

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

HUMBERTO GRIPP DE FARIA

**FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) NO PERIDOMICÍLIO DE
MORADORES DA ZONA RURAL DO MUNICÍPIO DE IÚNA, ESPÍRITO SANTO**

ALEGRE-ES

2017

HUMBERTO GRIPP DE FARIA

**FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) NO PERIDOMICÍLIO DE
MORADORES DA ZONA RURAL DO MUNICÍPIO DE IÚNA, ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Santos Zanini

ALEGRE-ES

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

F224f Faria, Humberto Gripp Faria, 1983-
Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no peridomicílio de moradores da zona rural do município de Iúna, Espírito Santo / Humberto Gripp de Faria. – 2017.
56 f. : il.

Orientador: Marcos Santos Zanini.
Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Leishmania. 2. Diptero. 3. Espírito Santo (Estado). 4. Iúna (ES).
I. Zanini, Marcos Santos. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 619j

HUMBERTO GRIPP DE FARIA

**FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) NO PERIDOMICÍLIO DE
MORADORES DA ZONA RURAL DO MUNICÍPIO DE IÚNA, ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.

Aprovado em 06 de junho de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

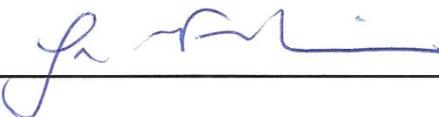


Prof. Dr. Marcos Santos Zanini
Universidade Federal do Espírito Santo

Orientador



Prof.ª Dr.ª Luceli de Souza
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof.ª Dr.ª Isabella Vilhena Freire Martins
Universidade Federal do Espírito Santo

Aos animais, seres verdadeiros, puros e sinceros, razões pelas quais todos os esforços em se aprimorar o conhecimento científico realmente fazem sentido.

AGRADECIMENTOS

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

A toda minha família, em especial a minha Mãe que apesar da distância, sempre me incentivou e apoiou nessa nova etapa da vida.

A Isabela F. Prince ou mais carinhosamente, Belinha, minha companheira, parceira de vida, minha amada, que colaborou exaustivamente me apoiando durante todos os momentos dessa trajetória.

Ao meu orientador, Prof. Marcos Santos Zanini por confiar no meu trabalho e me proporcionar o apoio e incentivo na execução desse projeto.

A Universidade Federal do Espírito Santo, por ter me recebido e ter me proporcionado condições para que eu desenvolvesse meu aprendizado e conhecimento.

A toda a equipe do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, por toda ajuda e auxílio no processamento e identificação dos flebotomíneos.

Aos meus primos Pedro, Priscila e Helena, por toda disponibilidade, apoio e atenção durante todo o tempo que estive cursando o Mestrado, desde a recepção até a minha conclusão de curso.

Ao meu Tio Binha e Tia Gianine pelo carinho e ajuda durante toda minha estadia em Pendotiba, pelos conselhos, incentivos e apoio na realização desse projeto.

Aos professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, em especial a “garotinha” Nara, pelas valiosas e imprescindíveis ajudas principalmente quando eu não me encontrava em Alegre.

Aos meus colegas de Laboratório de Microbiologia e Imunologia Veterinária da Universidade Federal do Espírito Santo, Silas e Laís.

A toda a equipe de Vigilância Sanitária do município de Lúna, em especial ao Danilo Leite Lima que nos ajudou imensamente na realização do projeto.

RESUMO

FARIA, HUMBERTO GRIPP DE. **FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) NO PERIDOMICÍLIO DE MORADORES DA ZONA RURAL DE IÚNA, ESPÍRITO SANTO**. 2017.56p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

Considerando a importância dos flebotomíneos nos ciclos de transmissão das leishmanioses, este estudo teve como objetivo avaliar a fauna local das espécies vetores da doença em área de transmissão endêmica para a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Foram realizadas coletas de amostras nas regiões rurais do município de Iúna, estado do Espírito Santo, Brasil. As capturas dos dípteros abrangeram cinco localidades rurais aonde casos de LTA já haviam sido previamente relatados. Quatorze pontos de coletas foram estabelecidos no peridomicílio de moradores dessas localidades. Os critérios de escolha para a instalação das armadilhas foram propriedades com histórico anterior de casos clínicos humanos de leishmanioses tegumentares e atualmente com a presença de cães sem sinais clínicos da doença, podendo ser soropositivos ou não para antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* pela técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) indireta convencional, assim como terem sido vacinados contra Leishmaniose Visceral Canina com vacinas comerciais. As capturas foram realizadas em dezembro de 2015 respeitando os hábitos comportamentais dos insetos. As coletas realizaram-se com o auxílio de armadilhas luminosas do tipo “CDC” (Centers for Diseases Controls) instaladas às 18h00min e recolhidas às 06h00min totalizando 336 horas de funcionamento. Entre quatorze pontos de coletas, dez apresentaram a presença de flebotomíneos sendo um total de 1148 espécimes. Uma parcela de 60 fêmeas, sendo 20 de cada um dos três pontos com maiores frequências de flebotomíneos, foram separadas e submetidas à extração de DNA e posteriormente a reação em cadeia da polimerase (PCR), com o intuito de se verificar a presença de ácidos nucleicos condizentes com o gênero *Leishmania* spp. nos seus tubos digestivos, porém, todas as análises apresentaram resultado negativos. Os 1088 flebotomíneos restantes foram processados e posteriormente identificados. A espécie *Migonemyia migonei* a foi a que se apresentou mais abundante sendo responsável por 71,7% dos espécimes, seguida

por *Nyssomyia intermedia* 21,5%, somando as demais espécies capturadas 6,8%. Considerando a capacidade vetorial de *Mg. migonei* e *Ny. intermedia*, bem como seus hábitos antropofílicos já descritos na literatura, podemos sugerir que essas espécies possam estar atuando como transmissoras de LTA na região.

Palavras-chave: Espírito Santo. *Leishmania braziliensis*. *Migonemyia migonei*

ABSTRACT

FARIA, HUMBERTO GRIPP DE. **FLEBOTOMINE SANDY FLIES (DIPTERA: PSYCHODIDAE) IN THE PERIDOMICILE OF RESIDENTS OF THE RURAL AREA OF THE MUNICIPALITY OF IÚNA, ESPÍRITO SANTO.** 2017. 56p. Dissertation (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

Considering the importance of sandflies in the transmission cycles of leishmaniasis, this study aimed to evaluate the local fauna of the species vectors of the disease in an area of endemic transmission to American Cutaneous Leishmaniasis (ACL). Samples were collected in the rural regions of the municipality of Iúna, state of Espírito Santo, Brazil. Diptera catches were made in five rural locations where cases of ACL had previously been reported. Fourteen collection points were established in the peridomicile of residents of these localities. The selection criteria for the installation of the traps were properties with a previous history of human clinical cases of tegumentary leishmaniasis and currently with dogs without clinical signs of the disease, and may be seropositive or not for antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by the technique of conventional indirect ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), and that they had been vaccinated against Visceral Canine Leishmaniasis with commercial vaccines. The catches were carried out in December of 2015 respecting the behavioral habits of the insects. The collections were carried out with the aid of "CDC" light traps (Centers for Diseases Controls) installed at 6:00 p.m. and collected at 06:00 a.m., totaling 336 operating hours. Between the fourteen collection points, ten presented the presence of sand flies, with a total of 1148 specimens. A sample of 60 females, 20 of each of the three points with higher frequencies of sandflies, were separated and submitted to DNA extraction and then the polymerase chain reaction (PCR), with the intention to verify the presence of nucleic acids compatible with the genus *Leishmania* spp. in their digestive tubes, however, all analyzes showed negative results. The remaining 1088 phlebotomines were processed and subsequently identified. *Migonemyia migonei* was the most abundant species in this study, accounting for 71.7% of the specimens, followed by *Nyssomyia intermedia* 21.5%, the other species added 6.8%. Considering the vector capacity of *Mg. Migonei* and *Ny. Intermedia*, as well as their anthropophilic habits

already described in the literature, we can suggest that these species may be acting as transmitters of ACL in the region.

Key-words: Espírito Santo. *Leishmania braziliensis*. *Migonemyia migonei*

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1- Ciclo de vida dos flebotomíneos.....	28
Figura 2- Limites administrativos do município de Iúna, Espírito Santo. Fonte: Instituto Jones dos Santos Neves modificada pelo autor. Destaque para as cinco localidades estudadas.....	33
Figura 3- Caracterização da região, intensa modificação antrópica promovendo a interação entre vários ecossistemas.....	35
Figura 4- Caracterização dos ambientes peridomiciliares: A, D, E presença de várias espécies de animais domésticos; B retirada da armadilha em galinheiro anexo a residência; C acúmulo de matéria orgânica oriunda da cafeicultura; F limite entre a lavoura de café e a residência.....	35
Figura 5- Armadilha luminosa do tipo CDC em funcionamento.....	36
Figura 6- Localização dos pontos de coletas dos flebotomíneos no município de Iúna, estrelas amarelas evidenciam os locais de captura. Fonte: Imagem de satélite Google, 2017, adaptada pelo autor.....	37
Figura 7- Placa acrílica de seis poços usada para realização da preparação dos flebotomíneos. Detalhe das setas indicando a sequência de passagem nas soluções químicas.....	38
Figura 8- Identificação das espécies de flebotomíneos. Imagem da lâmina de flebotomíneo em microscópio óptico no aumento de 4x mostrando um exemplar macho.....	39
Figura 9- Dados climáticos de Iúna, ES, temperatura, umidade relativa do ar e índice pluviométrico referente ao mês de dezembro de 2015.....	41
Figura 10- Espécies de flebotomíneos capturadas no peridomicílio de moradores de zonas rurais de Iúna, ES.....	43

Figura 11- Espécies de flebotomíneos transmissoras de LTA capturadas no peridomicílio de moradores de zonas rurais de Lúna, ES.....45

LISTA DE ABREVIATURAS

° -	Graus
°C	Graus Celsius
µm-	Micrômetro
<i>B.</i>	<i>Brumphyomyia</i>
CDC-	Centers for Diseases Controls
DNA-	Ácido desoxirribonucleico
ELISA-	Enzime-Linked Immunosorbent Assay
ES-	Espírito Santo
<i>Ev.-</i>	<i>Evandromyia</i>
FUNASA-	Fundação Nacional de Saúde
GPS-	Global Positioning System
HIV-	Human Immunodeficiency Virus
IBGE-	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDMR-	Intradermorreação de Montenegro
IFI-	Imunofluorescência indireta
INCAPER-	Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural
Kg-	Kilograma
<i>L.-</i>	<i>Leishmania</i>
<i>Lu.-</i>	<i>Lutzomyia</i>
LTA -	Leishmaniose Tegumentar Americana

LVA -	Leishmaniose Visceral Americana
MAPA-	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MG-	Minas Gerais
<i>Mg.-</i>	<i>Migonemyia</i>
mg-	Miligrama
ml-	Mililitros
mm-	Milímetros
MS-	Mato Grosso do Sul
<i>Ny.-</i>	<i>Nyssomyia</i>
<i>Pi.-</i>	<i>Pintomyia</i>
RJ-	Rio de Janeiro
sin.-	Sinonímia
SINAN-	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SP-	São Paulo
SUCAN-	Superintendência de Campanhas do Ministério da Saúde
TO-	Tocantins
<i>T.</i>	<i>Trichopygomyia</i>
<i>V.-</i>	<i>Viannia</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1- Espécies de flebotomíneos transmissores de leishmanioses no Brasil por regiões de ocorrência.....	31
Tabela 2-. Espécies de flebotomíneos, sexo, número absoluto e frequência relativa, coletados no peridomicílio dos moradores das localidades: São João do Príncipe, Tinguaciba, Serrinha da Torre, Figueira e Santíssima Trindade no município de Lúna, estado do Espírito Santo.....	42
Tabela 3- Espécies de flebotomíneos encontradas no peridomicílio de moradores de zonas rurais de Lúna/ES, de acordo com as localidades e os pontos de captura....	44

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Leishmanioses.....	17
2.1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana.....	19
2.1.2 Leishmaniose Visceral Americana.....	22
2.2 Leishmaniose Tegumentar Americana no Espírito Santo.....	25
2.3 Flebotomíneos.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Desenho do Estudo.....	32
3.2 Caracterização Município.....	32
3.3 Área de estudo.....	34
3.4 Métodos de coleta.....	36
3.5 Processamento dos Flebotomíneos.....	37
3.6 Informações Climáticas.....	40
3.7 Avaliação da presença de ácidos nucleicos de <i>Leishmania</i> spp. em amostragem das espécimes coletadas.....	40
3.8 Análise Estatística.....	40
4 RESULTADOS.....	41
5 DISCUSSÃO.....	45
6 CONCLUSÃO.....	49
7 REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças de transmissão vetorial que abrangem uma série de espécies de parasitas, vetores e reservatórios no seu ciclo de transmissão (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Amplamente distribuída pelo mundo, às leishmanioses são transmitidas por flebotomíneos (BRAZIL; BRAZIL, 2003) e se apresentam em quatro principais formas clínicas: visceral, cutânea (REY, 2008), mucocutânea e cutânea difusa.

O estado do Espírito Santo, Brasil, é endêmico para a transmissão das formas cutânea e mucocutânea da doença denominada Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), associadas à espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* (FALQUETO et al., 2003), sendo essa amplamente distribuída (ROCHA et al., 2010b).

No município de Lúna, região sul do estado, vários casos já foram relatados tanto em homens como animais (PINHEIRO, 2015). Falqueto (1985) relatou seis pacientes portadores da doença entre os anos de 1978 e 1982 e 107 casos da doença foram confirmados entre os anos de 2001 e 2015 (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS, 2017).

Considerando a amplitude e complexidade do agravo, os fatores que se relacionam com o mesmo merecem ser estudados para que possamos ter um melhor entendimento das variáveis que interferem nos diversos ciclos de transmissão da doença, bem como, as formas como ela se expressa nos vários ambientes. Os resultados obtidos enriquecem o conhecimento e poderão auxiliar nas decisões das ações de promoção à saúde, visando o combate à doença. Como objetivo deseja-se diminuir a transmissão do agente, reduzir o número de doentes, reduzir os custos com enfermos e prejuízos devido ao afastamento dos trabalhadores além de minimizar os danos físicos e emocionais causados pela doença.

As leishmanioses são transmitidas por flebotomíneos, e por tanto, o aprofundamento do conhecimento das espécies é necessário para o combate ao

agravo. Em áreas endêmicas a taxa de infecção natural dos vetores, assim como a identificação correta das espécies de *Leishmania* nesses dípteros, são de grande importância na epidemiologia da doença (PIRAJÁ; LUCHEIS, 2014).

O acompanhamento dos casos clínicos humanos e nos animais em áreas endêmicas para a transmissão da LTA, assim como o trabalho de pesquisa e vigilância entomológica, objetivando o monitoramento das espécies transmissoras, são pilares de base para a compreensão e entendimento do comportamento da doença na população.

Nesse contexto, o aprofundamento das pesquisas sobre a biologia, comportamento e diversidade da fauna dos flebotomíneos vetores de leishmanioses poderá contribuir para o melhor entendimento sobre o ciclo de transmissão da doença.

Diante disso, esse estudo teve como objetivo avaliar a fauna local de flebotomíneos coletada no peridomicílio de moradores das regiões rurais do município de Lúna, bem como verificar a presença de ácidos nucleicos condizentes com o gênero *Leishmania* spp. em uma parcela dos flebótomos coletados.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Leishmanioses

Consideradas um grande problema de saúde pública (BRASIL, 2007), segundo os autores Desjeux (1992) e Bryceson (1996), as leishmanioses não são uma doença única, mas um conjunto de síndromes complexas e multifacetadas causadas por diversas espécies do gênero *Leishmania* transmitida por insetos vetores, que afetam tanto seres humanos como animais domésticos e silvestres e que estão distribuídas por todos os continentes, com exceção da Oceania e da Antártida. As leishmanioses são doenças consideradas primariamente como zoonoses e quando o homem entra em contato com o ciclo do parasita, pode vir a ser infectado e dependendo de seu estado imunológico pode vir a adoecer (BRYCESON, 1996; DESJEUX, 1992).

Acometendo populações pobres da África, Ásia e América Latina, a doença está associada à desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação, baixo estado imunológico e carência de recursos. Mais de 98 países e territórios são áreas endêmicas para leishmaniose. Por ano estima-se de 700.000 a 1 milhão de novos casos com mortalidade variando entre 20.000 e 30.000 pessoas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Na atualidade, as leishmanioses encontram-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (PORTAL DA SAÚDE, 2014). O Continente Americano possui relatos do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, não sendo registrada nas ilhas do Caribe, Chile e Uruguai (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017). Dos 18 países com transmissão endêmica, 17 desses a doença é enquadrada como sendo de notificação obrigatória individual ou agregada (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016). Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo o Brasil responsável por 90% dos casos da forma clínica visceral da doença, especialmente na região Nordeste (BRASIL, 2003).

As leishmanioses estão entre as doenças mais comuns e importantes transmitidas pelos flebotomíneos (SHERLOCK, 2003), podendo ser classificada de acordo com a espécie de parasita envolvida, a interação com o sistema imune e as lesões apresentadas pelos pacientes.

As leishmanioses são causadas por protozoários pleomórficos pertencentes ao Reino: Protozoa, Filo: Euglenozoa, Classe: Kinetoplastea, Ordem: Trypanosomatida, Família: Trypanosomatidae, Gênero: *Leishmania*, Sub- Gênero: *Leishmania* e *Viannia* (LAINSON, 2010), apresentam reprodução assexuada e ciclo heteroxênico.

Hospedeiros vertebrados (mamíferos) de varias ordens: Carnívora, Rodentia, Marsupialia, Edentata, Primata e Artiodactyla, são responsáveis pela manutenção do ciclo silvestre da leishmaniose (LAINSON; SHAW, 1998), enquanto algumas espécies domésticas como os cães (*Canis familiares*) e equinos (*Equus caballus*), podem estar envolvidas na manutenção dos ciclos peri-domésticos e urbanos (RANGEL; LAINSON, 2003).

As diversas espécies de *Leishmania* se apresentam nas formas promastigotas, quando estão parasitando hospedeiros invertebrados (flebotomíneos de várias espécies), e sob a forma amastigota, no interior das células do sistema mononuclear fagocitário (Macrófagos) dos mamíferos. As formas promastigotas do parasita são flageladas e bioquimicamente distintas das amastigotas (GONTIJO; CARVALHO, 2003). As amastigotas são parasitas arredondados, imóveis, intracelulares que se instalam e se multiplicam por divisão binária no interior dos fagolisossomas dos macrófagos.

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

2.1.1- Leishmaniose Tegumentar Americana

As leishmanioses tegumentares constituem problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos humanos (BRASIL, 2007 ; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2014a).

Nas Américas existem 15 espécies causadoras da doença em humanos, divididas em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*. As três espécies mais

importantes do subgênero *Leishmania* causadoras da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) são: *Leishmania amazonensis*, *L.(L.) mexicana*, *L.(L.) venezuelensis*, enquanto as principais do subgênero *Viannia* são: *Leishmania Viannia brazilienses*, *L.(V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) guyanensi* (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2014a).

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

No território brasileiro, em média, são registrados cerca de 21.000 casos/ano, com coeficiente de incidência de 11,3 casos/100.000 habitantes nos últimos cinco anos. A região Norte apresenta o maior coeficiente sendo 54,4 casos/100.000 habitantes, seguida das regiões Centro-Oeste com 22,9 casos/10.000 habitantes e Nordeste com 14,2 casos/100.000 habitantes (PORTAL DA SAÚDE, 2014).

As três principais espécies que ocorrem no Brasil são: *Leishmania Viannia brazilienses*, *L. (V.) guyanensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. A doença pode acometer uma série de animais, dentre eles, silvestres, sinantrópicos e domésticos. Como exemplos de hospedeiros e reservatórios naturais silvestres podemos citar os roedores, gambás, tamanduás, tatus, canídeos, preguiças e primatas. Os animais domésticos, cão, gato e equinos, apesar de apresentarem a doença, sua função na manutenção do ciclo do parasita no meio ambiente ainda não está bem estabelecida, podendo ser considerados como hospedeiros acidentais (BRASIL, 2007).

Sua transmissão ocorre através do repasto sanguíneo (fêmeas infectadas) por diversas espécies de flebotomíneos, sendo as principais delas: *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia pessoai*, *Lutzomyia wellcomei*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia anduzei*, *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia ubiquitalis*, *Lutzomyia migonei*, *Lutzomyia fischeri*, *Lutzomyia complexo*, *Lutzomyia ayrozai*. Essas espécies foram citadas no Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar

Americana (BRASIL, 2007) e no livro Flebotomíneos do Brasil (RANGEL; LAINSON, 2003).

O espectro clínico da LTA em humanos inclui a leishmaniose mucosa, leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea disseminada e leishmaniose cutânea difusa (NASSIRI-KASHANI et al., 2005). O sinal clínico inicial da doença apresenta-se como uma pápula eritematosa, única ou múltipla, localizada geralmente na região exposta do tegumento, essa evolui para úlcera com bordas elevadas, contornos regulares e fundos com granulações grosseiras, recobertas ou não por exsudato sero-purulento. O envolvimento da mucosa nasal, palato, faringe, laringe e cordas vocais pode ocorrer em até 5% dos pacientes (ALMEIDA; SANTOS, 2011).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por meio do esfregaço direto da lesão, cultivo *in vitro* ou *in vivo*, histopatológico, teste de Montenegro, sorologia e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para a detecção do DNA do parasito (ALMEIDA; SANTOS, 2011).

O arsenal terapêutico contra as leishmanioses ainda é muito restrito, as medicações usadas apresentam muitas restrições devido aos efeitos colaterais apresentados (MACHADO-PINTO et al., 2002). Os antimoniais pentavalentes permanecem como as drogas em uso para o tratamento das leishmanioses desde 1945. Há comercialmente duas apresentações disponíveis: o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®) (LIMA et al., 2007), não parecendo existir diferenças quanto a eficácia terapêutica dessas formulações. No Brasil, a única formulação disponível é o antimoniato N-metil glucamina, que vem sendo distribuída pelo Ministério da Saúde em ampolas de 5 ml, contendo 405mg de Sb+5 (1 ml = 81mg de Sb+5), que devem ser armazenadas em local fresco e ao abrigo da luz para evitar problemas na estabilidade do medicamento (BRASIL, 2007). Com exceção dos pacientes co-infectados com HIV e mulheres grávidas, são utilizados como droga de primeira escolha sendo a anfotericina B e a pentamidina segundas opções para o tratamento. A dose recomendada é de 15 a 20 mg/Kg/dia de antimoniato de N-metil glucamina intravenoso ou intramuscular, por um período de 20 dias no tratamento das formas cutâneas localizadas e disseminadas, e 30 dias para a forma mucosa. Se não houver resposta satisfatória ao tratamento deve-se utilizar as drogas alternativas.

(MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Os efeitos colaterais relatados incluem: artralgia, mialgia, inapetência, náuseas, vômitos, sensação de plenitude gástrica, pirose, dor abdominal, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, insônia, edema, hepatite com aumento de transaminases e fosfatase alcalina, insuficiência renal aguda, pancreatite e alterações dose-dependente no eletrocardiograma. Arritmias fatais são raras, existindo poucos casos de morte súbita, provavelmente relacionados a arritmias ventriculares (PAULA et al., 2003; BRASIL, 2007). A anfotericina B é a droga de segunda escolha quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial ou na impossibilidade de seu uso, a pentamidina, droga de terceira escolha, possui eficácia bem menos conhecida (MACHADO-PINTO et al. 2002).

A diversidade de agentes, reservatórios e vetores da LTA, aliada ao conhecimento ainda insuficiente sobre vários aspectos, evidencia a complexidade do controle desta endemia (BRASIL, 2007).

2.1.2- Leishmaniose Visceral Americana

Doença considerada endêmica em 12 países nas Américas, segundo a Organização Panamericana da Saúde a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) apresenta três perfis distintos de transmissão: países com transmissão esporádicas (Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Bolívia, Guiana e México), com transmissão estável (Colômbia e Venezuela) e países com transmissão em expansão (Brasil, Argentina e Paraguai) (Organização Pan-Americana da Saúde; Organização Mundial da Saúde, 2016) .

No Brasil a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios, de todas as regiões, em 2014, casos confirmados com transmissão autóctone de LVA somaram 3453 pessoas, sendo registrados em 21 das 27 Unidades da Federação (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2014).

Os índices de letalidade podem alcançar entre 10% e 98% quando se analisa falhas de tratamento e pessoas não medicadas (DESJEUX, 2004). A ocorrência da doença em brasileiros no período entre os anos de 1990 e 2015 totalizou 81.722 casos, entre 2000 e 2014 registrou-se 3690 óbitos. (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2014).

A posição taxonômica do agente causador da LVA foi por muito tempo referido como *Leishmania (Leishmania) chagasi*, entretanto, análises mais extensas do DNA (MAURICIO et al., 1999) indicaram que a *L.(L.)infantum* e a *L.(L.)chagasi* apresentam tanta semelhança que só poderiam ser separadas em nível subespecífico.

Nas Américas a principal espécie de flebotomíneo transmissora da doença é a *Lutzomyia longipalpis*, sendo a *Lu. evansi* uma importante vetor na Colômbia e Venezuela. Na região de divisa entre o Brasil e Bolívia a espécie *Lu. cruzi* é também incriminada como vetor (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2014 b).

No Brasil, em resumo a transmissão se dá principalmente através da picada dos vetores – *Lutzomyia longipalpis* ou *Lu. cruzi* infectados pela *Leishmania infantum* (sin. *L. chagasi*) (MOYA et al., 2015; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2014) . *Mg. migonei*, em algumas áreas brasileiras é suspeita de transmissão na medida em que casos autóctones da doença estão sendo registrados mesmo na ausência da *Lu. longipalpis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

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

O período de incubação da doença é bastante variável sendo para o homem de 10 dias a 24 meses com média entre 2 e 6 meses e no cão de 3 meses a vários anos com média de 3 a 7 meses. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2014b).

Clinicamente consideramos a LVA uma enfermidade generalizada, crônica, caracterizada por febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia com leucopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, emagrecimento, edema e estado de debilidade progressivo, levando à caquexia e,

até mesmo, ao óbito (BADARÓ; DUARTE, 1996). A evolução das formas clínicas é diversa, podendo o indivíduo apresentar desde cura espontânea, formas oligossintomáticas e assintomáticas, até manifestações graves (HERWALDT, 1993).

O diagnóstico se baseia nas alterações clínicas e exames laboratoriais. Deve ser suspeitado quando o paciente apresentar: febre e esplenomegalia associado ou não a hepatomegalia. Os exames sorológicos, Imunofluorescência Indireta (IFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) são invariavelmente reativos e a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) negativa. O aspirado de medula óssea e do baço geralmente mostra presença de formas amastigotas do parasita.

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

As diretrizes para o tratamento da LVA se assemelham com o da LTA, sendo usados derivados pentavalentes. Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, mas sabe-se que atua nas formas amastigotas do parasita, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos. Os estudos sobre farmacocinética dos antimoniais pentavalentes mostram que em mais ou menos 2 horas esses compostos são eliminados da circulação através dos rins. A dose para o tratamento da LVA é de 20mg de Sb+5 kg/dia, com aplicação endovenosa ou intramuscular, por no mínimo 20 e no máximo 40 dias. Apesar de identificado casos de resistência primária aos antimoniais em outros países, no Brasil tais casos não foram documentados e cepas de *L. infantum* resistentes *in vitro* não foram relatadas (BRASIL, 2003).

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

Recentemente por meio da Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, assinada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelo Ministério da Saúde (MS), foi autorizado o registro do Milteforam®, medicamento de uso veterinário com princípio ativo a base de miltefosina para o tratamento clínico da Leishmaniose Visceral Canina. Os cães são considerados os principais reservatórios domésticos em áreas urbanas e rurais (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2014b), são hospedeiros da *Leishmania infantum* e fonte infectiva para o *Lu. longipalpis*, a nota por sua vez ressalta o tratamento como medida individual e optativa destinada à proprietários que desejem tratar os seus cães, não sendo recomendada como ação de saúde pública (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2016). Como formas de prevenção da doença e controle, o mercado apresenta diversos produtos de uso veterinário autorizados pelo MAPA. Esses produtos visam impedir a contaminação canina e possuem em suas fórmulas químicas, substâncias inseticidas e repelentes, sendo essas disponíveis em várias apresentações comerciais. No mercado ainda existe uma vacina comercial aprovada, a Leishtec®, com eficácia de 71,3% (informação do fabricante) que visa estimular uma resposta imune eficiente capaz de proteger os animais contra a eventual infecção.

2.2- Leishmaniose Tegumentar Americana no estado do Espírito Santo

Situado na região sudeste do Brasil, o Espírito Santo é considerado área de transmissão endêmica para as formas cutânea e mucocutânea da LTA, associada à espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* (FALQUETO et al., 2003), sendo que o estado alberga a ocorrência de vários casos de LTA tanto em humanos quanto em animais.

A LTA foi inicialmente registrada em 1912 por Cunha e Carine e posteriormente em 1913 por Terra e 1915 por Silva. Após isto, a LTA no estado do Espírito Santo, passou por um período grande de ausência de referencial bibliográfico apesar de permanecer conhecida pelos médicos, que segundo a Superintendência de Campanhas do Ministério da Saúde - Regional do Espírito Santo, SUCAN-ES, continuavam registrando casos da doença (BARROS et al., 1985).

No final de 1977, houve um aumento dos casos positivos no exame IDRM nos pacientes do hospital Cassiano Antônio Moraes, hospital da Universidade Federal do Espírito Santo. Entre janeiro de 1973 e abril de 1978, dados da SUCAN-ES apontam 39 casos diagnosticados e os pacientes provindos de localidades nos municípios de Vianna e Cariacica (BARROS et al., 1985).

Segundo informações fornecidas pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), do total de 45.527 casos relatados da doença na região sudeste do Brasil, entre os anos de 1980 e 2000, o estado do Espírito Santo foi responsável por 8889 das ocorrências (FALQUETO, 2003). A LTA é endêmica e amplamente distribuída por todo o estado (ROCHA et al., 2010b). O SINAN registrou entre o ano de 1986 e 2015, um total de 1067 casos confirmados da doença (Ministério da Saúde/SVS, 2017).

A região norte do estado até meados do século vinte apresentava vegetação caracterizada por Mata Atlântica, nesse período não ocorreram registros de casos da LTA entre os colonizadores originais. No início dos anos 80 do século passado, a suspensão do uso de inseticidas visando controle da malária pode ter influenciado na domiciliação dos flebotomíneos e na ocorrência do primeiro relato de caso da doença no norte do estado. Estudos da área foram realizados com o intuito de obter informações epidemiológicas onde casos humanos foram observados. Entre 1986 e 2003 foram notificados 2132 casos (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, 2004).

2.3- Flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos dípteros psicodídeos (BRAZIL; BRAZIL, 2003) transmissores naturais das leishmanioses, de outros tripanossomatídeos, arboviroses e de bartoneloses. Apresentam ampla distribuição mundial podendo ser encontrados em quase todas as regiões do planeta, sua fauna é diversa e apresenta-se em maior número na região neotropical (SHERLOCK, 2003).

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

Coquilletti em 1907 fez a primeira descrição dos flebotomíneos nas Américas, em 1912, Adolfo Lutz junto com Arthur Neiva a fizeram no Brasil (SHERLOCK, 2003).

Young & Ducan (1994) dividem os flebotomíneos em seis gêneros: três (*Lutzomyia* França, 1924; *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 e *Warileya* Hertig, 1948) habitantes do Novo Mundo e três habitam o Velho Mundo (*Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840; *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 e *Chinus* Leng, 1987).

Os gêneros de interesse entomológico médico, especialmente relacionados à vetoração de *Leishmania* spp., e por tanto, transmissores das leishmanioses são os *Phlebotomus* (Velho mundo) e o *Lutzomyia* (Novo Mundo).

São descritas no mundo, mais de 900 espécies de flebotomíneos sendo aproximadamente 500 na região neotropicais (SHIMABUKURO et al., 2011). Galati,, atualmente contabiliza um número total de 1002 táxons, sendo 973 atuais somados com 29 fósseis, desse total 537 possuem destaque nas Américas sendo 17 espécies fósseis (GALATI, 2003).

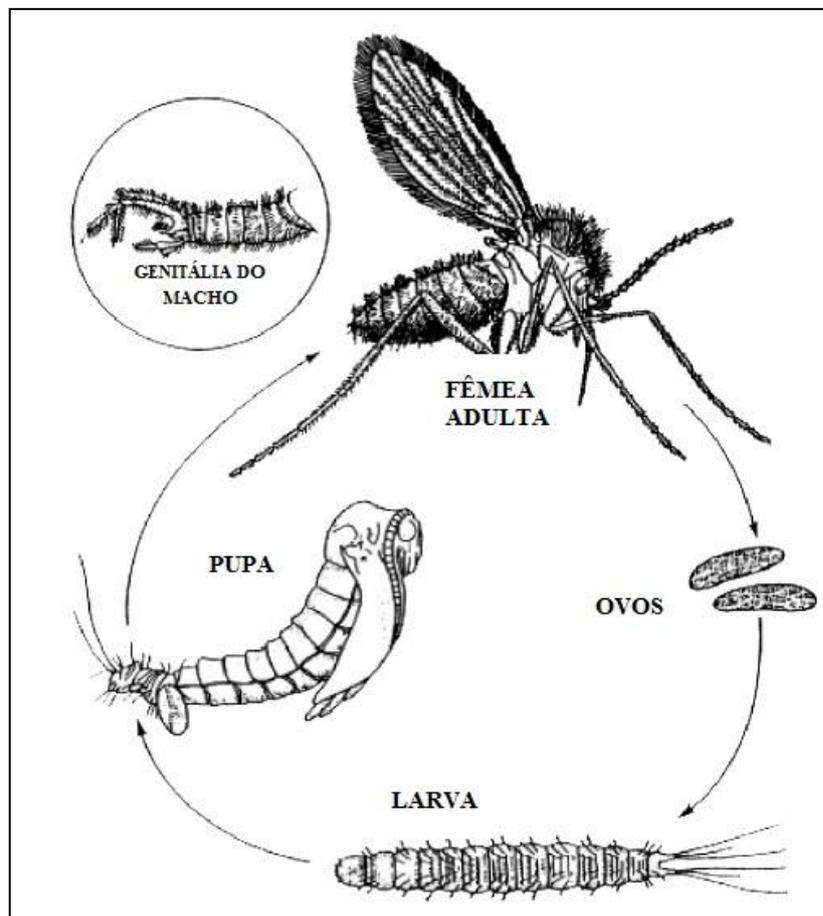
Como forma alternativa de classificação dos flebotomíneos, Galati adota um modelo que divide a sub-família Phlebotominae em duas tribos: Hertigini e Phlebotomini e nove subtribos, desse total, três apresentam destaque por sua importância médica: *Sergentomyiina*, *Lutzomyiina* e *Psychodopygina* abrangendo vários gêneros, subgêneros e séries de espécies (GALATI, 2003).

A diversidade da fauna de flebotomíneos no Brasil é imensa, sendo pertinente ressaltar a importância entomológica médica (Tabela 1), Arthur Neiva e Adolph Lutz em 1912 descreveram as três primeiras espécies. Com o avanço nos estudos entomológicos, alguns pesquisadores atentaram para a importância e utilidade do uso das estruturas espermateca e cibário das fêmeas na taxonomia desse díptero (Adler; Theodor, 1926 e Theodor, 1932), a partir daí, entre 1930 e 1960 várias novas espécies de flebotomíneos neotropicais foram descritas por Mangabeira Filho (1938, 1941a, 1941b, 1941c, 1942), Floch e Abonnenc (1952), Barreto (1947b), Costa Lima (1932), ao mesmo tempo que as suas características de vetor foram sendo descobertas (SHERLOCK, 2003).

O gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) é considerado o de maior importância por conter espécies transmissoras de patógenos aos humanos, apresenta ampla distribuição no território brasileiro desde regiões do sul até o norte do país (REIS et al., 2013).

Flebotomíneos são insetos frequentemente encontrados em abrigos naturais, tais como: troncos de árvores, abrigos de animais, folhas caídas, buracos entre rochas e cavernas (GALATI et al., 2003). Seus hábitos são crepusculares e noturnos, os machos e as fêmeas procuram ficar em locais dissociados dos seus criadouros naturais (BRAZIL; BRAZIL, 2003). Poucas informações existem a respeito dos flebotomíneos, sendo ainda poucas espécies estudadas, apresentam comprimento variando entre 1 e 3 mm sendo sua superfície corporal composta de intensa densidade pilosa (BRASIL, 2003), são holometábolos realizando em seu ciclo de vida uma fase de ovo, uma fase de larva com 4 estádios, uma fase de pupa e adulto (Figura 1).

Figura 1: Ciclo de vida dos flebotomíneos.



Seus criadouros naturais são de difícil localização, acredita-se ser pela mobilidade de suas formas larvais que apresentam um comportamento muito ativo em busca de alimento (SHERLOCK, 2003), porém, muitos trabalhos a respeito dos criadouros, Feliciangeli (2004), incrimina a dificuldade de extração das formas imaturas nas amostras de solo e matéria orgânica como sendo a razão dos baixos índices de insetos coletados (FELICIANGELI, 2004).

As fêmeas dos flebotomíneos, em laboratório, realizam em média a postura de 40 ovos, podendo variar de acordo com a espécie. Os ovos são ovoides ou elipsoides, apresentam-se na coloração castanho escuro variam de 300 a 500 μm de comprimento por 70 a 150 μm de largura. A postura pode ser feita isolada ou em grupos, os ovos se aderem ao substrato devido as substancias produzidas pelas glândulas acessórias (Brazil; Brazil, 2003).

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

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

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

Os flebotomíneos adultos possuem dimorfismo sexual não relacionado apenas aos aspectos morfológicos. Seus hábitos costumam ser crepusculares e noturnos, seu desenvolvimento ocorre em matéria orgânica em decomposição (BRAZIL; BRAZIL, 2003). Informações sobre o local onde os flebotomíneos se criam são de grande valia para estudos epidemiológicos (ALENCAR, 2007). Os criadouros naturais da maioria das espécies ainda não foram descobertos necessitando de maiores estudos (BRAZIL; BRAZIL, 2003). Essa característica resulta em dificuldade de estabelecer estratégias de controle baseadas nas formas imaturas e conseqüentemente interrupção do ciclo de transmissão de *Leishmania* e outros patógenos. Maiores informações sobre os criadouros são necessárias para se realizar estratégias de controle na fonte de criação (FELICIANGELI, 2004).

O tempo de duração do seu ciclo de vida irá variar de acordo com a espécie, as condições climáticas e do tipo de alimentação (SHERLOCK, 2003). Criados em laboratórios adultos tem um tempo médio de vida de 30 a 40 dias, Os machos e as fêmeas necessitam de carboidratos como fonte de energia e apresentam-se como fitófagos, alimentam-se de seiva vegetal e secreções açucaradas (Brazil; Brazil, 2003). As fêmeas além de fitófagas, apresentam-se como hematófagas, excluindo raríssimas exceções de algumas espécies autógenas, elas necessitam do sangue de vertebrados para maturação de seus ovários, sendo essa característica de fundamental importância na transmissão de patógenos (SHERLOCK, 2003).

Algumas espécies de flebotomíneos apresentam hábitos alimentares seletivos, alimentando-se em uma determinada espécie de vertebrado, outras já são mais ecléticas podendo picar indiferentemente várias espécies de mamíferos sendo isso uma importante informação em relação ao seu potencial de vetoração de patógenos tanto para os animais como para o homem. O estudo dos hábitos alimentares e do conteúdo intestinal dos flebotomíneos permite a identificação dos

hospedeiros, indicando os potenciais reservatórios do gênero *Leishmania* (MISSAWA et al., 2008). Algumas espécies de flebotomíneos são consideradas importantes vetores, baseadas no grau de antropofilia, capacidade de se infectar naturalmente e locais de distribuição coincidentes com os quais a doença vem ocorrendo (RANGEL; LAISON, 2003).

Tabela 1- Espécies de flebotomíneos transmissoras de leishmanioses no Brasil por regiões de ocorrência (AGUIAR; MEDEIROS, 2003).

Espécies	Regiões
<u>Leishmaniose Tegumentar Americana</u>	
<i>Nyssomyia intermedia</i> (Lutz & Neiva, 1912)	N, NE, CO, SE, S
<i>Migonemyia migonei</i> (França, 1920)	N, NE, CO, SE, S
<i>Bichromomyia flaviscutellata</i> (Mangabeira, 1942)	N, NE,CO,SE
<i>Nyssomyia neivai</i> (Pinto, 1926)	SE, S
<i>Nyssomyia umbratilis</i> (Ward & Fraiha, 1977)	N, NE, CO
<i>Nyssomyia whitmani</i> (Antunes & Coutinho, 1939)	N, NE, CO, SE, S
<i>Pintomyia fischeri</i> (Pinto, 1926)	NE, CO, SE, S
<i>Pintomyia pessoai</i> (Coutinho & Barreto, 1940)	NE, CO, SE, S
<i>Psychodopygus paraensis</i> (Costa Lima, 1941)	N
<i>Psychodopygus ayrozai</i> (Coutinho & Barreto, 1940)	N, NE,CO,SE
<i>Psychodopygus complexa</i> (Mangabeira, 1941)	N, CO
<i>Psychodopygus hirsuta hirsuta</i> (Mangabeira, 1942)	N, NE, CO, SE, S
<i>Psychodopygus wellcomei</i> (Fraiha, Shaw & Lainson, 1971)	N,NE
<i>Trichophoromyia ubiquitalis</i> (Mangabeira, 1942)	N, NE,CO,SE
<u>Leishmaniose Visceral Americana</u>	
<i>Lutzomyia cruzi</i> (Mangabeira, 1938)	N, CO,SE
<i>Lutzomyia longipalpis</i> (Lutz & Neiva, 1912)	N, NE, CO, SE,

N- Norte, **NE,** Nordeste, **CO-** Centro Oeste, **SE-** Sudeste, **S-** Sul.

A necessidade de se avançar com os estudos relacionados à fauna e biologia dos flebotomíneos é mais do que justificável, considerando o impacto causado pelas leishmanioses nos homens e animais, assumindo assim o papel de vetor no ciclo

dessas doenças, além dos outros agentes patogênicos por eles transmitidos, do incômodo físico causado pelas dolorosas picadas e eventuais reações alérgicas.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

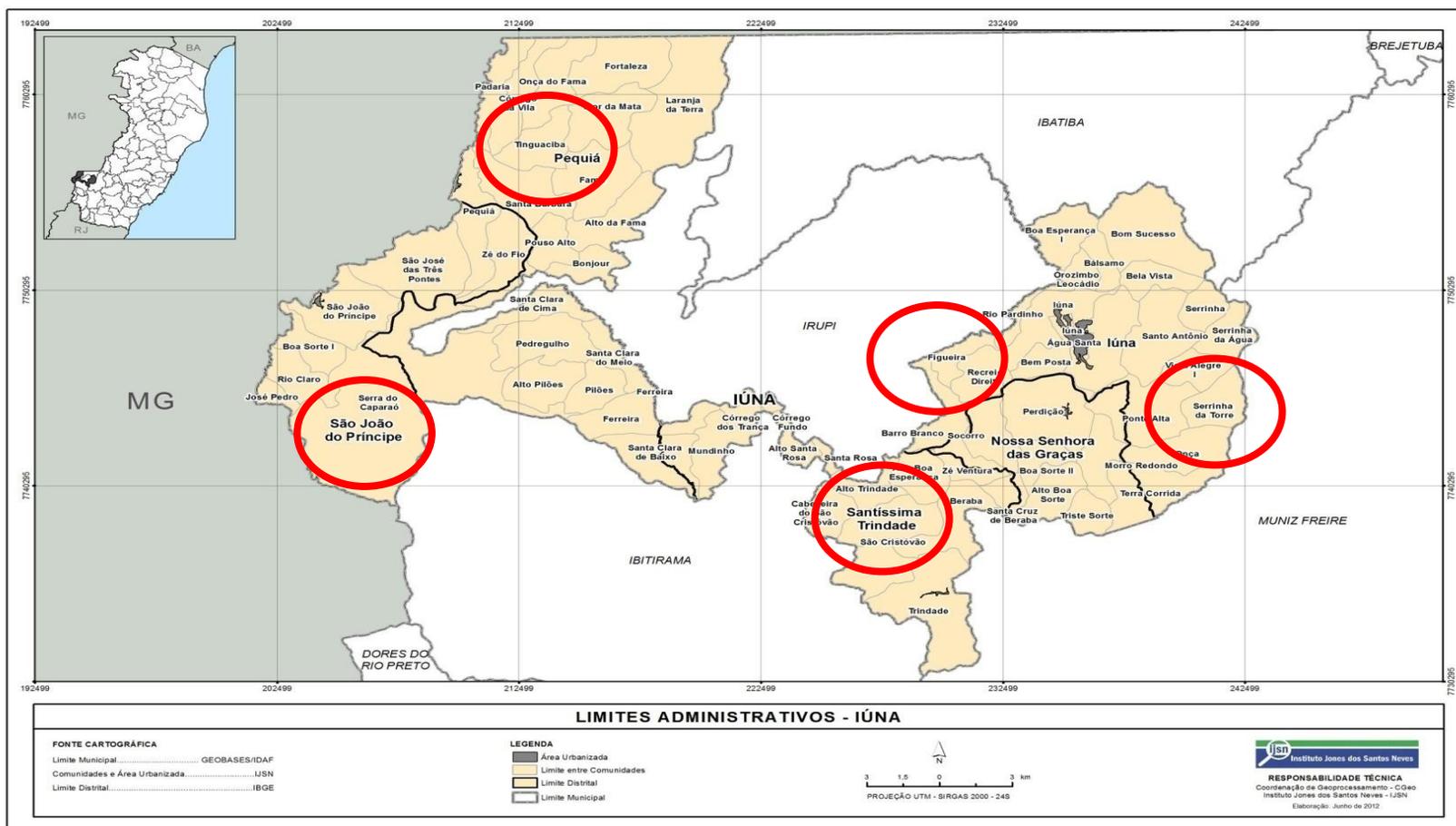
3.1 Desenho do estudo

Estudo observacional do tipo descritivo, de interesse médico e médico veterinário, com o intuito de identificar e avaliar as espécies de flebotomíneos transmissoras de LTA capturados no peridomicílio de moradores de cinco localidades da zona rural do município de Lúna, Espírito Santo, áreas consideradas de transmissão endêmica para LTA com relato de vários casos em humanos e animais.

3.2 Caracterização do município

Apresentando uma população de aproximadamente 27.328 habitantes (IBGE, 2017), o município de Lúna, se encontra na região sul do estado do Espírito Santo, Brasil, a uma altitude média de 661 metros, ocupando território de 460 Km², temperaturas médias variando entre sete e 30°C, clima tropical de altitude e Mata Atlântica como vegetação característica. O município está situado na Região do Caparaó e faz divisa com os municípios de Muniz Freire ao leste, Ibitirama ao sul, Irupi e Ibatiba ao norte e o Estado de Minas Gerais a oeste (IÚNA/ES, 2017) (Figura 2).

Figura 2- Limites administrativos de Iúna, Espírito Santo. Fonte: Instituto Jones dos Santos Neves modificada pelo autor. Destaque para as cinco localidades estudadas.



O município de Lúna é considerado uma área de transmissão de LTA, Falqueto (1985) relatou seis pacientes portadores da doença entre os anos de 1978 e 1982 (SESSA et al., 1985) e 107 casos da doença foram confirmados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) entre os anos de 2001 e 2015 (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS, 2017).

3.3 Áreas de estudo

O estudo foi realizado em cinco localidades pertencentes à zona rural de Lúna: São João do Príncipe, Tinguaciba, Serrinha da Torre, Santíssima Trindade e Figueira. (Figura 2) A região se caracteriza por intensa modificação antrópica, nas propriedades rurais as alterações ambientais resultaram em substituição da vegetação nativa com instalação de diversas atividades agrárias: cafeicultura (principal atividade econômica), agricultura em geral e pecuária, sendo comum a presença peridomiciliar de vários tipos de criações de animais: bovinocultura, caprinocultura, suinocultura e avicultura; além da presença de cães (*Canis familiaris*), gatos (*Felis catus*) como animais de estimação e equinos (*Equus caballus*), usados como animal de trabalho em atividades de tração, transporte de carga e pessoas (Figuras 3 e 4).

Figura 3: Caracterização da região, intensa modificação antrópica promovendo a interação entre vários ecossistemas.



Figura 4: Caracterização dos ambientes peridomiciliares. A, D, E presença de várias espécies de animais domésticos; B retirada da armadilha em galinheiro anexo a residência; C acúmulo de matéria orgânica oriunda da cafeicultura; F limite entre a lavoura de café e a residência.



3.4 Métodos de coleta

As coletas ocorreram no mês de dezembro de 2015 e utilizou-se armadilhas luminosas do tipo CDC (Centers for Disease Control) para as capturas (figura 5). Foram selecionados quatorze imóveis rurais sendo as coordenadas marcadas com auxílio do GPS (Global Positioning System). A instalação das armadilhas realizou-se no peridomicílio das residências não mais afastadas do que 30 metros da casa sede das propriedades. Respeitando os hábitos comportamentais dos flebotomíneos, as armadilhas luminosas foram instaladas e ligadas às 18h00min e recolhidas às 06h00min do dia seguinte. Foram usadas duas armadilhas por ponto de captura totalizando 336 horas de capturas nos quatorze pontos de coleta nas cinco localidades (figura 6).

Figura 5: Armadilha luminosa do tipo CDC em funcionamento.



Figura 6: Localização dos pontos de coletas de flebotomíneos no município de Iúna, estrelas amarelas evidenciando os locais de captura. Fonte: Imagem de satélite Google, 2017, adaptada pelo autor.



3.5 Processamento dos Flebotomíneos

Os flebotomíneos foram preparados de acordo com as técnicas de rotina do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera (LIVEDIH) do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. A identificação das espécies foi realizada segundo metodologia proposta por Galati (GALATI, 2003).

Triagem

Após as coletas os insetos foram anestesiados e eutanasiados por resfriamento, realizada a etapa de triagem para separar os flebotomíneos dos demais insetos. Após essa separação o material foi acondicionado em frascos do tipo Falcon de 15 ml, previamente identificados, contendo uma solução de Álcool 70° com a finalidade de conservação do material.

Preparação dos Flebotomíneos

O procedimento foi executado na capela de exaustão de gases QUIMIS[®], com o intuito de preparar o material antes da montagem em lâminas de microscopia para posterior identificação. Com o auxílio de uma placa acrílica de seis poços (Figura 7) e estiletos para transferência dos flebotomíneos, o procedimento foi realizado nas seguintes etapas:

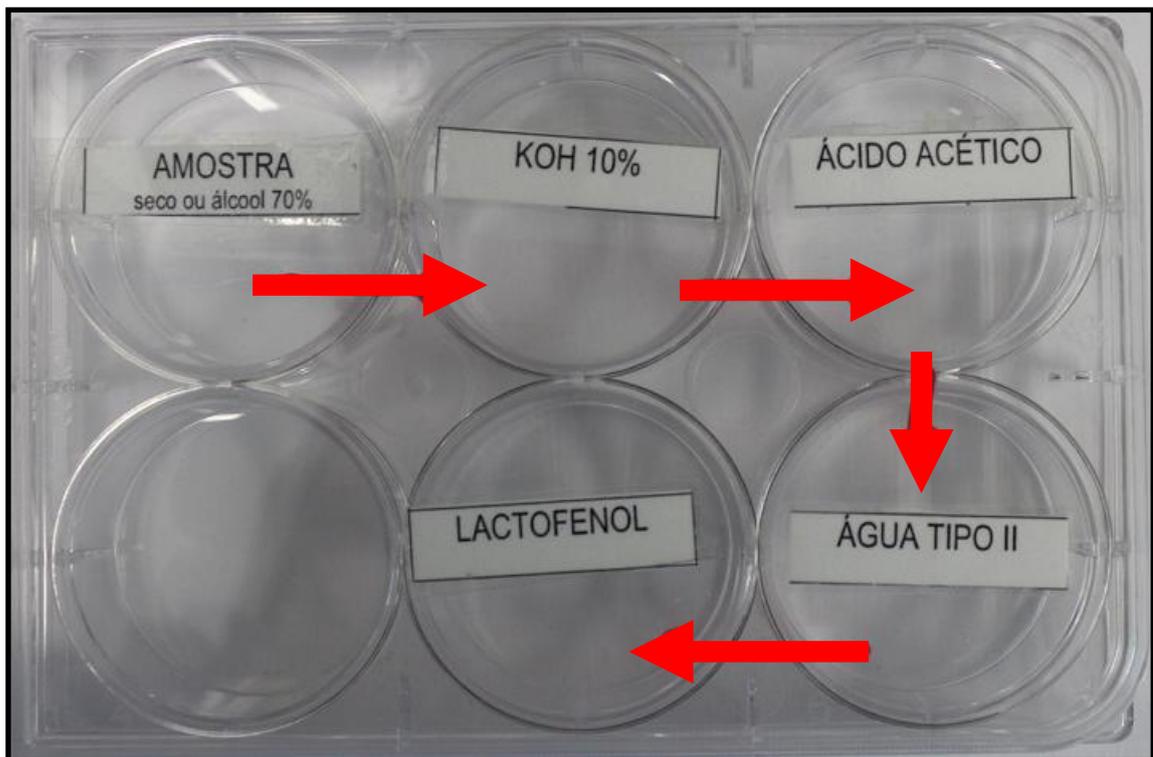
1^a Imersão dos flebotomíneos no poço da placa contendo hidróxido de potássio a 10% (KOH 10%) por 2-3 horas.

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

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

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

Figura 7: Placa acrílica de seis poços usada para realização da preparação dos flebotomíneos. Detalhe das setas indicando a sequência correta de passagem nas soluções químicas.



Montagem das Lâminas

As montagens das lâminas foram executadas com auxílio de um microscópio estereoscópico modelo Stemi DV4 sendo esse procedimento também realizado na capela de exaustão de gases. O processo consistiu de adicionar uma pequena gota de solução de Berlesse na lâmina de vidro, posicionar adequadamente o flebotomíneo e colocar a lamínula sobre a gota na lâmina. Os machos foram montados lateralmente com a cabeça normalmente voltada para o lado esquerdo. As fêmeas foram decapitadas, sendo a cabeça posicionada ventralmente, o tórax foi seccionado do abdômen com auxílio de um estilete e posicionado lateralmente na lâmina, enquanto o abdômen foi virado e colocado na posição ventral (Figura 8).

Identificação dos Flebotomíneos

Etapa realizada com auxílio de do microscópio óptico modelo Primo Star, marca ZEISS®, sendo utilizado o conhecimento sobre as espécies, literatura específica e chave dicotômica. Para a nomenclatura das espécies foram considerados os critérios adotados por Galati (GALATI, 2003).

Figura 8: Imagem da lâmina de flebotomíneo em microscópio óptico no aumento de 4 vezes mostrando um exemplar macho.



3.6 Informações Climáticas

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

3.7 Avaliação da presença de ácidos nucleicos de *Leishmania* spp. em amostragem das espécimes coletadas.

Uma parcela de 20 flebotomíneos fêmeas dos pontos de coleta: P7, P8 e P13, os que apresentaram o maior número de flebotomíneos, foi separada com o auxílio de microscópio estereoscópico modelo Stemi DV4. Os flebotomíneos foram então submetidos na forma de “pool” à extração de DNA e posteriormente à técnica da reação em cadeia da polimerase-PCR (PAIVA et al., 2007) a fim de verificar a presença de ácidos nucleicos condizentes com o gênero *Leishmania* spp. no tubo digestivo desses flebotomíneos.

3.8 Análise Estatística

Foi realizada uma análise estatística descritiva, a diversidade entre as espécies foi calculada através do Índice de Simpson, sendo esse calculado através da fórmula:

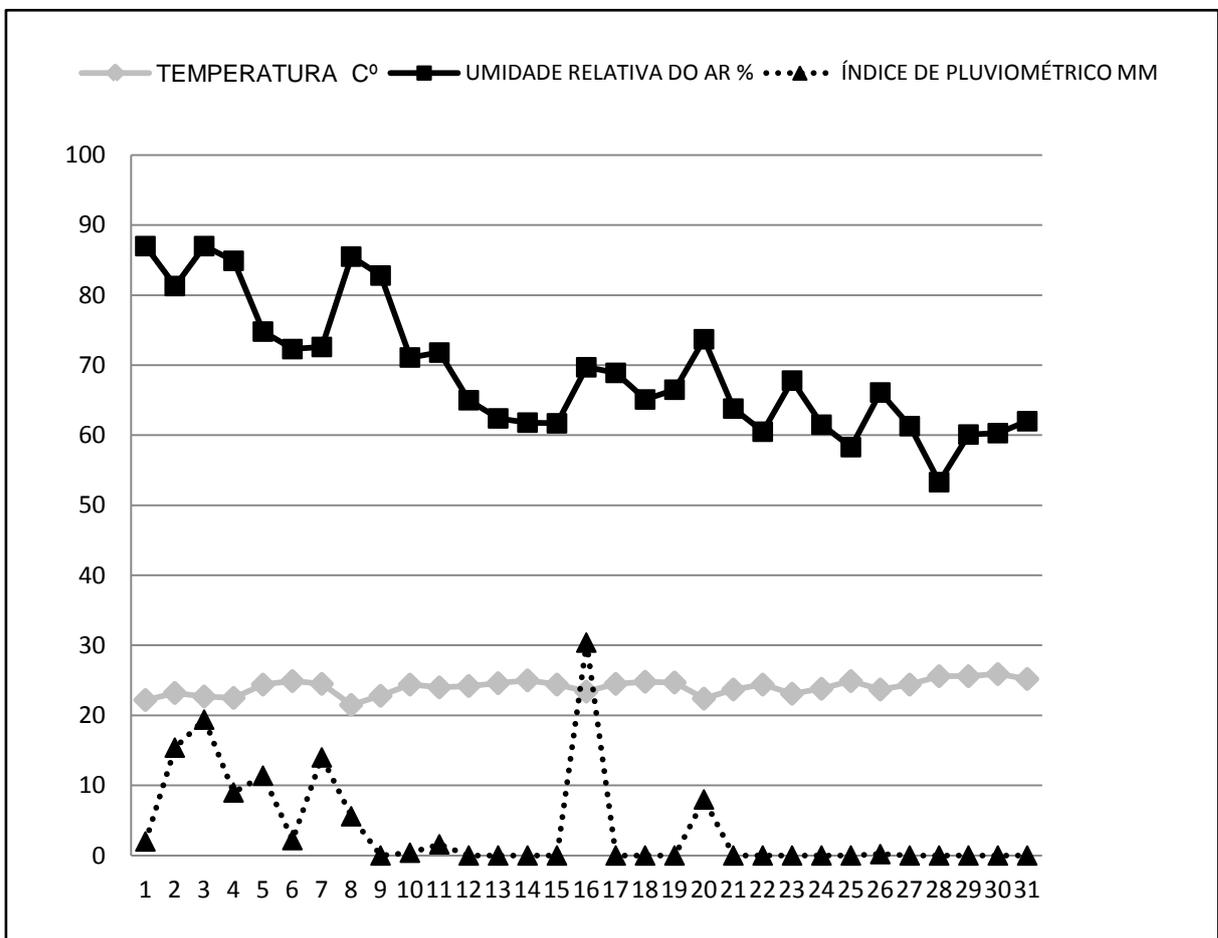
$$D = \sum_{i=1}^S \left[\frac{n_i(n_i-1)}{N(N-1)} \right]$$

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

4 RESULTADOS

Os dados climáticos registrados no mês de dezembro foram de acordo com as temperaturas e umidade considerados ótimos para a ocorrência da maioria das espécies de flebotomíneos neotropicais (BRAZIL; BRAZIL, 2003) (Figura 9).

Figura 9: Dados climáticos de Iúna, ES, temperatura, umidade relativa do ar e índice pluviométrico referente ao mês de dezembro de 2015. Fonte: INCAPER.



Foram realizadas 336 horas de capturas nos 14 pontos amostrados com um total de 1148 flebotomíneos. O sucesso na captura com as armadilhas CDC foi de 0,12 flebotomíneos/hora/armadilha. Excetuando a parcela de 60 fêmeas utilizadas para avaliação da presença de ácidos nucleicos de *Leishmania* spp., o total de

flebotomíneos identificados foi 1088, pertencentes a seis gêneros e nove espécies, 614 machos (56,43%) e 474 fêmeas (43,57%) (Tabela 2).

Tabela 2. Espécies de flebotomíneos, sexo, número absoluto e frequência relativa, coletados no peridomicílio dos moradores das localidades: São João do Príncipe, Tinguaciba, Serrinha da Torre, Figueira e Santíssima Trindade no município de Iúna, estado do Espírito Santo.

Espécies	Sexo		Número de Flebotomíneos	Frequência das Espécies (%)
	♂	♀		
<i>Brumphyomyia cunhai</i>	1	5	6	0,55
<i>Evandromyia (Barretomyia) cortelezii</i> ou <i>Ev. (Bar.) sallesi</i>	0	2	2	0,18
<i>Evandromyia (Barretomyia) Série: tupyngambai</i>	0	1	1	0,09
<i>Evandromyia lenti</i>	11	18	29	2,67
<i>Nyssomyia intermedia</i> *	113	121	234	21,5
<i>Nyssomyia whitmani</i> *	3	1	4	0,37
<i>Migonemyia migonei</i> *	485	295	780	71,7
<i>Pintomyia fischeri</i> *	1	30	31	2,85
<i>Trichopygomyia longispina</i>	0	1	1	0,09
TOTAL	614	474	1088	100,00
Razão macho/ fêmea	1,29			
Índice de Dominância				0,56
Índice de Diversidade de Simpson				0,44

Evandromyia (Barretomyia) cortelezii ou *Ev. (Bar.) sallesi* obs: espécie não identificada fêmeas indistinguíveis.

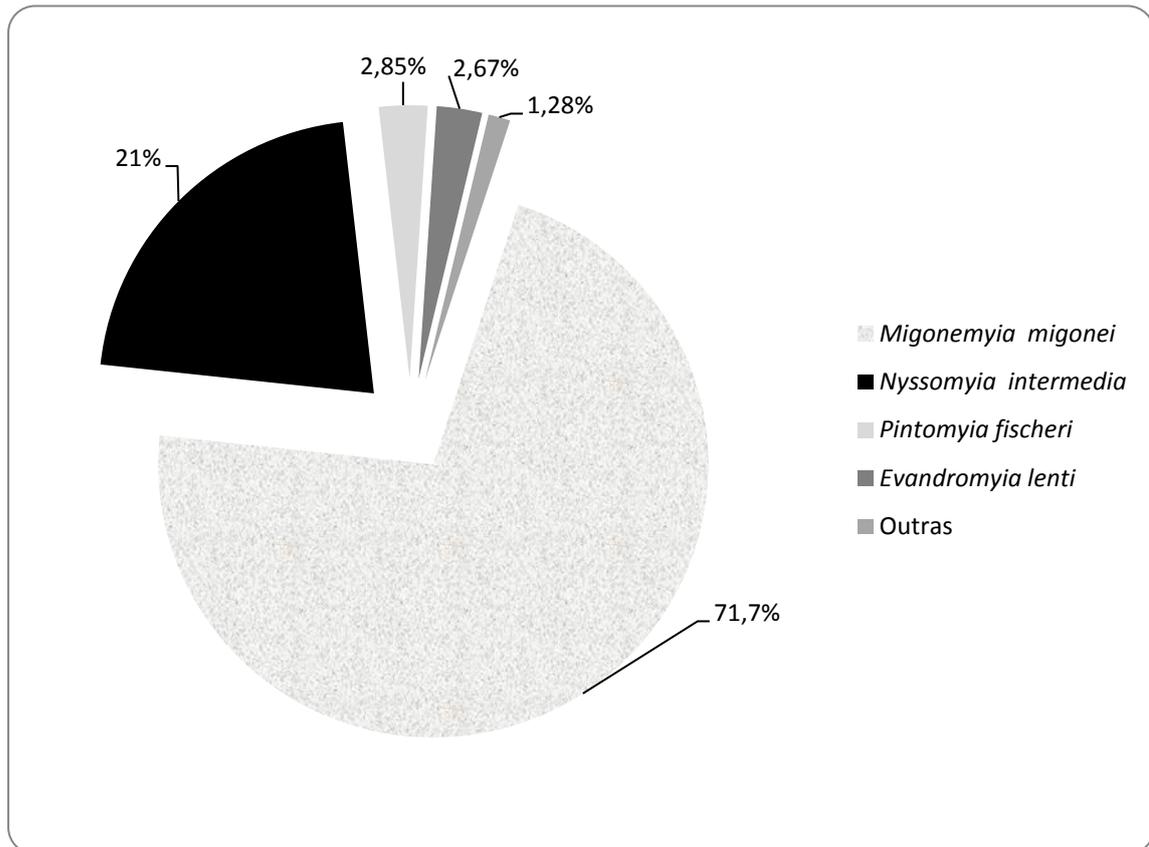
Evandromyia (Barretomyia) Série: tupyngambai obs: espécie não identificada fêmeas indistinguíveis.

* Espécies transmissoras de Leishmaniose Tegumentar Americana

As espécies de flebotomíneos capturadas e suas frequências relativas foram respectivamente: *Migonemyia migonei* 71,7%, *Nyssomyia intermedia* 21,5%, *Pintomyia fischeri* 2,85%, *Evandromyia lenti* 2,67%, *Brumphyomyia cunhai* 0,55%, *Nyssomyia whitmani* 0,37%, *Evandromyia (Barretomyia) sallesi* ou *cortelezii* 0,18%,

Evandromyia (Barretomyia) Série tupimambay 0,09, *Trichopygomyia longispina* 0,09% (Tabela 2).

Figura 10. Espécies e frequência relativa de flebotomíneos capturados no peridomicílio de moradores de zonas rurais de Lúna, Espírito Santo.



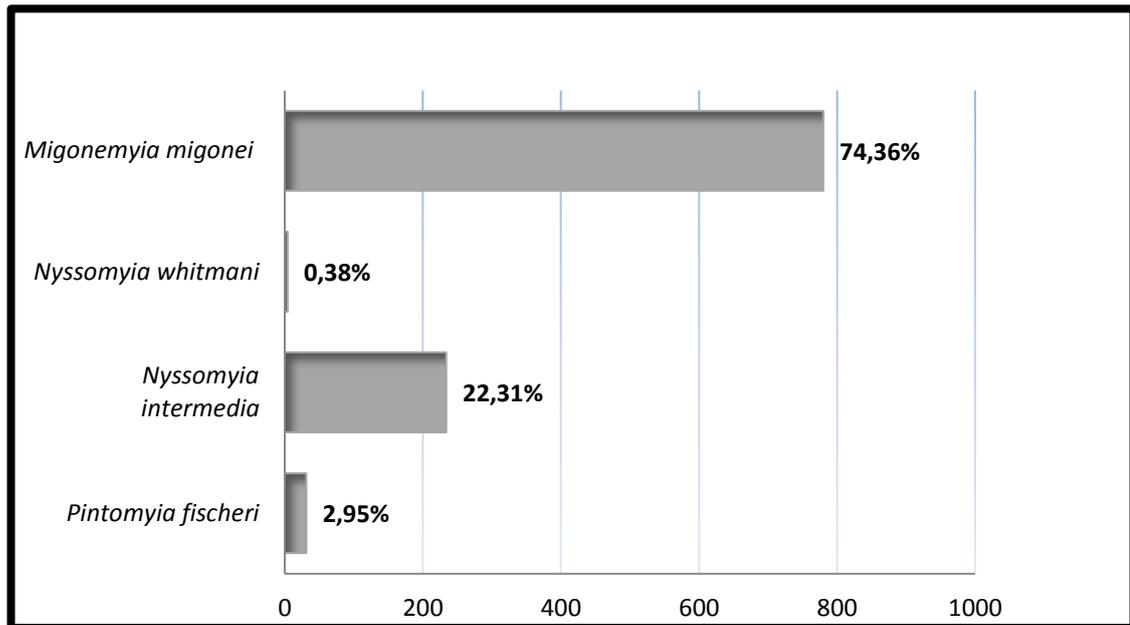
Nesse estudo quatro pontos de coletas não apresentaram a presença de flebotomíneos, sendo eles: P1, P2, P5 e P9, pertencentes à localidade de São João do Príncipe, Tinguaciba e Serrinha da Torre. Os três com as maiores taxas foram P7, P8 e P13 que juntos foram responsáveis por 993 flebotomíneos (Tabela 3).

Tabela 3: Espécies de flebotomíneos encontradas no peridomicílio de moradores de zonas rurais de lúna/ES, de acordo com as localidades e os pontos de captura.

ESPÉCIES	LOCALIDADES E PONTOS DE CAPTURA														TOTAL
	SÃO JOÃO DO PRÍNCIPE			TINGUACIBA		SERRINHA DA TORRE					SANTÍSSIMA TRINDADE	FIGUEIRRA			
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	
♂-♀	♂-♀	♂-♀	♂-♀	♂-♀	♂-♀	♂-♀	♂-♀	♂-♀	♂-♀	♂-♀	♂-♀	♂-♀	♂-♀	♂-♀	
<i>Brumphyomyia cunhai</i>	—	—	—	—	—	—	—	0—5	—	—	—	1—0	—	—	6
<i>Evandromyia (Barretomyia) cortelezii</i> ou <i>Ev. (Bar.) sallesi</i>	—	—	—	—	—	—	0—1	0—1	—	—	—	—	—	—	2
<i>Evandromyia (Barretomyia) Série: tupynambai</i>	—	—	—	—	—	—	0—1	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>Evandromyia lenti</i>	—	—	1—0	1—1	—	5—15	—	0—1	—	1—1	2—0	—	1—0	—	29
<i>Migonemyia migonei</i>	—	—	1—3	—	—	6—4	260—190	204—90	—	3—3	1—0	—	3—10	0—2	780
<i>Nyssomyia intermedia</i>	—	—	4—3	—	—	1—4	27—29	21—19	—	2—1	4—1	7—4	43—57	4—3	234
<i>Nyssomyia whitmani</i>	—	—	3—1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4
<i>Pintomyia fischeri</i>	—	—	0	—	—	—	0—10	1—18	—	0—2	—	—	—	—	31
<i>Trichopygomyia longispina</i>	—	—	—	—	—	—	—	0—1	—	—	—	—	—	—	1
Total por sexo	—	—	9—7	1—1	—	12—23	287—231	226—135	—	6—7	7—1	8—4	47—67	4—5	1088
Total geral	—	—	16	2	—	35	518	361	—	13	8	12	114	9	

Os resultados da técnica de PCR foram negativos para amplificação de ácidos nucleicos de *Leishmania* spp. entre flebotomíneos que compuseram a amostragem dos três pontos de coletas analisados.

Figura 11: Espécies de flebotomíneos transmissoras de Leishmaniose Tegumentar Americana capturadas no peridomicílio de moradores de zonas rurais de Iúna/ES.



6 DISCUSSÃO

O combate às doenças negligenciadas permanece sendo um desafio mundial principalmente nos países mais pobres.

A distribuição da LTA é influenciada por fatores geográficos e climáticos pouco conhecidos. Esses fatores determinam a distribuição de diferentes flebotomíneos vetores, parasitas e reservatórios (FERREIRA et al.,2001). A complexidade da interação desses agentes nos diferentes ciclos de transmissão da doença colabora para as dificuldades em se controlar o agravo. Nas regiões mais carentes, a falta de estrutura favorece o avanço da LTA, contribui para o aumento do

número de vítimas que muitas vezes são acometidas por lesões graves e debilitantes.

De acordo com Falqueto et al.(2003), definitivamente a LTA no estado do Espírito Santo é causada pela espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

A fauna de flebotomíneos encontrada no estado é de aproximadamente 59 espécies (MENEGUZZI et al. 2016), cinco espécies com características antropofílicas são usualmente coletadas em áreas com ocorrência de casos de leishmaniose tegumentar: *Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia whitmani*, *Migonemyia migonei*, *Pintomyia fischeri* e *Pintomyia monticola* (FERREIRA et al.,2001; ROCHA et al., 2010a), sendo todas incriminadas como vetores da doença, com exceção de *Pi. monticola* (BRASIL, 2007).

Todos os gêneros de interesse médico capturadas nesse estudo já haviam sido relatados no estado, do total das nove espécies encontradas, quatro delas são consideradas transmissoras da *L. (V.) braziliensis*: *Ny. intermedia*, *Ny. whitmani*, *Mg. migonei* e *Pi. fischeri* (BRASIL, 2007; RANGEL; LAINSON, 2009).

Ny. intermedia é a principal espécie relacionada com a transmissão da doença no sudeste do Brasil, (MENEGUZZI et al. 2016; ROCHA et al., 2010a; RANGEL et al., 1986) devido a sua alta prevalência muitos autores a consideram como a principal espécie vetor em ambientes modificados (VIRGENS et al., 2015), sendo acompanhada também por *Mg. migonei* e *Ny. whitmani* (FERREIRA et al.,2001).

Nesse estudo *Mg. migonei* foi a espécie amplamente mais abundante, com 71,7% de frequência, influenciando diretamente o índice de diversidade de espécies. Essa alta prevalência nessa região nos sugere que em lúna, ela possa ser uma importante vetor da doença. A adaptação a ambientes modificados pela agricultura e o notável grau de antropofilia dessa espécie já foi apontado em vários trabalhos (RANGEL; LAINSON, 2009; RANGEL; LAINSON, 2003). *Mg. migonei* junto com *Ev. lenti*, em estudo de fauna também na região do Caparaó, no estado de Minas Gerais, apresentaram maiores taxas de capturas em ambiente de cafezal (SARAIVA et al., 2006). Ferreira et al., (2013), entre os município de Pancas e Águia Branca, municípios estes do Vale do Rio Doce do Espírito Santo onde esporadicamente

ocorrem casos humanos de Leishmaniose Visceral, realizaram coletas peridomiciliares em três pontos e relataram taxas de prevalência de 3,64%, 26,56% e 54,10% para *Mg. migonei* (FERREIRA et al., 2013), essa grande variação sugere haver outros fatores locais inerentes que interferem na sua ocorrência. Nesse mesmo estudo, Ferreira et al. (2013) que as duas maiores frequências de ocorrência de *Mg. migonei*, ou seja 26,56% e 54,10% , ocorreram em pontos nos quais a espécie *Lutzomyia longipalpis* estava ausente, e a menor frequência de *Mg. migonei*, 3,64%, ocorreu quando a *Lu. longipalpis* apresentou 87% de prevalência. É possível que a presença da *Lu. longipalpis* afete o número e a diversidade de outras espécies de flebotomíneos. Pinto et al. (2012), concluíram que *Ev. lenti* pode ser usado como índice de espécies para ocorrência de *Lu. longipalpis* (PINTO et al., 2012).

Somente um caso autóctone de Leishmaniose Visceral foi relatado em Iúna, esse ocorreu no ano de 2009 (SINAN, 2017), porém não foi identificada a presença da principal espécie vetor *Lu. longipalpis*. Dada a gravidade dessa forma da doença somada aos recentes achados, é necessária a vigilância entomológica e epidemiológica constante, pois estudos incriminam a transmissão de Leishmaniose Visceral pela *Mg. migonei* em áreas onde casos autóctones da doença estão ocorrendo mesmo na ausência da *Lu. longipalpis* (CARVALHO et al., 2010), na Argentina, *Mg. migonei* já foi encontrado naturalmente infectado com *Leishmania infantum* ampliando a possibilidade dessa espécie também poder ser vetor da Leishmaniose Visceral (MOYA et al., 2015). Também não foram relatados casos autóctones de LTA no município de Iúna durante o ano de 2016 (SINAN, MS – 19/01/2017) o que certamente contribui para o resultado negativo para amplificação de ácidos nucleicos de *Leishmania* spp. pela técnica de PCR observado após a extração de DNA de macerados de flebotomíneos, apesar da amostragem não ter significância representativa ou estatística dos flebotomíneos coletados.

Pintomyia fischeri foi a terceira espécie de importância vetorial no contexto das leishmanioses, representou 2,85% do total da amostra, considerada antropofílica, também demonstra atratividade por cães e pássaros (RANGEL; LAINSON, 2009). *Pi. fischeri* já foi relatada em grande quantidade em ambiente de cafeeiro no estado de Minas Gerais (ALEXANDRE et al., 2002), em região com características ambientais parecidas com as encontradas nos locais de coleta desse

estudo. Em 2011 foi identificada com infecção natural por *Leishmania (Viannia)*, sendo considerada vetor secundária no estado do Rio Grande do Sul (PITA-PEREIRA et al., 2011).

Nyssomyia whitmani apesar de participar do ciclo de transmissão da LTA em outros municípios do Espírito Santo, como em Afonso Cláudio (ALEXANDRE et al., 2002; FALQUETO, 1997) e ter sido a segunda espécie mais abundante na Região do Caparaó mineira (SARAIVA et al., 2006), nesse estudo não se apresentou em grande número sendo somente 0,37% dos flebotomos.

A diversidade de flebotomíneos em ambientes de floresta é claramente maior do que no peridomicílio, mesmo sendo dentro da mesma área de estudo (PINTO et al., 2012), a baixa ocorrência das demais espécies de flebotomíneos em diversidade e número no peridomicílio contribui para o entendimento sobre o impacto das alterações ambientais na fauna de flebotomíneos. A modificação antrópica do meio ambiente favorece a sobrevivência de espécies com maiores capacidade adaptativas, provavelmente as que possuem menores exigências alimentares e climáticas, neste contexto, justifica-se o alto percentual de 93,2% do total de espécimes capturadas, pertencerem a somente duas espécies, *Ny. intermedia* e *Mg. migonei*, ambas com capacidade vetorial, e portanto importantes no ciclo de transmissão e na ocorrência das leishmanioses (FARIAS, 2014).

Considerando o Índice de Dominância (0,56) e o somatório das frequências relativas (96,42%) das espécies com capacidade vetorial, é necessário que se mantenha atenção especial ao município, incluindo nesse aspecto a vigilância entomológica, uma vez que o mesmo apresenta condições favoráveis à transmissão da doença.

Mg. migonei e *Ny. intermedia* representaram 96,67% do total das espécies transmissoras de LTA, esse alto valor nos sugeri que essas duas espécies são provavelmente os principais vetores na região de Lúna.(Figura 11)

Mais recursos e incentivos devem ser destinados às pesquisas visando melhorar o tratamento dos doentes assim como para ampliar o conhecimento das variáveis que influenciam o ciclo da doença. O aumento do conhecimento irá

melhorar as decisões nas ações de saúde, com ele, medidas profiláticas poderão ser adotadas com o intuito de diminuir a ocorrência de novos casos da doença e dos custos com os serviços de saúde.

7 CONCLUSÃO

Baseando nos achados entomológicos podemos sugerir que por sua ampla maioria na região pesquisada, por sua capacidade vetorial e características antropofílica já descritas na literatura, *Mg. migonei* é uma importante espécie vetor de LTA no município de Lúna, provavelmente é a espécie que está atuado como vetor primária da Leishmaniose Tegumentar Americana na região, juntamente com *Ny. intermedia*. Maiores estudos relacionados ao comportamento da fauna e distribuição em relação às variações de sazonalidade, devem ser realizados com o intuito de se confirmar essa suspeita, bem como avaliação de infecção natural dos flebotomíneos.

8 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G.M.; MEDEIROS, W.M. Distribuição Regional e Hábitats das Espécies de Flebotomíneos do Brasil. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. p. 207-255.
- ALENCAR, R.B. Emergência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em chão de floresta de terra firme na Amazônia Central do Brasil: uso de um modelo modificado de armadilha de emergência. **Acta Amazonica**.v.37, nº2, Manaus, June 2007.
- ALEXANDER, B.; OLIVEIRA, E.B.; HAIGH, E.; ALMEIDA, L.L. Transmission of *Leishmania* in coffee plantations of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2002, 97: 627-630.
- ALMEIDA, O.L.S.; SANTOS, J.B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. **An Bras Dermatol**. 2011; 86 (3):497-506.
- BADARÓ, R.; DUARTE, M.I.S. Leishmaniose visceral (Calazar). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Editora Ateneu, p.1234 -1259, 1996.
- BARRETO, M.P. Observações sobre a biologia do *Phlebotomus whitmani* Antunes e Coutinho, 1939 (Diptera, Psychodidae) em condições experimentais. **Papéis Avulsos Zool.**, v.1, p.87-100, 1941.
- BARROS, G.C.; SESSA, P.A.; MATTOS, E.A.DE.; CARIAS, V.R.D.; MAYRINK, W.; ALENCAR, J.T.A.DE.; FALQUETO, A.; JESUS, A.C.DE. Foco de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Viana e Cariacica, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Rev. Saúde Pública** v.19 nº 2 .São Paulo Apr. 1985. 146-53.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2ª ed. Ed. Ministério da Saúde, Brasília 2007.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Ed. Ministério da Saúde, Brasília 2003.
- BRAZIL, R.P.; BRAZIL, B.G. Biologia de flebotomíneos do Brasil, In: Rangel, E.F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003.p.257-274.

- BRYCESON, A.D.M. Leishmaniasis. In: COOK, G. C. **Manson's Tropical Diseases**. 20 ed. WB Saunders Company LTDA, cap.65, p.1213-38, 1996.
- DEDET, J.P.; VIGNES, R.; RANGEL, E.F. Morfologia E Taxonomia: Grupo Cipa. In: RANGEL, E.F.; LAINSON, R. Organizadores. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. p.177-184.
- DESJEUX, P. Human leishmaniasis: Epidemiology and public health aspects. Genebra. **World Health Stat**. Q. 45:312,1992.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunol, Microbiol and Infect Dis**; 27:305-318, 2004
- FALQUETO, A. Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no estado do Espírito Santo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 30(6): 531-532,1997.
- FALQUETO, A.; SESSA, P.A.; FERREIRA, A.L.; VIEIRA, V.P.; SANTOS, C.B.; VAREJÃO, J.B.M.; CUPOLILLO, E.; PORROZZI, R.; CARVALHO-PAES, L.E.; GRIMALDI JR, G. Epidemiological and Clinical Features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 98(8): 1003- 1010, December 2003.
- FARIAS, P.C.G. Análise de fatores geográficos e climáticos relacionados à distribuição de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) em área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana no estado do Espírito Santo, Brasil / Priscila Camargo Granadeiro Farias. – 2014. 91 f.: il.
- FELICIANGELI, M.D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**.18: 71-80, 2004.
- FERREIRA, A.L.; FALQUETO, A.; GRIMALDI JR, G.; PEIXOTO, A.A.; PINTO, I.D.S. Sand Fly Fauna in Southeastern Brazil. Ecological and Epidemiological Aspects of the Sand Fly (Diptera, Psychodidae) Fauna of the National Monument of Pontões Capixabas, State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. **Entomological Society of America**. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/full/10.1603/ME13037>>.
- FERREIRA, A.L.; SESSA, P.A.; VAREJÃO, J.B.M.; FALQUETO, A. Distribution of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) at Different Altitudes in Endemic Region of American Cutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 96(8) 1061-1067, November, 2001.

GALATI, E.A.B. Morfologia e Taxonomia. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003, p. 23-175.

GALATI, E.A.B.; et al. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in caves of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, n. 2, p. 283-296, 2003.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.DE.L.R.DE. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 36(1):71-80, jan-fev, 2003.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet** 1993; 54: 1191-1199.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE 2017. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=320300&search=espirito-santo|iuna|infograficos:-informacoes-completas>. Acesso em 19 de janeiro de 2017.

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

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Rev Pan- Amaz Saude** v.1 n.2. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232010000200002>.

LAINSON, R; SHAW, J.J. New World leishmaniasis - the Neotropical *Leishmania* species. In: COX, F.E.; KREIER, J.P.; WAKELIN, D. editors. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. 9th ed. London: Hodder Headline Group; 1998. p. 241-66

LEITE, A.C.R.; WILLIAMS, P. The First Instar Larva of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotomidae) **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 92(2): 197-203, 1997.

LEWIS, D.F. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). **Bulletin of the British Museum (Natural History) - Entomology, London**, v. 45, n. 2, p. 121-209, 1982.

LIMA, E.B.; PORTO, C.; MOTTA, J.C.O.; SAMPAIO, R.N.R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **An. Bras. Dermatol.** 82(2): 111-124, 2007.

MACHADO- PINTO, J.; PINTO, J.; COSTA, C.A.DA.; GENARO, O.; MARQUES, M.J.; MOBABBER, F.; et al. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. **Int. J. Dermatol.** 41:73-8, 2002.

MAURICIO, I.L.; HOWARD, M.K.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**.v.119, p. 237-246. September. 1999.

MENEGUZZI, V.C.; SANTOS, C.B.D.; LEITE, G.R.; FUX, B.; FALQUETO, A. Environmental Niche Modelling of Phlebotomine Sand Flies and Cutaneous Leishmaniasis Identifies *Lutzomyia intermedia* as the Main Vector Species in Southeastern Brazil. **PLOS ONE** | DOI: 10.1371/journal.pone.0164580 October 26, 2016. 1/16.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários- DFIP-SDA - CPV Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - **Nota Técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA.**

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. 1ª ed. atual. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2016. 773 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - **Sinan Net.** LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA - CASOS CONFIRMADOS NOTIFICADOS NO SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - ESPÍRITO SANTO. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/ltaes.def>>. Acesso em 19 de janeiro de 2017.

MISSAWA, N.A.; LOROSA, E.S.; DIAS, E.S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 41(4):365-368, jul-ago, 2008.

MOYA, S.L.; GIULIANIA, M.G.; ACOSTA, M.M.; SALOMÓNA, O.D.; LIOTTA, D.J. First description of *Migonemyia migonei* (França) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Psychodidae: Phlebotominae) natural infected by *Leishmania infantum* in Argentina- **Acta Tropica** 152 (2015) 181–184.

NASSIRI-KASHANI, M.; FIROOZ, A.; KHAMESIPOUR, A.; MOJTAHED, F.; NILFOROUSHZADEH, M.; HEJAZI, H. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of itraconazole in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** 2005; 19:80-3.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Informe Epidemiológico das Américas. Informe Leishmanioses nº4, julho 2016.

PAIVA, B.R.DE; SECUNDINO, N.F.C; PIMENTA, P.F.P; GALATI, E.A.B; ANDRADE JUNIOR, H.F; MALAFRONTA, R.DOS.S. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos(Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. **Cad de Saúde Pública**, 23(1):87-94.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis. Disponível em :
<http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417&Itemid=39345&lang=em>. Atualizado em 01 de maio de 2014b, acessada 02 de abril de 2017.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. General Information: Leishmaniasis. Disponível em:
<http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417&Itemid=40250&lang=em>. Atualizada 17 de março de 2017, acesso em 03 de abril de 2017.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Visceral Leishmaniasis. Disponível em:
<http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420&Itemid=39347&lang=en>. Atualizada em 31 de março de 2014a, acesso em 27 de outubro 2016.

PAULA, C.D.R.DE.; SAMPAIO, J.H.D.; CARDOSO, D.R.; SAMPAIO R.N.R. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mg SbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 36:365-371, mai-jun, 2003.

PINHEIRO, J.D.A. Resposta sorológica para *Leishmania braziliensis* utilizando técnica ELISA para cães imunizados com duas vacinas comerciais frente à leishmaniose visceral. 2015. 35p. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo**. Alegre, ES, 2015.

PINTO, I.DE.S.; FERREIRA, A.L.; VALIM, V.; CARVALHO, F.DOS.S.; SILVA, G.M.DA.; FALCÃO A.L.; DIETZE, R.; FALQUETO, A. Sand fly vectors (Diptera, Psychodidae) of American visceral leishmaniasis areas in the Atlantic Forest, State of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Journal of Vector Ecology**. v.37,nº.1 June 90 - 96 pág. 2012.

PIRAJÁ, G. V.; LUCHEIS, S.B. A Vigilância Epidemiológica De Flebotomíneos no Planejamento de Ações de Controle nas Leishmanioses. **Vet. e Zootec**. 2014 dez.; 21(4): 503-515.

PITA-PEREIRA, D.DE; SOUZA, G.D.; PEREIRA, T.DE.A; ZWETSCH A.; BRITTO, C.; 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 assay D.d. **Acta Tropica** 120 (2011) 273– 275.

PORTAL DA SAÚDE - SUS. 2014. Descrição da Doença. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/723-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-tegumentar-americana-lta/11324-descricao-da-doenca>>. Criado em 27 de março de 2014, acesso em: 27 de abril de 2017.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 104(7): 937- 954, November 2009.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. Ecologia das Leishmanioses. In: **Flebotomíneos do Brasil**. Ed Fiocruz 2003; 291-336.

RANGEL, E.F.; SOUZA, N.A.; WERMELINGER, E.D.; AZEVEDO, A.C.R.; BARBOSA, A.F.; ANDRADE, C.A. Flebotomos de Vargem Grande, Foco de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 81: 347- 349, 1986.

REIS, S.R.; et al. Ocorrência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no ambiente peridomiciliar em área de foco de transmissão de leishmaniose tegumentar no município de Manaus, Amazonas. **Acta Amazonica**. 43(1), p. 121– 124, 2013.

REY, L. **Parasitologia**. Ed. Guanabara Koogan, 4ª Ed, 2008. 930p.

ROCHA, L.D.S.; SANTOS, C.B.D.; FALQUETO, A.; GRIMALDI JR, G.; CUPOLILLO, E. Molecular biological identification of monoxenous trypanosomatids and *Leishmania* from antropophilic sand flies (Diptera: Psychodidae) in Southeast Brazil. **Parasitology Research** 107: 465-468. 2010b.

ROCHA, L.S.; FALQUETO, A.; DOS SANTOS, C.B.; FERREIRA, A.L.; DA GRAÇA, G.C.; GRIMALDI JR, G.; CUPOLILLO, E. Survey of natural infection by *Leishmania* in sandfly species collected in southeastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 104, 2010a, 461–466

SARAIVA, L.; LOPES, J.DOS.S; OLIVEIRA, G.B.M.; BATISTA, F.DE.A.; Falcão, A.L.; ANDRADE FILHO, J.D. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39(1): 56-63, jan-fev, 2006.

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO. Série histórica dos casos notificados período 1986- 2004. Vitória: Programa de Controle das Leishmanioses, Secretaria de Saúde do Estado do Espírito Santo; 2004.

SESSA, P.A.; BARROS, G.C.; MATTOS, E.A. DE.; CARIAS, V.R.D.; ALENCAR, J.T.A. DE.; DELMAESTRO, D.; COELHO, C.C.; FALQUETO, A. Distribuição Geográfica da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Espírito Santo-Brasil . **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 18(4): 237- 241, Out-Dez, 1985.

SHERLOCK, I. A. Importância Médico-Veterinária. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003, p. 15-22.

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

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (SINAN-2014). Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-iv/11334-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em 19 de janeiro de 2017.

VIRGENS, T.M.DAS.; REZENDE, H.R.; PINTO, I.DE.S.; FALQUETO, A. Sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) from the Goytacazes National Forest and surrounding areas of southeastern Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v.40, nº 1,2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 27 de abril de 2017.

YOUNG ,D.C.; DUNCAN, .MA. Guide to the Identification an Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera, Psychodidae). **Mem Amer Entomol Inst** 1994; 54:p1-881.