012 .

SANTOS D.R,;SANTOS A.R; POLANI L.P; OLIVEIRA O; SILVA A.M e GALATI E.A.B. Ocorrência de *Nyssomyia intermedia* (Lutz e Neivai) (Diptera Psychodidae) e fauna associada no Paraná. *Neotropical Entomology*. v. 38, p. 298-301, 2009.

SARAIVA L CARVALHO G.M.L; GONTIJO C.M.F; QUARESMA P.F; LIMA A.C.V.M.R; FALCÃO A.L e ANDRADE FILHO J.D. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v.46, p.1159-1163,2009.

SARAIVA L; LOPES J. S; OLIVEIRA G.B.M; BATISTA F. A; FALCÃO A. L e FILHO J D .A. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó, estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*,v. 39,p. 56-63, 2006.

SHANNON R. Methods for collecting and feeding mosquitos in jungle yellow fever studies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1939.

SHERLOCK IA. Importância Médico-Veterinária: A importância dos flebotomíneos. In Rangel EF e Lainson R, editores. *Flebotomíneos do Brasil*.Fiocruz, 2003.

SHIMABUKURO P.H.F; ANDRADE A.J e GALATI E.A.B. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. *Zookeys*, v.660, p.67-106,2017.

SILVA R.A; RUBENS A; MERCADO V.T.C; HENRIQUES L.F.C; DE CARVALHO R.M, e WANDERLEY D.M.V. Magnitude e tendência da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo, Brasil, 1975 a 2008. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v.15, p. 617-626, 2012.

SILVA A.F; OLIVEIRA L.M.R.D e GALATI E.A.B. Fatores relacionados à ocorrência de leishmaniose tegumentar no Vale do Ribeira. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.43, p.46-51, 2010.

SILVA A.M; DE CAMARGO N; DOS SANTOS D.R ; MASSAFERA R ; FERREIRA A.C ; POSTAI C; CRISTÓVÃO E.C ; KONOLSAISEN J.F ; BISELTO A.J; PERINAZO R ;TEODORO U e GALATI E.A.B. Diversidade, Distribuição e Abundância de Flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) no Paraná. *Neotropical Entomology*, v.37,p.209-225, 2008.

SILVA J.G.D; WERNECK G.L; CRUZ M.S.P; COSTA C.H.N e MENDONÇA I.L. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Teresina, Piauí, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v.23,p.1715-1720, 2007.

SILVEIRA NETO S; NAKANO O; BARBIN De VILLA NOVA N.A. Manual de ecologia dos insetos. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976.

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Brasil, 2018.

SOARES M.R.A; CARVALHO C.C; SILVA L.A; CRUZ SOUZA M.S;BARRAL A.M.P;REBÊLO J.M.M e PEREIRA, FERREIRA SR. Análise molecular da infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* em área endêmica de leishmaniose visceral no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*,v.26,p.2408-2413,2010.

SOUZA C.F; BRAZIL R.P; CQUA P.D.B e FILHO DE SOUZA J.D.A. The phlebotomine sand flies fauna in Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil. *Parasites and Vectors*,v.8,p.1-7, 2015.

SOUZA G.D; SANTOS E e ANDRADE FILHO J.D. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104,p. 1181-1182, 2009.

TEODORO U; SILVEIRA H.G.V; SANTOS D.R; SANTOS E.S; SANTOS A.R; OLIVEIRA O e KÜHL J.B. Frequência da fauna de flebotômíneos no domicílio e em abrigos de animais domésticos no peridomicílio, nos municípios de Cianorte e Doutor Camargo Estado do Paraná - Brasil. Revista de. Patologia Tropical, v.30, p.209-224, 2011.

TEODORO U; LONARDONI M.Y.C; SILVEIRA T.G.Y; DIAS A.C; ABBAS M, ALBERTON D e SANTOS D.R. Light and heat as attraction factors of *Nyssomyia whitmani* in a rural area, Southern Brazil. Caderno de. Saúde Pública, v. 41, p.383-388, 2007.

TEODORO U; SILVEIRA T.G.V; DOS SANTOS D.R; DOS SANTOS E.S; RODRIGUES DOS SANTOS A.R; DE OLIVEIRA O; KÜHL J.B e ALBERTON D. Influência da reorganização, da limpeza do peridomicílio e a da desinsetização de edificações na densidade populacional de flebotômíneos no Município de Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. Caderno de Saúde Pública, v.19, p.1801-1813, 2003.

TEODORO U; LA SALVIA FILHO V; LIMA E.M; SPINOSA R.P; BARBOSA O.C; FERREIRA E.M.C e LONARDONI M.Y.C. Observações sobre o comportamento de flebotômíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no Norte do estado do Paraná, sul do Brasil. Revista de. Saúde Pública, v.27, p.242-249, 1993.

VASCONCELOS DOS SANTOS T; DE PITA-PEREIRA D; ARAÚJO-PEREIRA T; BRITTO C e SILVEIRA FT. *Leishmania* DNA detection and species characterization within phlebotomines (Diptera: Psychodidae) from a peridomicile-forest gradient in an Amazonian/Guianan bordering area. v.14, 2019.

XIMENES M.F.F.M; SOUZA M.F e CASTELLÓN E.G. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral *Leishmania* sis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 94, p. 427-432, 1999.

WILLIAMS J.G.K; KUBELIK A.R; LIVAK K.J; RAFALSKI J.A e TINGEY S.V .DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids, v.82, p.:6531-6535, 1990.

YOUNG D. A review of the bloodsucking psychodid flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae). Institute of Food and Agricultural Sciences; Agricultural Experiment Stations, Gainesville. Technical Bulletin, p.266,1979.

YOUNG, D.G. e DUNCAN M.A. Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in the Mexico, the West Indies, Central and the South America (Diptera:Psychodidae). Memoirs of the American Entomological institute, v.89,p.881, 1994.

APÊNDICE I

Pontos (P)	Caracterização das áreas de coletas	Caso de LTA relatado em moradores
P1	Área rural. Presença de animais domésticos (galinhas e cachorros) no peridomicílio. Casa de madeira próxima a borda de mata e afastada da via de acesso de carros. Presença de curso de água (ramal do Rio Assunguí) na parte anterior da casa. Luz no peridomicílio. Peridomicílio limpo. Ausência de vão na parte inferior da casa.	SIM
P2	Área rural. Presença de animais domésticos (galinhas) no peridomicílio. Casa de madeira próxima à borda de mata e frontal a via de acesso de carros. Presença de curso de água (ramal do Rio Assunguí) na parte posterior da casa. Presença de bananeiras. Luz no peridomicílio. Peridomicílio limpo. Ausência de vão na parte inferior da casa.	SIM
P3	Área rural. Presença de animais domésticos (cachorros, galinhas e porcos) no peridomicílio. Casa de madeira próxima à borda de mata e afastada da via de acesso de carros. Presença de curso de água (ramal do Rio Assunguí) na parte anterior da casa. Presença de bananeiras e bambuzais. Peridomicílio com acúmulo de lixo. Presença de vão na parte inferior da casa.	SIM
P4	Área rural. Presença de animais domésticos (cachorros e galinhas) no peridomicílio. Casa de madeira próxima à borda de mata e paredão de rochas, porém frontal a via de acesso de carros. Presença de curso de água (ramal do Rio Assunguí) na parte posterior da casa. Presença de horta na lateral da casa. Luz proveniente de iluminação pública. Peridomicílio limpo. Presença de vão na parte inferior da casa.	SIM
P5	Área rural. Presença de animais domésticos (cachorros e galinhas) no peridomicílio. Casa de alvenaria distante da borda de mata e, porém frontal a via de acesso de carros. Presença do Rio Assunguí na parte posterior da casa. Presença de luz no peridomicílio. Peridomicílio limpo. Ausência de vão na parte inferior da casa.	NÃO

P6	Área rural. Presença de animais domésticos (cachorros e galinhas) no peridomicílio. Casa de madeira próxima à borda de mata frontal e distante via de acesso de carros. Presença de curso de água (ramal do Rio Assunguí) na parte frontal da casa. Peridomicílio limpo. Ausência de luz no peridomicílio. Ausência de vão na parte inferior da casa.	SIM
P7	Área rural. Presença de animais domésticos (cachorros e galinhas) no peridomicílio. Casa de alvenaria distante da borda de mata e frontal a via de acesso de carros. Na parte posterior e lateral da casa havia plantação de <i>Pinus</i> spp. Ausência de curso de água próximo a casa. Luz no peridomicílio. Peridomicílio limpo. Presença de pomar na lateral da casa. Ausência de vão na parte inferior da casa.	SIM
P8	Área rural. Presença de animais domésticos (cachorros e galinhas) no peridomicílio. Presença de chiqueiro próximo a casa. Casa de alvenaria distante da borda de mata e próxima a via de acesso de carros. Presença de curso de água (ramal do Rio Assunguí) na parte frontal da casa. Luz no peridomicílio. Peridomicílio limpo. Presença de vão na parte inferior da casa.	SIM
P9	Área rural. Presença de animais domésticos (cachorros e galinhas) no peridomicílio. Presença de galinheiro próximo a casa. Casa de alvenaria distante da borda de mata e frontal a via de acesso de carros. Ausência de curso de água próximo a casa. Luz no peridomicílio. Peridomicílio limpo. Presença de pomar e horta nas laterais e na parte posterior da casa. Ausência de vão na parte inferior da casa.	SIM
P10	Área rural. Presença de animais domésticos (cachorros e galinhas) no peridomicílio. Presença de galinheiro próximo a casa. Presença de chiqueiro afastado da casa. Casa de alvenaria próxima a borda de mata e distante da via de acesso de carros. Ausência de curso de água próximo a casa. Luz no peridomicílio. Peridomicílio limpo. Presença de pomar (incluindo bananeiras) e horta nas laterais e na parte posterior da casa. Ausência de vão na parte	NÃO

	inferior da casa. Presença de locas de animais silvestres (ex. tatus).	
--	--	--

APÊNDICE II



Prancha: A) Ponto 1 mostrando uma casa de madeira com o curso de água do Rio Assunguí; B) Ponto 2 mostrando parte da casa de madeira e a presença de bananeiras; C) Ponto 3 mostrando o caminho a ser percorrido até a casa, passando por bambuzais e pelo curso de água do Rio Assunguí; D) Ponto 3 mostrando o vão embaixo da casa de madeira; E) Ponto 5 mostrando a casa de alvenaria; F) Ponto 4 mostrando o vão embaixo da casa com a presença de cachorros e de um porco; G) Ponto 9 mostrando o local de instalação da armadilha CDC.

APÊNDICE III

Amostra	N de flebs	Conc.	260/280	260/230
I-05/17- 1	3	2	2,1	1,53
I-05/17- 2	7	7,2	2,28	2,04
I-05/17- 3	8	3,1	2,52	-2,52
I-05/17- 4	1	1	2,45	2,69
I-05/17- 5	3	3	2,38	7,08
I-05/17- 6	10	5,6	2,31	0,64
I-05/17- 7	7	15,6	2,25	1,16
I-05/17- 8	10	11,3	2,51	1,46
I-05/17- 9	7	10,5	2,06	0,89
I-05/17- 10	10	13,9	2,32	1,4
I-05/17- 11	10	13	2,32	1,39
I-05/17- 12	4	9,6	2,19	0,67
I-05/17- 13	10	10,8	2,32	0,82
I-05/17- 14	7	8,5	2,37	1,14
I-05/17- 15	1	2,8	2,93	0,44
I-05/17- 16	2	2,7	2,64	0,78
I-08/17- 17	10	13,3	2,36	1,57
I-08/17- 18	10	11	2,33	1,11
I-08/17- 19	10	7,8	2,13	0,87
I-08/17- 20	3	3,8	2,45	0,27
I-08/17- 21	10	4,6	1,65	0,46
I-08/17- 22	10	7,1	1,81	0,25
I-08/17- 23	10	9,1	1,96	0,47
I-08/17- 24	10	7,9	1,99	0,28
I-08/17- 25	1	1,6	1,61	0,08
I-08/17- 26	1	1,3	2,4	0,02
I-08/17- 27	7	5,4	2,14	0,48
I-08/17- 28	2	3,1	1,71	0,11
I-08/17- 29	1	1,8	2,25	0,21
I-08/17- 30	5	5,3	1,91	0,08
I-08/17- 31	4	7,2	2,12	0,13
I-08/17- 32	2	2,8	1,87	0,07
I-08/17- 33	6	7,1	1,91	0,6
I-09/17- 34	10	10,4	1,93	0,85
I-09/17- 35	10	7,2	1,8	0,47
I-09/17- 36	10	6,3	1,87	0,47
I-09/17- 37	10	6,6	1,86	0,67
I-09/17- 38	10	12,8	2,09	1,1
I-09/17- 39	10	6,4	1,68	0,44

I-09/17- 40	1	0,6	1,34	0,09
I-09/17- 41	10	9,7	2,19	0,2
I-09/17- 42	7	7,9	1,62	0,22
I-09/17- 43	10	11,4	2	1,2
I-09/17- 44	10	12	1,81	0,61
I-09/17- 45	10	8,3	2,3	0,77
I-09/17- 46	10	9	2,13	1,34
I-09/17- 47	10	13,9	2,2	0,85
I-09/17- 48	10	9	2,25	0,94
I-09/17- 49	10	8,7	1,93	0,74
I-09/17- 50	10	6,2	1,93	0,44
I-09/17- 51	10	5,7	1,79	0,73
I-09/17- 52	10	11,1	1,81	0,8
I-09/17- 53	10	9	1,9	0,85
I-09/17- 54	10	19,3	1,97	1,51
I-09/17- 55	9	13,7	1,95	1,19
I-09/17- 56	10	9,3	2	1,17
I-09/17- 57	4	8	1,76	0,55
I-09/17- 58	1	3,2	2,31	0,79
I-09/17- 59	4	6,2	1,94	0,99
I-09/17- 60	10	10,7	2,07	1,16
I-09/17- 61	6	6,3	1,74	0,47
I-09/17- 62	1	2,2	2,1	0,14
I-09/17- 63	10	13,4	2,36	1,05
I-09/17- 64	10	16,6	2,2	1,21
I-09/17- 65	10	AD	AD	AD
I-10/17-66	2	2,8	1,99	0,59
I-10/17-67	1	5,1	2,14	0,65
I-10/17-68	3	2,4	2,5	0,71
I-10/17-69	1	3,2	2,27	0,45
I-10/17-70	3	1,8	2,17	0,54
I-10/17-71	1	2	1,35	0,22
I-11/17-72	5	5,3	2,32	0,47
I-11/17-73	4	5,7	2,21	0,3
I-11/17-74	8	1,1	4,24	0,57
I-11/17-75	1	5,3	2,14	0,61
I-11/17-76	7	4,8	2,43	0,93
I-11/17-77	1	6,8	2,32	1,15
I-12/17-78	8	0,6	2,05	0,37
I-12/17-79	1	1,1	3,88	0,44
I-12/17-80	1	8,7	2,12	0,62
I-12/17-81	10	12,1	1,81	1,15
I-12/17-82	6	13	2,21	1,21
I-12/17-83	10	9	2,26	0,89
I-12/17-84	10	10	2,1	0,97
I-12/17-85	10	3,2	2,04	0,64

I-12/17-86	10	8,1	1,93	0,53
I-12/17-87	10	5,8	1,89	0,66
I-12/17-88	10	8	2,18	1,23
I-12/17-89	10	4	2,6	0,86
I-12/17-90	10	5,2	2,29	0,34
I-12/17-91	10	7,2	1,81	0,5
I-12/17-92	10	9,2	1,82	0,89
I-12/17-93	10	7,3	1,78	0,31
I-12/17-94	1	2,1	1,59	0,56
I-12/17-95	1	AD	AD	AD
I-12/17-96	1	0,9	4,06	0,23
I-12/17-97	8	6,6	2,14	1,26
I-12/17-98	10	27,3	2,13	1,67
I-12/17-99	5	8,7	2,27	1,09
I-01/18-100	3	4,4	2,21	0,82
I-01/18-101	1	AD	AD	AD
I-01/18-102	1	2,9	1,52	0,25
I-02/18-103	1	2,9	1,83	0,28
I-02/18-104	3	2,3	2,27	0,36
I-02/18-105	1	3,6	1,36	0,22
I-02/18-106	6	7,6	1,69	0,52
I-02/18-107	1	5,2	1,96	0,35
I-02/18-108	3	9,5	1,81	0,43
I-02/18-109	1	1,2	2,37	0,11
I-02/18-110	10	6,9	1,66	0,33
I-02/18-111	8	8,5	2,07	0,6
I-02/18-112	10	7,3	1,97	0,79
I-02/18-113	10	7,3	1,64	0,39
I-02/18-114	10	6,4	2,12	0,91
I-02/18-115	10	9,2	2,04	1,04
I-02/18-116	10	7,1	2,33	1
I-02/18-117	10	7,5	1,96	0,76
I-02/18-118	10	6,8	2,11	0,81
I-02/18-119	10	4,2	1,77	0,6
I-02/18-120	10	6,9	1,83	0,69
I-02/18-121	10	4,6	2,67	0,49
I-02/18-122	10	6,4	1,86	0,8
I-02/18-123	10	6,5	2,1	0,18
I-02/18-124	10	5,4	1,88	0,62
I-02/18-125	10	3,1	2,02	0,26
I-02/18-126	10	5	1,84	0,5
I-02/18-127	10	7,7	1,75	0,21
I-02/18-128	10	8,9	1,91	0,56
I-02/18-129	10	11,5	1,73	0,63
I-02/18-130	2	1	4,97	0,3
I-02/18-131	1	2,4	1,86	0,18

I-02/18-132	1	AD	AD	AD
I-02/18-133	10	9,8	1,93	0,9
I-02/18-134	10	4,8	1,68	1,27
I-02/18-135	10	2,5	2,94	2,73
I-02/18-136	10	5,4	2,3	2,01
I-02/18-137	10	10,1	2,24	0,6
I-02/18-138	5	7,6	2,14	1,25
I-02/18-139	2	3,2	1,7	0,36
I-02/18-140	8	5,3	2,03	1,6
I-02/18-141	10	8,4	2	1,16
I-02/18-142	10	7,1	2,06	1,65
I-02/18-143	10	5,9	1,95	1,21
I-02/18-144	10	5,2	2,13	1,41
I-02/18-145	10	6,9	2,07	1,16
I-02/18-146	6	12,6	2,04	1,78
I-02/18-147	5	2,2	2,92	1,78
I-02/18-148	10	11	1,95	1,06
I-02/18-149	3	7,6	2,34	1,15
I-03/18-150	1	1,2	2,12	0,38
I-03/18-151	2	1,1	4,55	0,29
I-04/18-152	2	2,2	2,43	0,15
I-04/18-153	1	AD	AD	AD
I-04/18-154	10	10,2	2,55	1,29
I-04/18-155	10	9,2	2,37	0,76
I-04/18-156	10	AD	AD	AD
I-04/18-157	2	2,4	4,13	0,62
I-04/18-158	10	7,8	2,6	1,9
I-04/18-159	10	9,6	2,02	0,35
I-04/18-160	10	10,1	2,25	1,33
I-04/18-161	8	8,1	2,14	0,9
I-04/18-162	3	2,8	2,63	0,43
I-04/18-163	3	2,8	3,09	0,91
I-04/18-164	1	2,7	2,23	0,31
I-05/18-165	10	4	2,12	0,74
I-05/18-166	10	15,6	2,04	0,63
I-05/18-167	10	3,7	3,02	1,2
I-05/18-168	6	6,3	2,53	1,46
I-05/18-169	3	3,1	2,38	0,77
I-05/18-170	3	2,8	4,07	0,48
I-05/18-171	10	4,5	2,54	0,57
I-05/18-172	2	1,8	2,21	0,55
I-05/18-173	2	2	3,22	1,02
I-05/18-174	1	1,6	3,07	1,11
I-05/18-175	7	2,4	1,89	0,73
I-07/18-176	2	3,3	2,66	1,51
I-07/18-177	1	2,3	3,23	0,89

Pools de Flebotomíneos, entre 1 a 10 espécimes (N/ Número de flebotomíneos por *pool*), (Conc/ Concentração em ng de DNA total extraído), (Razão 260/280 o resultado da divisão expressa a proporção entre a quantidade de DNA e a quantidade de proteínas extraídos, indicando a pureza do DNA obtido), (Razão 260/230 que indica contaminação com diversos compostos: fenóis, guanidina, carboidratos e proteínas.), AD/ amostra descartada.

APÊNDICE IV



Legenda: M- marcador de peso molecular 100 bp, 1 e 2 - Controles negativos da reação, 3 ao 6 - machos de insetário, 7 ao 17 - fêmeas do campo, 11, 14 e 16 - fêmeas positivas, 18 e 19 - controle positivo

