



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Sabrina Fernandes Cardoso

**Levantamento de Fauna de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e Infecção Natural
por *Leishmania* spp. no Município de Tubarão, Santa Catarina, Brasil**

Florianópolis

2021

Sabrina Fernandes Cardoso

Levantamento de Fauna de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e Infecção Natural por *Leishmania* spp. no Município de Tubarão, Santa Catarina, Brasil

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof.^a Luísa Damazio Rona Pitaluga, Dra.

Coorientador: André Nóbrega Pitaluga, Dr.

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra

Fernandes Cardoso, Sabrina
Levantamento de Fauna de Flebotomíneos (Diptera:
Psychodidae) e Infecção Natural por Leishmania spp. no
Município de Tubarão, Santa Catarina, Brasil / Sabrina
Fernandes Cardoso ; orientador, Luísa Damazio Rona
Pitaluga, coorientador, André Nóbrega Pitaluga, 2021.
95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento,
Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.
Flebotomíneos. 3. Leishmaniose. 4. Leishmania Infantum. I.
Damazio Rona Pitaluga, Luísa . II. Nóbrega Pitaluga, André.
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV.
Título.

Sabrina Fernandes Cardoso

Levantamento de Fauna de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e Infecção Natural por *Leishmania* spp. no Município de Tubarão, Santa Catarina, Brasil

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Elisa Cupolillo, Dr.^a

Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ

Prof. Reginaldo Peçanha Brazil, Dr.

Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ

Prof. Guilherme de Toledo e Silva, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Andressa Alencastre Fuzari Rodrigues, Dr.^a

Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Prof.^a Evelise Maria Nazari, Dr.^a

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação

Prof.^a Luísa Damazio Rona Pitaluga, Dr.^a

Orientadora

Florianópolis, 2021.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por dar-me forças para superar o cansaço, fazer-me seguir em frente diante dos obstáculos e conceder proteção diante das longas viagens! Além disso, por colocar em meu caminho pessoas maravilhosas, que de alguma forma estiveram comigo nesse período acadêmico, as quais são elencadas em agradecimento a seguir:

Minha orientadora, a professora Dr.^a Luísa Damazio Rona Pitaluga, que me concedeu a oportunidade de ser sua orientanda, acreditando no meu potencial quando nem eu mesma acreditava! Que sempre foi uma grande incentivadora, repassando seus conhecimentos, conduzindo-me nos primeiros experimentos na bancada do laboratório, fazendo-se presente e trazendo paz para meu coração inquieto;

Ao meu coorientador, Dr. André Nóbrega Pitaluga, pela calma e paciência nos conhecimentos transmitidos, por se deslocar da Capital, viajando cerca de 280km, com custeio próprio, para ensinar-me a essência da pesquisa com flebotomíneos;

Aos membros da banca examinadora: Dr.^a Elisa Cupolillo, Dr. Reginaldo Peçanha Brazil, Dr. Guilherme de Toledo e Silva, Dr.^a Andressa Alencastre Fuzari Rodrigues e Dr.^a Yara Costa Netto Muniz, pelas contribuições enriquecedoras e tempo disponibilizado;

Ao aluno de Iniciação Científica João Victor Costa Guesser, por ser meu braço direito, esquerdo e minhas pernas durante todo o mestrado, principalmente na arte da montagem de lâminas, bem como pela amizade e apoio incondicional;

A todos os alunos do laboratório Lapoge/Rona Pitaluga/Ufsc, em especial a Natália Valério, pelo companheirismo e ensinamentos durante o período solitário da pandemia de Covid-19; ao André Akira, por sempre estar disponível para me ouvir; e a Kamila Voges, pelas constantes hospedagens;

Ao Dr. Reginaldo Peçanha Brazil e à Dr.^a Andressa Alencastre Fuzari Rodrigues, por receber-me tão bem em seu laboratório no Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz/RJ, ensinando-me todo o processo para a identificação morfológica de flebotomíneos;

Ao Dr. José Dilermando Andrade Filho, do Instituto René Rachou/Fiocruz/MG, por gentilmente ceder-me os controles positivos de *Leishmania*;

Ao enfermeiro Ivon Ferreira Júnior, da Supervisão Regional de Saúde de Tubarão, que conduziu os trabalhos à frente do setor de zoonoses com excelência durante as minhas ausências;

Ao laboratório de Entomologia da Diretoria de Vigilância Epidemiológica (Dive/SC), em especial ao técnico Erickson Ramos Batista, pelo auxílio na identificação morfológica dos flebotomíneos nos momentos de dúvida; e à bióloga Miriam Sant'Anna Ghazzi, pela disponibilização dos relatórios entomológicos do Estado;

À equipe da Divisão de Vetores, Reservatórios e Hospedeiros da Dive/SC, Renata Rísoli Gatti, Aysla Marcelino Baião e Vanessa Neves Carvalho Santos, pela disponibilização dos boletins epidemiológicos sobre as leishmanioses em tempo recorde!

Às Irmãs da Divina Providência, pelo carinho, cuidado e hospedagem no início dessa jornada;

À Glaucilene da Silva Costa, da Fiocruz/Rio, pelo altruísmo e tempo disponibilizado para me guiar nos primeiros passos rumo às análises das sequências genéticas;

A toda equipe técnica e professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Ufsc;

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (Lameb/Ufsc), pelo auxílio para a realização das fotografias dos flebotomíneos;

Ao Programa de Bolsas Universitárias de Santa Catarina (Uniedu), pela concessão de bolsa de estudos;

À equipe do Centro de Controle de Zoonoses do município de Tubarão, por permitir a pesquisa e facilitar o acesso ao local durante as coletas;

À Camila Hüpner e Jeanine Teófilo, pela amizade e companheirismo durante o início do mestrado, nas disciplinas obrigatórias e no decorrer de todo o curso;

Agradeço de modo especial à minha mãe, Silvana Fernandes do Carmo, por todo o incentivo aos estudos desde criança, por criar-me para o mundo para tentar fazer dele um lugar melhor! Por ensinar-me a ser forte e não esmorecer diante das dificuldades;

Ao meu pai afetivo, Alexandre Nunes do Carmo, que sempre foi um grande amigo e parceiro, apoiando-me de maneira incondicional em todos os momentos da minha vida, nos dias felizes e, principalmente, nos tristes;

E, por último, mas não menos importante, ao meu companheiro, Rodrigo Mainieri Zandavalle, por compartilhar a vida comigo e torná-la mais leve e feliz! Pelo apoio e incentivo constante, por lembrar-me frequentemente que sou a pessoa mais perseverante que ele conhece, não permitindo-me desistir!

RESUMO

As leishmanioses são doenças provocadas por protozoários do gênero *Leishmania* spp., que podem acometer tanto humanos quanto animais, podendo levar à morte. A transmissão do patógeno ocorre por meio da picada de fêmeas infectadas do inseto vetor flebotomíneo (Diptera: Psychodidae). No corpo do hospedeiro vertebrado, os parasitos vivem e se multiplicam intracelularmente em células do sistema fagocítico mononuclear, podendo causar distintas formas clínicas da doença. Em dezembro de 2018, no município de Tubarão/SC, pela primeira vez foram identificados casos de cães com leishmaniose visceral, não sendo possível, após investigação, confirmar ou descartar a autoctonia dos casos. Infecções por *Leishmania* em cães desempenham um papel crucial na transmissão do agente etiológico para humanos. Deste modo, estudou-se a fauna de flebotomíneos do Centro de Controle de Zoonoses do município de Tubarão, local onde foram identificados os animais positivos para o protozoário. Coletas em quatro pontos distintos foram realizadas durante 16 meses, e a infecção natural destes dípteros por *Leishmania* spp. foi avaliada por meio da técnica de PCR, tendo como alvo a região ITS1 do rDNA, seguida de sequenciamento para a identificação das espécies. Além da identificação morfológica, os insetos positivos passaram por identificação molecular confirmatória. Todos os cães abrigados na instituição foram testados para *Leishmania* por meio de técnica não invasiva (*Swab* ocular), seguida de PCR e sequenciamento. Ademais, foram correlacionados fatores ambientais (temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica) com a abundância total e o sexo dos referidos insetos. No total, 3419 flebotomíneos foram coletados, sendo 72.5% machos e 27.5% fêmeas. A espécie mais abundante foi *Nyssomyia neivai* (85.74%), seguida de *Migonemyia migonei* (13.30%), *Pintomyia fischeri* (0.82%), *Brumptomyia* spp. (0.10%) e *Evandromyia edwardsi* (0.04%). A taxa de infecção natural por *Leishmania* foi de 0.39%, sendo todos os exemplares *Leishmania infantum*. Os flebotomíneos naturalmente infectados pertenciam à espécie *Ny. neivai*, identificação obtida tanto na análise morfológica quanto na molecular. No total, 47 cães foram analisados, e dois animais foram identificados com *L. infantum*, gerando uma taxa de infecção de 4,2%. Constatou-se correlação positiva entre a abundância total, machos, fêmeas e temperatura, e coeficientes de correlação de $r = 0.50$; $r = 0.48$; $r = 0.55$, respectivamente, bem como entre valores de $p < 0,05$ para todas as referidas análises. Na ausência de *Lutzomyia longipalpis* em Santa Catarina, principal vetor da *Leishmania infantum* no Brasil, acredita-se que a *Nyssomyia neivai* seja o potencial vetor na região sul, podendo estar atuando como transmissor do patógeno causador da leishmaniose visceral no Estado.

Palavras-chave: Phlebotominae. Leishmaniose. *Leishmania infantum*. *Nyssomyia neivai*.

ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases caused by protozoans of the genus *Leishmania* spp., such diseases can compromise humans and animals, and in severe cases can also lead to death. The pathogen transmission occurs through the bite of the infected female insect vector, the phlebotomine (Diptera: Psychodidae). In the vertebrate host's body, the parasite lives and multiply intracellularly in macrophages, which leads to distinct clinical manifestations of the disease. In December 2018, the municipality of Tubarão, Santa Catarina, identified for the first-time cases of dogs infected with visceral leishmaniosis. After investigation, it was not possible to confirm whether the cases were autochthones or not. The infections of dogs with *Leishmania* play a pivotal role in the transmission of the etiological agent to humans. In this matter, our group studied the phlebotomine fauna of the Zoonoses Control Center of the municipality of Tubarão, where the animals were first identified positive with the protozoan. The collection occurred in four distinct sites for 16 months. The natural infection of the dipteran with *Leishmania* spp. was through the PCR assay targeting regions of the rDNA, ITS1, then we sequenced the samples to identify species. The positive insects were identified using morphological characteristics with molecular confirmation. In addition, we tested for *Leishmania* every dog sheltered in the institution through a noninvasive collection technique (ocular swab), tested with PCR assay, and confirmed by sequencing. Besides, we correlated environmental factors (temperature, air relative humidity, and precipitation) with the insects' total abundance and sex. A total of 3419 phlebotomine were collected, which 72.5% were male and 27.5% were female. The most abundant species was *Nyssomyia neivai* (85.74%), followed by *Migonemyia migonei* (13.30%), *Pintomyia fischeri* (0.82%), *Brumptomyia* spp. (0.10%), and *Evandromyia edwardsi* (0.04%). The natural infection rate by *Leishmania* was 0.39% and all infections were identified as caused by *Leishmania infantum*. The infected phlebotomine were identified through morphological and molecular analysis as *Ny. neivai*. We analyzed a total of 47 dogs and identified two animals infected with *L. infantum*, resulting in an infection rate of 4.2%. We found a positive correlation between total abundance, male, female, and temperature, with correlation coefficients of $r = 0.50$; $r = 0.48$; $r = 0.55$. respectively. All statistical analysis considered $p < 0.05$. In the absence of the confirmed vector of *Leishmania infantum* in Santa Catarina, *Lutzomyia longipalpis*, we believe that *Nyssomyia neivai* could be the possible vector in the South Region of Brazil. This species acts in the transmission of the pathogen that causes visceral and integumentary leishmaniasis in the Santa Catarina State.

Keywords: Phlebotominae. Leishmaniasis. *Leishmania infantum*. *Nyssomyia neivai*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Flebotomíneo macho.....	20
Figura 2 – Ciclo de vida dos flebotomíneos.....	21
Figura 3 – A – Promastigotas de <i>Leishmania</i> spp. corados pelo método Giemsa; B – Macrófago intacto com núcleo proeminente e três amastigotas de <i>Leishmania</i> contíguos à parede do vacúolo parasitóforo.....	23
Figura 4 – Esquema geral do ciclo biológico dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	24
Figura 5 – Esquema da região ITS1 do rDNA de <i>leishmania</i> , demonstrando os iniciadores LITSR e L5.8S.....	26
Figura 6 – A – Lesão clássica da LTA; B – Forma difusa; C – Forma mucosa.....	28
Figura 7 – Caso de Leishmaniose Visceral.....	28
Figura 8 – Registro dos casos confirmados de Leishmaniose Visceral Humana no Estado de SC, entre os anos de 2010 e 2020.....	29
Figura 9 – Cão com LV, lesão provocada por <i>L. infantum</i>	30
Figura 10 - Registro dos casos confirmados de Leishmaniose Visceral Canina no Estado de SC no período de janeiro de 2010 a maio de 2021.....	31
Figura 11 – Mapa do Brasil e do Estado de SC, com destaque para o município de Tubarão.....	35
Figura 12 – Imagem de satélite do CCZ do município de Tubarão SC.....	36
Figura 13 – Localização das armadilhas nos pontos de coletas do CCZ do município de Tubarão, SC, sendo: A – Ponto 1, B – Ponto 2, C – Ponto 3 e D – Ponto 4.....	38
Figura 14 – Contenção dos cães para a coleta de <i>swab</i> conjuntival, no CCZ do município de Tubarão/SC.....	45
Figura 15 – Coleta de células da conjuntiva ocular de cães com <i>swab</i> para diagnóstico de <i>Leishmania</i> spp.....	45
Figura 16 – Gel de agarose a 1%, corado com <i>Safe dye</i> , mostrando os produtos amplificados na segunda reação de PCR. MPM: Marcador de peso molecular de 100 pb; CP: Controle positivo (<i>L. infantum</i>); CN: Controle negativo; amostras positivas: 7-6, 8-15, 37-11 e 50-142.....	59
Figura 17 – Gel de agarose a 2%, corado com <i>Safe dye</i> , exibindo as amostras de fêmeas de flebotomíneos positivas para tripanossomatídeos, referentes à segunda PCR – MPM: Marcador de peso molecular de 100 pb.....	60
Figura 18 – Gel de agarose a 1% corado com <i>Safe dye</i> , mostrando as amostras de fêmeas de flebotomíneos positivas para tripanossomatídeos e amplificadas com o alvo COI, analisadas	

para a determinação da espécie do vetor – MPM: Marcador de peso molecular de 100 pb; CN: Controle negativo	62
Figura 19 – Fêmea de flebotomíneo da espécie <i>Ny. neivai</i> , encontrada naturalmente infectada por <i>L. infantum</i> no CCZ de Tubarão/SC. Inseto montado em lâmina para microscopia, após clarificação, e visualizado ao microscópio com aumento de 40x.....	62
Figura 20 – Gel de agarose a 1%, corado com <i>Safe dye</i> , referente às amostras de <i>swab</i> conjuntival dos 47 cães do CCZ de Tubarão/SC – MPM: Marcador de peso molecular de 100 pb; CP: Controle positivo (<i>L. infantum</i>), CN: Controle negativo.....	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Abundância de flebotomíneos distribuídos por ponto amostral e sexo, coletados no CCZ de Tubarão/SC, no período de março de 2019 a junho de 2020.....	50
Gráfico 2 - Abundância de flebotomíneos por espécie, capturados no CCZ de Tubarão/SC, no período de março de 2019 a junho de 2020.....	54
Gráfico 3 – Distribuição das espécies de flebotomíneos por ponto de coleta, coletas realizadas no CCZ de Tubarão/SC, no período de março de 2019 a junho de 2020.....	57
Gráfico 4 – Correlação entre as variáveis climáticas e a abundância total de flebotomíneos, machos e fêmeas, capturados no CCZ do município de Tubarão/SC entre março de 2019 e junho de 2020	64
Gráfico 5 – Correlação entre temperatura com machos e fêmeas capturados no CCZ do município de Tubarão/SC entre março de 2019 e junho de 2020 – Transformação de dados por $\log + 1$	65
Gráfico 6 – Correlação entre temperatura, precipitação total, umidade relativa do ar e flebotomíneos da espécie <i>Ny. neivai</i> capturados no CCZ do município de Tubarão/SC entre março de 2019 e junho de 2020.....	66
Gráfico 7 – Relação entre as variáveis temperatura e abundância de flebotomíneos capturados no CCZ do município de Tubarão/SC entre março de 2019 e junho de 2020 – $Y =$ Fórmula da equação, $R^2 =$ Coeficiente de determinação	67
Gráfico 8 – Relação entre as variáveis temperatura e machos de flebotomíneos capturados no CCZ do município de Tubarão/SC entre março de 2019 e junho de 2020 – $Y =$ Fórmula da equação, $R^2 =$ Coeficiente de determinação	68
Gráfico 9 – Relação entre as variáveis temperatura e fêmeas de flebotomíneos capturados no CCZ do município de Tubarão/SC entre março de 2019 e junho de 2020 – $Y =$ Fórmula da equação, $R^2 =$ Coeficiente de determinação	69
Gráfico 10 – Análise de Componentes Principais (PCA) realizadas com a abundância total de flebotomíneos, machos, fêmeas e médias das variáveis climáticas, com descrição da primeira e segunda dimensão – dados referentes às capturas de flebotomíneos realizadas no CCZ.....	71
Gráfico 11 – Análise multivariada (agrupamento do <i>Cluster</i>) realizada com a abundância total de flebotomíneos, machos, fêmeas e médias das variáveis climáticas e suas distâncias de similaridade entre as capturas de flebotomíneos realizadas no CCZ	72

Gráfico 12 – Dendrograma da análise multivariada (agrupamento do *cluster*) ilustrando os quatro agrupamentos gerados. Dados referentes às capturas de flebotomíneos realizadas no CCZ do município de Tubarão/SC entre março de 2019 e junho de 2020..... 72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Iniciadores utilizados nas reações de PCR para a detecção de <i>Leishmania</i> spp....	40
Quadro 2 - Quantidades e concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR.....	41
Quadro 3 – Iniciadores utilizados nas reações de PCR para a identificação molecular das espécies de flebotomíneos: gene mitocondrial, citocromo c oxidase subunidade I – COI	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estatística da abundância total de flebotomíneos distribuídos por pontos de coleta, insetos capturados no CCZ de Tubarão/SC, no período de março de 2019 a junho de 2020 ..	51
Tabela 2 – Frequência absoluta e relativa de flebotomíneos capturados por sexo, mês, ano e razão sexual, no CCZ do município de Tubarão/SC, no período de março de 2019 a junho de 2020	51
Tabela 3 – Análise estatística da abundância total de flebotomíneos distribuídos por mês, insetos capturados no CCZ de Tubarão/SC, no período de março de 2019 a junho de 2020.....	52
Tabela 4 – Riqueza de flebotomíneos por sexo, capturados no CCZ de Tubarão/SC, no período de março de 2019 a junho de 2020	53
Tabela 5 – Distribuição mensal, frequência absoluta e relativa das espécies de flebotomíneos capturadas no CCZ de Tubarão/SC, no período de março de 2019 a junho de 2020.....	56
Tabela 6 – Estatística referente à comparação das espécies de flebotomíneos capturados no CCZ de Tubarão/SC no período de março de 2019 a junho de 2020.....	57
Tabela 7 – Índice de Shannon referente aos pontos amostrais de flebotomíneos capturados no CCZ de Tubarão/SC no período de março de 2019 a junho de 2020.....	58
Tabela 8 – Resultado do alinhamento realizado com BLASTn para as amostras de fêmeas de flebotomíneos positivas para <i>L. infantum</i>	61
Tabela 9 – Comparação entre a identificação morfológica e molecular das fêmeas de flebotomíneos infectadas por <i>L. infantum</i> , no CCZ de Tubarão/SC. Alinhamento realizado com o algoritmo BLASTn.....	63
Tabela 10 – Resultado do alinhamento realizado com BLASTn para as amostras de fêmeas de flebotomíneos positivas para <i>L. infantum</i> – Alinhamento realizado com o algoritmo BLASTn	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anova – Análise de Variância

AGR – Agência Reguladora de Saneamento de Tubarão

CCZ – Centro de Controle de Zoonoses

Ceua – Comitê de Ética no Uso de Animais

COI – *Citocromo C Oxidase subunidade I*

Dive – Diretoria de Vigilância Epidemiológica

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeo Fosfatado

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

Enso – El Niño Oscilação Sul

Ev. edwardsi – *Evandromyia edwardsi*

Fg – Fentograma

H₂O – Água

H₃C-COOH – Ácido acético

ITS1 – Espaçador Interno Transcrito 1

kDNA – DNA do cinetoplasto

KOH – Hidróxido de Potássio

Lacen – Laboratório Central de Saúde Pública

L. chagasi – *Leishmania chagasi*

LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada

LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa

L. infantum – *Leishmania infantum*

LM – Leishmaniose Mucosa

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

Lu. longipalpis – *Lutzomyia longipalpis*

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

Mg. migonei – *Migonemyia migonei*

Mg – Miligrama

ml – Mililitro

mM – Milimolar

MPM – Marcador de Peso Molecular

MS – Ministério da Saúde

mtDNA – DNA mitocondrial

Ng – nanograma

Ny. neivai – *Nyssomyia neivai*

Ny. umbratilis – *Nyssomyia umbratilis*

Ny. whitmani – *Nyssomyia whitmani*

Pb – Pares de bases

PCA – Análise de Componentes Principais

PCR– *Polymerase Chain Reaction*

Pi. fischeri – *Pintomyia fischeri*

Pg – Picograma

Pmoles - Picomoles

rDNA - DNA ribossômico

RNA – Ácido ribonucleico

RS – Rio Grande do Sul

SC – Santa Catarina

Sinan – Sistema de Informação de Agravos de Notificações

SMS – Secretária Municipal de Saúde

Spp. – Espécies

SSU rDNA – Subunidade menor do ribossomo

TR - DPP® – Teste Rápido *Dual Path Plataform*

µl – Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

% - Porcentagem

® - Marca registrada

< - Menor

> - Maior

r - Coeficiente de correlação

R² - Coeficiente de determinação

♂ - Masculino

♀ - Feminino

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	FLEBOTOMÍNEOS.....	20
1.2	LEISHMANIAS	23
1.3	DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS POR <i>LEISHMANIA</i>	25
1.4	LEISHMANIOSES	27
1.4.1	Leishmaniose Tegumentar Americana.....	27
1.4.2	Leishmaniose Visceral.....	28
1.4.3	Leishmaniose Visceral Canina (LVC).....	29
1.4.3.1	<i>Diagnóstico da Infecção por Leishmania em cães.....</i>	31
1.4.4	Leishmanioses no município de Tubarão/SC.....	32
1.5	JUSTIFICATIVA.....	33
1.6	OBJETIVOS.....	33
1.6.1	Objetivo Geral	34
1.6.2	Objetivos Específicos.....	34
2	METODOLOGIA	35
2.1	ÁREA DE ESTUDO – CCZ DO MUNICÍPIO DE TUBARÃO/SC.....	35
2.2	CAPTURE E TRIAGEM DOS FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS.....	37
2.3	PROTOCOLO UTILIZADO NA PREPARAÇÃO, MONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FLEBOTOMÍNEOS.....	38
2.4	ANÁLISES MOLECULARES	39
2.4.1	Detecção da infecção natural das fêmeas de flebotomíneos por <i>Leishmania</i> spp. 39	
2.4.1.1	<i>Extração de DNA das fêmeas não ingurgitadas</i>	40
2.4.1.2	<i>PCR dirigida à região ITS1 do DNA</i>	40
2.4.1.3	<i>Reação de sequenciamento.....</i>	42
2.4.2	Identificação molecular das espécies de flebotomíneos.....	42
2.4.2.1	<i>PCR dirigida ao COI.....</i>	42
2.5	DADOS CLIMÁTICOS.....	43
2.6	DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS CÃES DO CCZ PARA <i>LEISHMANIA</i>	44
2.6.1	Técnica de coleta com <i>swab</i> conjuntival.....	44

2.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
2.7.1	Variáveis de Estudo	47
2.7.2	Análises comparativas das variáveis de estudo	47
2.7.2.1	<i>Abundância de flebotomíneos</i>	47
2.7.2.2	<i>Riqueza de espécies de flebotomíneos</i>	47
2.7.2.3	<i>Machos x fêmeas</i>	48
2.7.2.4	<i>Dados climáticos</i>	48
3	RESULTADOS	50
3.1	ABUNDÂNCIA DE FLEBOTOMÍNEOS	50
3.2	RIQUEZA DE FLEBOTOMÍNEOS.....	53
3.3	INFEÇÃO NATURAL DAS FÊMEAS DE FLEBOTOMÍNEOS POR <i>LEISHMANIA</i> SPP.	58
3.4	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE FLEBOTOMÍNEOS INFECTADAS COM <i>L. INFANTUM</i>	61
3.5	ANÁLISE DOS DADOS CLIMÁTICOS.....	63
3.6	DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS CÃES DO CCZ PARA <i>LEISHMANIA</i>	73
4	DISCUSSÃO	75
5	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

Nesta seção, será realizada uma análise introdutória entre aspectos relacionados à biologia e à identificação dos flebotomíneos e leishmanias e suas relações com as leishmanioses. Além disso, serão abordados conceitos relacionados ao diagnóstico dos agentes etiológicos das leishmanioses, bem como à epidemiologia da doença.

1.1 FLEBOTOMÍNEOS

São insetos que fazem parte da ordem Diptera, família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*. Eles são conhecidos popularmente como mosquito palha, cangalhinha, birigui, asa branca e asa dura, dependendo da região do país (FORATTINI, 1973). São pequenos, raramente seu comprimento ultrapassa 0,5cm, apresentam coloração palha ou castanho claro, sendo densamente pilosos, com corpo alongado e pernas mais longas e delgadas (BRAZIL; BRAZIL, 2003) (Figura 1).

Apresentam importância médica por atuarem como vetores de agentes etiológicos de doenças que afetam tanto humanos quanto animais, como é o caso dos protozoários do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), causadores das leishmanioses, além de outros tripanossomatídeos, como bactérias do gênero *Bartonella* e diversos arbovírus (SHERLOCK, 2003).

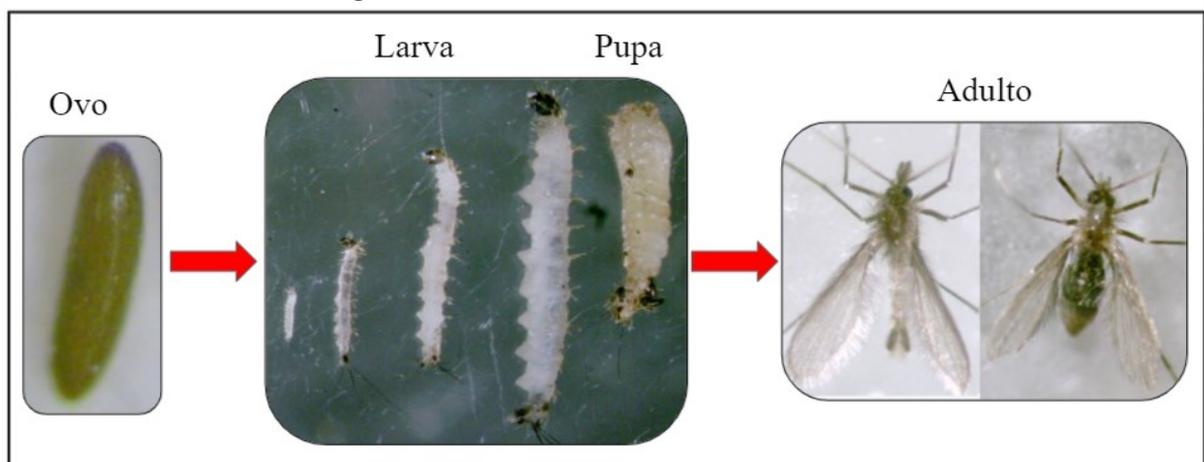
Figura 1 – Flebotomíneo macho.



Fonte: Arquivo pessoal de João Victor Costa Guessser (2020).

As formas imaturas dos flebotomíneos são terrestres, ao contrário dos demais dípteros, desenvolvendo-se em matéria orgânica em decomposição. São insetos holometábolos e passam pelas fases de: ovo, larva (quatro estádios) e pupa até a eclosão dos adultos (Figura 02). A duração de cada estágio varia de acordo com as espécies, as condições climáticas e o tipo de alimentação que dispõem (BRAZIL; BRAZIL, 2018; SHERLOCK, 2003). Em virtude de tais características, diversos autores têm estudado a associação da abundância de flebotomíneos a variáveis ambientais e fenômenos climáticos, tais como El Niño e La Niña (ÁVILA *et al.*, 2018; MANN; KAUFMAN, 2010; MIRANDA *et al.*, 2015; ALTAMIRANDA-SAAVEDRA *et al.*, 2020; CARDENAS *et al.*, 2008; CHAVES *et al.*, 2014).

Figura 2 – Ciclo de vida dos flebotomíneos.



Fonte: Arquivo pessoal de André Nóbrega Pitaluga (2007).

Os flebotomíneos ocorrem essencialmente em ambientes silvestres. No entanto, algumas espécies de vetores estão se adaptando a áreas desmatadas e locais de habitação humana, bem como ocupando ambientes urbanos e periferias. A adaptação desses insetos para novos habitats, principalmente aqueles ambientalmente impactados, indica um novo cenário de transmissão das leishmanioses (RANGEL; VILELA, 2008; CARVALHO *et al.* 2014).

Os abrigos usados por flebotomíneos adultos variam de acordo com o micro-habitat, a estação do ano, a umidade relativa do ar e a espécie. Devido ao seu revestimento corpóreo fino, eles se abrigam em locais onde podem se proteger de mudanças repentinas no ambiente. Assim, geralmente refugiam-se em locais com bom teor de umidade, com matéria orgânica em decomposição, pouca ou nenhuma luz e movimento de ar, ou seja, em pontos que os protegem da dessecação. Os locais de refúgio ideais, em particular, são folhas caídas no solo da floresta,

tocas de animais selvagens, troncos de árvores e raízes tabulares, ocos de árvores, fendas em rochas e cavernas etc. Em ambientes antrópicos, abrigos artificiais incluem áreas sombreadas e úmidas, além de abrigos para animais domésticos, como galinheiros, chiqueiros, currais, canis e outros (AGUIAR; VILELA, 1987; BRAZIL; BRAZIL, 2003).

Os flebotomíneos possuem atividade predominantemente crepuscular e/ou noturna (BRAZIL; BRAZIL, 2003). Segundo Souza e Costa (2018), os machos e as fêmeas se alimentam de carboidratos, especialmente néctar e secreções de afídeos. Normalmente, saem de seus abrigos naturais para se alimentar à noite ou ao anoitecer. A atividade hematofágica, entretanto, pode ocorrer durante todo o período noturno, do crepúsculo ao amanhecer. Apenas as fêmeas são hematófagas, uma condição necessária para que seus ovários amadureçam. Em decorrência de seus hábitos alimentares, as fêmeas são infectadas quando picam reservatórios de *Leishmania* spp. e podem, posteriormente, transmitir formas infecciosas do patógeno ao picarem humanos e outros mamíferos, ocasionando as Leishmanioses (SHERLOCK, 2003).

Os flebotomíneos representam um grupo de aproximadamente 1000 espécies conhecidas em todo o mundo, das quais 530 foram encontradas nas Américas. Estima-se que 98 espécies são possíveis vetores naturais de *Leishmania* spp. (SHIMABUKURO *et al.*, 2017).

A competência de uma espécie de flebotomíneo infectar-se e transformar-se em vetor depende de muitos fatores intrínsecos que definirão sua capacidade de ser suscetível ou refratário ao desenvolvimento de determinadas espécies de *Leishmania* (PIMENTA *et al.*, 2003).

A incriminação de um flebotomíneo como vetor de *Leishmania* depende da antropofilia do inseto e da identificação da mesma espécie de protozoário a partir dos insetos e vertebrados. Além disso, evidências adicionais são fornecidas com a observação de que o inseto comumente suga os reservatórios, e que ocorre nos locais em que o parasito e a doença causada por ele são identificados, suportando o desenvolvimento do protozoário e à possibilidade de transmissão da doença pela picada (KILLICK-KENDRICK, 1990; MARCONDES, 2011).

A identificação das espécies de flebotomíneos tradicionalmente é realizada com base na morfologia dos adultos, podendo se dar por meio da visualização de estruturas com valor taxonômico, como a genitália, tanto nos machos quanto nas fêmeas, entre outros caracteres (GALATI, 2003).

No entanto, técnicas moleculares têm se mostrado bastante promissoras e confiáveis para a identificação da fauna flebotomínica. A região do *Citocromo C Oxidase subunidade I* (COI), do DNA mitocondrial (mtDNA), tem sido utilizada com sucesso como marcador para a

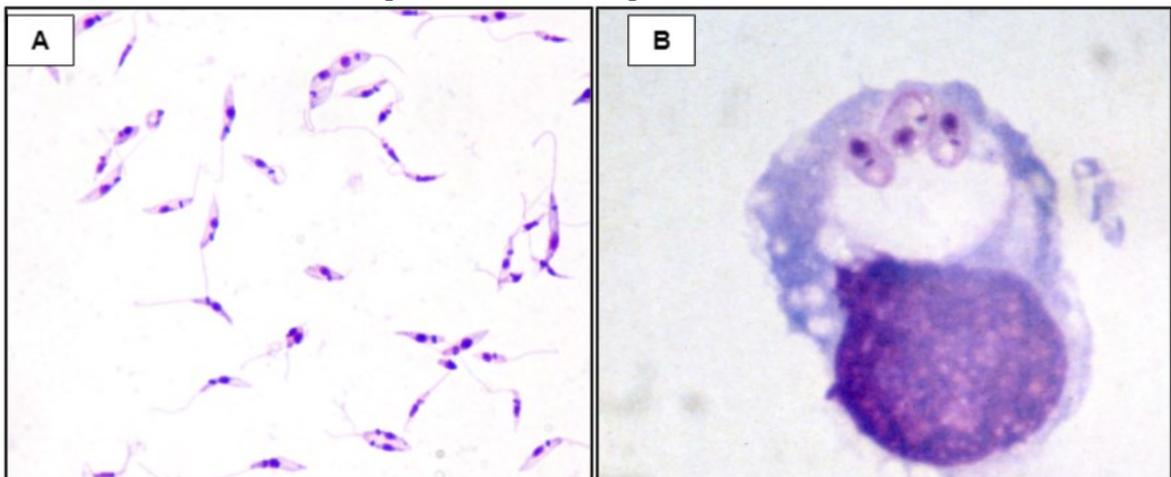
identificação de espécies, amplificando cerca de 658 pares de bases (pb), funcionando como um código de barras de DNA específico da espécie, o DNA *Barcode*. Um estudo realizado no Brasil utilizando o COI como alvo identificou corretamente 90% das espécies de flebotomíneos estudadas (PINTO *et al.*, 2015).

1.2 LEISHMANIAS

São protozoários incluídos no gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, cujos representantes apresentam como característica uma mitocôndria única (cinetoplasto), rica em mtDNA (NEVES *et al.*, 2016).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são heteroxênicos, ou seja, só completam seu ciclo biológico passando por dois hospedeiros. Os hospedeiros invertebrados são os flebotomíneos; e os vertebrados, diversos répteis e mamíferos. Eles apresentam formas distintas: amastigota (intracelular), comumente observada no hospedeiro vertebrado; e promastigota (extracelular), encontrada no hospedeiro invertebrado (ASHFORD, 2000). (Figura 03).

Figura 3 – **A** – Promastigotas de *Leishmania* spp. corados pelo método Giemsa; **B** – Macrófago intacto com núcleo proeminente e três amastigotas de *Leishmania* contíguos à parede do vacúolo parasitóforo.



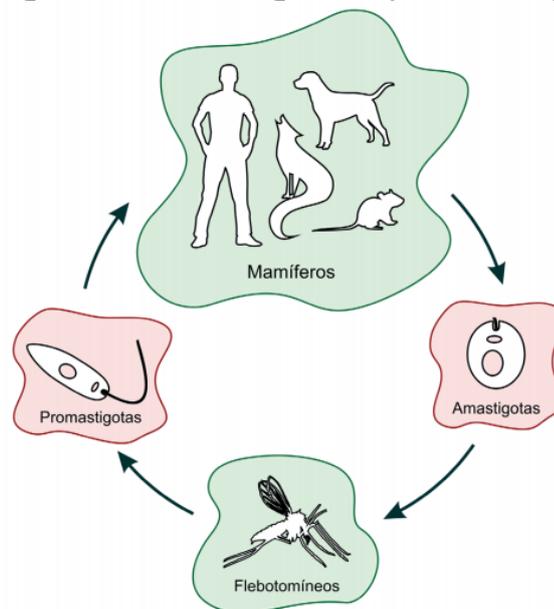
Fonte: Opas (2021).

As formas amastigotas do parasito são ingeridas pela fêmea do flebotomíneo durante o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, no interior do tubo digestivo do inseto. As amastigotas transformam-se em promastigotas. Entre quatro e sete dias, elas escapam da matriz peritrófica, deslocando-se para as porções anteriores do intestino. Nesse local, iniciam um

processo de diferenciação e multiplicação, e nele é possível observar a presença das formas promastigotas metacíclicas infectantes migrando para a probóscide, que serão inoculadas no hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo (SACKS; KAMHAWI, 2001). No mamífero, o parasito invade células do sistema fagocítico mononuclear, e o patógeno é internalizado em um vacúolo parasitóforo, no interior do qual ocorre a diferenciação para a forma amastigota, que se divide em fissões binárias sucessivas até o rompimento da membrana celular, liberando amastigotas que serão fagocitadas por novas células. Uma nova fêmea do inseto vetor, ao realizar seu repasto sanguíneo, ingere amastigotas que reiniciarão o ciclo (MARCONDES, 2009, 2011) (Figura 4).

Aproximadamente 70 espécies de mamíferos, incluindo os seres humanos, são considerados hospedeiros vertebrados de *Leishmania* em todo o mundo, sendo alguns deles reservatórios do parasito na natureza (NEVES *et al.*, 2016).

Figura 4 – Esquema geral do ciclo biológico dos parasitos do gênero *Leishmania*.



Fonte: Heloisa Diniz/IOC/Fiocruz (2014).

Certamente, *Leishmania* é o gênero de protozoário que parasita humanos e que compreende o maior número de espécies patogênicas (PACHECO; CARVALHO-COSTA, 2014). Atualmente, o gênero é subdividido em três subgêneros: *Sauroleishmania*, *Viannia* e *Leishmania*. O primeiro engloba apenas parasitos de répteis, e os outros dois parasitam mamíferos (LAINSON; SHAW, 1987). A diferenciação entre os subgêneros *Viannia* e *Leishmania* foi definida com base nos sítios de desenvolvimento dos parasitos no sistema

digestivo dos flebotomíneos, assim como no desenvolvimento do agente etiológico em meio de cultura e em *hamsters*. Quanto à distribuição geográfica, de modo geral, o subgênero *Leishmania* é encontrado tanto no Velho Mundo quanto no Novo Mundo. Entretanto, o subgênero *Viannia* está restrito ao Novo Mundo (LAINSON; SHAW, 1987, 2010).

A relação das formas clínicas das leishmanioses e espécies de *Leishmania* envolvidas na doença vem definindo o perfil da enfermidade em todo o mundo. Nas Américas, a Leishmaniose Visceral (LV) é ocasionada pelo protozoário da espécie *Leishmania infantum*, cujo principal vetor é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (OPAS, 2021). Destaca-se que *L. chagasi* e *L. infantum* são consideradas sinônimas atualmente.

Na forma tegumentar da doença, pelo menos 16 diferentes espécies de *Leishmania* foram identificadas como agentes causais da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), em ambos os subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. No Brasil, as espécies causadoras de LTA mais comuns são: *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis* (BRASIL, 2017). Quanto aos possíveis vetores primários dos agentes etiológicos da LTA, Rangel *et al* (2018) consideram: *Bichromomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia gomezi*, *Nyssomyia intermedia*, *Ny. whitmani*, *Ny. neivai*, *Ny. umbratilis*, *Migonemyia migonei*, *Pintomyia fischeri*, *Psychodopygus wellcomei*, entre outros com atividade secundária na transmissão dos parasitos.

1.3 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS POR *LEISHMANIA*

A identificação adequada das espécies de flebotomíneos em áreas de ocorrência das leishmanioses, assim como a estimativa das taxas de infecção natural por espécies do gênero *Leishmania*, ajudam no entendimento da epidemiologia da enfermidade e na adoção de medidas profiláticas e de controle das leishmanioses (BRITTO; PEREIRA, 2014).

A dissecação do intestino de fêmeas de flebotomíneos, com exame subsequente ao microscópio entre lâmina e lamínula, é o método tradicional para a identificação das formas de *Leishmania* no inseto vetor. Ainda assim, a positividade das amostras deve passar por teste confirmatório, com o isolamento do parasito em meio de cultura e/ou por meio de inoculação em animais de laboratório. Faz-se necessário realizar o teste confirmatório, pois os flebotomíneos também são hospedeiros de protozoários dos gêneros *Trypanosoma* e *Endotrypanum*; neste último, a forma promastigota do parasito é indiscriminável de *Leishmania*. Essa técnica é frequentemente suscetível à contaminação, além de ser um

procedimento laborioso, em virtude do tamanho diminuto dos flebotomíneos e da grande quantidade de insetos para análise, aliado à baixa sensibilidade (BRITTO; PEREIRA, 2014).

Estudos têm demonstrado que a reação em cadeia da polimerase, que em inglês significa *polymerase chain reaction* (PCR), é mais eficaz na identificação de *Leishmania* que o método clássico. No entanto, quando a técnica é utilizada para triagem em massa de flebotomíneos individuais, não se torna prática. Diante disso, as pesquisas são realizadas por meio da aplicação da PCR em *pools* de insetos, o que torna o método acessível e hábil. Dados de infecção experimental indicam que a reação pode detectar um único inseto infectado em dez (PITA-PEREIRA *et al.*, 2005; 2008). Além disso, menos de um fentograma (fg) de DNA de *Leishmania* pode ser detectado pela reação de PCR, mesmo na presença de excesso de DNA de flebotomíneo (BRUIJN; BARKER, 1992). A tecnologia representa um método alternativo, mais rápido e sensível, para a detecção e identificação de *Leishmania* spp. em estudos de campo, com a finalidade de avaliar a competência vetorial de insetos flebotomíneos. Quando a PCR é utilizada com posterior reação de sequenciamento para a caracterização molecular da espécie de *Leishmania*, a identificação é otimizada, chegando à 100% de confiança na detecção da espécie do parasito (BRITTO; PEREIRA, 2014).

Vários marcadores moleculares são utilizados nas reações de PCR para a detecção de *Leishmania* com êxito, incluindo os minicírculos do DNA do cinetoplasto (kDNA), genes da subunidade menor do ribossomo (SSU rDNA), regiões espaçadoras transcritas (ITS), entre outros. Destaca-se o Espaçador Interno Transcrito 1 (ITS1) do DNA ribossômico (rDNA), que apresenta cerca de 20 a 200 cópias idênticas no genoma de *Leishmania*, tornando-o um bom alvo para analisar pequenas quantidades dos parasitos. Além disso, a região do ITS1 apresenta alto grau de variação, mesmo entre espécies intimamente relacionadas, sendo ideal seu uso para a identificação de espécies do gênero *Leishmania* (TOLOUEI *et al.*, 2014) (Figura 5).

Figura 5 – Esquema da região ITS1 do rDNA de *leishmania*, demonstrando os iniciadores LITSR e L5.8S.



Fonte: Adaptado pela autora de Tai *et al.* (2000) e Schönian *et al.* (2003).

Odiwuor *et al.* (2010) alertaram que, para a utilização do marcador molecular ITS1, dependendo da área geográfica, região e tipo de amostra clínica analisada, deve-se ter atenção

quanto à potencial reatividade cruzada com outras espécies que não *Leishmania*. Nesse contexto, a PCR, seguida da reação de sequenciamento, se torna o padrão ouro.

Segundo Pacheco e Carvalho-Costa (2014), sequências genômicas de ITS1, depositadas no GenBank, foram analisadas e exibiram com eficiência a separação dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, bem como a separação das espécies dentro dos complexos existentes.

1.4 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são consideradas um grande problema de saúde pública e constituem um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica, dependendo da interação de fatores relacionados ao parasito, ao vetor e ao hospedeiro. Estão entre as doenças que mais impactam a saúde humana, sendo consideradas doenças endêmicas emergentes, com uma clara expansão territorial. Fazem parte da lista de doenças do Sistema de Informação de Agravos de Notificações (Sinan), do Ministério da Saúde (MS), com registro em todas as regiões brasileiras. O Brasil é o país com maior prevalência dessas doenças nas Américas (BRASIL, 2017).

As leishmanioses são ocasionadas por diversas espécies de *Leishmania*, que geram no ser humano infectado um conjunto de síndromes clínicas que podem afetar a pele, as mucosas e as vísceras (OPAS, 2021).

1.4.1 Leishmaniose Tegumentar Americana

A LTA é a forma mais frequente na região das Américas e é dividida em três formas clínicas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucosa (LM). As duas primeiras têm um tratamento mais difícil, com frequentes recaídas. Não obstante, a LM é a forma mais grave entre as LTA, pois causa mutilações e incapacidades importantes caso não seja diagnosticada e tratada precocemente (OPAS, 2021) (Figura 6).

No Brasil, a LTA ocorre em todas as unidades federadas, sendo uma das doenças dermatológicas de maior magnitude. Além disso, pode causar deformidades graves, até mesmo ao sistema psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, é considerada uma doença ocupacional (BRASIL, 2017).

Figura 6 – **A** – Lesão clássica da LTA; **B** – Forma difusa; **C** – Forma mucosa.



Fonte: Imagens A e B: OPAS (2021); Imagem C: Arquivo pessoal da autora (2019).

Entre os anos de 2003 e 2018, foram registrados mais de 300.000 casos de LTA no Brasil, com média de 21.158 casos por ano (BRASIL, 2019). Em Santa Catarina (SC), há registro da doença em 63 municípios. Entre 2007 e 2020, foram notificados 386 casos da enfermidade; destes, 239 foram autóctones (DIVE, 2021).

1.4.2 Leishmaniose Visceral

A LV é uma doença infecciosa e sistêmica, que acomete preferencialmente órgãos e vísceras do sistema linfohematopoiético, como baço, fígado, gânglios e medula óssea, sendo capaz de afetar outros órgãos, como rim e pulmão (Figura 7). É uma infecção com disseminação mundial, sendo a forma mais grave da doença, visto que pode levar à morte em até 90% dos casos não tratados (BRASIL, 2019; CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014; OPAS, 2021).

Figura 7 – Caso de Leishmaniose Visceral.

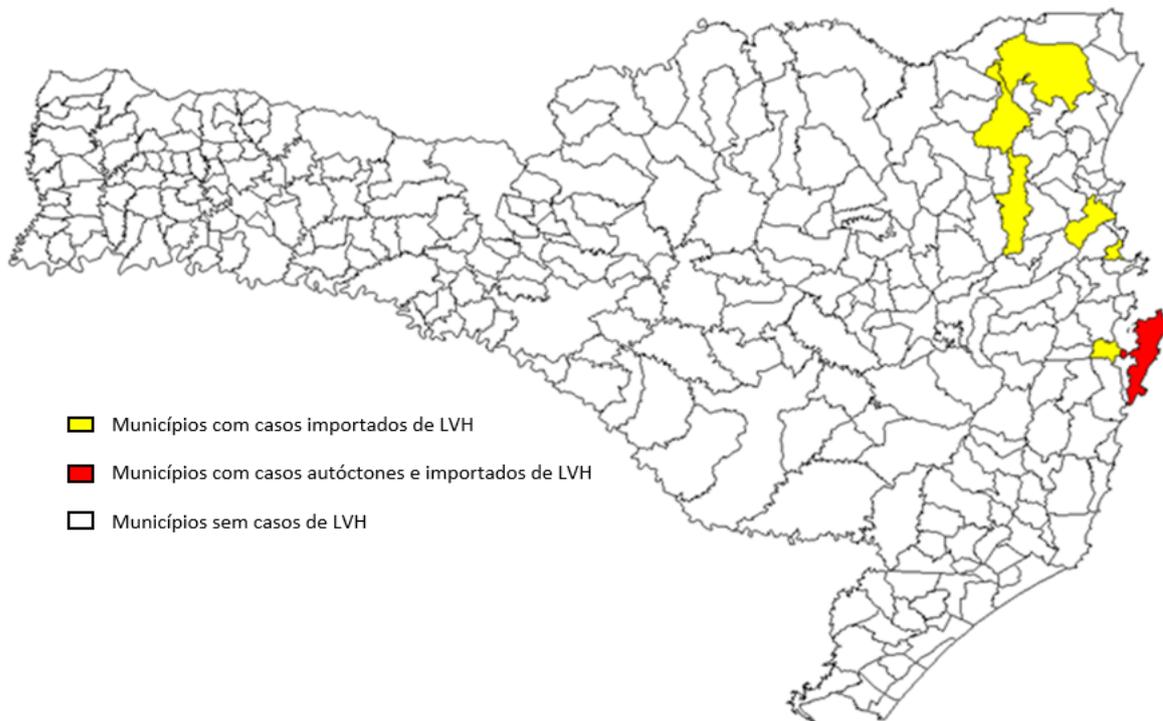


Fonte: Opas (2021).

No Brasil, no período compreendido entre os anos de 2003 e 2018, foram confirmados mais de 51 mil casos humanos de LV, com incidência média de 1,7 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2019).

No Estado de SC, entre os anos de 2010 e 2020, houve notificação de 15 casos de LV. No entanto, quatro dos casos registrados foram determinados como autóctones, todos eles no município de Florianópolis, sendo que, destes, três tiveram notificação no ano de 2017, e um, em 2020 (DIVE, 2021) (Figura 8).

Figura 8 – Registro dos casos confirmados de Leishmaniose Visceral Humana no Estado de SC, entre os anos de 2010 e 2020.



Fonte: Dive (2021).

1.4.3 Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

No ciclo de transmissão das leishmanioses, o cão (*Canis familiaris*) apresenta papel central entre os animais domésticos envolvidos com protozoários do gênero *Leishmania*, em razão de sua proximidade com o ser humano, sendo o principal reservatório (BRASIL, 2019). O referido animal atua como elo no ciclo de transmissão, agindo como mantenedor e dispersor de vários agentes etiológicos causadores das leishmanioses em áreas urbanas (FIGUEIREDO; MADEIRA, 2014).

Os cães têm sido encontrados naturalmente infectados tanto por espécies de *leishmanias* dermatrópicas quanto viscerotrópicas. No entanto, a gama de patógenos que podem infectar esses animais pode ser maior, uma vez que a etiologia nem sempre é confirmada. Sua importância epidemiológica está relacionada principalmente à transmissão das espécies causadoras da LV, que são foco das ações de controle (FIGUEIREDO; MADEIRA, 2014).

A LVC é mais predominante que a humana e precede a endemia. A enfermidade nos cães é de evolução lenta e frequentemente assintomática, levando a um acentuado emagrecimento, perda de pelos e apatia, embora possa haver um alto grau de parasitismo na pele sã e nas vísceras (Figura 9). Sintomas oftalmológicos em cães com leishmaniose não são incomuns; a ocorrência relatada na literatura varia de 16% a 80% (MARZOCHI *et al.*, 1985).

Além disso, Molina *et al.* (1994), em estudo sobre a infectividade de flebotômios, demonstraram que até mesmo cães assintomáticos, infectados por *L. infantum*, são fontes de parasitos para o inseto vetor, fator esse que sobrepuja a importância epidemiológica desses animais no ciclo de transmissão da LV.

Figura 9 – Cão com LV, lesão provocada por *L. infantum*.

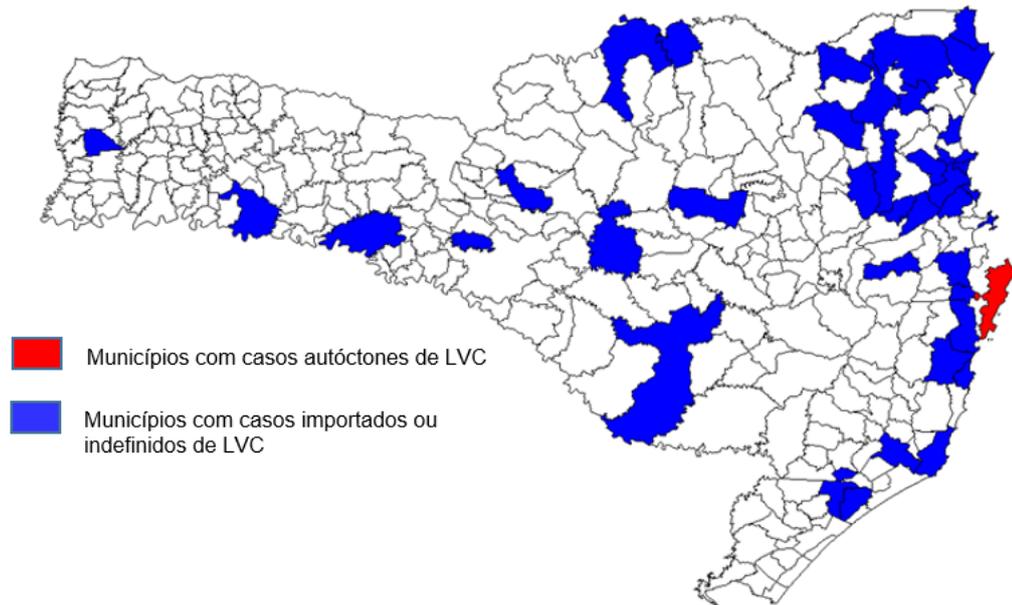


Fonte: Arquivo pessoal da autora (2019).

Na série histórica do Estado de SC, no período de janeiro de 2010 a maio de 2021, foram analisados 21.200 cães. Do total de animais testados, 904 foram positivos para LVC,

sendo 782 autóctones. Os demais casos foram considerados importados ou sem possibilidade de determinação do local provável de infecção (Figura 10).

Figura 10 - Registro dos casos confirmados de Leishmaniose Visceral Canina no Estado de SC no período de janeiro de 2010 a maio de 2021.



Fonte: DIVE (2021).

Quarenta e três municípios catarinenses apresentaram casos da doença em cães, porém os autóctones estão localizados apenas no município de Florianópolis (DIVE, 2021).

Salienta-se que a LVC em SC está em expansão e que os casos de infecção autóctone em humanos estão localizados nos bairros do município de Florianópolis com focos da doença em cães.

1.4.3.1 Diagnóstico da Infecção por *Leishmania* em cães

Para a identificação de fatores de risco e controle epidemiológico das leishmanioses, além da realização de vigilância das espécies de *Leishmania* e flebotomíneos predominantes em áreas com ocorrência da doença, há a necessidade de detecção dos reservatórios (BRITTO; PEREIRA, 2014). Nesse sentido, é fundamental a realização de testes diagnósticos sensíveis, confiáveis e não invasivos, principalmente nos inquéritos realizados com cães de áreas endêmicas, visto que o referido animal é a principal fonte de infecção em área urbana (BRASIL, 2014).

No Brasil, os testes sorológicos são indicados pelo MS para o diagnóstico laboratorial de cães suspeitos de LVC em inquéritos. Atualmente, é utilizado o teste rápido qualitativo *Dual Path Plataform* (TR – DPP®), desenvolvido pela Biomanguinhos/Fiocruz (BRASIL, 2011). A tecnologia consiste em imunoenensaio cromatográfico compreendendo antígenos recombinantes K26 e K39, específicos para *L. infantum*. Para a execução do teste, podem ser utilizados sangue total, plasma ou soro como material biológico (COURA-VITAL *et al.*, 2014). O teste imunocromatográfico DPP® é empregado como método para a triagem inicial. Nos animais positivos, é realizado um segundo exame confirmatório, empregando o método Elisa, que reage na presença de anticorpos específicos para *Leishmania* no sangue do cão, assim como no DPP® (DIVE, 2020).

Travi *et al.* (2018) relatam que há desafios que devem ser superados no uso de testes sorológicos para o diagnóstico de LVC, que são: a incapacidade de diferenciar cães clinicamente saudáveis, porém infectados, e vacinados, uma vez que estes últimos também apresentam anticorpos para *Leishmania*. Nesse contexto, métodos moleculares, como a PCR, seriam uma das alternativas, pois são capazes de detectar pequenas quantidades de DNA do parasito e não, nesse caso, anticorpos produzidos na presença de *Leishmania*, como nos métodos citados anteriormente.

Além disso, Barbosa *et al.* (2012) mencionam que o uso de método não invasivo para a coleta de material biológico, como o *swab* conjuntival, é rápido e de fácil execução. A técnica, ainda, minimiza a relutância dos proprietários dos cães para o monitoramento periódico de seus animais.

1.4.4 Leishmanioses no município de Tubarão/SC

O município de Tubarão está localizado no Sul do Estado de SC e, até o momento, não apresenta casos autóctones das leishmanioses em humanos.

Entretanto, em dezembro de 2018 foram identificados dez cães positivos para LVC no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) municipal. Esses animais foram diagnosticados com a doença e eutanasiados sem notificação prévia, tampouco testes confirmatórios por parte do Estado. No momento da investigação realizada pela, Diretoria de Vigilância Epidemiológica de SC (Dive), o CCZ não apresentava histórico dos animais eutanasiados, com suas respectivas origens e prontuários, não sendo possível comprovar a procedência dos casos, bem como o local provável de infecção.

Na oportunidade, todos os cães abrigados na instituição foram testados novamente para LVC. Dessa vez, as análises foram realizadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública de SC (Lacen), e apenas um cão testou positivo.

Diante do ocorrido, restaram questionamentos importantes: Quais as espécies que compõem a fauna flebotomínica do CCZ de Tubarão? Os flebotomíneos estão infectados por *Leishmania* spp.? Os casos de LVC da instituição são autóctones? Ainda restam animais infectados?

1.5 JUSTIFICATIVA

Até a década de 2010, o Sul do país era considerado uma região sem casos autóctones de LV. O estado de Santa Catarina foi a última unidade federativa do país a apresentar endemicidade da doença, que acometeu, inicialmente, cães e, posteriormente, humanos. Observa-se que os casos de LV estão atrelados ao crescente aumento da LVC, que está alastrando-se gradativamente pelo Estado.

No Sul catarinense, os municípios de Criciúma e Içara têm casos importados de LVC. No município de Tubarão, após investigações em virtude da ocorrência de cães positivos para a doença, não foi possível determinar a autoctonia dos casos.

No cenário estadual, há poucos estudos no território quanto à descrição da fauna flebotomínica; a maioria deles está concentrada no município de Florianópolis, fato que dificulta o esclarecimento quanto aos potenciais vetores da doença no Estado, visto que o *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor do protozoário causador da LV, não foi encontrado até o momento em Santa Catarina.

Nesse âmbito, faz-se necessário conhecer a fauna de flebotomíneos do município de Tubarão, bem como identificar se estes insetos estão infectados por *Leishmania* spp., de modo a estimar o risco de transmissão da Leishmaniose para os moradores do município. A identificação das espécies, tanto de flebotomíneos quanto de *Leishmania*, é de suma importância para que sejam desencadeadas ações de acompanhamento, controle e prevenção das leishmanioses em Tubarão. Além disso, é fundamental traçar um perfil epidemiológico da região, a fim de prevenir que casos humanos da doença aconteçam.

1.6 OBJETIVOS

Nas seções abaixo estão descritos o objetivo geral e os objetivos específicos desta dissertação.

1.6.1 Objetivo Geral

Conhecer a fauna de flebotomíneos e avaliar a infecção natural por *Leishmania* spp. nos insetos coletados no CCZ do município de Tubarão/SC, Brasil.

1.6.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar as espécies de Flebotomíneos presentes no CCZ de Tubarão;
- b) Detectar a infecção natural por *Leishmania* spp. nas fêmeas dos insetos coletados;
- c) Efetuar identificação molecular das espécies de flebotomíneos naturalmente infectadas por *leishmania* spp.;
- d) Realizar diagnóstico para *Leishmania* spp. nos cães do CCZ por meio de técnica não invasiva;
- e) Verificar as espécies de *Leishmania* encontradas nos insetos vetores e cães;
- f) Correlacionar a influência dos fatores climáticos com a abundância de flebotomíneos.

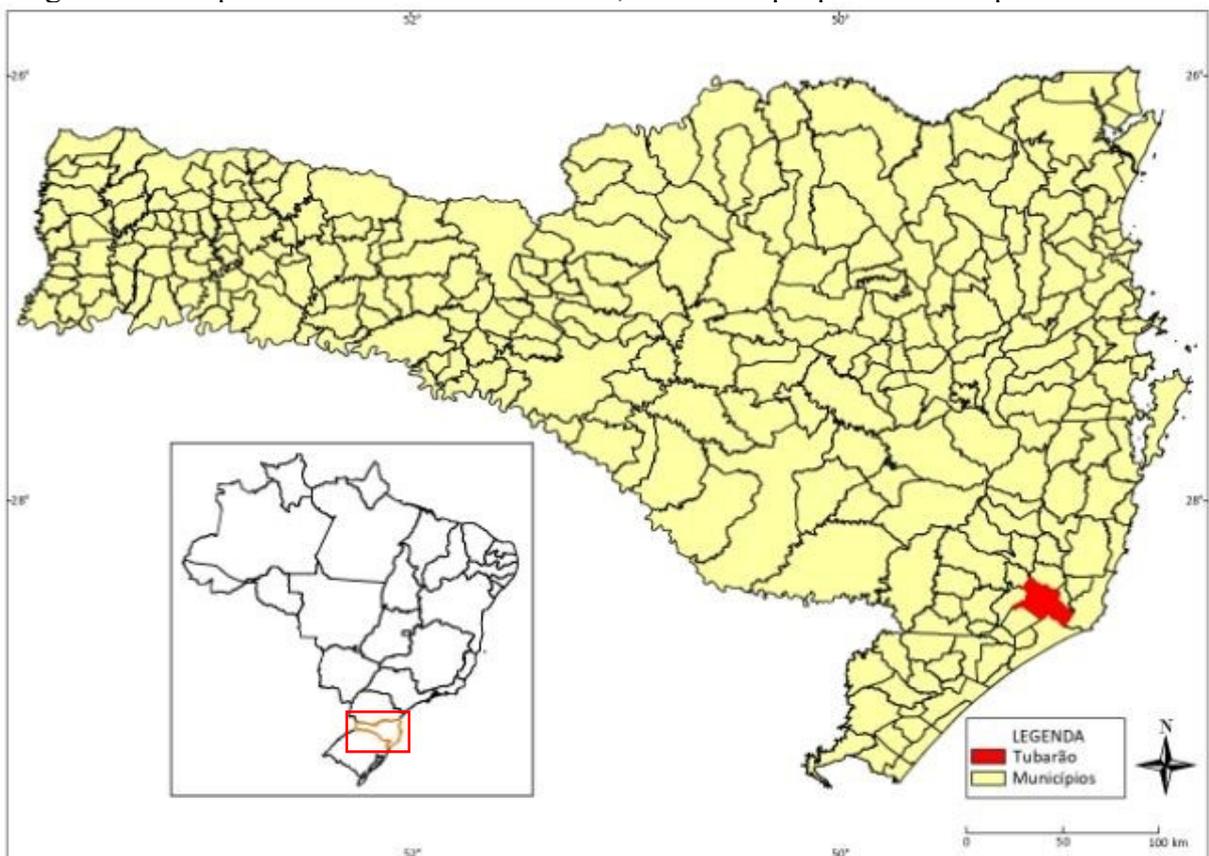
2 METODOLOGIA

Serão apresentados, nesta seção, todos os procedimentos metodológicos realizados para a execução desta pesquisa.

2.1 ÁREA DE ESTUDO – CCZ DO MUNICÍPIO DE TUBARÃO/SC

O município de Tubarão ($28^{\circ}28'18.5''\text{S } 49^{\circ}00'53.5''$) está localizado na região Sul do Estado de SC – Brasil, com uma área territorial de 301.484 km² (Figura 11). Tubarão limita-se ao Norte com os municípios de Gravatá e Capivari de Baixo; ao Sul, com Treze de Maio e Jaguaruna; a Leste, com Laguna; e a Oeste, com Pedras Grandes e São Ludgero. A população estimada é de 105.686 habitantes (IBGE, 2019).

Figura 11 – Mapa do Brasil e do Estado de SC, com destaque para o município de Tubarão.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Com relação aos aspectos físicos, Tubarão possui altitude média de nove metros acima do nível do mar; o ponto culminante é o Morro Martinele, com 540 metros. O clima é

subtropical, com média máxima de 23,6°C e média mínima de 15,5°C. A precipitação média anual é de 1.493 centímetros cúbicos, sendo abril e maio os meses de menor precipitação. A umidade relativa do ar apresenta uma média anual de 83,59 pontos. O índice é elevado em virtude da presença de lagoas e do mar, havendo influências devido à temperatura e à altitude. No verão, quando o quociente barométrico é mais acentuado, os ventos sopram com mais constância e regularidade. O outono é a estação com menos vento, e isso se explica pelo equilíbrio entre valores barométricos no Atlântico e no continente, tendo como consequência a diminuição das massas de ar. No inverno, devido à predominância de outra área de alta pressão no interior do continente, o componente de ventos do oeste adquire importância, podendo ultrapassar a soma de velocidade dos ventos de leste (TUBARÃO, 2015).

A vegetação natural pertence ao bioma Mata Atlântica – formação Floresta Ombrófila Densa. Porém, a cobertura vegetal na atualidade encontra-se descaracterizada, sem a presença da vegetação original, com o predomínio da fisionomia herbácea sob pequenos fragmentos de vegetação arbustiva e pequenas áreas com espécies exóticas de reflorestamento de *Melia azedarach* e *Eucalyptus* spp. (TUBARÃO, 2017).

O CCZ do município de Tubarão localiza-se no bairro Monte Castelo, margem direita do município (Figura 12).

Figura 12 – Imagem de satélite do CCZ do município de Tubarão SC.



Fonte: Adaptado do Google Earth Pro pela autora (2021).

O local tem capacidade para abrigar cerca de 60 cães. Além disso, encontra-se em uma área pouco urbanizada, situado num fragmento de vegetação natural, com área medindo cerca de 86.000m², rodeado por plantações de arroz. O fragmento de mata adjacente ao CCZ fica a aproximadamente 500 metros.

2.2 CAPTURA E TRIAGEM DOS FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS

As coletas tiveram início em março de 2019 e finalizaram em junho do ano de 2020. Para o presente estudo, foram definidos quatro pontos de coleta dentro do CCZ municipal. Realizou-se a captura dos insetos com armadilhas luminosas do tipo CDC, alimentadas por uma bateria de 12 volts, por um período mínimo de 12 horas, uma vez ao mês. Ao final de todas as coletas, obteve-se um total de 192 horas (no mínimo) de esforço amostral em cada armadilha. Elas foram instaladas sempre ao final da tarde, na segunda quinzena de cada mês, e retiradas no início da manhã seguinte.

As armadilhas foram distribuídas no local da seguinte forma: armadilha do ponto 1 – instalada no interior da baia dos cães, em cima do local onde os animais dormiam, em área bem abrigada contra as intempéries; armadilha referente ao ponto 2 – localizada dentro do recinto dos cães, porém em local exposto às adversidades climáticas; armadilha do ponto 3 – situada no meio da mata; e, por fim, a armadilha do ponto 4 – inserida ao lado da baia dos cães, no exterior, em local mais afastado (Figura 13).

No laboratório de entomologia da Regional de Saúde de Tubarão, após a retirada das armadilhas, os insetos foram mantidos a -20°C por quarenta minutos, para eutanásia. Após, realizou-se a triagem inicial dos flebotomíneos coletados, com a separação entre machos, fêmeas não ingurgitadas e fêmeas ingurgitadas, acondicionando-os em microcubos de polipropileno contendo álcool 70%. Em seguida, os espécimes foram armazenados a temperatura de -20°C até o momento do processamento.

Os flebotomíneos capturados nas coletas realizadas entre março de 2019 e junho de 2020 foram utilizados para a realização do levantamento da fauna flebotomínica, com a identificação morfológica das espécies encontradas, com exceção das fêmeas não ingurgitadas, coletadas entre março de 2019 e fevereiro de 2020, que foram utilizadas para a determinação da infecção natural por *Leishmania* spp., sendo realizada a identificação morfológica e molecular apenas das fêmeas positivas para tripanossomatídeos nas análises de biologia molecular.

Figura 13 – Localização das armadilhas nos pontos de coletas do CCZ do município de Tubarão, SC, sendo: **A** – Ponto 1, **B** – Ponto 2, **C** – Ponto 3 e **D** – Ponto 4.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2020).

2.3 PROTOCOLO UTILIZADO NA PREPARAÇÃO, MONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FLEBOTOMÍNEOS

Tanto os machos quanto as fêmeas alimentadas e não alimentadas positivas na análise molecular para *Leishmania* spp. mantiveram-se por 16 horas no hidróxido de potássio (KOH) a 10%, para a clarificação das estruturas. Com o intuito de neutralizar o processo anterior, os flebotomíneos foram submetidos a um banho de ácido acético ($H_3C-COOH$) a 10%, por cerca de 15 a 20 minutos. Logo em seguida, foi realizado o processo de desidratação seriada em álcool 70% – 10 minutos; álcool 90% – 10 minutos; álcool 95% – 10 minutos; e álcool 100% – 10

minutos. Posteriormente, colocou-se os espécimes no Eugenol por pelo menos 24 horas, para diafanização.

Finalizados os processos descritos acima, posicionou-se cada flebotomíneo em lâmina de vidro sob uma gota de Bálsamo do Canadá, com o auxílio de dois estiletos de pontas finas; em seguida, colocou-se uma lamínula sobre o exemplar (RODRIGUES, 2016). Os machos inteiros foram montados nas lâminas. No caso das fêmeas ingurgitadas, foi realizada a separação da cabeça do restante do corpo, para melhor visualização das estruturas com valor taxonômico. As lâminas prontas secaram em temperatura ambiente por duas semanas. Após essa etapa, adicionou-se esmalte incolor ao redor da lamínula, para sua impermeabilização, sendo as lâminas armazenadas em caixas próprias e depositadas no laboratório de entomologia da Gerência Regional de Saúde de Tubarão, para posterior consulta.

Nas fêmeas não ingurgitadas, dissecou-se a cabeça e os três últimos segmentos abdominais. As partes do tórax e abdômen foram armazenadas em álcool etílico 70%, mantendo-as a -20°C para análise de determinação da infecção natural por *Leishmania* spp., por meio de ensaio molecular. Além disso, foram montadas em lâmina, como já descrito anteriormente, a cabeça e os três últimos segmentos abdominais das fêmeas positivas para *Leishmania* spp., para a identificação taxonômica da espécie de flebotomíneo infectado.

Procedeu-se a identificação morfológica das espécies de flebotomíneos com a visualização dos insetos montados em lâminas, seguindo a chave taxonômica proposta por Galati (2003).

2.4 ANÁLISES MOLECULARES

Nas subdivisões deste item, serão explicados os protocolos utilizados nas análises moleculares para a detecção da infecção natural dos flebotomíneos por *leishmania* e para a identificação molecular da espécie de flebotomíneo infectado.

2.4.1 Detecção da infecção natural das fêmeas de flebotomíneos por *Leishmania* spp.

Analisa-se as fêmeas não ingurgitadas, coletadas no período de março de 2019 a fevereiro de 2020, para a detecção da infecção natural por *Leishmania* spp., conforme protocolos que seguem abaixo.

2.4.1.1 Extração de DNA das fêmeas não ingurgitadas

Extraíu-se individualmente o DNA das fêmeas de flebotomíneos não ingurgitadas (tórax e segmentos iniciais do abdômen) utilizando o protocolo de Jowett (1998), com alguns ajustes. Macerou-se cada inseto com 100µl de solução Tampão-SQ de extração (Tris-HCL 10 mM; EDTA 2 mM; Triton absoluto 0,2%), com o auxílio de ponteiros adaptadas. Após a maceração, adicionou-se 1µl de Proteinase K a 20mg/ml, homogeneizando a mistura e, posteriormente, incubando os insetos em banho seco a 37°C por uma hora. Depois desse período, elevou-se a temperatura para 100°C por dez minutos, para desnaturar a proteinase K. Após a extração, utilizou-se uma alíquota de 2µl do DNA extraído individualmente de cada inseto, para a confecção de “pools”, que continham material genético de dez indivíduos, no máximo, separados de acordo com a data e o ponto de coleta. Foram mantidos no freezer a -20°C, até o momento das análises, tanto os tubos com os “pools” quanto os produtos da extração individual dos DNA’s.

2.4.1.2 PCR dirigida à região ITS1 do DNA

Para a identificação da infecção natural por *Leishmania* spp., analisaram-se inicialmente os “pools” contendo DNA de, no máximo, dez espécimes, por meio da técnica de PCR, dirigida à região ITS1 do rDNA de *Leishmania* (TAI *et al.*, 2000). A referida região é conhecida por ser conservada, porém apresenta polimorfismos pontuais, possibilitando a identificação de várias espécies de tripanossomatídeos, incluindo as espécies de *Leishmania* que ocorrem no Brasil, amplificando a sequência de 300 a 350 pb (SCHÖNIAN *et al.*, 2003). As sequências de nucleotídeos dos iniciadores e as concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR estão especificados nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1 – Iniciadores utilizados nas reações de PCR para a detecção de *Leishmania* spp.

Nome do iniciador	Sequência de nucleotídeos
LITSR (<i>forward</i>)	5' CTGGATCATTTTCCGATG 3'
L5.8S (<i>reverse</i>)	5' TGATACCACTTATCGCACTT 3'

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Quadro 2 - Quantidades e concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR.

Reagente	Quantidade
Buffer 5x Green Go Taq®	4µl
MgCl solution 25mM	2µl
dNTP (10mM de cada nucleotídeo)	0,40µl
Iniciador <i>forward</i> (10µM)	1µl
Iniciador <i>reverse</i> (10µM)	1µl
Go Taq® DNA Polimerase (5u/µl)	0,1µl
H2O Milli-Q	10,5µl
DNA (~90ng/µl)	1µl
Volume final	20µl

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Em todas as reações, utilizaram-se controles negativos e positivos. Os controles negativos continham as mesmas concentrações dos reagentes, porém sem DNA, que foi substituído por H₂O Milli-Q. Nos controles positivos usou-se DNA de referência de *L. infantum* (Cepa MZQ03). Com a utilização dos referidos controles, foi possível assegurar a ausência de contaminação, bem como o funcionamento correto da reação de amplificação.

Foram realizadas as reações de PCR utilizando termociclador BioRad sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C, durante nove minutos, seguida de 40 repetições de desnaturação a 95°C, por 30 segundos, anelamento a 52°C, por 45 segundos, e extensão a 72°C, por 45 segundos. A extensão final ocorreu a 72°C, durante sete minutos.

Os produtos amplificados na PCR foram visualizados em gel de agarose a 1%, corados com *Safe dye* e analisados sob luz ultravioleta. Consideraram-se positivos os produtos da amplificação que continham banda de peso molecular entre 300 e 350 pb. Usou-se marcador de peso molecular de 100 pb.

As amostras individuais de DNA dos flebotomíneos, referentes aos “pools” positivos, foram analisadas por meio de uma segunda reação de PCR, nas mesmas condições detalhadas acima, com o intuito de identificar quantas e quais amostras foram positivas para *Leishmania* spp., a fim de se determinar a taxa de infecção natural.

2.4.1.3 Reação de sequenciamento

Realizou-se o sequenciamento, pelo método “Sanger”, dos *amplicons* positivos para *Leishmania* spp., provenientes das amostras individuais dos flebotomíneos testados na segunda PCR, para a identificação das espécies de *Leishmania*.

Os fragmentos amplificados foram purificados usando o kit QIAquick® PCR purification kit (Qiagen), conforme as instruções do fabricante. Em seguida, houve a quantificação do DNA das amostras utilizando um espectrofotômetro NanoDrop® 2000 da Thermo Scientific.

Para as reações de sequenciamento, preparou-se uma mistura contendo de 3 a 10 ng de DNA purificado; 2,5µl de cada iniciador (os mesmos utilizados na PCR) na concentração de 3,2 pmoles, em tubos separados (um com *forward* e outro com *reverse*); e H₂O Milli-Q, quando necessário, até atingir o volume final de 7,5µl em cada tubo. As amostras foram enviadas para a plataforma de sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro. As sequências resultantes foram analisadas e alinhadas com o programa Geneious Prime, para a obtenção das sequências consensos. Por fim, utilizou-se o algoritmo BLASTn para o alinhamento das consensos obtidas com as armazenadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

2.4.2 Identificação molecular das espécies de flebotomíneos

As fêmeas não ingurgitadas de flebotomíneos, positivas para *Leishmania* spp., além de serem identificadas por meio de suas estruturas morfológicas, conforme protocolo já descrito, passaram por identificação molecular. Foram utilizados, nas análises, os DNAs extraídos individualmente das fêmeas não alimentadas, de acordo com o item 2.4.1.1 deste trabalho.

2.4.2.1 PCR dirigida ao COI

Para a identificação molecular das espécies de flebotomíneos, das fêmeas não ingurgitadas positivas para *Leishmania* spp., analisou-se o DNA individual por meio da técnica de PCR, utilizando-se iniciadores que amplificam um fragmento de 658 pb a partir do gene mitocondrial COI, o DNA *barcode*, que identifica diversas espécies de flebotomíneos (PINTO

et al., 2015). Os iniciadores utilizados estão descritos no Quadro 3, e as concentrações dos reagentes usados nas reações de PCR foram as descritas no Quadro 2.

Quadro 3 – Iniciadores utilizados nas reações de PCR para a identificação molecular das espécies de flebotomíneos: gene mitocondrial, citocromo c oxidase subunidade I – COI.

Nome do iniciador	Sequência de nucleotídeos
LCO 1490 (<i>forward</i>)	5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3'
HCO 2198 (<i>reverse</i>)	5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Para a realização das reações de PCR, utilizou-se termociclador BioRad, sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C, por cinco minutos, seguida de 35 repetições de desnaturação a 94°C, por 30 segundos; anelamento a 54°C, por 60 segundos; e extensão a 72°C, por 90 segundos. A extensão final ocorreu a 72°C, durante sete minutos. Em todas as reações, foram utilizados controles negativos com água no lugar do DNA.

Os DNAs amplificados na PCR foram analisados em gel de agarose a 1%, corados com *Safe dye* e visualizados sob luz ultravioleta. Os produtos da amplificação foram purificados usando o kit QIAquick® PCR purification kit (Qiagen), de acordo com as orientações do fabricante. Após este processo, realizou-se a quantificação do DNA, conforme descrito anteriormente. As amostras de DNA purificadas foram sequenciadas e analisadas, como descrito no item 2.4.1.3 deste trabalho.

2.5 DADOS CLIMÁTICOS

Instalou-se no CCZ um termo-higrômetro – HOBO MX2301 –, que durante todo o período de estudo registrou a cada hora os dados referentes à temperatura e à umidade relativa do ar. Os registros referentes à precipitação pluviométrica foram obtidos mensalmente com a Agência Reguladora de Saneamento de Tubarão (AGR). Os dados eram provenientes da estação meteorológica, localizada no município de Tubarão.

Para verificar a influência das variáveis climáticas (temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica) em relação à quantidade de flebotomíneos capturados, foram utilizados os dados climáticos municipais e a abundância total dos insetos coletados (machos e fêmeas) durante o período de estudo.

2.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS CÃES DO CCZ PARA LEISHMANIA

Com o intuito de identificar a contaminação por *Leishmania* spp., todos os cães do CCZ foram testados com *swab* conjuntival, técnica não invasiva e rápida. Esse procedimento foi realizado porque lesões oftálmicas em cães infectados são comuns, inclusive nos assintomáticos (LIMA *et al.*, 2015).

2.6.1 Técnica de coleta com *swab* conjuntival

A coleta foi realizada com todos os cães abrigados no CCZ municipal, totalizando 47 animais. Os cães foram submetidos a exame clínico pela médica veterinária da instituição, a sra. Alda Maria Ribeiro Leitão – inscrita no Conselho Regional de Medicina Veterinária sob o nº 2132 –, sendo todos assintomáticos.

Durante o procedimento, os animais foram mantidos em pé, dentro dos próprios recintos, visto que são extremamente dóceis (Figura 14). Coletaram-se células da conjuntiva do olho direito de cada cão, sendo a pálpebra inferior levemente afastada, para que fosse friccionado o *swab* de algodão na conjuntiva ocular (Figura 15).

Apenas as pontas de algodão dos *swabs* foram transferidas para tubos estéreis contendo 200µl de solução Tampão-SQ de extração (Tris-HCL 10 mM; EDTA 2 mM; Triton absoluto 0,2%) e mantidas a -20°C até o momento da análise. Para a extração do DNA, o algodão foi macerado com o tampão-SQ e foi adicionado 2µl de Proteinase K (20mg/ml); a solução foi incubada a 37°C por uma hora em banho seco e, após esse período, a 100°C, por 20 minutos, para desnaturar a proteinase K. Realizou-se PCR individual das amostras para a identificação de *Leishmania* spp., conforme protocolo descrito anteriormente no tópico 2.4.1.2. Os produtos da PCR nos quais houve amplificação foram purificados e, em seguida, submetidos ao sequenciamento, como detalhado no item 2.4.1.3.

Figura 14 – Contenção dos cães para a coleta de *swab* conjuntival, no CCZ do município de Tubarão/SC.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2021).

Figura 15 – Coleta de células da conjuntiva ocular de cães com *swab* para diagnóstico de *Leishmania* spp.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2021).

A Secretaria Municipal de Saúde (SMS) de Tubarão, por meio do CCZ, órgão sob sua responsabilidade, foi comunicada quanto à positividade para *Leishmania* spp. nos animais analisados neste estudo. Eles foram testados com testes rápidos imunocromatográficos com o kit TR DPP® para Leishmaniose visceral canina (Bio Manguinhos), realizados pelo Lacen/SC, sob responsabilidade do município, não estando vinculados a este trabalho tais análises. Os resultados que serão aqui discutidos foram comparados com os obtidos pelo Lacen.

A responsável pelos animais do CCZ de Tubarão foi devidamente esclarecida quanto aos procedimentos de pesquisa deste trabalho e assinou um termo de consentimento, conforme Resolução Normativa n. 22, de 25 de junho de 2015.

O projeto referente a esta pesquisa foi analisado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Ceua), da Ufsc, e aprovado (Ceua nº 8644190221, ID 001784).

2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados foram transcritos em planilhas eletrônicas, e as análises descritivas, registradas no programa Microsoft Excel® (Office 2013). Os dados foram processados nessas planilhas para cálculo da taxa de infecção natural por *Leishmania* spp., índice de Shannon (índice de diversidade dos pontos amostrais) e produção de tabelas de frequência absoluta e relativa de flebotomíneos. Abaixo, as fórmulas utilizadas nos cálculos feitos no Excel®.

$$\text{Taxa de infecção natural} = \frac{N^{\circ} \text{ de fêmeas infectadas}}{N^{\circ} \text{ de fêmeas analisadas}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Índice de Shannon } (H') = - \sum_{i=1}^S P_i \cdot \ln P_i \quad (2)$$

Onde:

P_i = Abundância relativa de cada espécie, obtido por meio de $\frac{n_i}{N}$ n_i = nº total de indivíduos por espécies e N = número total de indivíduos de todas as espécies.

$\ln P_i$ = Logaritmo natural de P_i

S = Número total de espécies amostradas

$\sum_{i=1}^S P_i$ = Número total de todos os indivíduos

$$\text{Frequência relativa (fr)} = \frac{\text{Frequência absoluta (fi)}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de espécimes}} \times 100 \quad (3)$$

2.7.1 Variáveis de Estudo

As variáveis analisadas foram: abundância (quantidade de espécimes de flebotomíneos), riqueza (variedade de espécies de flebotomíneos), sexo (machos e fêmeas), pontos de coleta, meses, estações do ano, ano, temperatura, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar.

2.7.2 Análises comparativas das variáveis de estudo

As análises estatísticas e gráficos foram efetuados com o ambiente R 4.0.3 (R CORE TEAM, 2020).

2.7.2.1 Abundância de flebotomíneos

Para essa análise, utilizou-se o somatório de todos os espécimes capturados de flebotomíneos (machos, fêmeas não ingurgitadas, fêmeas ingurgitadas) entre março de 2019 e junho de 2020. A variável abundância total foi comparada com os meses, estações do ano, ano e pontos de coleta. Realizou-se o teste de análise de variância (Anova), e os resíduos gerados foram verificados por meio dos testes de Shapiro-Wilk, para a avaliação da normalidade das amostras, e do teste de Levene, cujo objetivo é determinar a homogeneidade das variâncias dos grupos. Constatou-se que os padrões de normalidade e homoscedasticidade não foram atendidos. Dessa forma, realizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, para identificar se há diferenças significativas entre os grupos comparados, seguido do teste de Dunn, para a comparação múltipla dos grupos e identificação das significâncias. As diferenças observadas com valor de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

2.7.2.2 Riqueza de espécies de flebotomíneos

As análises quanto à riqueza de espécies foram realizadas com os dados referentes à identificação taxonômica dos flebotomíneos triados em machos e fêmeas, coletados de março de 2019 a junho de 2020, excetuando-se as fêmeas não ingurgitadas capturadas de março de

2019 a fevereiro de 2020. Estas foram utilizadas exclusivamente para o estudo de infecção natural por *Leishmania* spp., e apenas as positivas para o protozoário tiveram identificação morfológica e molecular quanto à espécie de flebotomíneo.

Foram realizadas comparações entre as espécies de flebotomíneos e os meses, estações do ano, ano, pontos de coleta e entre espécies.

Todos os parâmetros verificados nas análises comparativas apresentaram ausência de normalidade e homoscedasticidade, identificados por meio do teste de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente, aplicados aos resíduos da Anova. Em virtude disso, foi realizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para a comparação múltipla dos grupos. Valores de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativos.

2.7.2.3 Machos x fêmeas

Para realizar a comparação entre machos e fêmeas, foi utilizado o somatório dos exemplares coletados, sendo: machos, fêmeas ingurgitadas e fêmeas não ingurgitadas, capturados de março de 2019 a junho de 2020.

A variável sexo foi confrontada com os meses, estações do ano, ano e pontos de coleta, e também pela comparação entre machos e fêmeas.

Os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias não foram atendidos, dessa forma foram realizados os mesmos testes não-paramétricos aplicados nos itens 2.7.2.1 e 2.7.2.2. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

2.7.2.4 Dados climáticos

Para analisar se os fatores climáticos exerceram influência na abundância de flebotomíneos coletados, efetuou-se a correlação entre as seguintes variáveis: temperatura, umidade relativa do ar, precipitação pluviométrica, abundância total, machos e fêmeas. Após a análise do coeficiente de correlação (r), as correlações consideradas positivas foram testadas estatisticamente com a aplicação do teste de correlação de Spearman. O referido teste foi escolhido em virtude da natureza não paramétrica dos dados; essa investigação mede a força e direção da associação entre duas variáveis. Foram consideradas significativas as correlações com $p < 0,05$, as quais foram representadas por gráficos.

Complementarmente, foram utilizados os resultados referentes às correlações de Spearman, às relações significativas entre os fatores climáticos, à abundância e ao sexo, bem como aplicado o modelo de regressão linear simples, cuja função é determinar a amplitude da variação em uma variável, em função da variação de outra. As regressões foram representadas por gráficos, e os valores de $p < 0,05$, considerados significativos.

Análises multivariadas foram realizadas, compreendendo uma pesquisa exploratória por meio da análise dos componentes principais (PCA), distância de similaridade e análise de agrupamento do *Cluster*, com base na distância euclidiana. Tais análises foram realizadas com o propósito de verificar possíveis padrões na abundância de flebotomíneos relacionadas a associações com as variáveis climáticas, estações do ano e coletas. Os resultados foram plotados em gráficos.

Todos os cálculos desse item foram efetuados com o pacote FactoMiner, versão 1.34 (LE *et al.*, 2008) do ambiente R 4.0.3 (R CORE TEAM, 2020).

3 RESULTADOS

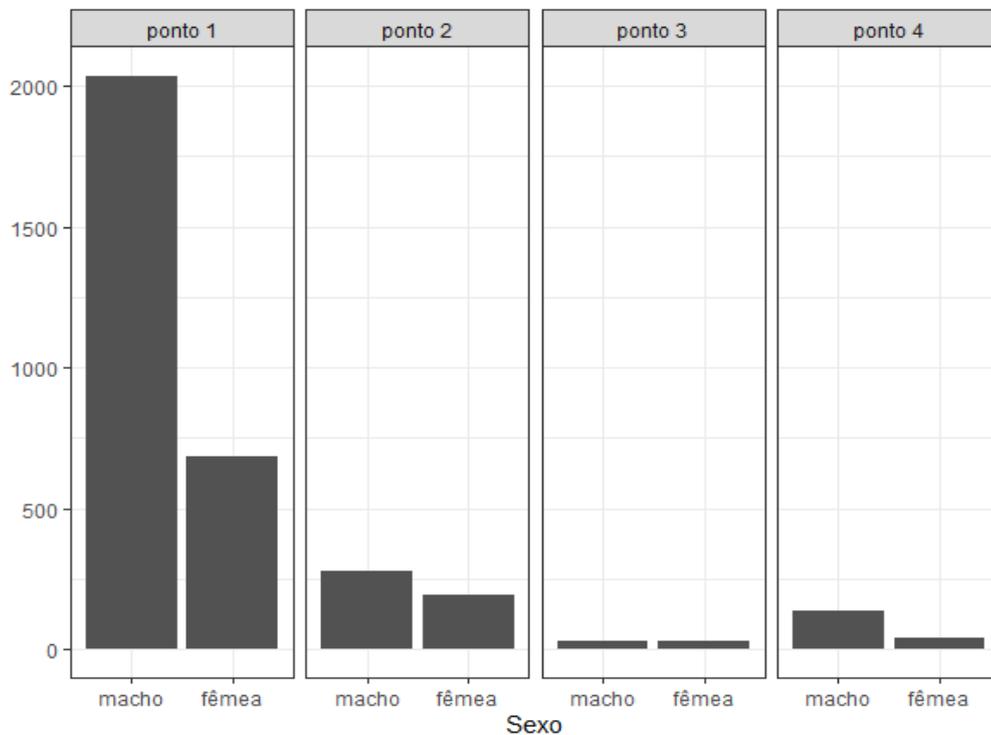
Nos itens desta seção, são apresentados os principais resultados encontrados nos estudos realizados durante esta pesquisa.

3.1 ABUNDÂNCIA DE FLEBOTOMÍNEOS

Foram realizadas 16 coletas de flebotomíneos em quatro pontos distintos no CCZ do município de Tubarão/SC, no período de março de 2019 a junho de 2020.

A quantidade de insetos capturados por ponto e sexo é apresentada no Gráfico 1. Um total de 3419 flebotomíneos foram coletados em 16 meses. O ponto 1 foi o mais abundante, tendo 2722 (79,6%) espécimes coletados, seguido do ponto 2, com 464 (13,6%); e do ponto 4, com 176 (5,1%). O ponto 3, localizado dentro da mata, foi o menos abundante, apresentando 57 (1,7%) indivíduos coletados.

Gráfico 1 – Abundância de flebotomíneos distribuídos por ponto amostral e sexo, coletados no CCZ de Tubarão/SC, no período de março de 2019 a junho de 2020.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Em todos os pontos amostrais, a quantidade de machos coletados foi superior à de fêmeas. O número total de machos foi de 2478; e o de fêmeas, 941, sendo a razão macho/fêmea igual a 2,6. Porém, não foi evidenciada diferença estatística na comparação entre os gêneros, com valor de $P = 0,32$.

O teste de Kruskal-Wallis (Tabela 1) foi estatisticamente significativo ao comparar os dados referentes à abundância de flebotomíneos e os pontos de coleta ($H=19,25$; $P=0,000$). O ponto de coleta 1 mostrou significância ao ser confrontado com os demais pontos amostrais, apresentando média de 170 psicodídeos coletados nos 16 meses pesquisados.

As comparações entre a abundância total de flebotomíneos e as estações do ano e ano não apresentaram resultados significativos nas análises estatísticas realizadas.

Tabela 1 – Estatística da abundância total de flebotomíneos distribuídos por pontos de coleta, insetos capturados no CCZ de Tubarão/SC, no período de março de 2019 a junho de 2020.

Pontos amostrais	N	Mínimo	Máximo	Média	Erro padrão
Ponto 1	16	0	1379	170	85,3
Ponto 2	16	0	81	29	7,05
Ponto 3	16	0	16	3,56	1,3
Ponto 4	16	0	59	11	4,57

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Observou-se que a distribuição dos insetos foi desigual nos pontos amostrais ao longo dos 16 meses de amostragem. A coleta referente ao mês de abril de 2019 representou 40,6% do total geral de flebotomíneos capturados, seguida pelo mês de março de 2019, com 13,8%, perfazendo, as duas coletas, 54,4% dos flebotomíneos coletados; e os 14 meses restantes foram responsáveis por 45,6% dos espécimes. Todavia, constatou-se que nos meses de março e abril de 2020 foram coletados 8,8% do total de flebotomíneos dos 16 meses, uma diminuição de 84% em comparação ao mesmo período do ano anterior (Tabela 2).

Tabela 2 – Frequência absoluta e relativa de flebotomíneos capturados por sexo, mês, ano e razão sexual, no CCZ do município de Tubarão/SC, no período de março de 2019 a junho de 2020.

Mês/Ano	♂ (N)	♂ (%)	♀ (N)	♀ (%)	Total	%	Razão
mar/19	355	75,0	118	25,0	473	13,8	3,0
abr/19	1095	78,9	293	21,1	1388	40,6	3,7
mai/19	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0,0
jun/19	110	61,8	68	38,2	178	5,2	1,6

Continua

Mês/Ano	♂ (N)	♂ (%)	♀ (N)	♀ (%)	Total	%	conclusão
							Razão
jul/19	44	64,7	24	35,3	68	1,9	1,8
ago/19	1	100,0	0	0,0	1	0,03	
set/19	36	66,7	18	33,3	54	1,6	2,0
out/19	75	64,1	42	35,9	117	3,4	1,8
nov/19	210	69,5	92	30,5	302	8,8	2,3
dez/19	169	75,4	55	24,6	224	6,6	3,0
jan/20	36	53,7	31	46,3	67	2,0	1,2
fev/20	139	66,5	70	33,5	209	6,1	1,9
mar/20	116	64,4	64	35,6	180	5,3	1,8
abr/20	76	64,4	42	35,6	118	3,5	1,8
mai/20	8	61,5	5	38,5	13	0,4	1,6
jun/20	8	29,6	19	70,4	27	0,8	0,4
Total	2478	72,5	941	27,5	3419	100,0	

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Com a realização do teste de Kruskal-Wallis (Tabela 3), verificou-se uma diferença significativa na abundância de flebotomíneos entre os meses amostrados ($H=19,88$; $P=0,047$).

Tabela 3 – Análise estatística da abundância total de flebotomíneos distribuídos por mês, insetos capturados no CCZ de Tubarão/SC, no período de março de 2019 a junho de 2020.

Ano	Mês	N	Mínimo	Máximo	Média	Erro padrão
2019	março	4	0	465	118	116
	abril	4	0	1379	347	344
	maio	4	0	0	0	0
	junho	4	0	129	44,5	29,7
	julho	4	2	51	17	11,6
	agosto	4	0	1	0,25	0,25
	setembro	4	0	37	13,5	8,21
	outubro	4	0	57	29,2	12,5
	novembro	4	16	146	75,5	27,1
	dezembro	4	0	107	56	22
2020	janeiro	4	0	61	16,8	14,8
	fevereiro	4	0	140	52,2	32,5
	março	4	9	99	45	20,8
	abril	4	2	55	29,5	13
	maio	4	0	7	3,25	1,89
	junho	4	0	20	6,75	4,72

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Os meses com menos espécimes coletadas foram maio de 2019, com nenhum indivíduo capturado; e agosto de 2019, com média de 0,25 flebotomíneos, não sendo observada a diferença na comparação entre eles. No entanto, confrontando os referidos meses com abril

de 2019, que apresentou média de 347 flebotomíneos, e março, com média de 118 – meses com as maiores coletas do ano de 2019 e de todos os meses de estudo –, foi constatada uma diferença significativa entre: agosto e março (P=0,010) e abril e maio (P=0,019).

3.2 RIQUEZA DE FLEBOTOMÍNEOS

Os flebotomíneos capturados entre março de 2019 e junho de 2020 no CCZ do município de Tubarão foram utilizados para avaliar a riqueza da fauna flebotomínica, com exceção das fêmeas não alimentadas capturadas entre março de 2019 e fevereiro de 2020, que foram usadas nos estudos de infecção natural por *Leishmania* spp.

A quantidade de flebotomíneos coletados por espécie e sexo é apresentada na Tabela 4. Um total de 2910 espécimes de flebotomíneos foi identificado, pertencentes aos gêneros: *Brumptomyia* (FRANÇA & PARROT, 1921); *Evandromyia* (MANGABEIRA, 1941); *Migonemyia* (GALATI, 1995); *Nyssomyia* (BARRETO, 1962) e *Pintomyia* (COSTA LIMA, 1932). As espécies capturadas foram: *Evandromyia edwardsi* (MANGABEIRA, 1941); *Migonemyia migonei* (FRANÇA, 1920); *Nyssomyia neivai* (PINTO, 1926) e *Pintomyia fischeri* (PINTO, 1926). Os espécimes do gênero *Brumptomyia* não puderam ser identificados em nível de espécie por falta de estruturas morfológicas necessárias para sua identificação, pois estavam danificados, ficando, dessa forma, identificados em nível de gênero.

Tabela 4 – Riqueza de flebotomíneos por sexo, capturados no CCZ de Tubarão/SC, no período de março de 2019 a junho de 2020.

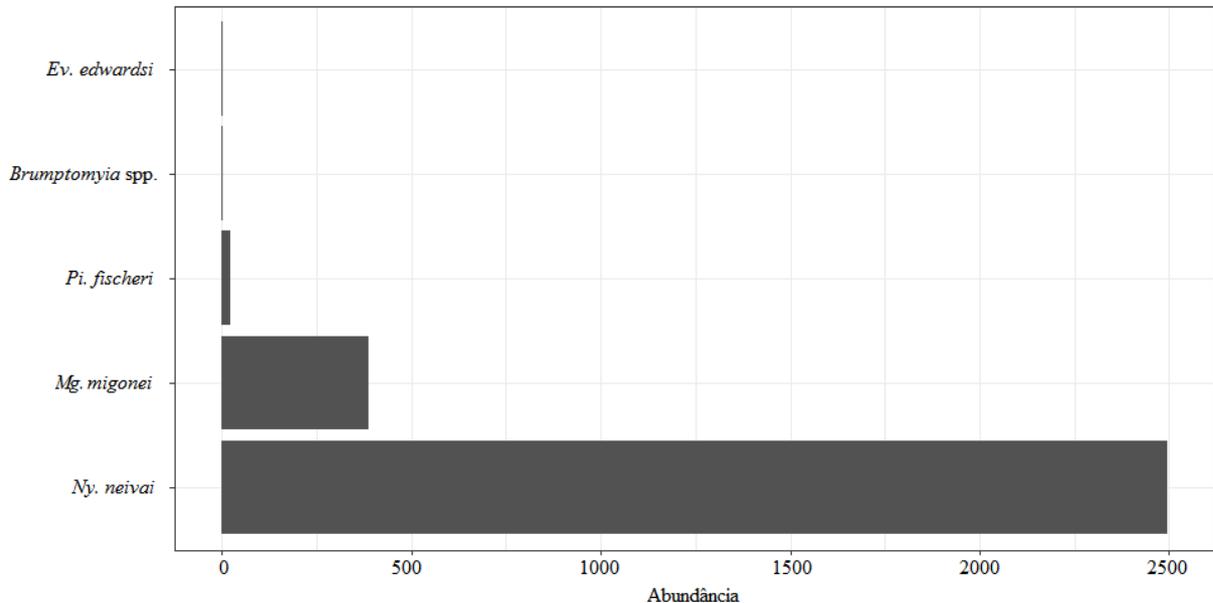
Espécies	♂ (N)	♂ (%)	♀ (N)	♀ (%)	Total	%
<i>Ny. neivai</i>	2209	88,50	286	11,50	2495	85,74
<i>Mg. migonei</i>	251	64,90	136	35,10	387	13,30
<i>Pi. fischeri</i>	15	62,50	9	37,50	24	0,82
<i>Brumptomyia spp.</i>	3	100,00	0	0,00	3	0,10
<i>Ev. edwardsi</i>	0	0,00	1	100,00	1	0,04
Total	2478	85,20	432	14,80	2910	100,00

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Conforme pode-se verificar tanto na Tabela 4 quanto no Gráfico 2, *Ny. neivai* foi a espécie mais abundante, com 2495 espécimes coletados, correspondendo a 85,74% do total de flebotomíneos. A segunda espécie de psicodídeo mais abundante foi *Mg. migonei*, com 387 indivíduos, representando 13,30%; seguida de *Pi. fischeri*, apresentando 24 exemplares, com abundância relativa de 0,82%; *Brumptomyia spp.*, com três indivíduos amostrados e taxa

amostral de 0,10%; e *Ev. edwardsi*, com um espécime coletado ao longo das 16 coletas, constituindo 0,04% dos flebotomíneos. Em todas as coletas, o número de machos capturados foi superior ao de fêmeas, exceto na espécie *Ev. edwardsi*, uma vez que o único exemplar capturado durante o estudo foi fêmea.

Gráfico 2 - Abundância de flebotomíneos por espécie, capturados no CCZ de Tubarão/SC, no período de março de 2019 a junho de 2020.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

A Tabela 5 mostra a distribuição das espécies capturadas de acordo com os meses de coleta, bem como a abundância relativa e absoluta delas.

O mês de novembro de 2019 apresentou maior riqueza de espécies capturadas, sendo encontradas quatro das cinco espécies identificadas durante o estudo. Coletou-se *Ny. neivai*, com maior frequência, nos meses de abril (39,24%), março (12,89%) e novembro (7,49%) de 2019, respectivamente, não sendo identificada nos meses de maio e agosto do mesmo ano. A espécie *Mg. migonei* foi encontrada em maiores taxas nos meses de fevereiro (2,03%) e março (3,23%) de 2020 e abril (2,10%) de 2019, não sendo localizada nos meses de maio e setembro desse mesmo ano. *Pi. fischeri* teve maior frequência no mês de abril (0,17%) de 2019 e março (0,17%) e abril (0,24%) do ano de 2020. Os espécimes do gênero *Brumptomyia* foram detectados nos meses de novembro e dezembro de 2019, correspondendo a 0,07% e 0,03%, respectivamente. Encontrou-se um único indivíduo referente à espécie *Ev. edwardsi* no mês de junho de 2020. Em todos os meses amostrados, o número de *Ny. neivai* foi superior ao das outras espécies, exceto no mês de março de 2020, cuja espécie mais abundante foi *Mg. migonei*.

Ao realizar o teste de Kruskal-Wallis, este permitiu verificar uma diferença significativa ($H= 108,41$; $P= 0$) entre as espécies coletadas, sendo que *Ny. neivai* apresentou significância estatística ao ser confrontada com todas as demais espécies identificadas no estudo, apresentando valor máximo de 1137 espécimes coletados e média de 39 (Tabela 6).

Tabela 5 – Distribuição mensal, frequência absoluta e relativa das espécies de flebotomíneos capturadas no CCZ de Tubarão/SC, no período de março de 2019 a junho de 2020.

Mês	<i>Ny. neivai</i>	%	<i>Mg. migonei</i>	%	<i>Pi. fischeri</i>	%	<i>Brumptomyia spp.</i>	%	<i>Ev. edwardsi</i>	%	Total	%
março/19	375	12,89	46	1,58	1	0,03	0	0,00	0	0,00	422	14,50
abril/19	1142	39,24	61	2,10	5	0,17	0	0,00	0	0,00	1208	41,51
maio/19	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
junho/19	121	4,16	13	0,45	0	0,00	0	0,00	0	0,00	134	4,60
julho/19	46	1,58	6	0,21	0	0,00	0	0,00	0	0,00	52	1,79
agosto/19	0	0,00	1	0,03	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,03
setembro/19	37	1,27	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	37	1,27
outubro/19	70	2,41	8	0,27	1	0,03	0	0,00	0	0,00	79	2,71
novembro/19	218	7,49	8	0,27	4	0,14	2	0,07	0	0,00	232	7,97
dezembro/19	127	4,36	50	1,72	0	0,00	1	0,03	0	0,00	178	6,12
janeiro/20	26	0,89	21	0,72	0	0,00	0	0,00	0	0,00	47	1,62
fevereiro/20	123	4,23	59	2,03	0	0,00	0	0,00	0	0,00	182	6,25
março/20	81	2,78	94	3,23	5	0,17	0	0,00	0	0,00	180	6,19
abril/20	96	3,30	15	0,52	7	0,24	0	0,00	0	0,00	118	4,05
maio/20	11	0,38	1	0,03	1	0,03	0	0,00	0	0,00	13	0,45
junho/20	22	0,76	4	0,14	0	0,00	0	0,00	1	0,03	27	0,93
Total	2495	85,74	387	13,30	24	0,82	3	0,10	1	0,04	2910	100,00

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

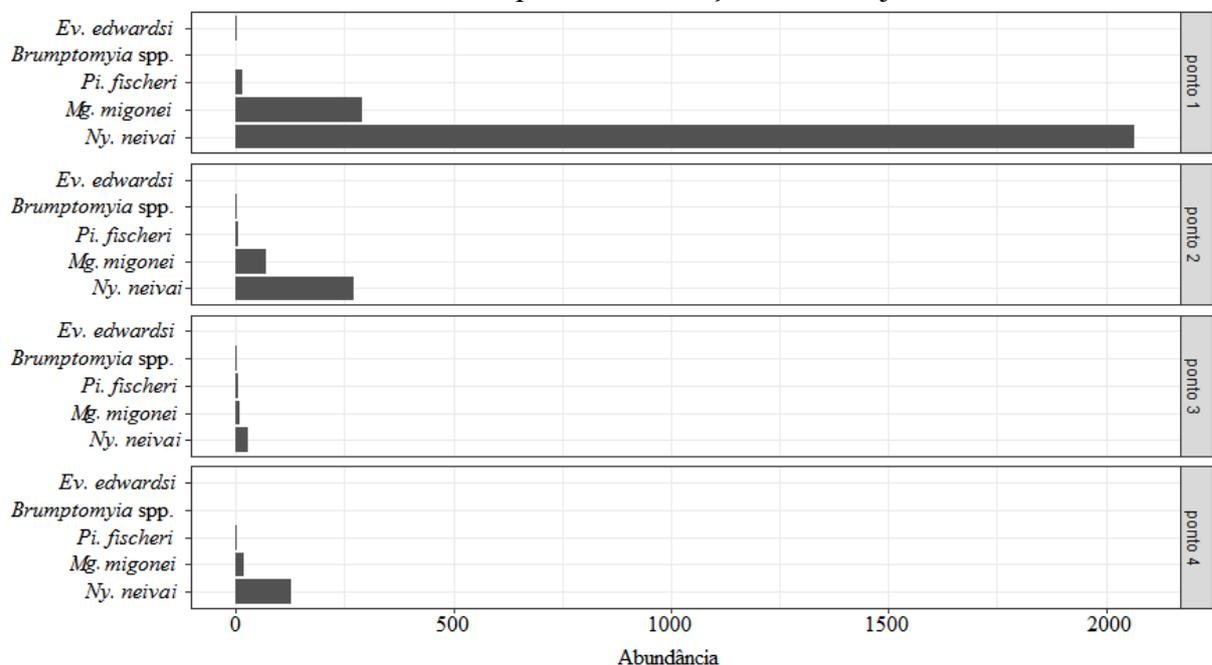
Tabela 6 – Estatística referente à comparação das espécies de flebotomíneos capturados no CCZ de Tubarão/SC no período de março de 2019 a junho de 2020.

Espécies	N	Mínimo	Máximo	Média	Erro padrão
<i>Ny. neivai</i>	64	0	1137	39	18,6
<i>Mg. migonei</i>	64	0	63	6,05	1,7
<i>Pi. fischeri</i>	64	0	5	0,375	0,112
<i>Brumptomyia spp.</i>	64	0	2	0,047	0,035
<i>Ev. edwardsi</i>	64	0	1	0,016	0,016

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Quanto à frequência de espécies de flebotomíneos nos pontos amostrais, o ponto 1 apresentou maior abundância das espécies coletadas, seguido dos pontos 2, 4 e 3, respectivamente, sendo *Ny. neivai* a espécie mais frequente em todos os pontos amostrais, seguida de *Mg. migonei* e *Pi. fischeri*, que foram identificados em todos os locais de captura. Com relação à diversidade de espécies de flebotomíneos dos pontos de amostragem, nos pontos 1, 2 e 3 observou-se a ocorrência de quatro diferentes espécies, enquanto no ponto amostral 4 evidenciou-se apenas três, conforme pode-se verificar no gráfico a seguir.

Gráfico 3 – Distribuição das espécies de flebotomíneos por ponto de coleta, coletas realizadas no CCZ de Tubarão/SC, no período de março de 2019 a junho de 2020.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

O índice de Shannon, cálculo que permite averiguar a diversidade e uniformidade dos locais de coleta, permitiu realizar uma comparação entre os pontos amostrais. Conforme dados da Tabela 7, o ponto amostral 3 possui o índice de Shannon mais elevado, sendo, desta forma, o mais diverso.

Tabela 7 – Índice de Shannon referente aos pontos amostrais de flebotomíneos capturados no CCZ de Tubarão/SC no período de março de 2019 a junho de 2020.

Pontos amostrais	Índice de Shannon
Ponto 1	0,41
Ponto 2	0,58
Ponto 3	1
Ponto 4	0,41

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

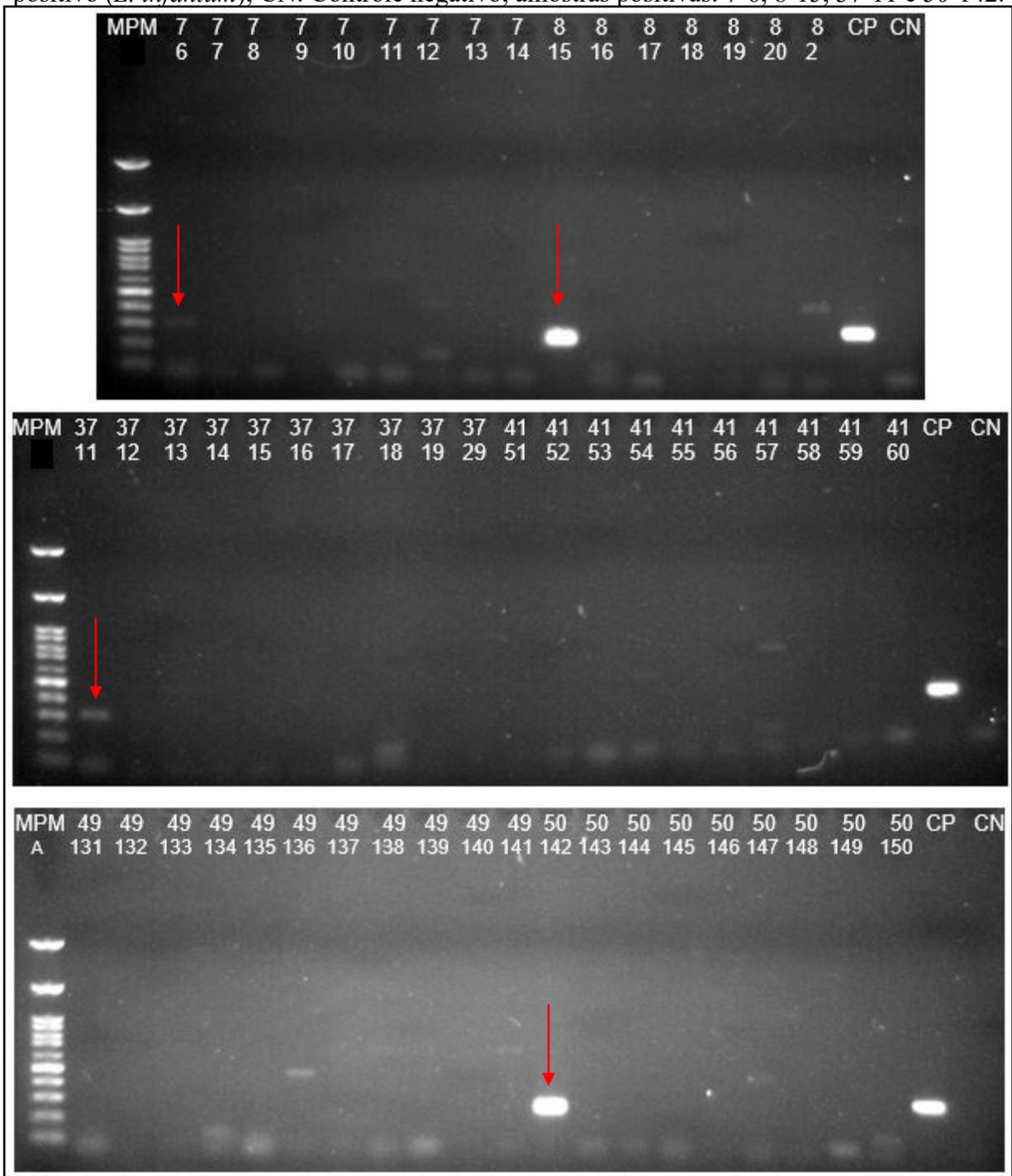
3.3 INFECÇÃO NATURAL DAS FÊMEAS DE FLEBOTOMÍNEOS POR *LEISHMANIA* SPP.

Para uma investigação quanto à infecção natural por *Leishmania* spp. nos flebotomíneos, foram analisadas as fêmeas não ingurgitadas, capturadas entre março de 2019 e fevereiro de 2020.

No total, 509 fêmeas foram pesquisadas, correspondendo a 54,1% das fêmeas coletadas. Realizou-se a preparação de 53 *pools*, cada um contendo DNA individual de, no máximo, dez flebotomíneos para triagem inicial por meio da reação de PCR dirigida ao alvo ITS1. Foram consideradas positivas as amostras com produtos amplificados que continham de 300 a 350 pb. Dos *pools* analisados, quatro (7,5%) foram reagentes para a presença de DNA de tripanossomatídeos.

Analisou-se individualmente o material genético de cada flebotomíneo utilizado na preparação dos *pools* positivos, por meio de uma nova reação de PCR, tendo como alvo a região intergênica ITS1. Conforme é possível verificar na Figura 16, houve amplificação do fragmento com padrão de bandas no tamanho esperado para *Leishmania*, ou seja, de 300 a 350 pb em quatro amostras, sendo encontrado um espécime positivo em cada um dos quatro *pools* reagentes inicialmente.

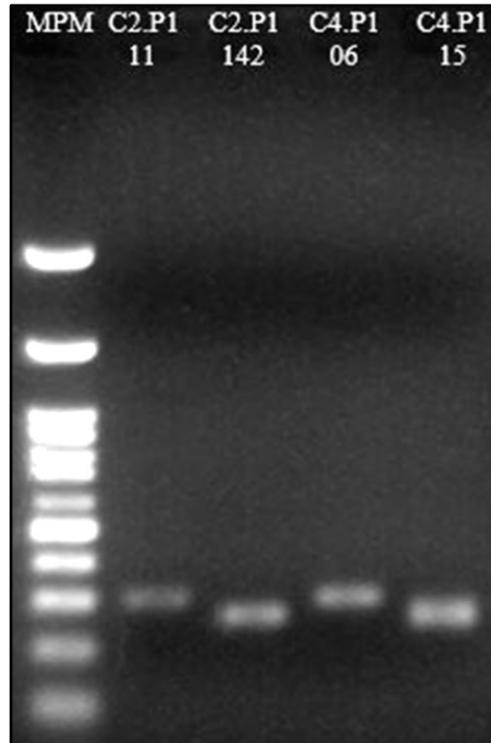
Figura 16 – Gel de agarose a 1%, corado com *Safe dye*, mostrando os produtos amplificados na segunda reação de PCR. MPM: Marcador de peso molecular de 100 pb; CP: Controle positivo (*L. infantum*); CN: Controle negativo; amostras positivas: 7-6, 8-15, 37-11 e 50-142.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

As quatro amostras positivas para DNA de tripanossomatídeos, provenientes da segunda reação de PCR, foram purificadas e, em seguida, sequenciadas para a determinação da espécie do protozoário envolvido na infecção natural (Figura 17).

Figura 17 – Gel de agarose a 2%, corado com *Safe dye*, exibindo as amostras de fêmeas de flebotomíneos positivas para tripanossomatídeos, referentes à segunda PCR – MPM: Marcador de peso molecular de 100 pb.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Após a execução do sequenciamento genético, as sequências consensos obtidas foram comparadas com as existentes no banco de dados GenBank, sendo alinhadas por meio do algoritmo BLASTn. Foi possível identificar em duas das quatro amostras positivas DNA de *L. infantum* (amostras C2P111 e C4P106), apresentando 100% de similaridade e cobertura com as sequências depositadas no banco de dados (Tabela 8). As outras duas amostras apresentaram resultados inconclusivos quanto às espécies, em razão da baixa cobertura apresentada, abaixo de 35%, provavelmente porque são espécies de tripanossomatídeos ainda não sequenciadas. Pode-se observar na Figura 17 que o padrão de amplificação apresentado pelas amostras inconclusivas (C2P1142 e C4P115) está abaixo de 300 pb e que, possivelmente, não são espécies do gênero *Leishmania*. A taxa de infecção natural para *L. Infantum* foi de 0,39%.

Os indivíduos positivos para *L. infantum* foram capturados nos meses de abril e junho de 2019, ambos no ponto amostral 1, localizado dentro da baía dos cães, sobre o recinto em que eles dormiam.

Tabela 8 – Resultado do alinhamento realizado com BLASTn para as amostras de fêmeas de flebotomíneos positivas para *L. infantum*.

Identificação da amostra	Hit BLAST	Número acesso Blast	E-value	Similaridade (%)	Cobertura (%)
C2P111	<i>L. infantum</i>	MN503527.1	4E-148	100	100
C4P106	<i>L. infantum</i>	MN503527.1	1E-147	100	100

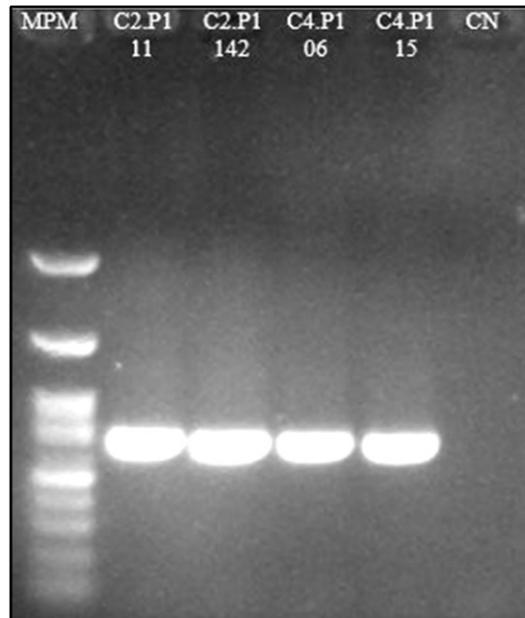
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

3.4 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE FLEBOTOMÍNEOS INFECTADAS COM *L. INFANTUM*

As quatro fêmeas positivas para tripanossomatídeos, incluindo as naturalmente infectadas por *L. infantum* (C2P111 e C4P106), passaram tanto por identificação morfológica quanto molecular para a detecção precisa da espécie vetora de flebotomíneo. No exame morfológico, foram analisadas estruturas com valor taxonômico, tais como: o Cibário e as Espermatecas. Para a identificação molecular dessas fêmeas e amplificação do alvo COI (DNA *Barcode*) foi realizado a PCR, atingindo o nível esperado de amplificação, com padrão de bandas de 650 a 700 pb (Figura 18), seguido de sequenciamento. As sequências consensos obtidas foram alinhadas, mediante o uso do algoritmo BLASTn, com as sequências armazenadas no banco de dados genético GenBank.

Após a identificação integrativa, que utiliza a junção da análise morfológica com a molecular para a definição das espécies, foi constatado que todas as fêmeas são da espécie *Ny. neivai* (Figura 19; Tabela 9).

Figura 18 – Gel de agarose a 1% corado com *Safe dye*, mostrando as amostras de fêmeas de flebotomíneos positivas para tripanossomatídeos e amplificadas com o alvo COI, analisadas para a determinação da espécie do vetor – MPM: Marcador de peso molecular de 100 pb; CN: Controle negativo.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 19 – Fêmea de flebotomíneo da espécie *Ny. neivai*, encontrada naturalmente infectada por *L. infantum* no CCZ de Tubarão/SC. Inseto montado em lâmina para microscopia, após clarificação, e visualizado ao microscópio com aumento de 40x.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 9 – Comparação entre a identificação morfológica e molecular das fêmeas de flebotomíneos infectadas por *L. infantum*, no CCZ de Tubarão/SC. Alinhamento realizado com o algoritmo BLASTn.

Identificação da amostra	Identificação Taxonômica	Identificação Molecular
C2P111	<i>Ny. neivai</i>	<i>Ny. neivai</i>
C4P106	<i>Ny. neivai</i>	<i>Ny. neivai</i>
C2P1142	<i>Ny. neivai</i>	<i>Ny. neivai</i>
C4P115	<i>Ny. neivai</i>	<i>Ny. neivai</i>

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

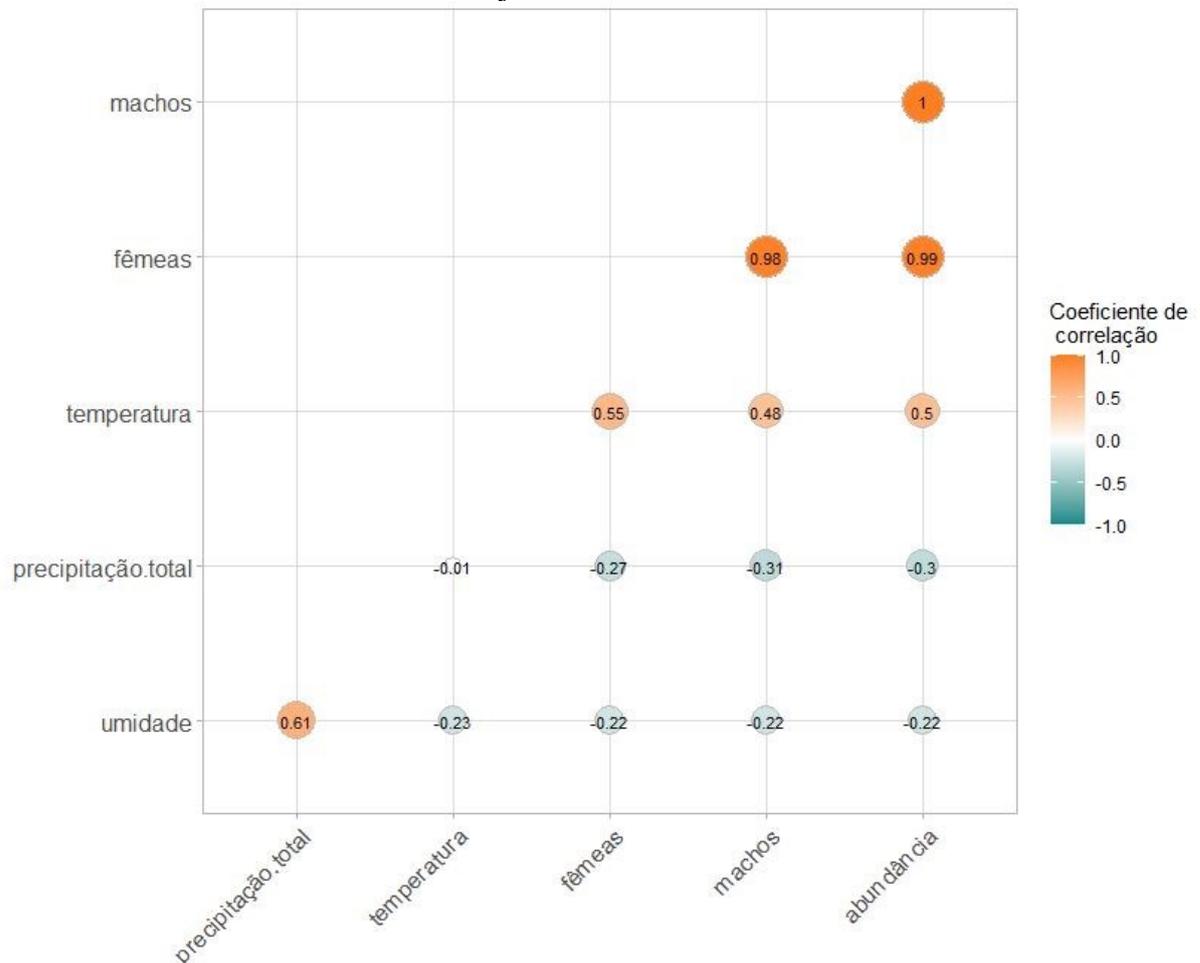
3.5 ANÁLISE DOS DADOS CLIMÁTICOS

Com o intuito de avaliar se fatores como temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica exerceram influência sobre a abundância dos flebotomíneos coletados durante o estudo, ou seja, de março de 2019 a junho de 2020, realizou-se a correlação de Spearman confrontando os dados climatológicos mencionados acima com a abundância de flebotomíneos e com o sexo (machos e fêmeas).

A temperatura média mensal máxima registrada foi de 24,78°C, e a mínima, de 15,64°C. As temperaturas mais elevadas foram encontradas nos meses de abril de 2019 e janeiro de 2020, enquanto as mínimas foram registradas em julho e agosto de 2019. A média mensal da umidade relativa do ar variou de 72,23% a 89,31%, sendo a maior umidade registrada em maio de 2019, e a menor, em dezembro do mesmo ano. A precipitação pluviométrica total mensal oscilou de 7,4mm a 331,21mm, apresentando maiores índices em maio e junho de 2019, e menores, em maio de 2020. Constatou-se uma correlação positiva com significância estatística entre temperatura e abundância de flebotomíneos capturados, com coeficiente de correlação de $(r) = 0,50$ e valor de $p = 0,008$. Da mesma forma, foram obtidos correlação positiva entre machos e temperatura, com coeficiente de correlação $(r) = 0,48$ e $p = 0,009$ e entre fêmeas e temperatura, apresentando $r = 0,55$ e $p = 0,008$ (Gráfico 4).

Tanto a variável climática precipitação pluviométrica quanto a umidade relativa do ar apresentaram correlação negativa fraca, com abundância total de flebotomíneos, machos e fêmeas, ou seja, quanto maior a precipitação pluviométrica e a umidade mensal, menor a abundância de flebotomíneos capturados.

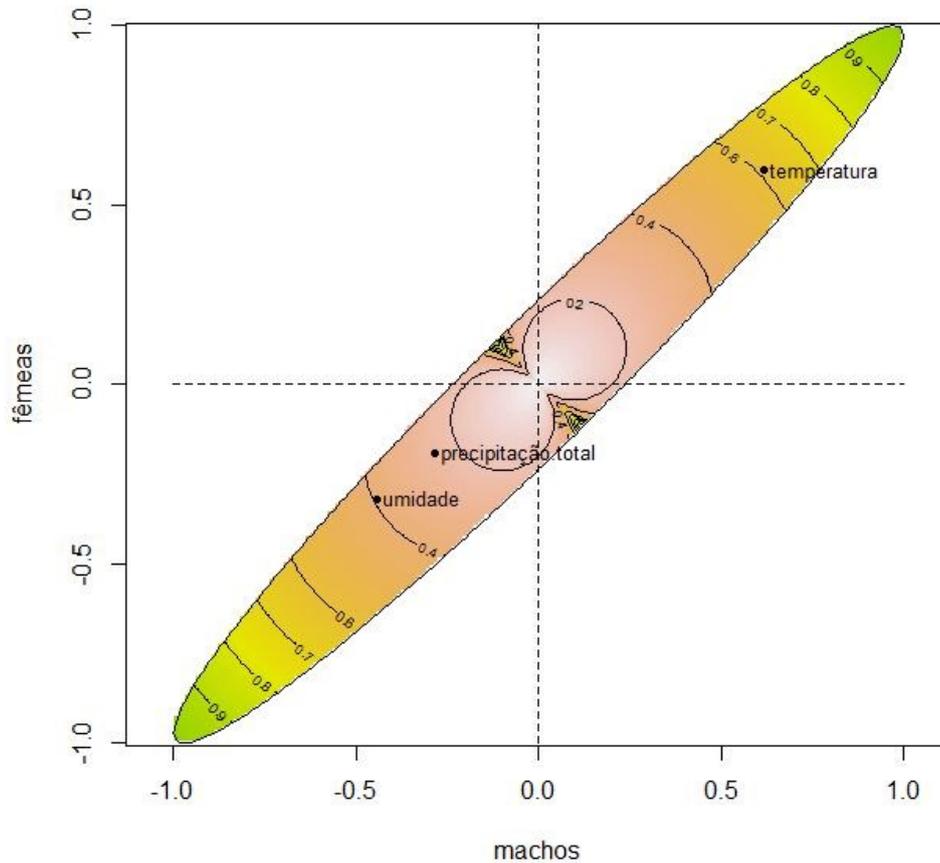
Gráfico 4 – Correlação entre as variáveis climáticas e a abundância total de flebotomíneos, machos e fêmeas, capturados no CCZ do município de Tubarão/SC entre março de 2019 e junho de 2020.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Foram plotadas em gráfico as correlações determinadas anteriormente como positivas, envolvendo as variáveis: temperatura e sexo (machos e fêmeas), para uma melhor visualização do relacionamento entre elas (Gráfico 5). Ficou evidente, dessa forma, a relação positiva entre esses fatores.

Gráfico 5 – Correlação entre temperatura com machos e fêmeas capturados no CCZ do município de Tubarão/SC entre março de 2019 e junho de 2020 – Transformação de dados por log + 1.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

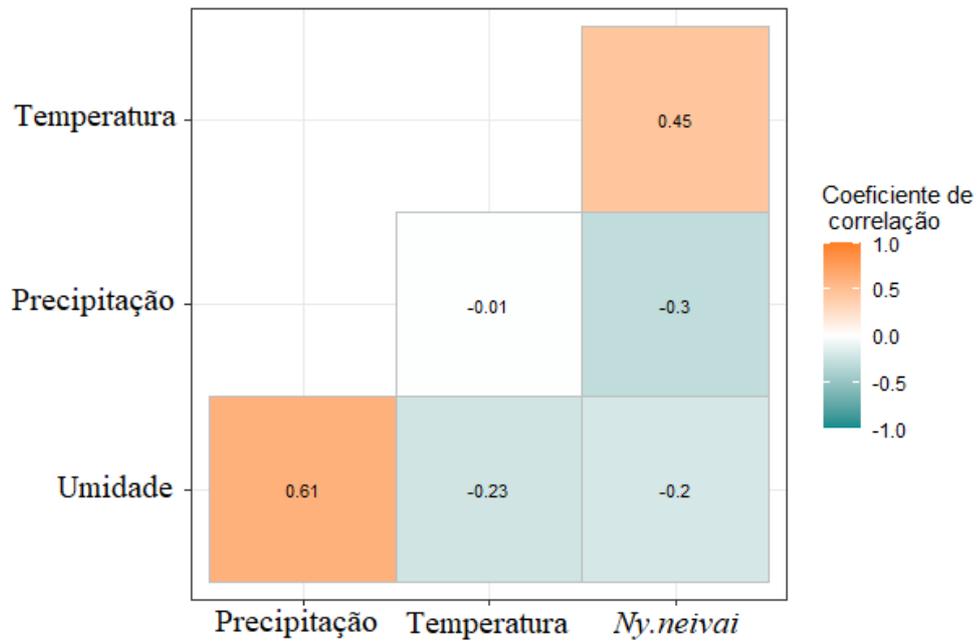
Considerando que *Ny. neivai* foi a espécie mais capturada e com ampla distribuição durante o período de estudo, foram realizadas análises de correlação entre a referida espécie e a temperatura, a umidade relativa do ar e a precipitação total. Com isso, foi evidenciada correlação positiva com significância estatística apenas com a variável temperatura, apresentando $r = 0,45$ e valor de $p = 0,01$ (Gráfico 6). No entanto, não foi possível constatar correlações positivas entre as demais variáveis analisadas (umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica) com a espécie analisada.

Nas variáveis que apresentaram correlação positiva e significância estatística nas análises, aplicou-se o modelo de regressão linear para uma melhor visualização das relações entre elas e a afirmação dos resultados.

O Gráfico 7 representa a relação entre a variável temperatura e a abundância de flebotomíneos capturados, apresentando coeficiente de determinação de $R^2 = 0,25$ e valor de p

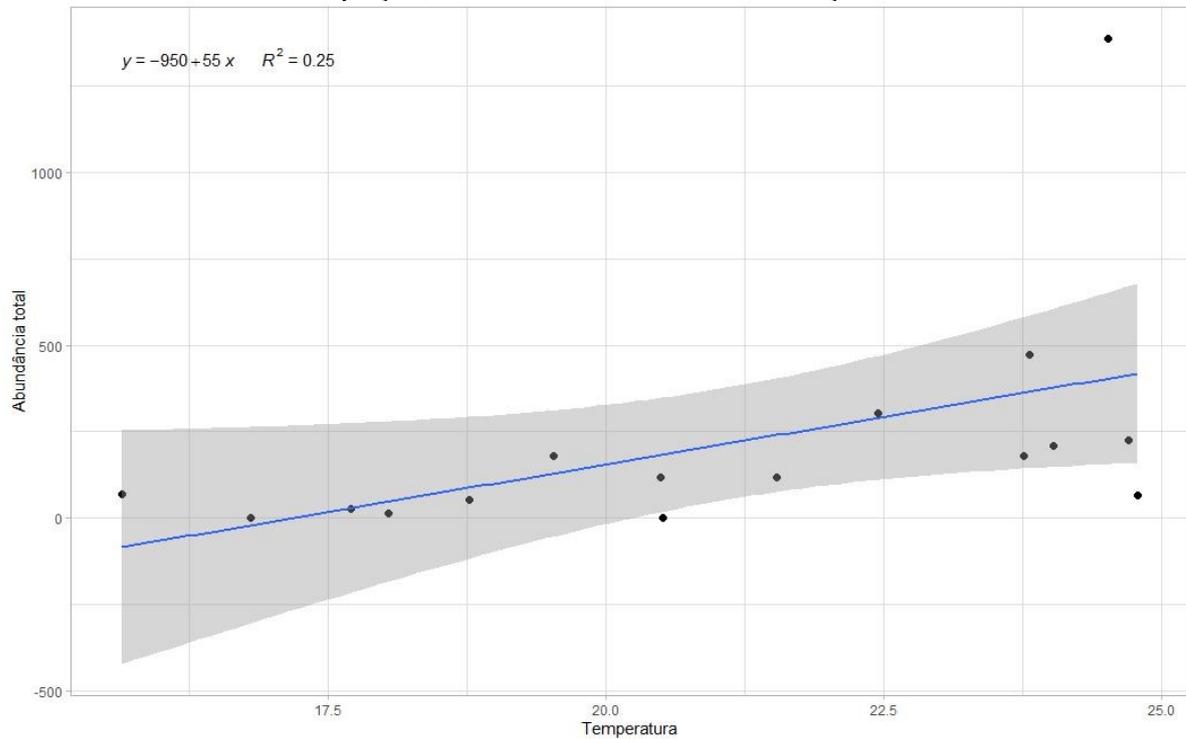
= 0,048. Observa-se que as variáveis se relacionam, e o modelo de regressão explica 25% da variância entre os dados.

Gráfico 6 – Correlação entre temperatura, precipitação total, umidade relativa do ar e flebotomíneos da espécie *Ny. neivai* capturados no CCZ do município de Tubarão/SC entre março de 2019 e junho de 2020.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Gráfico 7 – Relação entre as variáveis temperatura e abundância de flebotomíneos capturados no CCZ do município de Tubarão/SC entre março de 2019 e junho de 2020 – $Y =$ Fórmula da equação, $R^2 =$ Coeficiente de determinação.

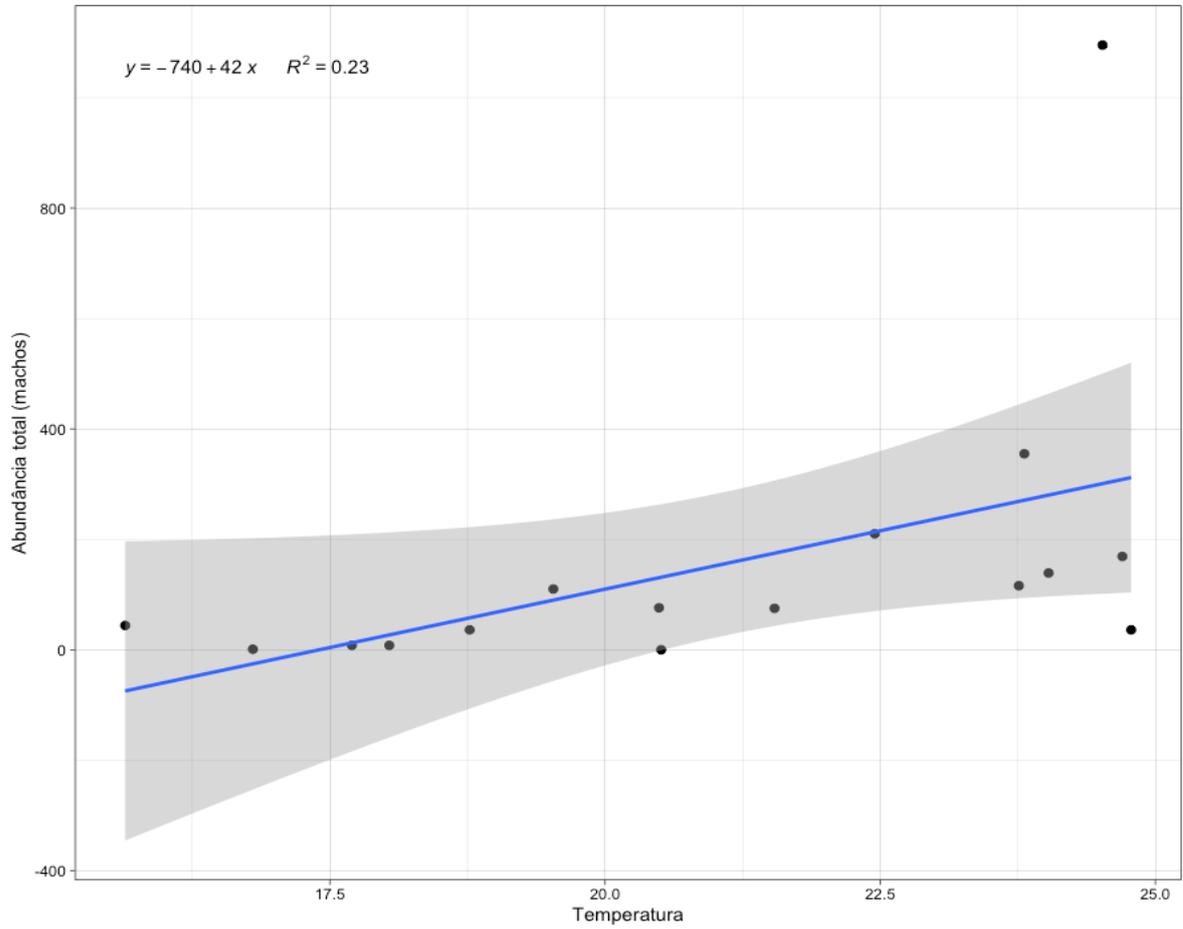


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

No Gráfico 8, verifica-se a relação entre a variável independente temperatura e a variável dependente machos, que corresponde ao total de machos de flebotomíneos capturados durante o período de estudo. O modelo linear apresenta um $R^2 = 0,23$, elucidando 23% da relação entre as variáveis estudadas com valor de $p = 0,05$.

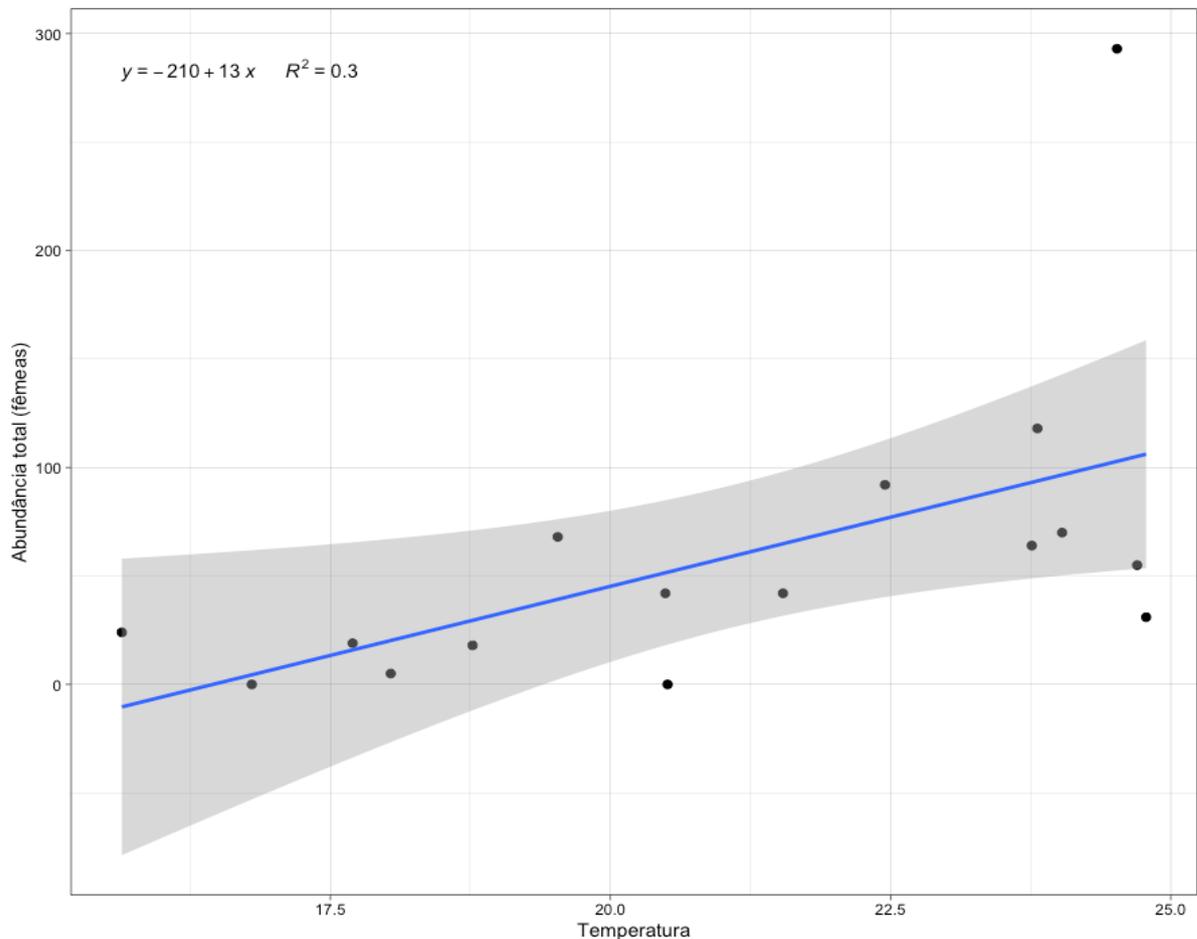
O modelo linear aplicado para analisar a relação entre as variáveis temperatura e abundância total de fêmeas coletadas apresentou valor de $R^2 = 0,30$ e valor de $p = 0,03$, ou seja, algo significativo, indicando que as alterações da variável independente (temperatura) estão relacionadas à variável resposta (abundância de fêmeas) e podem ser vistas no Gráfico 9.

Gráfico 8 – Relação entre as variáveis temperatura e machos de flebotomíneos capturados no CCZ do município de Tubarão/SC entre março de 2019 e junho de 2020 – Y = Fórmula da equação, R^2 = Coeficiente de determinação.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Gráfico 9 – Relação entre as variáveis temperatura e fêmeas de flebotomíneos capturados no CCZ do município de Tubarão/SC entre março de 2019 e junho de 2020 – Y = Fórmula da equação, R^2 = Coeficiente de determinação.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Os gráficos 10, 11 e 12 são referentes às análises exploratórias realizadas com as variáveis de estudo. Ressalta-se que as dimensões apresentadas nos gráficos explicaram 82,3% da variância dos dados obtidos (Dim 1: 59% e Dim 2: 23,3%) de maneira significativa ($p < 0,05$).

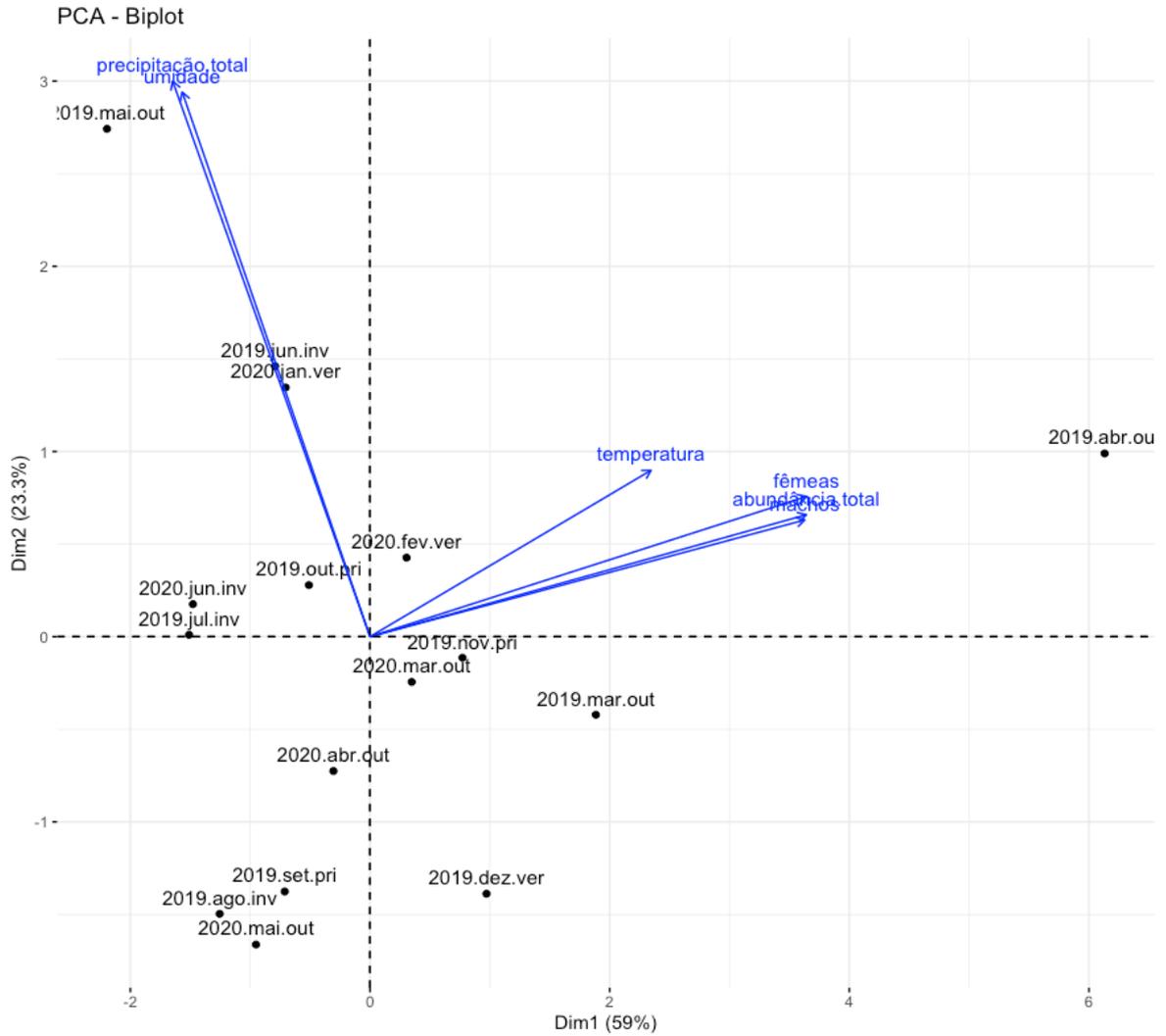
Representa-se uma Análise de Componentes Principais (PCA) no Gráfico 10, na qual é possível avaliar as associações constatadas durante a pesquisa, entre meses de coletas, as estações do ano, o ano (unidades amostrais) e como elas se relacionam com as variáveis ambientais e a abundância de flebotomíneos, bem como com machos e fêmeas. As estações do ano foram agrupadas de acordo com as datas das capturas da seguinte forma: outono, compreendendo os meses de março a maio; inverno, englobando os meses de junho a agosto; primavera, de setembro a novembro; e verão, de dezembro a fevereiro. Percebe-se no gráfico que as variáveis, quanto à abundância total de flebotomíneos, machos e fêmeas, estão

intimamente relacionadas à variável climatológica, temperatura, fato que vem sendo corroborado pelas análises de correlação e regressão apresentadas anteriormente. Além disso, a referida relação está apontando principalmente para a segunda coleta do estudo, que foi realizada em abril de 2019, no outono, cuja abundância foi a maior de todas as coletas desta pesquisa. A precipitação total e a umidade estão estreitamente associadas à diminuição dos índices de abundância de flebotomíneos (maio de 2019).

Nos gráficos 11 e 12, pode-se visualizar a representação da análise de agrupamento do *cluster*, realizada com o objetivo de verificar as semelhanças e os padrões entre os meses das coletas, estações do ano e ano, tendo como base para o agrupamento as variáveis: a abundância total de flebotomíneos, machos e fêmeas, e as médias quanto à temperatura, umidade relativa do ar e o acumulado mensal referente à precipitação pluvial.

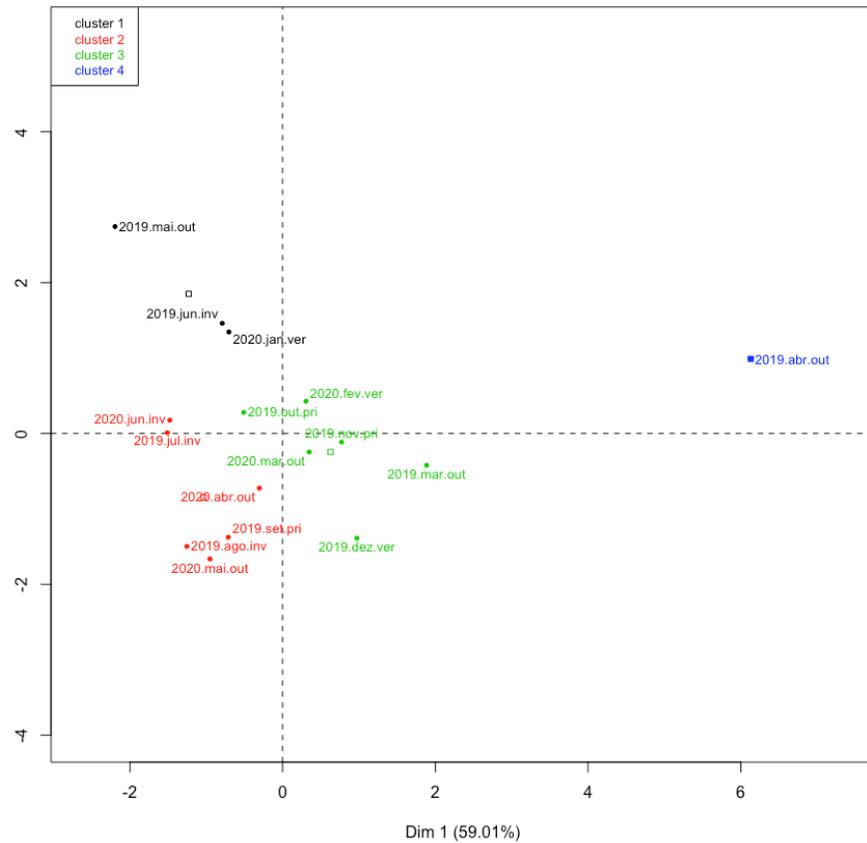
Verifica-se que houve a separação, estatisticamente significativa ($p < 0,05$), das variáveis em quatro grupos distintos, que são: *cluster 1*, *cluster 2*, *cluster 3* e *cluster 4*. O padrão principal de associação do *cluster 1* foi o valor da precipitação pluvial, que foi semelhante nos meses de maio e junho de 2019 e janeiro de 2020, com valor de $p = 0,0003$. O *cluster 2* teve como fator de agrupamento determinante a diminuição nos valores das temperaturas médias, que foi correlato entre os meses de julho, agosto e setembro de 2019 e abril, maio e junho de 2020, justamente na época em que há diminuição natural das temperaturas no Estado; para esse agrupamento, o valor de p foi $= 0,001$. No *cluster 3*, a variável responsável pela separação do grupo foi a temperatura, a qual foi similar entre os meses de março, outubro, novembro e dezembro do ano de 2019 e fevereiro, março e abril de 2020, ou seja, meses que apresentaram temperaturas um pouco mais elevadas que as do *cluster 2*. O padrão de segregação do grupo foi significativo, com $p = 0,02$. O *cluster 4* teve como critério de separação do *cluster* as variáveis abundância total de flebotomíneos e machos e fêmeas, que foram significativas para o grupo, com valor de $p < 0,001$ para todas as variáveis citadas. O agrupamento foi representado apenas pela amostragem referente ao mês de abril de 2019. Vale ressaltar que a referida coleta correspondeu a 40,6 % de todos os espécimes de flebotomíneos coletados durante o período de estudo, sendo extremamente diferente das demais coletas.

Gráfico 10 – Análise de Componentes Principais (PCA) realizadas com a abundância total de flebotômíneos, machos, fêmeas e médias das variáveis climáticas, com descrição da primeira e segunda dimensão – dados referentes às capturas de flebotômíneos realizadas no CCZ.



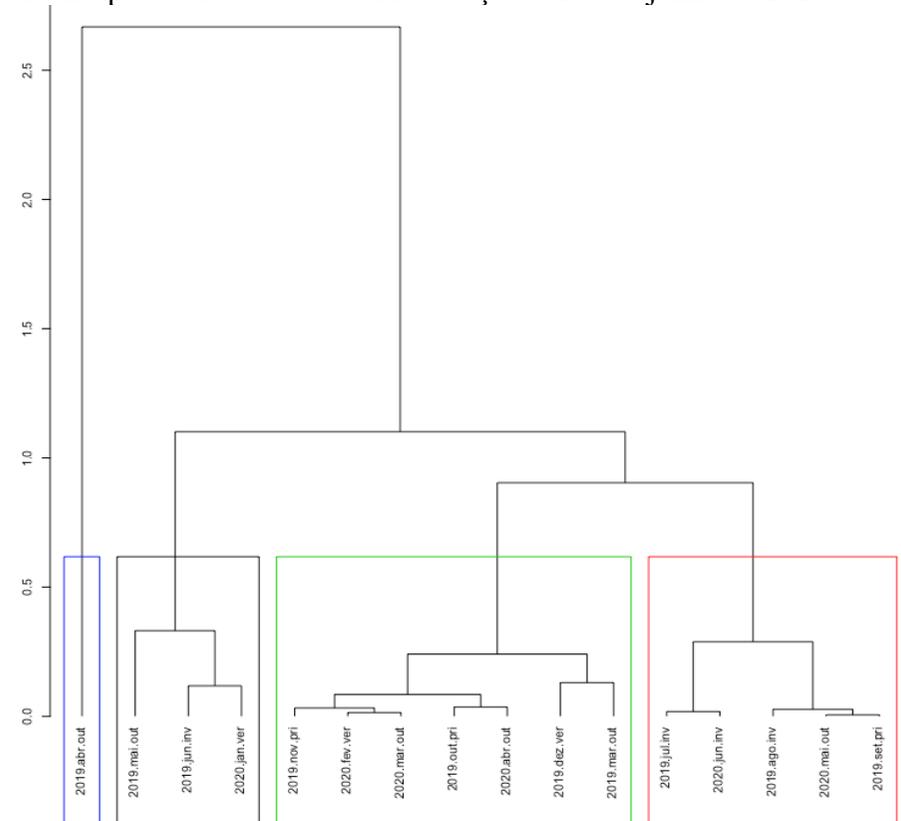
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Gráfico 11 – Análise multivariada (agrupamento do *Cluster*) realizada com a abundância total de flebotomíneos, machos, fêmeas e médias das variáveis climáticas e suas distâncias de similaridade entre as capturas de flebotomíneos realizadas no CCZ.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Gráfico 12 – Dendrograma da análise multivariada (agrupamento do *cluster*) ilustrando os quatro agrupamentos gerados. Dados referentes às capturas de flebotomíneos realizadas no CCZ do município de Tubarão/SC entre março de 2019 e junho de 2020.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

3.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS CÃES DO CCZ PARA *LEISHMANIA*

Para a avaliação da infecção dos cães por *Leishmania* spp., foram coletadas células da conjuntiva do olho direito dos 47 (quarenta e sete) cães abrigados no CCZ no momento da pesquisa. Utilizou-se a técnica não invasiva de *swab* conjuntival para a coleta das amostras. Os cães analisados não apresentavam raça definida e eram assintomáticos para as leishmanioses no período da amostragem. É possível perceber, na Figura 20, que houve amplificação do perfil de bandas, conforme esperado, para o alvo ITS1 em cinco das quarenta e sete amostras.

Após a realização do sequenciamento e a obtenção das sequências consensos, com o posterior alinhamento realizado com as sequências do banco de dados GenBank, constatou-se que, dos cinco animais positivos inicialmente para tripanossomatídeos, apenas dois, os cães 10 e 16, foram positivos para *L. infantum*. Os outros três animais apresentaram resultados inconclusivos para a espécie de tripanossomatídeo envolvido na infecção, em virtude da baixa cobertura e/ou similaridade encontrada com as sequências disponíveis nos bancos de dados. Dessa forma, a taxa de infecção dos cães para *L. infantum* foi de 4,2% (Tabela 10).

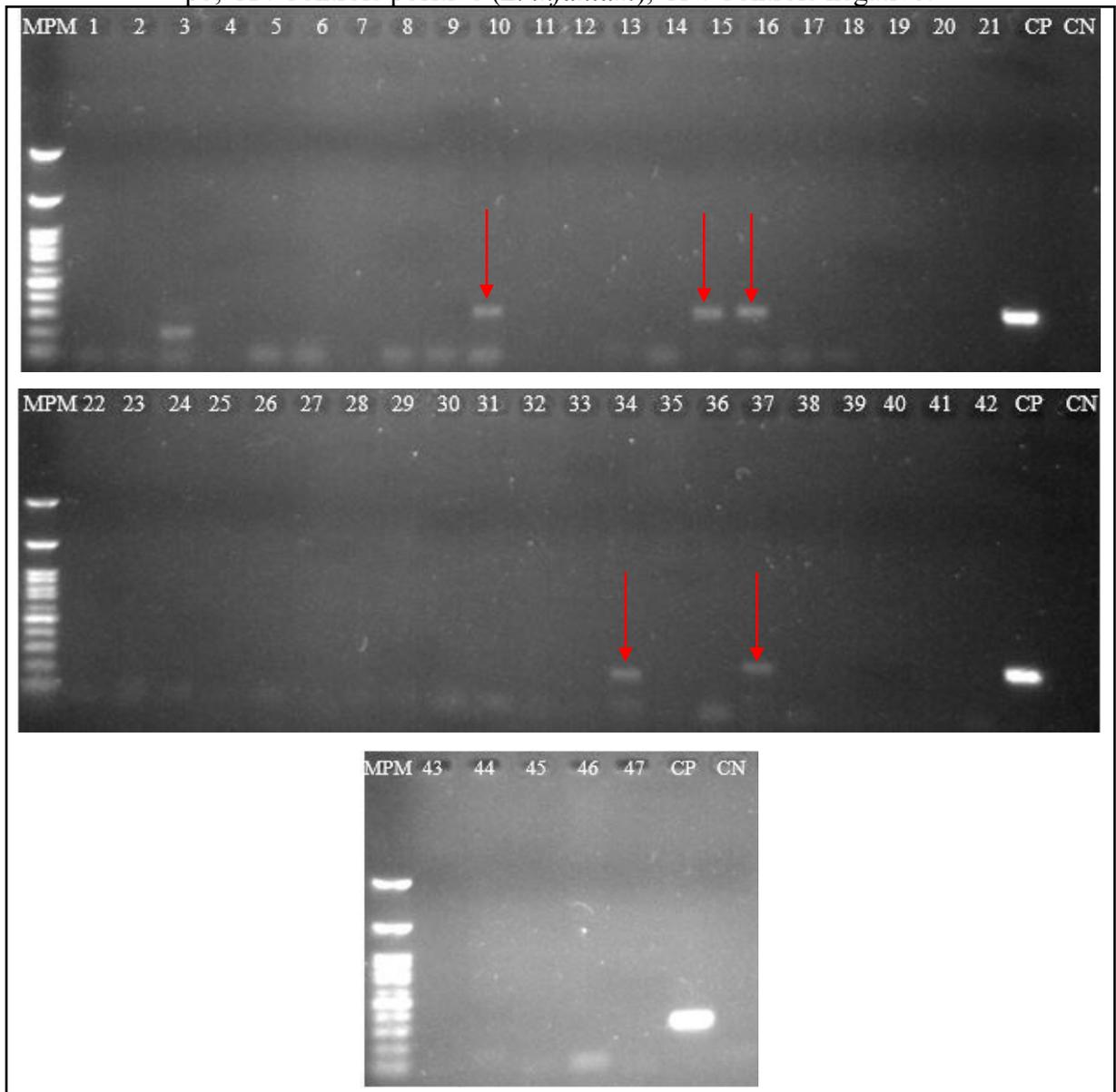
Tabela 10 – Resultado do alinhamento realizado com BLASTn para as amostras de fêmeas de flebotomíneos positivas para *L. infantum* – Alinhamento realizado com o algoritmo BLASTn.

Identificação da amostra	Hit BLAST	Número acesso Blast	E-value	Similaridade (%)	Cobertura (%)
Cão 10	<i>Leishmania infantum</i>	MG969403.1	4E-162	100	100
Cão 16	<i>Leishmania infantum</i>	MN503527.1	1E-132	99,62	100

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Os cinco cães positivos na PCR para DNA de tripanossomatídeos tiveram sangue coletado pela equipe do CCZ do município de Tubarão para diagnóstico de *Leishmania* por meio do Lacen/SC. Os animais foram testados com testes rápidos imunocromatográficos – realizados com kit TR DPP® – para diagnóstico da leishmaniose visceral canina da Bio Manguinhos. Os resultados dos testes rápidos realizados pelo Lacen foram não reagentes.

Figura 20 – Gel de agarose a 1%, corado com *Safe dye*, referente às amostras de *swab* conjuntival dos 47 cães do CCZ de Tubarão/SC – MPM: Marcador de peso molecular de 100 pb; CP: Controle positivo (*L. infantum*), CN: Controle negativo.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4 DISCUSSÃO

O estudo da fauna de flebotomíneos de uma região é imprescindível, visto que muitas espécies desses insetos são responsáveis pela transmissão dos agentes etiológicos das leishmanioses, propiciando, dessa forma, medidas de controle mais eficazes e sustentáveis contra a doença (OPAS, 2021). A partir do conhecimento de cães positivos para LV no CCZ do município de Tubarão, delineou-se o presente trabalho com o intuito de determinar os possíveis vetores envolvidos na transmissão da doença, as variáveis climáticas relacionadas à abundância de flebotomíneos e os possíveis cães ainda infectados no local.

Constatou-se que a distribuição de flebotomíneos, durante os 16 meses de estudo, foi desigual, e a fauna apresentou-se pouco diversa, com quatro espécies e cinco gêneros identificados. De acordo com Aguiar e Vieira (2018), na região Sul do Brasil são conhecidas 57 espécies de flebotomíneo; e em Santa Catarina foram identificadas dezessete espécies.

A maior abundância de espécimes foi encontrada em março e abril de 2019, e, somando as duas coletas, correspondem a mais da metade dos flebotomíneos capturados ao longo de toda a amostragem. As duas capturas são consideradas atípicas se comparadas às demais. Não foi constatado o mesmo padrão de amostragem nos meses de março e abril do ano subsequente, 2020, visto que o estudo foi desenvolvido durante 16 meses. Houve uma diminuição de 84% da abundância de flebotomíneos quando comparados os dois meses citados do ano de 2019 e 2020. Segundo Forattini (1973), o desenvolvimento das formas imaturas dos flebotomíneos está atrelado à temperatura, umidade e disponibilidade de alimento. Em condições térmicas ligeiramente superiores à temperatura considerada ótima, que, para a maioria das espécies de flebotomíneos neotropicais fica entre 25°C e 27°C, o desenvolvimento do ciclo biológico é mais rápido. Conforme a temperatura diminui, o ciclo de evolução se torna mais lento (BRAZIL; BRAZIL, 2018). Além disso, flutuações interanuais de fenômenos climáticos, como o El Niño, podem impactar a sazonalidade dos flebotomíneos e leishmanioses (CARDENAS *et al.* 2006).

O El Niño é a mais forte flutuação climática interanual em todo o mundo, caracterizada por um aquecimento em grande escala do Oceano Pacífico equatorial oriental e central. O fenômeno também é conhecido por El Niño Oscilação Sul (Enso) e pode ser entendido como a fase quente de um ciclo irregular com uma frequência média de três a quatro anos; o auge de aquecimento ocorre de dezembro a maio (FRANKE *et al.* 2002). Esse evento tem um grande impacto no vento, na temperatura da superfície do mar e nos padrões climáticos em toda a região do Pacífico e em muitas outras partes do mundo (RODRÍGUES-MORALES *et al.*,

2005). Segundo Puchalski (2000), os efeitos do El Niño no Sul do Brasil acarretam aumento da temperatura atmosférica e precipitação pluvial, condições ideais para o desenvolvimento biológico do inseto vetor das leishmanioses.

De acordo com Blunden e Arndt (2020), da Sociedade Meteorológica Americana, no início de 2019 estávamos sob a influência do Enso, que fez transição para condições neutras até a metade do mesmo ano. Acreditamos que o padrão de coleta incomum para a região, que constatamos no início de 2019, esteja relacionado ao aumento das temperaturas e da umidade ocasionado pelo El Niño, levando ao desenvolvimento acelerado das formas imaturas de flebotomíneos e à consequente elevação da quantidade de adultos coletados.

Variza (2016), entre abril de 2015 e março de 2016, realizou a caracterização da fauna de flebotomíneos no Sul de Santa Catarina, sendo um dos pontos de coleta para a referida pesquisa o CCZ do município de Tubarão; ao final dos doze meses de amostragem, apenas dois flebotomíneos da espécie *Ny. neivai* foram capturados. No entanto, em fevereiro de 2019 realizou-se um levantamento entomológico no referido local, pela Dive/SC, em virtude da ocorrência de casos de LVC, sendo coletados, em três dias, em torno de 900 flebotomíneos, todos com importância epidemiológica: *Ny. neivai*; *Mg. migonei* e *Pi. fischeri* (DIVE, 2019). Tais relatos corroboram nossa hipótese quanto ao aumento da abundância de espécimes coletados, ocasionado pelas condições climáticas especiais geradas pelo fenômeno meteorológico El Niño. Entre elas, destacamos a temperatura, que em nossas análises apresentaram correlação positiva com a abundância de flebotomíneos capturados, indicando que há uma tendência ao aumento desses insetos conforme a temperatura se eleva. Em contrapartida, a abundância dos psicodídeos evidenciou uma correlação negativa tanto com a precipitação pluviométrica quanto com a umidade relativa do ar, sinalizando, dessa forma, que a variável climática que determinou o aumento da quantidade de espécimes capturadas foi a temperatura. Dados semelhantes foram relatados por Ávila *et al.* (2018), Mann e Kaufman (2010) e Miranda *et al.* (2015).

Além disso, salienta-se que no CCZ há fonte de alimentação estável para os flebotomíneos, proveniente dos cães acolhidos na instituição e da vegetação em seu entorno, bem como locais potenciais para o descanso e a procriação durante todo o ano. Esse é um fator que reforça ainda mais nossa hipótese, em virtude da estabilidade anual das referidas condições do local, não estando, dessa forma, a abundância de espécimes associada a condições alimentares ou de abrigo da instituição.

Diversos estudos têm associado a ocorrência dos fenômenos climáticos El Niño e La Niña às flutuações da distribuição e abundância de insetos vetores e patógenos, relacionados à

ocorrência de doenças. Cardenas *et al.* (2006, 2008) relataram o aumento dos casos das leishmanioses na Colômbia em períodos de El Niño e a diminuição na fase de La Niña, na qual ocorre o decréscimo das temperaturas e períodos de seca. Chaves *et al.* (2014) avaliaram dados sobre a abundância de flebotomíneos, casos de leishmanioses no Panamá e sua relação com padrões e variabilidade climática. Os autores sugerem que mudanças abruptas na abundância de flebotomíneos sejam desencadeadas por clima anômalo e padrões associados ao Enso, desempenhando, provavelmente, um papel importante nos ciclos de transmissão interanuais das leishmanioses no Panamá.

Altamiranda-Saavedra *et al.* (2020) pesquisaram os efeitos dos ciclos do El Niño e La Niña na distribuição potencial das espécies de vetores da LTA na Colômbia e compararam a riqueza dos vetores com a ocorrência de LTA. Os autores verificaram que no período de El Niño houve aumento da distribuição das espécies de flebotomíneos analisadas, e no período da La Niña houve diminuição. Outrossim, concluíram que as anomalias na precipitação e temperatura induzidas pelos fenômenos meteorológicos produziram mudanças na distribuição potencial de vetores, enfatizando a necessidade de monitorar a variabilidade climática para melhorar a previsão de novos casos de leishmaniose.

Destaca-se que a única coleta que não houve flebotomíneos capturados foi em maio de 2019. No referido mês, no dia programado para a amostragem, a região foi assolada por uma tempestade com ventos fortes e muita chuva. Ainda assim, houve tentativas por mais duas noites seguidas, porém sem êxito, em virtude da tempestade que persistia. O mês de agosto de 2019 representou a menor coleta do estudo, num padrão já esperado, sendo que era inverno, um período com as menores temperaturas no sul do país. Os resultados foram semelhantes aos encontrados por Rêgo *et al.* (2020) em investigação quanto à fauna de flebotomíneos no município de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul (RS), que nos meses de inverno, junho e agosto de 2017, não conseguiram capturar espécimes para estudo. No entanto, os autores não obtiveram correlação com significância estatística ao confrontarem os dados referentes à temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica com a abundância de flebotomíneos coletados no estudo citado.

Rivas *et al.* (2014) demonstraram em estudo com *Lu. longipalpis* que a espécie apresenta maior atividade ao entardecer em temperaturas mais altas. A pesquisa indicou que a temperatura modula o comportamento do inseto em condições de laboratório, sugerindo que os flebotomíneos podem usar informações ambientais para sustentar sua atividade crepuscular e noturna, bem como outros aspectos importantes, como acasalamento e busca de hospedeiro, padrão esse que pode ser extrapolado para justificar os achados desta pesquisa quanto à

abundância de flebotomíneos relacionados à variável climática. Ademais, Fuenzalida *et al.* (2011) demonstraram que a atividade de *Ny. neivai* é maior à noite e que a temperatura, no verão, foi a variável que mais influenciou na abundância da espécie. Vale frisar que 85,7% dos espécimes capturados aqui eram *Ny. neivai*, e a espécie também apresentou correlação positiva com a temperatura nas análises realizadas.

Com relação ao sexo dos flebotomíneos coletados, houve predomínio de machos em relação às fêmeas. Apesar de não realizarem a hematofagia, os machos de flebotomíneos chegam primeiro ao local do acasalamento e são atraídos pela presença de animais (OPAS, 2021). A corte nupcial feita pelos machos da espécie *Lu. longipalpis* consiste em movimentos circulares contínuos e no bater de asas (BRAZIL; BRAZIL, 2018). Acredita-se que houve predomínio quanto ao sexo masculino em razão da quantidade de animais no CCZ, fonte de alimentação sanguínea para as fêmeas. Os cães atuam liberando cairomônios, responsáveis pela atração dos flebotomíneos machos, que, por sua vez, liberam feromônios, responsáveis por atraírem as fêmeas suscetíveis à cópula (SOUZA *et al.*, 2004; VIGODER *et al.*, 2015).

Diversos estudos com flebotomíneos demonstraram a predominância de machos em relação às fêmeas em proporções semelhantes às encontradas nesta pesquisa (DIAS *et al.*, 2013; DIVE, 2017; FIGUEIREDO *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2010; QUIROGA *et al.*, 2017; SENGHOR *et al.*, 2011).

Pinto *et al.* (2011) analisaram a eficiência do cairomônio octenol, presente em muitos animais, na captura de flebotomíneos, tanto com armadilhas luminosas quanto nas sem fonte de luz, na localidade de Rincão, no Estado de São Paulo. Os pesquisadores constataram que na presença do cairomônio houve aumento significativo da quantidade de flebotomíneos coletados em ambas as armadilhas. Nas armadilhas sem luz, foram coletados 72,5% de machos e, conforme aumentava a concentração de octenol liberado, maior era a abundância de psicodídeos. A espécie de flebotomíneo mais abundante na presença do cairomônio foi *Ny. neivai*, somando 99,9% dos espécimes capturados.

Isso pode explicar os resultados obtidos nesta pesquisa, pois observou-se o aumento da abundância de flebotomíneos de maneira significativa, conforme a proximidade das armadilhas com os cães. Conforme já mencionado, *Ny. neivai* foi a espécie mais abundante em todos os pontos amostrais, estando presente durante 14 meses, evidenciando significância estatística quando comparada às demais espécies identificadas. Destaca-se que o ponto amostral localizado em cima do local onde os cães dormiam (Ponto 1) foi o mais abundante e mais próximo dos animais, seguido dos pontos 2 e 4. *Ny. neivai* foi a espécie predominante e a única que demonstrou esse comportamento de elevação da densidade, conforme a proximidade dos

animais. A atratividade de flebotomíneos a cairomônios pode ser explicada fisiologicamente pela presença de quimiorreceptores específicos nas antenas desses insetos (PINTO *et al.*, 2011). Sugere-se que *Ny. neivai* tenha alto tropismo por cairômonios animais, porém mais estudos específicos são necessários para tal determinação.

O ponto de coleta 3, localizado dentro da mata, foi o que apontou o maior índice de diversidade (índice de Shannon = 1), sendo assim o mais diverso. Ressalta-se que *Ny. neivai* apresentou menor captura nesse ambiente entre os quatro amostrados, fato que comprova a preferência da espécie por ambientes modificados, apresentando hábito oportunista de acordo com a fonte alimentar disponível e a proximidade com reservatórios animais. Todavia, *Mg. migonei*, *Pi. fischeri* e *Brumptomyia spp.* tiveram maior proporção de espécimes capturados no referido ponto amostral. Acredita-se que *Ny. neivai* possa estar realizando pressão seletiva sobre as espécies locais que foram identificadas em menor quantidade nos pontos onde as taxas de *Ny. neivai* foram maiores, apresentando-se, as três espécies, em maior proporção justamente no ponto cuja frequência de *Ny. neivai* foi menor.

Modificações ambientais antrópicas, como o desmatamento e a atividade agrícola, podem atuar nos aspectos bioecológicos dos flebotomíneos, ocasionando mudanças no padrão da fauna de determinada região. Consequentemente, certas espécies adaptam-se a essas alterações enquanto outras desaparecem progressivamente (AGUIAR *et al.*, 2014).

O perfil da fauna de flebotomíneos do CCZ do município de Tubarão é constituído por espécies com importância epidemiológica comprovada, por se tratarem de vetores dos agentes etiológicos da LTA, sendo elas: *Ny. neivai*, *Mg. migonei* e *Pi. fischeri*. Os flebotomíneos *Brumptomyia spp.* e *Ev. edwardsi* foram encontrados em baixa quantidade nos pontos amostrados. Os resultados desta pesquisa corroboram com os apresentados por diversos autores em estudos na região sul (DIAS *et al.*, 2013; DIVE, 2017; DIVE, 2019; MARCONDES *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2008).

Mg. migonei é uma espécie de flebotomíneo primariamente silvática, que sobreviveu às mudanças ecológicas, adaptando-se aos ambientes modificados. Possui, notavelmente, hábitos antropofílicos, sendo encontrada frequentemente alimentando-se em animais domésticos, como cães. Quanto à sazonalidade, a espécie pode ser capturada durante todo o ano, porém não é comum encontrá-la nos meses mais secos e frios (RANGEL; LAINSON, 2009). Nas análises aqui realizadas, *Mg. migonei* esteve ausente apenas no mês de maio de 2019, seguindo o padrão esperado. A espécie já foi encontrada sendo parasitada por *L. braziliensis*, agente etiológico da LTA (PITA-PEREIRA *et al.*, 2005). No entanto, Carvalho *et*

al. (2010); Moya *et al.* (2015) e Rodrigues *et al.* (2016) identificaram infecção natural de *Mg. migonei* por *L. infantum* em Pernambuco, Argentina e Ceará, respectivamente.

Pi. fischeri é detectado frequentemente em áreas com casos de LTA e já foi encontrado infectado naturalmente pelos agentes etiológicos da doença (PITA-PEREIRA *et al.*, 2011; ROCHA *et al.*, 2010). Galvis-Ovallos *et al.* (2017) incriminaram *Pi. fischeri* como potencial vetor da *L. infantum* em estudo realizado em área com casos de LVC. Em Santa Catarina, a espécie é comumente encontrada compondo a fauna flebotomínica, porém não foi constatada a infecção por *Leishmania*.

De acordo com Cutolo e Von Zuben (2008), flebotomíneos do gênero *Brumptomyia* não têm importância epidemiológica na transmissão das leishmanioses. Representantes do referido gênero apresentam hábitos zoofílicos restritos, realizando repasto sanguíneo em tatus (*Dasypodidae*). Assim, quanto mais especializada a espécie, menor seu alcance de dispersão e maior sua dependência de *habitats* igualmente especializados (AGUIAR; VIEIRA, 2018). Dessa forma, pode-se inferir que há presença de tatus no CCZ municipal. Destaca-se que dois dos três espécimes coletados foram capturados na armadilha localizada dentro da mata, local onde possivelmente há presença de abrigos desses pequenos mamíferos.

Um único exemplar de *Ev. edwardsi* foi amostrado durante o período de estudo; a espécie é encontrada em ambientes de florestas, sendo incriminada como vetor potencial do agente etiológico da LTA em ambiente silvestre (AGUIAR; VIEIRA, 2018). Embora seja ínfima a amostragem de *Ev. edwardsi* nesta pesquisa, é importante salientar que a espécie já foi encontrada naturalmente infectada por *L. braziliensis* no município de Cotia, na região da Grande São Paulo (SUCEN, 2005).

Ny. neivai ocorre nas regiões mais frias e secas do Brasil e é apontado como um importante vetor da LTA nos estados das regiões sul e sudeste (MCINTYRE *et al.*, 2017). Os autores citados anteriormente ainda pontuam que a faixa climática apropriada para a espécie está atualmente restrita às regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, sendo que mudanças climáticas no futuro tornarão esta última região menos habitável para flebotomíneos da espécie.

Taxas de amostragem de *Ny. neivai* semelhantes às encontradas em nossa pesquisa são descritas por diversos autores. Marcondes *et al.* (2005), em estudo realizado em área de foco de LTA no município de Piçarras, em Santa Catarina, encontraram 94% de flebotomíneos da referida espécie e 23% de *Pi. fischeri*. Silva *et al.* (2008) efetuaram pesquisa flebotomínica em 37 municípios do Estado do Paraná, e *Ny. neivai* foi a espécie predominante, representando 75,6% das capturas, sendo que 7,8% dos espécimes coletados eram *Mg. Migonei*, e 16%, *Pi. fischeri*.

Ny. neivai já foi encontrado infectado naturalmente pelos agentes etiológicos da LTA diversas vezes (CÓRDOBA-LANÚS *et al.*, 2006; NEITZKE-ABREU *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2011; PITA-PEREIRA *et al.*, 2009), inclusive em Santa Catarina, onde Marcondes *et al.* (2009) identificaram uma infecção natural da espécie por *L. brasiliensis*. No referido estudo, 98,5% dos flebotomíneos coletados eram da espécie. Os autores mencionam o aumento da abundância dos insetos comparados a estudos anteriores realizados pelo grupo.

Conforme exposto na literatura, há relatos de infecção natural por *L. infantum* nas três principais espécies encontradas durante esta pesquisa. Porém, a incriminação de espécies como vetores engloba a análise de diversos parâmetros, tais como: densidade do vetor, antropofilia, distribuição geográfica coincidente com a do parasito, sobrevivência e competência vetorial (KILLICK-KENDRICK, 1990).

Em Santa Catarina, tanto nas áreas com caos de LV em humanos quanto em cães, não se identificou *Lu. longipalpis*. Todavia, *Ny. neivai*, espécie altamente antropofílica, sempre é detectada nos levantamentos entomológicos. O relatório de pesquisa entomológica realizado pela Dive (2017), em virtude do primeiro caso humano de LV no Estado, efetuado na residência e adjacências do imóvel onde residia o paciente, apontou para a ausência de *Lu. longipalpis*. Em contrapartida, houve predomínio de *Ny. neivai*; a espécie esteve presente em todas as armadilhas instaladas tanto no intradomicílio quanto no peridomicílio e extradomicílio.

Nessa pesquisa, encontramos taxas elevadas de *Ny. neivai* aliadas à infecção natural por *L. infantum*, que também foi identificada infectando os cães da área de estudo. Ressalta-se que o perfil genético de *L. infantum*, detectado durante as análises moleculares, tanto nos flebotomíneos quanto nos cães, era idêntico, apontando para um único polimorfismo em um dos cães positivos. Ante o exposto, é possível deduzir que *Ny. neivai* esteja alimentando-se do hospedeiro vertebrado (cão) e que a infecção pelo parasito está sendo suportada no interior do inseto, após a digestão do sangue ingerido, podendo o agente etiológico da LV ser transmitido por meio de novas picadas do flebotomíneo. Porém, estudos posteriores quanto à competência vetorial da espécie serão necessários.

Além disso, Dias *et al.* (2013) já haviam identificado *Ny. neivai*, infectado naturalmente por *L. infantum*, na Lagoa da Conceição, em Florianópolis, em uma área com casos de LVC. Contudo, os resultados apresentados aqui são mais robustos, uma vez que a definição molecular da infecção natural por *leishmania* ocorreu com análise individual do DNA, após a triagem inicial, e não em *pool*, como no estudo dos autores citados, gerando, dessa forma, uma taxa de infecção natural fidedigna, e não aproximada. Ademais, a identificação molecular dos flebotomíneos infectados, aliada à morfológica, forneceu consistência, precisão

e confiança quanto à identificação da espécie do vetor. Destaca-se que esta pesquisa fornece as primeiras sequências de DNA *barcode* de *Ny. neivai* do Brasil, contribuindo não só para a identificação da espécie no país, mas também no mundo, visto que as únicas sequências da espécie disponíveis no banco de dados genético (GenBank) são da Argentina, contando com apenas 543 pb (MOYA *et al.*, 2020). As sequências nucleotídicas obtidas neste estudo são maiores, variando entre 554 pb e 672 pb, estando dentro do esperado para o sequenciamento do COI. Dessa forma, os dados gerados poderão auxiliar outros pesquisadores na identificação precisa dessa espécie de flebotomíneo.

A taxa de infecção natural por *Leishmania* detectada nas análises realizadas nesta pesquisa é condizente com as taxas encontradas na literatura. Pita-Pereira *et al.* (2008), em estudo realizado no Mato Grosso de Sul, detectaram taxas de infecção natural por *L. infantum* de 1,5% e 0,7% em flebotomíneos das espécies *Lu. cruzi* e *Lu. forattinii*, respectivamente. Oliveira *et al.* (2011), em estudo no Paraná, constataram que 97,3% dos flebotomíneos capturados eram *Ny. neivai*, com uma taxa de infecção mínima de 0,22% para *Leishmania* (*Viannia*) spp. Dias *et al.* (2013) encontraram taxas de infecção natural de 1,6% para *Ny. neivai*; 0,6% para *Pi. Fischeri*; e 0,3% para *Mg. migonei*.

De acordo com Britto e Pereira (2014), o uso da técnica de PCR tem proporcionado a identificação de infecção natural por *Leishmania* em flebotomos em distintos países que têm ocorrência das leishmanioses, com taxas de infecção variando de 0,22% a 9,1%.

Salienta-se que a infecção natural por *L. infantum* foi constatada nas capturas de flebotomíneos realizadas nos meses de abril e junho de 2019, no ponto amostral 1, no período que havia influência do El Niño. Nos referidos meses, foram encontrados mais dois flebotomíneos infectados por tripanossomatídeos, porém, ao ser realizado o alinhamento com as sequências provenientes do banco de dados GenBank, as taxas de cobertura foram muito baixas (abaixo de 35%), não sendo possível a identificação com precisão da espécie de protozoário envolvida na infecção. Provavelmente, trata-se de espécies de parasitos ainda não sequenciadas, entretanto uma investigação posterior será necessária para tal definição.

Diante da detecção de flebotomíneos infectados por *L. infantum* no CCZ de Tubarão, a equipe julgou prudente testar os cães abrigados na instituição para averiguar se havia um ciclo de transmissão instaurado entre o principal reservatório doméstico e os flebotomíneos.

Todos os 47 cães da instituição que foram testados com a técnica de *swab* conjuntival eram assintomáticos para LVC no momento da coleta de material biológico para o diagnóstico, por meio da técnica de PCR dirigida ao alvo ITS1. Cinco amostras apresentaram amplificação nos testes, porém, ao ser realizada a análise das sequências nucleotídicas obtidas com o

sequenciamento, identificou-se uma taxa de positividade nos animais de 4,2% para *L. infantum*. Infelizmente, em três amostras não foram obtidos resultados conclusivos quanto à espécie de tripanossomatídeo envolvida na infecção, pois apresentaram cobertura e/ou similaridade baixas quando confrontadas com as sequências disponíveis nos bancos de dados genéticos. Todavia, os cinco cães positivos inicialmente nos ensaios tiveram resultados negativos no teste rápido DPP® realizado pelo Lacen para a identificação da LVC.

A conjuntiva ocular apresenta, em sua camada superficial, folículos linfóides que drenam para os linfonodos submaxilares e paratireóides (BARBOSA *et al.*, 2012). Por isso, frequentemente pode-se encontrar formas amastigotas de *Leishmania* nesse tecido.

Leite *et al.* (2010) demonstraram a eficácia do *swab* conjuntival, aliado à PCR (ITS1), para o diagnóstico de LVC em animais assintomáticos. Amostras biológicas de biópsia de pele e sangue também foram analisadas. As taxas de positividade foram 83,3%, 50% e 56,7% para as mostras de *swab* conjuntival, biópsia de pele e sangue, respectivamente. Os autores concluíram que o método empregado é adequado para detectar DNA de *Leishmania* em animais assintomáticos.

Métodos sorológicos e parasitológicos para a detecção das leishmanioses em cães são inadequados para a discriminação das espécies de *Leishmania*, principalmente nos cães infectados sem sinais clínicos da enfermidade, pois a sensibilidade dos testes é baixa (GOMES *et al.*, 2007).

Grimaldi *et al.* (2012) realizaram um estudo para analisar a eficiência do teste rápido DPP® na detecção de LVC. O ensaio apresentou alta especificidade (96%) e baixa sensibilidade (47%) na identificação de cães positivos assintomáticos para a patologia. Todavia, a sensibilidade ao teste foi significativamente maior (98%) em animais doentes, indicando que pode ser útil para identificar os cães mais infecciosos, ou seja, os sintomáticos, fato que não se aplica aos animais analisados do CCZ, pois nenhum apresentava sintomas clínicos para LVC.

Outra hipótese levantada é que o estágio de infecção para LVC nos animais analisados pode ser recente, portanto pode não ter acontecido a soroconversão, sobrepujando resultados negativos no teste sorológico executado pelo Lacen. Esse fator enobrece ainda mais as análises por meio da técnica de PCR, evidenciando sua alta sensibilidade diante de marcadores específicos para a detecção do agente etiológico das leishmanioses.

Além disso, vale alertar que cães vacinados contra leishmaniose testam positivo nos exames sorológicos tradicionais, tornando esses ensaios ineficazes para programas de controle envolvendo animais vacinados, conjuntura que não ocorre com o teste de PCR, pois nessa

análise há detecção do material genético de *Leishmania* e não dos anticorpos produzidos, como ocorre naquele.

Perante o exposto, pode-se inferir que o teste diagnóstico de PCR, realizado durante esse projeto, foi mais sensível na identificação do patógeno causador da LVC em comparação ao teste rápido DPP® aplicado pelo Lacen. As reações de PCR com o marcador molecular ITS1 têm potencial para amplificar tão pouco quanto 0,1 picograma (pg) de DNA de *Leishmania*, que corresponde a cerca de metade do genoma de um parasito (ODIWUOR *et al.*, 2010). A técnica de coleta utilizada, *swab* conjuntival, mostrou-se eficiente para o diagnóstico proposto, além de não causar estresse aos cães durante o procedimento, ao contrário da coleta de sangue, necessária para a realização do teste rápido, que se caracteriza por ser morosa, laboriosa e submeter os animais a estresse.

Este estudo apresenta grande relevância para a ciência, por identificar, pela primeira vez, flebotomíneos da espécie *Ny. neivai* infectados naturalmente por *L. infantum* no mesmo local de ocorrência de cães igualmente contaminados pela mesma espécie de protozoário. Além disso, a técnica de *Swab* conjuntival aliada a PCR, mostrou-se como um método adequado e não invasivo na detecção de *Leishmania* em cães. Na ausência dos vetores tradicionais da LV no Estado de Santa Catarina, sugere-se que *Ny. neivai* seja um potencial vetor e possa estar atuando na transmissão do agente etiológico no Estado. Ademais, foram caracterizadas espécies de vetores da LTA no município pesquisado. Diante do exposto, a pesquisa servirá para a avaliação do risco de transmissão e expansão das leishmanioses, bem como para medidas profiláticas visando o controle da doença no Estado.

5 CONCLUSÃO

A fauna flebotomínica do CCZ do município de Tubarão/SC é representada por alguns dos principais vetores da LTA no Brasil: *Ny. neivai*, *Mg. migonei* e *Pi. fischeri*. Além disso, foi detectada infecção natural por *L. infantum* tanto em flebotomíneos da espécie *Ny. neivai* quanto nos cães abrigados na instituição, sugerindo que *Ny. neivai* possa estar atuando como vetor do parasito causador da LV na região. No entanto, estudos posteriores com o intuito de determinar a competência vetorial da espécie são necessários.

Além disso, a técnica de *swab* conjuntival para a coleta de material biológico mostrou-se eficiente para a detecção de *Leishmania*.

Foi possível realizar a identificação integrativa (junção dos aspectos morfológicos e moleculares) para a determinação das espécies de flebotomíneos infectados, gerando as primeiras sequências de DNA *BARCODE* de *Ny. neivai* do Brasil.

Ademais, constatou-se correlação positiva entre a variável climática temperatura e a abundância dos flebótomos encontrados, indicando relação entre a quantidade de insetos capturados e o aumento da temperatura.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Gustavo M. de *et al.* Aspects of the ecology of phlebotomines (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in an area of cutaneous leishmaniasis occurrence, municipality of Angra do Reis, coast of Rio de Janeiro state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 2, p. 143-149, abr. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652014000200010>. Acesso em: 13 jun. 2021.
- AGUIAR, Gustavo M. de; VIEIRA, Vanessa R. Regional Distribution and Habitats of Brazilian Phlebotomine Species. *In*: RANGEL, Elizabeth F.; SHAW, Jeffrey J. (ed.). **Brazilian Sand Flies: biology, taxonomy, medical importance and control**. Cham, Switzerland: Springer, 2018. *E-book*. p. 251-298. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1>. Acesso em: 10 dez. 2019.
- AGUIAR, Gustavo Marins de; VILELA, Maurício Luiz. Aspects of the ecology of sandflies at the Serra dos Orgãos National Park, state do Rio de Janeiro: VI. Shelters and breeding places (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 4, p. 585-586, dez. 1987. <Http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02761987000400021>. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02761987000400021>. Acesso em: 05 jun. 2021.
- ALTAMIRANDA-SAAVEDRA, Mariano *et al.* Effect of El Niño Southern Oscillation cycle on the potential distribution of cutaneous leishmaniasis vector species in Colombia. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 5, p. 1-17, 28 maio 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008324>. Acesso em: 06 jun. 2021.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal For Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, nov. 2000. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00136-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00136-3). Acesso em: 20 jun. 2020.
- ÁVILA, Márcia Moreira de *et al.* Ecology, feeding and natural infection by *Leishmania* spp. of phlebotomine sand flies in an area of high incidence of American tegumentary leishmaniasis in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 26 jan. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-018-2641-y>. Acesso em: 04 jun. 2021.
- BARBOSA, V.T. *et al.* Detecção de formas amastigotas em exame parasitológico de esfregaço obtido a partir de suabe conjuntival de cães com leishmaniose visceral. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 64, n. 6, p. 1465-1479, set. 2012.
- BLUNDEN, Jessica; ARNDT, Derek S. (ed.). State of the Climate in 2019. **Bulletin of the American Meteorological Society**, North Carolina, v. 101, n. 8, p. 01-429, ago. 2020. Mensal. Disponível em: <https://journals.ametsoc.org/bams/article/101/8/S1/353885/State-of-the-Climature-in-2019>. Acesso em: 03 nov. 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde. 2014. *E-book*. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf. Acesso em: 06 jun. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. Brasília, DF: Ministério da Saúde. 2017. *E-book*. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 05 jun. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota Técnica conjunta nº 01/2011 - CGDT - CGLAB/DEVIT/SVS/MS**. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília, DF: Ministério da Saúde. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais**. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. 2019. *E-book*. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos> Acesso em: 25 jun. 2021.

BRAZIL, Reginaldo P.; BRAZIL, Beatriz G. Biologia de flebotômíneos neotropicais. *In*: RANGEL, Elizabeth F.; LAINSON, Ralph (org.). **Flebotômíneos do Brasil**. 20. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. Cap. 4. p. 257-274.

BRAZIL, Reginaldo P.; BRAZIL, Beatriz G. Bionomy: Biology of Neotropical Phlebotomine Sand Flies. *In*: RANGEL, Elizabeth F.; SHAW, Jeffrey J. (ed.). **Brazilian Sand Flies: biology, taxonomy, medical importance and control**. Switzerland: Springer, 2018. p. 299-318.

BRITTO, Constança F. de Paoli de Carvalho; PEREIRA, Daniela de Pita. Diagnóstico Molecular de *Leishmania* spp. em Flebótomos Provenientes de Áreas de Ocorrência de Leishmanioses. *In*: CONCEIÇÃO-SILVA, Fátima; ALVES, Carlos Roberto (org.). **Leishmanioses do continente americano**. 22. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. Cap. 13. p. 217-231. Disponível em: <https://doi.org/10.7476/9788575415689>. Acesso em: 06 jul. 2021.

BRUIJN, Maarten H.L. de; BARKER, Douglas C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, v. 52, n. 1, p. 45-58, set. 1992. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0001-706x\(92\)90006-j](http://dx.doi.org/10.1016/0001-706x(92)90006-j). Acesso em: 07 jul. 2021.

CARDENAS, Rocio *et al.* Impact of climate variability in the occurrence of leishmaniasis in northeastern Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 2, p. 273-277, 1 ago. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2006.75.273>. Acesso em: 27 maio 2020.

CARDENAS, Rocio *et al.* Zoonoses and Climate Variability: the example of leishmaniasis in southern departments of colombia. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1149, n. 1, p. 326-330, dez. 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1428.094>. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1428.094>. Acesso em: 06 jun. 2021.

CARVALHO, Bruno Moreira *et al.* Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) from Rio de Janeiro State, Brazil: species distribution and potential vectors of leishmaniasis. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 58, n. 1, p. 77-87, mar. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0085-56262014000100013>. Acesso em: 05 jun. 2021.

CARVALHO, Maria Rosimery de *et al.* Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative

vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 116, n. 1, p. 108-110, out. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.03.009>. Acesso em: 27 jun. 2021.

CHAVES, Luis Fernando *et al.* Cutaneous Leishmaniasis and Sand Fly Fluctuations Are Associated with El Niño in Panamá. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. 1-11, 2 out. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003210>. Acesso em: 06 jun. 2021.

CONCEIÇÃO-SILVA, Fátima; ALVES, Carlos Roberto (org.). **Leishmanioses do continente americano**. 22. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014. 512 p. Disponível em: <https://doi.org/10.7476/9788575415689>. Acesso em: 10 mar. 2021.

CÓRDOBA-LANÚS, Elizabeth *et al.* Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. **Acta Tropica**, v. 98, n. 1, p. 1-5, abr. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.11.010>. Acesso em: 20 jun. 2021.

COURA-VITAL, Wendel *et al.* Evaluation of Change in Canine Diagnosis Protocol Adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a New Proposal for Diagnosis. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. 1-6, 7 mar. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0091009>. Acesso em: 06 jul. 2021.

CUTOLO, André A.; VON ZUBEN, Claudio J. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área de cerrado no Município de Corumbataí, Centro-Leste do. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 45-49, mar. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612008000100010>. Acesso em: 20 jun. 2021.

DIAS, Edelberto Santos *et al.* Detection of *Leishmania infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis, in *Lutzomyia neivai*. **Journal Of Vector Ecology**, v. 38, n. 1, p. 193-196, 23 maio 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1948-7134.2013.12028.x>. Acesso em: 20 set. 2020.

DIVE. **Boletim Epidemiológico das Leishmanioses**. Florianópolis: DIVE, 2021.

DIVE. **Guia de Orientação para a Vigilância da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)**. Florianópolis: DIVE, 2020. Disponível em: www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Guia_LCV_2020_29.12.pdf. Acesso em: 10 mar. 2021.

DIVE. **Relatório de pesquisa entomológica**. Florianópolis: DIVE, 2019.

DIVE. **Relatório de pesquisa entomológica**. Florianópolis: DIVE, 2017.

FIGUEIREDO, Fabiano Borges; MADEIRA, Maria de Fátima. Os Parasitos e a Questão da Infecção em Animais Domésticos e Domiciliados. *In*: CONCEIÇÃO-SILVA, Fátima; ALVES, Carlos Roberto (org.). **Leishmanioses do continente americano**. 22. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014. *E-book*. Cap. 15. p. 259-273. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/42089/3/conceicao-9788575415689.pdf>. Acesso em: 06 jul. 2021.

FIGUEIREDO, Helen Rezende de *et al.* Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in an Endemic Area of Leishmaniasis in Aquidauana Municipality, PA. **Revista do Instituto de Medicina**

Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 58, p. 01-12, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201658087>. Acesso em: 04 nov. 2020.

FORATTINI, Oswaldo Paulo. **Entomologia médica**. 4. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1973.

FRANKE, Carlos Roberto *et al.* Impact of El Niño/Southern Oscillation on Visceral Leishmaniasis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 914-917, set. 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3201/eid0809.010523>. Acesso em: 15 set. 2020.

FUENZALIDA, Ana Denise *et al.* Hourly activity of *Lutzomyia neivai* in the endemic zone of cutaneous leishmaniasis in Tucumán, Argentina: preliminary results. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 5, p. 635-638, ago. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762011000500020>. Acesso em: 12 jun. 2021.

GALATI, Eunice Aparecida Bianchi. Morfologia e Taxonomia: classificação de phlebotominae. In: RANGEL, Elizabeth F.; LAINSON, Ralph (org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 23-176.

GALVIS-OVALLOS, Fredy *et al.* Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite**, v. 24, p. 2, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2017002>. Acesso em: 15 jun. 2021.

GOMES, Aparecida H.s. *et al.* PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 3-4, p. 234-241, mar. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.10.008>. Acesso em: 07 jul. 2021.

GRIMALDI, Gabriel *et al.* Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54-59, jan. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.10.001>. Acesso em: 06 jul. 2021.

IBGE. **Cidades**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sc/tubarao/panorama>. Acesso em: 20 out. 2019.

JOWETT, T. **Drosophila, a Practical Approach**. Oxford: IRL Press, 1998.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical And Veterinary Entomology**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 1-24, jan. 1990. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.1990.tb00255.x>. Acesso em: 01 maio 2021.

LAINSON, Ralph; SHAW, Jeffrey J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peter W, Killick-Kendrick R. **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. p. 12-120.

LAINSON, Ralph; SHAW, Jeffrey J. New World Leishmaniasis. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, p. 1-37, 15 mar. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/9780470688618.taw0182>. Acesso em: 01 mar. 2021.

LE, Sebastien *et al.* FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**, v. 25, n. 1, p. 1-18, 2008.

LEITE, Rodrigo Souza *et al.* PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3-4, p. 201-206, jun. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.020>. Acesso em: 01 jul. 2021.

LIMA, Aline Maria Vasconcelos *et al.* Imunomarcção de *Leishmania* sp. e aspectos histológicos na terceira Pálpebra de cães naturalmente infectados por *Leishmania (leishmania) chagasi*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, n. 4, p. 538-547, dez. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1089-6891v16i426859>. Acesso em: 20 mar. 2021.

MANN, Rajinder S.; KAUFMAN, Phillip E. The Seasonal Abundance of Phlebotomine Sand Flies, *Lutzomyia* Species in Florida. **Journal of The American Mosquito Control Association**, v. 26, n. 1, p. 10-17, mar. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2987/09-5901.1>. Acesso em: 23 fev. 2021.

MARCONDES, Carlos Brisola *et al.* Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: psychodidae, phlebotominae) by *leishmania (viannia)* spp. in Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 11, p. 1093-1097, nov. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.12.006>. Acesso em: 04 jun. 2021.

MARCONDES, Carlos Brisola *et al.* Phlebotomine sandflies in a focus of dermal leishmaniasis in the eastern region of the Brazilian State of Santa Catarina: preliminary results (diptera). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 4, p. 353-355, ago. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822005000400016>. Acesso em: 04 jun. 2021.

MARCONDES, Carlos Brisola. **Doenças Transmitidas e Causadas por Artrópodes**. São Paulo: Atheneu, 2009.

MARCONDES, Carlos Brisola. **Entomologia Médica e Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

MARZOCHI, Mauro Celio de A. *et al.* Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro - Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 5-17, mar. 1985. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-311x1985000100002>. Acesso em: 18 out. 2020.

MCINTYRE, Shannon *et al.* Species-specific ecological niche modelling predicts different range contractions for *Lutzomyia intermedia* and a related vector of *Leishmania braziliensis* following climate change in South America. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 24 mar. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-2093-9>. Acesso em: 20 jun. 2021.

MIRANDA, Débora Elienai de Oliveira *et al.* Ecology of sand flies in a low-density residential rural area, with mixed forest/agricultural exploitation, in north-eastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 146, n. 1, p. 89-94, jun. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.03.011>. Acesso em: 14 jun. 2021.

MOLINA, R. *et al.* Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 4, p. 491-493, jul. 1994. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90446-4](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(94)90446-4). Acesso em: 30 jun. 2021.

- MOYA, Sofia L. *et al.* First description of *Migonemyia migonei* (Franc, a) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Psychodidae: Phlebotominae) natural infected by *Leishmania infantum* in Argentina. **Acta Tropica**, v. 152, p. 181-184, dez. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.09.015>. Acesso em: 27 jun. 2021.
- MOYA, Sofia Lorián *et al.* Phylogenetic relationships of closely-related phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of *Nyssomyia* genus and *Lutzomyia* subgenus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 115, p. 1-10, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760200220>. Acesso em: 01 maio 2021.
- NEITZKE-ABREU, Herintha Coeto *et al.* detection of *Leishmania (Viannia)* in *Nyssomyia neivai* and *Nyssomyia whitmani* by multiplex polymerase chain reaction in Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 5, p. 391-395, set. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652014000500004>. Acesso em: 20 jun. 2021.
- NEVES, David Pereira *et al.* **Parasitologia Humana**. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016.
- ODIWUOR, S. Ogado Ceasar *et al.* Universal PCR assays for the differential detection of all Old World *Leishmania* species. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, n. 2, p. 209-218, 9 out. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-010-1071-3>. Acesso em: 07 jul. 2021.
- OLIVEIRA, Diego Molina *et al.* Natural Infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania (Viannia)* spp. in the State of Paraná, Southern Brazil, Detected by Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 2, p. 137-143, fev. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2009.0218>. Acesso em: 20 jun. 2021.
- OLIVEIRA, Gloria Maria Gelle de *et al.* 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**, Pará, v. 3, n. 1, p. 83-94, set. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232010000300012>. Acesso em: 12 jun. 2021.
- OPAS. **Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais**. Washington, D.C: OPAS, 2021. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/54129>. Acesso em: 03 de jun. 2021.
- PACHECO, Raquel S.; CARVALHO-COSTA, Filipe A. Diversidade Genética em Parasitos do Gênero *Leishmania*: uma abordagem molecular. In: CONCEIÇÃO-SILVA, Fátima; ALVES, Carlos Roberto (org.). **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014. *E-book*. Cap. 13. p. 29-38. Disponível em: <https://doi.org/10.7476/9788575415689>. Acesso em: 10 mar. 2021.
- PIMENTA, Paulo F. P. *et al.* Interação Vetor-Hospedeiro: interação. In: RANGEL, Elizabeth F. *et al* (org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 275-289.
- PINTO, Israel de Souza *et al.* DNA Barcoding of Neotropical Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): species identification and discovery within brazil. **Plos One**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 01-18, 27 out. 2015. <Http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0140636>. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0140636>. Acesso em: 10 abr. 2020.

PINTO, M. C. *et al.* Octenol as Attractant to *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the Field. **Journal Of Medical Entomology**, v. 48, n. 1, p. 39-44, 1 jan. 2011. Disponível em: <https://doi-org.ez46.periodicos.capes.gov.br/10.1603/ME10081>. Acesso em: 04 jun. 2021.

PITA-PEREIRA, Daniela de *et al.* Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum* chagasi in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, v. 107, n. 1, p. 66-69, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.04.015>. Acesso em: 07 jul. 2021.

PITA-PEREIRA, Daniela de *et al.* 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. 99, n. 12, p. 905-913, dez. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.06.019>. Acesso em: 27 jun. 2021.

PITA-PEREIRA, Daniela de *et al.* *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. **Acta Tropica**, v. 120, n. 3, p. 273-275, dez. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.09.004>. Acesso em: 10 jan. 2021.

PITA-PEREIRA, Daniela *et al.* First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 4, p. 593-595, 1 abr. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2009.80.593>. Acesso em: 07 nov. 2020.

PUCHALSKI, Leandro Azevedo. **Efeitos da associação ao El Niño e La Niña na temperatura média, precipitação pluvial e no déficit hídrico no estado do Rio Grande do Sul**. 2000. 83 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

QUIROGA, Cristina *et al.* Molecular Identification of *Leishmania* spp. in Sand Flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) From Ecuador. **Journal Of Medical Entomology**, v. 54, n. 6, p. 1704-1711, 12 jul. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/jme/tjx122>. Acesso em: 01 nov. 2020.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna R Foundation for Statistical Computing, 2020. Disponível em: <https://www.R-project.org>. Acesso em: 15 jan. 2021.

RANGEL, Elizabeth F. *et al.* Sand Fly Vectors of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. In: RANGEL, Elizabeth F.; SHAW, Jeffrey J. (ed.). **Brazilian Sand Flies: biology, taxonomy, medical importance and control**. Cham, Switzerland: Springer, 2018. p. 341-380. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1>. Acesso em: 04 jun. 2021.

RANGEL, Elizabeth F.; VILELA, Maurício L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde**

Pública, v. 24, n. 12, p. 2948-2952, dez. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-311x2008001200025>. Acesso em: 05 jun. 2021.

RANGEL, Elizabeth Ferreira; LAINSON, Ralph. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, p. 937-954, nov. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762009000700001>. Acesso em: 03 abr. 2021.

RÊGO, Felipe Dutra *et al.* 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, n. 4, p. 1286-1292, 29 fev. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/jme/tjaa036>. Acesso em: 02 nov. 2020.

RIVAS, Gustavo Bs *et al.* Effects of temperature and photoperiod on daily activity rhythms of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: psychodidae). **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 278, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-278>. Acesso em: 12 jun. 2021.

ROCHA, Leonardo S. *et al.* Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 7, p. 461-466, jul. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.02.005>. Acesso em: 27 jun. 21.

RODRIGUES, Ana Caroline Moura *et al.* Molecular identification of *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) as a potential vector for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Veterinary Parasitology**, v. 220, p. 28-32, abr. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.018>. Acesso em: 10 abr. 2021.

RODRIGUES, Andressa Alencastre Fuzari. **Avaliação do papel epidemiológico das Leishmanioses em Comunidades Inseridas em Área de Preservação Ambiental, Parque Estadual da Serra da Tiririca, Niterói e Maricá, RJ, Brasil**. 2016. 167 f. Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/28087/2/andressa_rodrigues_ioc_dout_2016.pdf. Acesso em: 19 out. 2019.

RODRÍGUES-MORALES, Alfonso J. *et al.* Ecoepidemiologia y epidemiologia satelital: nuevas herramientas en el manejo de problemas en salud pública. **Rev Peru Med Exp Salud Pública**, Lima, v. 1, n. 22, p. 54-63, mar. 2005. Disponível em: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342005000100009. Acesso em: 06 jun. 2021.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. **Rev. Microbiol**, v.55, p. 453-483, 2001.

SCHÖNIAN, Gabriele *et al.* PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, n. 1, p. 349-358, set. 2003. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0732-8893\(03\)00093-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0732-8893(03)00093-2). Acesso em: 10 maio 2020.

SENGHOR, Massila W. *et al.* Ecology of Phlebotomine Sand Flies in the Rural Community of Mont Rolland (Thiès Region, Senegal): area of transmission of canine leishmaniasis. **Plos**

One, v. 6, n. 3, p. 01-08, 21 mar. 2011. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0014773>. Acesso em: 04 nov. 2020.

SHERLOCK, Ítalo Rodrigues de Araújo. Importância Médico-Veterinária: a importância dos flebotomíneos. In: RANGEL, Elizabeth F.; LAINSON, Ralph (org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 15-22.

SHIMABUKURO, Paloma Helena Fernandes *et al.* Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. **Zookeys**, [S.L.], v. 660, p. 67-106, 8 mar. 2017. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5549530/>. Acesso em: 28 out. 2020.

SILVA, Allan M. da *et al.* Diversidade, Distribuição e Abundância de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 2, p. 209-225, abr. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1519-566x2008000200017>. Acesso em: 20 jun. 2021.

SOUZA, Nataly Araújo de; COSTA, Wagner Alexandre. Sand Flies: medical importance. In: RANGEL, Elizabeth F.; SHAW, Jeffrey J. (ed.). **Brazilian Sand Flies: biology, taxonomy, medical importance and control**. Switzerland: Springer, 2018. p. 01-08

SOUZA, Nataly A. *et al.* Analysis of the Copulatory Courtship Songs of *Lutzomyia longipalpis* in Six Populations from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 5, p. 906-913, 1 set. 2004. <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-41.5.906>. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-41.5.906>. Acesso em: 04 jun. 2021.

SUCEN. Superintendência de Controle de Endemias. Encontro de *Lutzomyia edwardsi* infectada na região da Grande São Paulo. **Rev. Saúde Pública**, v.39, n. 1, p. 137-8, 2005.

TAI, N.O. El *et al.* Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 575-579, set. 2000. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0035-9203\(00\)90093-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0035-9203(00)90093-2). Acesso em: 20 maio 2020.

TOLOUEI, Sepideh *et al.* Identification of Leishmania Isolates From Healing and Nonhealing Cutaneous Leishmaniasis Patients Using Internal Transcribed Spacer Region PCR. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 01-04, 1 abr. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5812/jjm.9529>. Acesso em: 07 maio 2021.

TRAVI, Bruno L. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 01-13, 11 jan. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006082>. Acesso em: 29 jun. 2021.

TUBARÃO. Prefeitura Municipal. **Diagnóstico de vegetação**: diagnóstico da vegetação arbórea localizados na área central do município de tubarão nas margens do rio tubarão. Tubarão: Prefeitura Municipal, 2017. Disponível em:

https://static.fecam.net.br/uploads/681/arquivos/982022_DIAGNOSTICO.pdf. Acesso em: 07 mar. 2021.

TUBARÃO. Prefeitura Municipal. **Aspectos físicos do município**. Tubarão, 2015. Disponível em: <https://www.tubarao.sc.gov.br/cms/pagina/ver/codMapaItem/22162>. Acesso em: 07 mar. 2020.

VARIZA, Paula Fassicolo. **Caracterização da fauna de flebotomíneos (DIPTERA: PSYCHODIDAE) no Sul de Santa Catarina, Brasil**. 2016. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2016. Disponível em: <http://www.riuni.unisul.br/handle/12345/2053>. Acesso em: 06 jun. 2021.

VIGODER, Felipe M. *et al.* Phenotypic differentiation in love song traits among sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 28 maio 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0900-8>. Acesso em: 04 jun. 2021