

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Vanessa Osmari

**FAUNA E SAZONALIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE:
PHLEBOTOMINAE) EM ÁREA DE TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE NA
REGIÃO CENTRAL DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Santa Maria, RS
2023

Vanessa Osmari

**FAUNA E SAZONALIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE:
PHLEBOTOMINAE) EM ÁREA DE TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE NA
REGIÃO CENTRAL DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio Sangioni

Santa Maria, RS
2023

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Osmari, Vanessa

Fauna e sazonalidade de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em área de transmissão de leishmaniose na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil / Vanessa Osmari.- 2023.

70 p.; 30 cm

Orientador: Luís Antônio Sangioni

Coorientador: Sônia de Avila Botton

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2023

1. Entomologia 2. Saúde Única 3. Epidemiologia 4. Leishmania spp. 5. Lutzomyia longipalpis I. Sangioni, Luís Antônio II. Botton, Sônia de Avila III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, VANESSA OSMARI, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Vanessa Osmari

**FAUNA E SAZONALIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE:
PHLEBOTOMINAE) EM ÁREA DE TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE NA
REGIÃO CENTRAL DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Medicina Veterinária**.

Aprovada em 03 de março de 2023:

Luís Antônio Sangioni, Dr.
(Presidente/Orientador)

Sônia de Avila Botton, Dr^a. (UFSM)

Jaíne Soares de Paula Vasconcellos, Dr^a. (UFSM)

Luciana Dalla Rosa, Dr^a. (UFRGS)

Lucas Trevisan Gressler, Dr. (UNICRUZ)

Santa Maria, RS
2023

Dedico a Deus, a minha família e a todas as pessoas que me incentivaram na busca desse sonho.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelos valores transmitidos e pelo incentivo na realização dos meus sonhos.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pelo ensino de qualidade durante esses 11 anos de instituição.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) da UFSM pela oportunidade de realizar minha qualificação em um programa de excelência.

Ao meu orientador, professor Dr. Luís Antônio Sangioni pela convivência, ensino, incentivo e oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

A minha coorientadora, professora Dr^a Sônia de Avila Botton por todos os ensinamentos, sempre disposta a prestar auxílio e pela sua colaboração.

Aos meus colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR), meu agradecimento pelos ensinamentos, apoio e por todos os bons momentos durante os últimos 6 anos. Agradeço também aos colegas do Laboratório de Bacteriologia (LABAC) pela convivência e aprendizado.

Aos proprietários das residências em que realizei as visitas e coletas ao longo dos 2 anos. Agradeço pela paciência, parceria e colaboração.

Agradeço ao Professor Dr. Andrey José de Andrade do Laboratório de Parasitologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e ao Getúlio Dornelles de Souza do Laboratório de Reservatórios e Vetores do Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (LACEN/RS) pela valiosa contribuição na identificação dos flebotomíneos.

Aos órgãos de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro na execução desse trabalho.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma me auxiliaram e me incentivaram na busca desse sonho.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”
(José de Alencar).

RESUMO

FAUNA E SAZONALIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) EM ÁREA DE TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE NA REGIÃO CENTRAL DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

AUTORA: Vanessa Osmari
ORIENTADOR: Luís Antônio Sangioni

Os flebotomíneos são insetos da Ordem Diptera, Família Psychodidae e Subfamília Phlebotominae, que incluem alguns gêneros de insetos hematófagos capazes de transmitir protozoários do gênero *Leishmania* que causam leishmaniose visceral humana (LVH), leishmaniose visceral canina (LVC) e leishmaniose tegumentar americana (LTA). Em Santa Maria, na região central do estado do Rio Grande do Sul (RS), é registrada a ocorrência da LVC desde 1985. No entanto, foi a partir de 2017 que houve um aumento na incidência dessa doença. Já em 2021 foram registrados dois casos autóctones de LVH, e o município passou a ser considerado área de transmissão da doença. O objetivo deste estudo foi identificar a fauna de vetores que podem estar envolvidos na transmissão da LVC e LVH, além de realizar testes moleculares para detectar a presença de *Leishmania* spp. nos insetos. Para isso, no período de janeiro de 2021 a dezembro de 2022, armadilhas luminosas modificadas do modelo CDC (Centers for Disease Control) foram instaladas em três bairros da cidade, onde casos de LVC foram relatados anteriormente. Das 89 coletas realizadas foram capturados 119 flebotomíneos pertencentes a cinco espécies: *Pintomyia fischeri* (76/119, 63,86%), *Migonemyia migonei* (23/119, 19,33%), *Lutzomyia longipalpis* (16/119, 13,45%), *Brumptomyia* sp. (2/119, 1,68%) e *Psathyromyia lanei* (2/119, 1,68%). A maioria dos exemplares foram capturados nos meses de fevereiro a abril de 2021 e 2022. Todos os pontos de coleta possuíam condições favoráveis ao encontro dos flebotomíneos, como matéria orgânica, sombreamento e fonte alimentar em abundância. Todas as fêmeas foram testadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e foram negativas para *Leishmania* spp. Relatamos pela primeira vez a presença do principal vetor transmissor do agente na região central do Rio Grande do Sul, *Lu. longipalpis*, além de outras espécies. Embora o DNA de *Leishmania* spp. não tenha sido detectado, esses resultados reforçam a necessidade da implementação de medidas para diminuir a proliferação desses insetos.

Palavras-chave: Entomologia. Saúde Única. Epidemiologia. *Leishmania* spp. *Lutzomyia longipalpis*.

ABSTRACT

FAUNA AND SEASONALITY OF SAND FLIES (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) IN A LEISHMANIASIS TRANSMISSION AREA IN THE CENTRAL REGION OF THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL

AUTHOR: Vanessa Osmari
ADVISOR: Luís Antônio Sangioni

Sandflies are insects of the Order Diptera, Family Psychodidae and Subfamily Phlebotominae, which include some genera of hematophagous insects capable of transmitting protozoa of the genus *Leishmania* that cause human visceral leishmaniasis (HVL), canine visceral leishmaniasis (CVL) and American tegumentary leishmaniasis (ATL). . In Santa Maria, in the central region of the state of Rio Grande do Sul (RS), the occurrence of CVL has been recorded since 1985. However, it was from 2017 onwards that there was an increase in the incidence of this disease. In 2021, two autochthonous cases of HVL were recorded, and the municipality started to be considered an area of transmission of the disease. The aim of this study was to identify the vector fauna that may be involved in the transmission of CVL and HVL, in addition to performing molecular tests to detect the presence of *Leishmania* spp. in insects. For this, from January 2021 to December 2022, modified light traps of the CDC model (Centers for Disease Control) were installed in three neighborhoods of the city, where cases of CVL were previously reported. Of the 89 collections carried out, 119 sand flies belonging to five species were captured: *Pintomyia fischeri* (76/119, 63.86%), *Migonemyia migonei* (23/119, 19.33%), *Lutzomyia longipalpis* (16/119, 13.45%), *Brumptomyia* sp. (2/119, 1.68%), and *Psathyromyia lanei* (2/119, 1.68%). Most specimens were captured from February to April 2021 and 2022. All collection points had favorable conditions for encountering sandflies, such as organic matter, shading and an abundant food source. All females were tested by polymerase chain reaction (PCR) and were negative for *Leishmania* spp. We report for the first time the presence of the main transmitter vector of the agent in the central region of Rio Grande do Sul, *Lu. longipalpis*, in addition to other species. Although the DNA of *Leishmania* spp. has not been detected, these results reinforce the need to implement measures to reduce the proliferation of these insects.

Keywords: Entomology. One Health. Epidemiology. *Leishmania* spp. *Lutzomyia longipalpis*.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1 - Seasonal distribution of sand flies (un), in relation to Average Compensated Temperature (°C) and Total Precipitation (mm), in the period between January 2021 and December 2022, in the municipality of Santa Maria, RS, Brazil.....55

LISTA DE TABELAS

PREFÁCIO

TABELA 1 - Espécies de <i>Leishmania</i> que causam leishmaniose no homem.....	19
--	----

CAPÍTULO I

Table 1 - <i>Lutzomyia longipalpis</i> collected by modified CDC light traps between January 2021 and January 2022, in the peridomicile of residence located the districts Nossa Senhora do Perpétuo Socorro (P1) and Presidente João Goulart (P2), Santa Maria, RS, Brazil.....	36
--	----

CAPÍTULO II

Table 1 - Description of sampling points and species of sand flies captured in the neighborhoods Nossa Senhora do Perpétuo Socorro (P1), Presidente João Goulart (P2) and Cerrito (P3) in Santa Maria, RS, Brazil.....	56
Table 2 - Species of sand flies collected with light traps of the CDC type from January 2021.to December 2022, in the neighborhoods Nossa Senhora do Perpétuo Socorro (P1), Presidente João Goulart (P2) and Cerrito (P3), Santa Maria, RS, Brazil.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATL	American Tegumentary Leishmaniasis
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDC	Centers for Disease Control
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CVL	Canine Visceral Leishmaniasis
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates
HVL	Human Visceral Leishmaniasis
LADOPAR	Laboratório de Doenças Parasitárias
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
MgCl ₂	Magnesium chloride
mM	Milimolar
mm	Milimetro
ng	Nanograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Base Pair
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPGMV	Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
RS	Rio Grande do Sul
U	Unidade
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
VL	Visceral Leishmaniasis
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 IMPORTÂNCIA DAS LEISHMANIOSES.....	17
2.2 ETIOLOGIA, CICLO E TRANSMISSÃO.....	18
2.3 VETORES E ADAPTAÇÃO AO AMBIENTE.....	20
2.4 RESERVATÓRIOS E HOSPEDEIROS.....	24
2.5 VETORES NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL.....	25
3 CAPÍTULO I - FIRST IDENTIFICATION OF <i>Lutzomyia longipalpis</i> IN AN AREA OF VISCERAL LEISHMANIASIS TRANSMISSION IN CENTRAL RIO GRANDE DO SUL STATE, SOUTHERN BRAZIL	27
4 CAPÍTULO II - FAUNA AND SEASONALITY OF SAND FLIES (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) FROM A LEISHMANIASIS TRANSMISSION AREA IN THE CENTRAL REGION OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL	37
5 CONSIDERAÇÕES GERAIS	58
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61

PREFÁCIO

Esta tese está composta por um artigo e um manuscrito científicos que se encontram nas seções CAPÍTULO I e CAPÍTULO II, respectivamente. As seções Material e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo. Para a conclusão do trabalho foi descrito as considerações gerais.

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas pertencem a um complexo de enfermidades que ocorrem principalmente em áreas tropicais e subtropicais, e afetam sobretudo populações que vivem em extrema pobreza. A epidemiologia dessas doenças é complexa e, muitas vezes, relacionada às condições ambientais, onde o acesso ao saneamento básico adequado e a saúde são limitados. Muitos dos agentes causadores dessas doenças são transmitidos por vetores, possuem reservatórios animais e estão associadas a ciclos de biológicos complexos, tornando o seu controle desafiador (PAHO, 2017; WHO, 2022). Dentre essas enfermidades podemos citar as leishmanioses que possuem grande importância para a saúde pública, devido à considerável expansão geográfica, à elevada incidência em animais e humanos e às altas taxas de mortalidade em humanos quando não tratados (ALVAR *et al.*, 2012). Devido a complexidade da doença, integrar a abordagem de Saúde Única (*One Health*) é a chave essencial para o seu controle, através de colaborações multissetoriais e transdisciplinares em todos os aspectos da saúde humana, animal e ambiental (HONG *et al.*, 2020).

Inicialmente a leishmaniose era caracterizada de ambiente silvestre e posteriormente passou por um processo de urbanização, que pode ser atribuído a modificações na cadeia epidemiológica, envolvendo parasito, vetores e hospedeiros. Dentre essas intervenções, destacam-se as alterações ambientais causadas por ações antrópicas, ligadas ao rápido processo migratório em áreas periurbanas (desmatamento e urbanização), a adaptação dos vetores ao peridomicílio com uma diversa preferência alimentar; e a interação e migração de reservatórios infectados para áreas indenes (SALÓMON *et al.*, 2015).

Atualmente, o Brasil é responsável por reportar aproximadamente 97% da casuística em humanos nas Américas, com mais de 2000 casos relatados por ano. A leishmaniose visceral (LV) está amplamente distribuída no Brasil, tendo sido notificada em 24 das 27 Unidades da Federação, atingindo todas as regiões geográficas, com maior número de casos notificados nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste (PAHO, 2021; SINAN, 2022).

Nas áreas urbanas, o cão é considerado o principal reservatório doméstico e apresenta importante papel na manutenção do ciclo do parasito, sendo o principal animal doméstico na cadeia de transmissão de *Leishmania* spp. ao ser humano (ALVAR *et al.*, 2004; BANETH *et al.*, 2008). Isto ocorre, principalmente, devido à alta prevalência da doença nestes animais, com elevado parasitismo na pele e a íntima relação dos cães com o ser humano (DANTAS-TORRES, 2009; PRADO *et al.*, 2011). Porém, a transmissão das leishmanioses só ocorre através da picada do inseto vetor. Diversas espécies de flebotomíneos são consideradas

vetores suspeitos ou confirmados de *Leishmania* spp. Esses insetos pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae e possuem atividade crepuscular e noturna (GUIMARÃES *et al.*, 2014; RÊGO *et al.*, 2014). Com o crescente processo de desmatamento e urbanização, estes insetos, naturalmente silvestres, estão se adaptando também em áreas periurbanas e urbanas, indicando assim a capacidade de habitar ambientes antrópicos (RAMOS *et al.*, 2014).

Desta forma, ampliar o conhecimento sobre a fauna e a sazonalidade dos vetores é de extrema importância para as medidas de monitoramento e controle para as leishmanioses. Para tanto, objetivou-se realizar a identificação da fauna flebotomínica assim como sua sazonalidade e a presença de *Leishmania* spp. nos flebotomíneos encontrados na região estudada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPORTÂNCIA DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema em saúde pública, representando um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção com registro aproximado de 2 milhões de novos casos por ano, manifestadas por diferentes apresentações clínicas (NEVES, 2016). A enfermidade é considerada uma doença negligenciada, pois a maioria dos casos ocorre em países pobres, principalmente devido à falta de saneamento básico, o que contribui para a multiplicação dos vetores, moradias irregulares próximas às áreas de matas, e também, a carência de políticas públicas (WAITE *et al.*, 2016). Além disso, o reduzido potencial de retorno lucrativo para a indústria farmacêutica gera baixo interesse no desenvolvimento de novos fármacos e vacinas para o controle da doença (OLIVEIRA *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2018).

No passado, as leishmanioses eram restritas aos animais silvestres, peridomésticos e aos flebotomíneos de florestas tropicais densas, caracterizando-a como uma doença de caráter silvestre e rural. Os seres humanos eram acidentalmente infectados quando adentravam ou colonizavam áreas próximas a focos silvestres (LAINSON & SHAW, 1979). Porém, ao longo dos anos, esse padrão foi sofrendo alterações e o ciclo de transmissão atualmente ocorre também em pequenos, médios e grandes centros urbanos (BRASIL, 2014).

As leishmanioses ocorrem nos cinco continentes e cerca de 98 países são considerados endêmicos (ALVAR *et al.*, 2012). Nas Américas, as duas formas incidentes são a leishmaniose visceral e a leishmaniose tegumentar americana (LTA) (WHO, 2008). As duas apresentações da doença estão amplamente distribuídas por todo o Brasil, se fazendo presentes em todas as regiões (BRASIL, 2006; CRUZ *et al.*, 2013).

A patogenicidade e a apresentação clínica da doença variam conforme a espécie de *Leishmania* envolvida, a carga parasitária e o estado imunológico do hospedeiro (SCOTT & NOVAIS, 2016). As formas clínicas da infecção em humanos podem ser caracterizadas como cutânea, muco cutânea ou visceral, apresentando gravidade variável. A LTA é considerada a forma com o maior número de casos notificados no mundo com uma estimativa de 1,5 milhões de novos casos por ano (WHO, 2012).

2.2 ETIOLOGIA, CICLO E TRANSMISSÃO

Os agentes etiológicos da leishmaniose são protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, sendo caracterizados como parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear. Possuem ciclo biológico heteroxênico, ou seja, necessitam de hospedeiro invertebrado, representado pelos flebotomíneos, os quais abrigam nas células intestinais a forma flagelada ou promastigota; e um vertebrado, representado por animais silvestres, domésticos, sinantrópicos, além de seres humanos, os quais albergam nos tecidos a forma aflagelada ou amastigota (ANTOINE, 1995; SCHLEIN, 1993).

Animais e humanos se infectam durante o repasto sanguíneo de fêmeas de insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, também denominados de flebotomíneos (LEWIS, 1974). Existem inúmeras espécies capazes de transmitir a leishmaniose, variando conforme a região geográfica, características ambientais e climáticas. No oriente, os principais transmissores da leishmaniose são os insetos pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, contudo, no ocidente são os insetos do gênero *Lutzomyia* (GARDINER et al., 1988). No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia wellcomei*, *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lutzomyia migonei* (BRASIL, 2014). Contudo, na LV, há duas espécies que estão relacionadas com a transmissão da enfermidade de acordo com o Ministério da Saúde, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (BRASIL, 2006).

A primeira fase do ciclo ocorre no intestino médio da fêmea do flebotomíneo infectada. Essa etapa caracteriza-se pelo parasita na forma de promastigota (GOSSAGE et al., 2003). O protozoário se adere à parede do intestino do vetor, dando assim início a sua multiplicação por fissão binária. Em seguida o agente se transforma em promastigota metacíclica, em que é capaz de infectar as células (KWEIDER et al., 1989). Durante esta fase, o parasito sofre uma série de modificações, entre elas a mudança do lipofosfoglicano (LPG), um glicoconjugado presente na membrana do protozoário que tem função na interação entre o parasita e o hospedeiro. A variação na composição das cadeias laterais do LPG é diferente entre as espécies de *Leishmania*. O LPG é um dos fatores principais para determinar a relação inseto vetor - *Leishmania*, sendo responsável pela aderência do protozoário no epitélio do intestino médio do flebotomíneo, evitando assim sua eliminação (SACKS & PERKINS, 1984).

Após a entrada de *Leishmania* spp. no hospedeiro vertebrado, por meio do repasto sanguíneo realizado pela fêmea do flebotomíneo, tem início a segunda fase. Nesta etapa, o

agente é fagocitado por células do sistema fagocítico, como macrófagos e neutrófilos, onde estabelece a infecção. No interior destas células, o parasita sofre uma mudança para a forma amastigota (ALCOLEA *et al.*, 2010) o qual multiplica-se intensamente por fissão binária. Isto acarreta na lise celular e a consequente dispersão de vários parasitas filhas para o meio extracelular, os quais são novamente fagocitados por novas células fagocíticas, conseguindo, dessa forma, se reproduzir em grande escala no organismo do hospedeiro. O ciclo se completará com o repasto sanguíneo do flebotomíneo, que ingere as células infectadas com formas amastigotas que retornarão à fase de promastigota em seu intestino (CARLSEN *et al.*, 2015).

As espécies de *Leishmania* consideradas patogênicas para humanos estão divididas em três subgêneros: *Viannia*, *Leishmania*, (LAINSON & SHAW, 1987) e *Mundinia* (ESPINOSA *et al.*, 2016). As espécies do subgênero *Viannia*, da qual faz parte *L. braziliensis* desenvolvem-se inicialmente na região posterior do intestino do flebotomíneo sendo considerado peripilárico. As espécies do subgênero *Leishmania*, estão restritas a região suprapilárica do intestino do vetor, por exemplo *L. infantum* (LAINSON & SHAW, 1987). Quanto às espécies do subgênero *Mundinia* pouco se sabe quanto a região do intestino dos flebotomíneos onde se desenvolvem (RANGEL & SHAW, 2018).

São conhecidas cerca de 30 espécies de *Leishmania*, das quais 20 são patogênicas para os seres humanos. As espécies de *Leishmania* geralmente apresentam diferenças epidemiológicas e clínicas. Na tabela 1 estão descritas as espécies de *Leishmania* que causam doença em humanos (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

Tabela 1. Espécies de *Leishmania* que causam leishmaniose no homem.

Subgênero	Espécie	Distribuição
<i>Leishmania</i>	<i>L. aethiopica</i>	África (Etiopia, Quênia)
	<i>L. amazonensis</i> (sin. de <i>L. garnhami</i>)	América do Sul (Brasil, Bolívia e Venezuela).
	<i>L. donovani</i> (sin <i>L. archibaldi</i>)	África Central, Sul da Ásia, Oriente Médio, Índia e China.
	<i>L. infantum</i> (sin. de <i>L. chagasi</i>)	Norte da África, Países do Mediterrâneo (Europa e Norte da África), Sudeste da Europa, Oriente Médio, Ásia Central, América do Norte (México), América Central e América do Sul (México, Venezuela, Brasil, Bolívia).
	<i>L. major</i>	África do Norte e Central Oriente Médio, Europa Mediterrânea e Subcontinente Indiano- Ásia Central.
	<i>L. major-like</i>	América do norte (México) e América do sul (Brasil, Equador Paraguai, Peru, Uruguai, Venezuela).
	<i>L. mexicana</i> (sin.	EUA, Equador, Venezuela, Peru.

	<i>L. pifanoi</i>	
	<i>L. tropica</i> (sin. de <i>L. killicki</i>)	África Central, África do Norte, Oriente Médio, Ásia Central e Índia.
Viannia	<i>L. venezuelensis</i>	Norte da América do Sul e Venezuela.
	<i>L. braziliensis</i>	Bacia Amazônica Ocidental e América do Sul (Brasil, Bolívia, Guatemala, Peru, Venezuela).
	<i>L. guyanensis</i>	Norte da América do Sul, Guiana Francesa, Suriname, Brasil e Bolívia.
	<i>L. lainsoni</i>	Brasil, Bolívia e Peru.
	<i>L. lindenbergi</i>	Brasil
	<i>L. naiffi</i>	Brasil e Guiana Francesa.
	<i>L. panamensis</i>	América Central e América do Sul (Brasil, Colômbia, Panamá, Venezuela).
	<i>L. peruviana</i>	Peru e Bolívia.
	<i>L. shawi</i>	Brasil
Mundinia	<i>L. martiniquensis</i>	Martinica e Tailândia.

(Adaptado e modificado de AKHOUNDI *et al.*, 2016 e ESPINOSA *et al.*, 2016)

Portanto, as oito espécies de *Leishmania* reportadas que causam enfermidades à humanos no Brasil são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Leishmania) amazonenses*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Viannia) lindenbergi*, sendo essas sete causadoras da forma tegumentar e *Leishmania (Leishmania) infantum*, da forma visceral (SANTOS, 2019).

2.3 VETORES E ADAPTAÇÃO AO AMBIENTE

Os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são insetos dípteros, de grande importância em saúde pública, uma vez que são responsáveis pela transmissão de bactérias, vírus, além de parasitas, incluindo protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Cerca de 98 espécies de flebotomíneos são considerados vetores (comprovados ou suspeitos de LVH) (MAROLI *et al.*, 2013).

Segundo a classificação de Galati (2003), os flebotomíneos americanos são divididos em 23 gêneros, sendo que os vetores de *Leishmania* estão distribuídos principalmente em sete deles: *Bichromomyia*, *Lutzomyia*, *Migonemyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Psychodopygus* e *Trichophoromyia*.

Esses insetos possuem uma ampla distribuição geográfica, sendo conhecidas aproximadamente 1026 espécies, sendo 539 delas encontradas no Novo Mundo. No Brasil, em termos de riqueza de espécies, a fauna de flebotomíneos da Amazônia é considerada uma das mais diversas do mundo (GALATI, 2018; ANDRADE *et al.*, 2020).

Os flebotomíneos são conhecidos popularmente, dependendo da região geográfica em que se encontram, como: mosquito-palha, birigui, cangalhinha, asinha branca ou tatuquira, e se diferem dos demais dípteros por desenvolverem seu estágio larval em matéria orgânica no solo e não em água, como a maioria dos mosquitos conhecidos (BAHIA *et al.*, 2007). São insetos de pequeno porte (1 a 3 mm), delgados, frágeis, pilosos, possuem dois pares de asas que lhes permitem deslocamento por pequenos saltos. Apresentam atividade crepuscular ou noturna e são holometábolos, ou seja, seu ciclo de vida compreende as fases evolutivas de ovo, larva, pupa e adulto, de formas diferenciadas (BRAZIL & BRAZIL, 2003; LEWIS, 1974).

Os ovos são depositados em micro habitats terrestres, ricos em substrato orgânico, e as larvas ao eclodirem no meio ambiente se alimentam de matéria orgânica em decomposição. Os adultos habitam locais que possuem pequenas variações de temperatura e umidade, como, troncos de árvores, folhas caídas no solo ou frestas de rochas, pois são extremamente sensíveis à dessecação e uma pequena variação desses fatores em seus habitats é suficiente para alterar a sua dinâmica de sobrevivência e dispersão (DIAS *et al.*, 2007).

Os locais de abrigo, geralmente correspondem ao ambiente onde as fêmeas dos flebotomíneos encontram os hospedeiros vertebrados para a realização do repasto sanguíneo (BASIMIKE *et al.*, 1991; COMER & BROWN, 1993; MEMMONT, 1991). Com a destruição das matas nativas, os hábitos naturais destes insetos foram alterados, levando a uma restrição de ambientes e de fonte alimentar, fazendo com que as espécies resistentes às condições adversas explorem novas áreas, aproximando-se cada vez mais dos peridomicílios dos centros urbanos (FORATTINI *et al.*, 1976; GOMES & GALATI, 1989). A maioria das mudanças ambientais que ocorreram nos últimos anos afetaram a epidemiologia das leishmanioses, sugerindo que parasitos e vetores possuem capacidade de se adaptar às alterações ecológicas de acordo com cada região (GRIMALDI JR & TESH, 1993; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

Estes insetos apresentam dimorfismo sexual e diferem-se também pelo hábito alimentar, sendo os machos exclusivamente fitófagos e as fêmeas, além da seiva vegetal, são hematófagas, necessitando de sangue (fonte de aminoácidos e proteínas) para realizar a maturação de seus ovários e a produção de ovos (GALATI *et al.*, 2010; KILLICK-KENDRICK, 1999). Morfologicamente, as principais diferenças entre os sexos estão relacionadas aos últimos segmentos abdominais. A distinção dos sexos dos flebotomíneos faz-se ainda facilmente através da observação dos últimos segmentos abdominais, os quais são modificados para construir a genitália do inseto. Nos machos encontra-se presente um

conjunto de apêndices bem desenvolvidos e ornamentados (estruturas com valor taxonômico), enquanto que nas fêmeas os segmentos menores e discretos dispõem-se como estruturas telescopadas, as quais conferem aspecto arredondado à genitália do inseto. As fêmeas possuem o corpo mais robusto com relação ao dos machos e ainda, internamente, possuem, entre o 8º e 9º segmento abdominal, um par de espermatecas (estrutura em forma de saco utilizada para armazenar os espermatozoides do macho) característico para cada espécie, a qual também tem valor taxonômico (SANTOS, 2014). Além disso, há diferença no aparelho bucal, onde a probóscida dos machos é mais curta e atrofiada, ao contrário das fêmeas que tem a probóscida mais longa e adaptada para picar a pele de vertebrados e sugar o sangue. Outra característica que só se encontra nas fêmeas é a presença do cibário, um conjunto de estruturas quitinizadas, também associado à hematofagia, localizado na região interna e ventral da cabeça (SANTOS, 2014).

As fêmeas dos flebotomíneos geralmente saem à procura de fontes alimentares no período noturno e a escolha pelo hospedeiro vertebrado é um processo ainda incompreendido, podendo apresentar variações entre as espécies. Alguns flebotomíneos possuem preferências limitadas a poucos hospedeiros animais, enquanto outros demonstram um comportamento "oportunista", ou seja, não são seletivos (MISSAWA *et al.*, 2008; QUINNELL *et al.*, 1992; TESH *et al.*, 1971). Provavelmente, essas fêmeas não seletivas possuem maior capacidade vetorial para transmissão de patógenos, visto que podem realizar repastos sanguíneos em uma grande variedade de hospedeiros potencialmente infectados (SACKS *et al.*, 2008).

Apesar do voo saltitante em curtas distâncias ser característico desses insetos, há evidências de determinadas espécies neotropicais que habitam as florestas serem capazes de subir a três metros de altura e permanecerem em voo contínuo por até 20 metros (READY *et al.*, 1986). Do mesmo modo, a dispersão dos flebotomíneos não costuma alcançar longas distâncias, em torno de 200 metros, excepcionalmente 900 metros (ALEXANDER & YOUNG, 1992; CHANIOTIS *et al.*, 1974).

Segundo Killick-Kendrick (1990), existem alguns critérios para vincular a espécie de flebotomíneo como vetor de *Leishmania* spp. Esses critérios referem-se ao comportamento antropofílico; a distribuição geográfica em concordância com a doença; a competência vetorial e a capacidade de infectar-se naturalmente pela mesma espécie responsável pela infecção humana; o grau de afinidade com os reservatórios e com o homem; a densidade e a taxa de infecção natural pelo parasito; a manutenção de todas as etapas do desenvolvimento parasitário nos espécimes infectados experimentalmente em laboratório e a capacidade desses insetos se infectarem e transmitirem experimentalmente o parasita por meio do repasto em

modelos experimentais. Recentemente, após a revisão destes critérios, foi proposto a inclusão de novos parâmetros para a comprovação vetorial de uma espécie de flebotomíneo que incluem, uma modelagem matemática que demonstre que a espécie é fundamental para a manutenção da transmissão do parasito e também a verificação da diminuição da incidência da doença causada pela redução da densidade do vetor específico (READY, 2013).

O desequilíbrio ambiental promove o desalojamento dos vetores e reservatórios silvestres, o que favorece a necessidade de adaptação ao ambiente antropizado. O incremento da densidade populacional contribui para o crescimento do número de moradias em condições favoráveis à sobrevivência e adaptação de vetores, tais como: acúmulo de lixo, ausência de saneamento básico e a presença de diferentes hospedeiros e fonte alimentar (CARDIM *et al.*, 2013; SHAW, 2007). Além disso, as mudanças climáticas também influenciam no comportamento e dispersão dos vetores e reservatórios, sendo que foi observada uma possível expansão de *Lu. longipalpis* para áreas anteriormente consideradas como não receptivas, acompanhando as alterações climáticas daquelas regiões (PETERSON *et al.*, 2017).

A maior parte dos estudos sobre flebotomíneos são baseados na necessidade de investigação de potenciais vetores em áreas de ocorrência de casos de LVH. Essas investigações envolvem a identificação de espécies antropofílicas no raio de abrangência do local provável de infecção e a pesquisa de espécimes naturalmente infectadas (ALEXANDER, 2000). O conhecimento da ecologia dos vetores das leishmanioses e da distribuição associada à influência das variáveis climáticas na densidade populacional dos flebotomíneos constituem importantes elementos para um melhor entendimento dos aspectos epidemiológicos e da dinâmica da doença, podendo favorecer a eficácia das estratégias de controle da enfermidade em áreas de transmissão e impedir que casos ocorram em áreas onde a enfermidade ainda não está circulando (REBÊLO *et al.*, 2001).

Para estudos entomológicos envolvendo insetos hematófagos (principalmente culicídeos, flebotomíneos e ceratopogonídeos), armadilhas luminosas do tipo CDC (*Centers for Disease Control*) são frequentemente utilizadas para capturas, pois elas têm a capacidade de atrair os insetos por uma pequena fonte de luz que os suga para o interior de um recipiente, quando estes se aproximam. A maioria dos insetos coletados por esse tipo de armadilha permanecem vivos até o momento do acondicionamento ao laboratório. As principais vantagens deste tipo de instrumento é que são pequenos, de fácil montagem e permitem a coleta de uma grande diversidade de espécies, possibilitando a coleta em estratos verticais até a copa das árvores. As desvantagens incluem a possibilidade de angariar um número relativamente pequeno de insetos, de danificar os exemplares quando estes passam pelas

palhetas da ventoinha e de não produzirem amostragens relacionadas com a atração humana quando comparadas a armadilhas que utilizam iscas humanas e animais (GORAYEB, 2013). Em função disso, são reconhecidas há muito tempo como as armadilhas mais eficazes e amplamente utilizadas para amostragem de insetos de importância médica, principalmente em estudos de vigilância e monitoramento (FAIMAN *et al.*, 2009).

2.4 RESERVATÓRIOS E HOSPEDEIROS

Em relação aos reservatórios e hospedeiros, uma grande diversidade de vertebrados está envolvida no ciclo de transmissão das leishmanioses. Nas Américas, as ordens que possuem espécies reconhecidas como reservatórios de *Leishmania* spp. são: Rodentia, Marsupialia, Primata, Edentata (Xenartros), Carnivora, Perissodactyla e Chiroptera. Entre estes, o humano é um hospedeiro acidental da infecção (LAINSON *et al.*, 1985). O cão é considerado como uma importante fonte de infecção para os vetores e atua como o principal reservatório doméstico do protozoário causador da LV (DEANE & DEANE, 1954). Uma vez infectados, os cães (sintomáticos ou não) podem apresentar parasitismo cutâneo, possibilitando transmissão de *L. infantum* aos flebotomíneos no momento do repasto sanguíneo (LAINSON & RANGEL, 2005).

Quando comparados aos demais reservatórios da doença, o cão apresenta uma maior taxa de infectividade para o vetor, como também é o que tem maior proximidade com a população humana, fortalecendo a sua importância no ciclo de transmissão da doença para a população humana (LAINSON & RANGEL, 2005). Ressalta-se ainda que em áreas endêmicas para LV, a prevalência da doença nos cães não só supera a doença em humanos, como a elevação da sua incidência eventualmente precede a ocorrência de casos humanos (BELO *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Em felinos domésticos, a leishmaniose é uma doença emergente, que tem sido relatada tanto em áreas endêmicas (PENNISI & PERSICHETTI, 2018) quanto em não-endêmicas (SPADA *et al.*, 2020) e o gato pode apresentar a infecção crônica e desempenhar o papel de hospedeiro e reservatório.

De acordo com alguns autores, os cães apresentam uma grande importância na manutenção da doença, principalmente, em grandes metrópoles, por serem reservatórios naturais do parasito, por estarem associados aos casos de endemias e por manter a endemicidade da LV no meio urbano (CAMPOS *et al.*, 2017; TEIXEIRA-NETO *et al.*, 2014; TELES *et al.*, 2015; URSINE *et al.*, 2016).

Dentre os outros animais domésticos, os abrigos de aves, principalmente galinhas, têm sido associados à presença maciça de *Lu. longipalpis*. Entretanto, essas não participam da manutenção do ciclo da LV, uma vez que são refratárias à infecção (ALEXANDER *et al.*, 2002; BRAZIL *et al.*, 1991; OLIVEIRA-PEREIRA *et al.*, 2008). Apesar dos galináceos não possuírem capacidade de albergar *Leishmania* spp., estas aves são uma fonte de alimentação e atração para as fêmeas de flebotomíneos (ALEXANDER *et al.*, 2002). Estudos demonstraram a possibilidade de utilização de aves como sentinelas para detectar o aparecimento de *Lu. longipalpis*, uma vez que elas produzem anticorpos contra a saliva deste vetor (ALEXANDER *et al.*, 2002; BRAZIL *et al.*, 1991; OLIVEIRA-PEREIRA *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2013).

Entre os principais potenciais reservatórios silvestres e sinantrópicos de *L. infantum* nas Américas foram verificadas várias espécies de mamíferos tais como: *Didelphis marsupialis* e *D. albiventris* (marsupiais), *Thrichomys laurentius* (roedor), *Cerdocyus thous* e *Speothos venaticus* (carnívoros) e *Carollia perspicillata* (quiróptero). Estes animais têm importância na manutenção da circulação do parasito nos ambientes silvestres, sendo que algumas espécies podem fazer a ligação entre o ciclo silvestre e peridoméstico, por possuírem hábitos sinantrópicos como as espécies de marsupiais (ROQUE & JANSEN, 2014).

2.5 VETORES NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

Os primeiros estudos entomológicos conduzidos no estado do Rio Grande do Sul foram realizados na região conhecida como Parque Estadual do Turvo, onde no período de novembro de 1996 a fevereiro de 1997, novembro de 1997 a janeiro de 1998 e novembro de 1998 a janeiro de 1999 foram coletados 5.244 espécimes, compreendendo 12 espécies de *Lutzomyia* e 2 de *Brumptomyia*. As espécies identificadas foram: *Lutzomyia migonei*, *Lutzomyia pessoai*, *Lutzomyia lanei*, *Lutzomyia misionensis*, *Lutzomyia neivai*, *Lutzomyia shannoni*, *Lutzomyia monticola*, *Lutzomyia fischeri*, *Lutzomyia bianchigalatae*, *Lutzomyia schreiberi*, *Lutzomyia correalimai*, *Lutzomyia alphabetica*, *Brumptomyia pintoii* e *Brumptomyia nitzulescui*. Das 920 fêmeas testadas, o DNA de *Leishmania* spp. foi detectado em 2 exemplares de *Lu. pessoai* e em um exemplar de *Lu. misionensis* (SILVA, 1999; 2000).

O primeiro relato do encontro do principal vetor da LV, *Lu. longipalpis* no estado ocorreu em 2008, após um cão ser diagnosticado com a doença no município de São Borja, na fronteira oeste (SOUZA *et al.*, 2009).

Em 2010, estudos entomológicos começaram a ser desenvolvidos em outras regiões para identificar espécies relevantes no ciclo da LTA, como no município de Estrela, na região centro-oriental, onde Eckert & Souza (2010) coletaram 74 flebotomíneos pertencentes a nove espécies: *Brumptomyia cunhai*, *Brumptomyia nitzulescui*, *Lutzomyia edwardsi*, *Lutzomyia fischeri*, *Lutzomyia lanei*, *Lutzomyia migonei*, *Lutzomyia misionensis*, *Lutzomyia neivai* e *Lutzomyia pascalei*. As espécies mais frequentes e importantes epidemiologicamente foram *Lu. neivai* e *Lu. fischeri*, pois indicam a possibilidade de transmissão da LTA, uma vez que estas espécies são comprovadamente antropofílicas e adaptadas às alterações do meio ambiente. Essa pesquisa também identificou pela primeira vez a presença de *Lu. pascalei* no Rio Grande do Sul.

Em 2015 no município de Viamão, na região metropolitana de Porto Alegre, Lindholz coletou 516 flebotomíneos pertencentes às espécies *Lu. neivai*, *Lu. migonei*, *Lu. fischeri* e *Lu. lanei*. Esses insetos foram submetidos a técnicas moleculares onde somente a espécie *Lu. lanei* não foi positiva para *L. infantum* (LINDHOLZ, 2015).

Entre 2014 e 2015, na cidade de Porto Alegre, foram coletados 518 flebotomíneos, pertencentes às espécies *Psathyromyia lanei*, *Brumptomyia* sp., *Migonemyia migonei*, *Pintomyia fischeri* e *Nyssomyia neivai*, onde foi pesquisada a presença de DNA de *Leishmania* spp. A espécie *Pi. fischeri* foi positiva para *L. infantum*, indicando um possível envolvimento no ciclo de transmissão na região avaliada (RÊGO *et al.*, 2019).

Entre 2016 e 2017 três casos autóctones de LVH foram relatados em Porto Alegre. Durante este mesmo período, foram capturados 501 flebotomíneos sendo que *Lu. gaminarai* foi a espécie mais abundante no intradomicílio, enquanto *Mg. migonei* foi a mais abundante no peridomicílio dos locais estudados. O DNA de *L. infantum* foi detectado em *Lu. gaminarai*, *Pi. fischeri* e *Mg. migonei*. O DNA de *L. braziliensis* foi detectado em *Lu. gaminarai* e *Pi. fischeri*. Esses importantes achados indicam um possível papel vetorial de *Pi. fischeri* no ciclo epidemiológico de *L. infantum* no Brasil. Além disso, a primeira detecção documentada de DNA de *Leishmania* em *Lu. gaminarai* pode ser indicativo de múltiplos vetores envolvidos no ciclo das leishmanioses em Porto Alegre, uma vez que até o momento não foram encontrados exemplares de *Lu. longipalpis* (RÊGO *et al.*, 2020).

Embora os estudos citados acima tenham contemplado a fauna de flebotomíneos de algumas regiões, não possuímos dados referentes à região central do Rio Grande do Sul. Para tanto, neste estudo objetivou-se realizar a identificação da fauna flebotomínica assim como sua sazonalidade e a presença de *Leishmania* spp. nos flebotomíneos encontrados.

3 CAPÍTULO I - First identification of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in central Rio Grande do Sul State, southern Brazil

Este capítulo originou um artigo científico que foi publicado na Revista Parasitology Research sob o DOI: 10.1007/s00436-022-07647-9.

1 **First identification of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in central Rio**
2 **Grande do Sul State, southern Brazil**

3

4 Vanessa Osmari¹; Maurício Tatto¹; Andrey José de Andrade²; Fabiana Raquel Ratzlaff¹; Jaíne Soares de Paula
5 Vasconcellos¹; Sônia de Avila Botton¹; Fernanda Silveira Flores Vogel¹; Luís Antônio Sangioni^{1*}

6

7 ¹Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP),
8 Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, nº 1000, Prédio
9 63D, Bairro Camobi. CEP: 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

10 ²Laboratório de Parasitologia Molecular, Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná
11 (UFPR). Avenida Coronel Francisco H. dos Santos, nº 100, Centro Politécnico, Jardim das Américas. CEP:
12 81531-980, Curitiba, Paraná, Brazil.

13

14

15 Corresponding author: Luís Antônio Sangioni

16 Endereço: Av. Roraima, nº 1000, Prédio 63D, Bairro Camobi. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

17 Telephone: +55 (55) 3220-8633

18 E-mail: lasangioni@gmail.com

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31 **First identification of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in central Rio**
32 **Grande do Sul State, southern Brazil**

33

34 **Abstract**

35 Sand flies are hematophagous dipterans and are considered vectors of the parasites belonging to the genus
36 *Leishmania*, which can infect mammals, including humans, and subsequently cause leishmaniasis. Rio Grande
37 do Sul State (RS), southern Brazil, was considered free of this disease for the last few decades. However, several
38 autochthonous cases of visceral leishmaniasis (VL) have been recorded in different municipalities in recent
39 years. Since 2017, cases of canine visceral leishmaniasis (CVL) have been reported in the municipality of Santa
40 Maria, located in the central region of RS. In 2021, two cases of human VL were confirmed in the city, resulting
41 in one death. To capture the possible vectors involved in the disease transmission cycle, Centers for Disease
42 Control (CDC) modified light traps were installed in the peridomestic residential areas. These
43 points were situated in two city districts where cases of CVL had been reported from January 2021 to January
44 2022. In the 41 sample collections of sand flies, 9 specimens of *Lutzomyia longipalpis* were identified,
45 confirming the municipality as an area of VL transmission, according to Brazilian sanitary standards. The spread
46 of *Leishmania* spp. has been occurring efficiently, resulting in a negative impact on the One Health. This study
47 reports the first detection of *L. longipalpis* in the central region of RS.

48

49 **Keywords:** Phlebotominae, Vector, Visceral leishmaniasis, One Health, Epidemiology.

50

51 **Introduction**

52 Sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) are hematophagous insects and vectors of parasites
53 belonging to the genus *Leishmania*, which can infect mammals and cause leishmaniasis. Brazil has one of the
54 highest numbers of reported cases of cutaneous and visceral leishmaniasis worldwide (OPAS 2017).

55 Infection occurs when female of sand flies bite susceptible hosts and release promastigotes into the
56 host's blood stream. Macrophages phagocytose these promastigote forms, which undergo binary division within
57 the macrophages and transform into amastigote forms. Upon lysis, macrophages release the amastigotes into the
58 blood and/or lymphatic stream, triggering an inflammatory reaction and infecting other cells of the immune
59 system, continuing the cycle in the vertebrate host. Sand flies ingest the amastigotes during another blood meal

60 and the amastigotes undergo transformation to different forms of promastigotes within the vector, which
61 continue their multiplication until they are inoculated into other susceptible hosts (CDC 2020).

62 From the 1980s, the visceral leishmaniasis (VL) distribution began to occur in peri-urban and urban
63 areas. The spread of VL in southern Brazil was influenced by the urbanization processes, poor basic sanitation
64 conditions, favorable environmental conditions for sand fly multiplication, and displacement of infected people
65 and animals to non-endemic areas, among other factors (Pasquali et al. 2019). Thus, VL has become an
66 important public health concern due to the spread of infection coupled with ineffective control measures (Silva et
67 al. 2019). Surveillance of canine visceral leishmaniasis (CVL) cases takes place actively in endemic areas, as
68 recommended by the “Visceral Leishmaniasis Prevention and Control Plan” (Brasil 2014).

69 The state of Rio Grande do Sul (RS; southern Brazil) was considered a VL-free area two decades ago.
70 However, over the years, several autochthonous cases of CVL have been reported in different cities (Deboni et
71 al. 2011). In addition, autochthonous cases of human visceral leishmaniasis (HVL) have been reported in areas
72 where CVL had previously occurred, changing the health status of RS to an area of VL transmission. Numerous
73 sand fly species are capable of transmitting leishmaniasis, and their distribution varies according to the
74 geographic region and climatic characteristics. In the East, the transmitters of VL are insects belonging to the
75 genus *Phlebotomus*; however, in the West, they are insects of the genus *Lutzomyia* (Gardiner et al. 1988). There
76 are two recognized species related to VL transmission in Brazil: *Lutzomyia longipalpis* (*L. longipalpis*) and
77 *Lutzomyia cruzi* (Brasil 2014). However, HVL cases have also been reported in Porto Alegre, the capital of RS,
78 where *L. longipalpis* is absent (Rêgo et al. 2019). In 2021, two autochthonous cases of HVL were reported in
79 Santa Maria (RS), of which one patient died (Wille 2021a, b). Nevertheless, until that year, there was no
80 description of the sand fly species that could be involved in the transmission cycle of CVL and HVL in the
81 municipality. This study aimed to identify the main vectors involved in the disease transmission in the city.

82

83 **Material and methods**

84 Santa Maria is located in the central region of Rio Grande do Sul State, southern Brazil (29°41'02"S and
85 53°48'25"W, 113 m altitude) (IBGE 2021).

86 To perform this study, all of the occurrences of CVL in Santa Maria from 2017 to 2020 were recorded.
87 The traps were placed in two districts of Santa Maria, Nossa Senhora do Perpétuo Socorro, in the northern region
88 (P1) (29°40'29.03"S, 53°48' 38.04"W) and Presidente João Goulart in the northeast region (P2) (29°40'47.92"S,

89 53°47'29.07"W), 1.94 km apart. The modified CDC traps (Horst™ model) were placed between January 2021
90 and January 2022 in the peridomicile of the residences.

91 The environment was evaluated to verify favorable conditions for sand flies, including the presence of
92 domestic animals, organic matter, humidity, vegetation, and shaded areas. At each collection point, the trap was
93 placed approximately 1.5 m above the ground in the afternoon (6:00 pm) and collected the following day (06:00
94 am). All traps were replaced at least once a month in each household. The collection bag was sent to the
95 Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) at Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) to separate
96 the captured insects. The apparatus was placed in a freezer at - 20 °C for 30 min to immobilize the arthropods.
97 After this procedure, all insects were examined under a stereoscopic microscope (Olympus™) and the dipterans
98 of interest were selected. Only the sand flies were screened according to their external morphological
99 characteristics, such as the size and presence of bristles throughout the body, especially on the wings; other
100 insects present in the collection bags were discarded.

101 The specimens were sent to the Laboratório de Parasitologia Molecular at Universidade Federal do
102 Paraná (UFPR) for species identification according to the taxonomic key of Galati (2018).

103

104 **Results and Discussion**

105 During the study period, a total of 41 collections were performed resulting in 9 specimens of sand flies
106 captured from two districts in Santa Maria, RS, Brazil (Table 1). All sand flies specimens were captured between
107 February and April 2021. The environmental characteristics observed in P1 included areas with vegetation close
108 to streams with abundant organic matter and humidity, and the presence of cats, while in P2 a patio with shaded
109 area was verified surrounded by bamboo with organic matter, and the presence of dogs.

110 The first report of *L. longipalpis* in RS occurred in 2008, after a dog was diagnosed with the disease in
111 the municipality of São Borja, on the border with Argentina (Souza et al. 2009). Lainson and Rangel (2005)
112 demonstrated that *L. longipalpis* has a wild origin and is gradually adapting to rural and urban areas,
113 demonstrating a high degree of adaptability to anthropic environments (Salomón et al. 2015). Sand fly adaptation
114 is favored by their varied hematophagous feeding habits. Moreover, they have a wide variety of vertebrates as
115 blood meal sources, such as wild animals (rodents, foxes, armadillos, and skunks), domestic and production
116 animals (dogs, pigs, horses, cattle, and chickens), and humans (Macedo-Silva et al. 2014). In our study, the
117 vector was adapted to the peridomicile, finding favorable conditions for its survival and multiplication, such as
118 sources of food, shelter, and organic matter.

119 The most important reservoir host for the maintenance and transmission of VL to humans is the
120 domestic dog (*Canis familiaris*) (Steindel et al. 2013). Infected dogs represent approximately 40–60% of
121 seropositive animals and can remain clinically healthy (asymptomatic) for long periods (months to years),
122 facilitating the spread of disease to other animal species and humans (Barata et al. 2013).

123 Infection cases in humans are usually preceded by canine cases, because dogs have a greater cutaneous
124 parasitism than humans, making acquisition of the parasite by vectors easier. In this context, symptomatic and
125 asymptomatic seropositive dogs play an important role in maintaining the disease cycle in urban areas (Steindel
126 et al. 2013).

127 Confirming the presence of the vector in the studied region was important, as it will help health
128 authorities monitor disease spread, implement vector control and promote CVL interventions in the
129 municipalities of the central region in order to prevent new cases of HVL.

130

131 **Conclusions**

132 This is the first study to report the presence of *L. longipalpis* in the central region of Rio Grande do Sul,
133 Brazil. The presence of two autochthonous cases of HVL in Santa Maria, the vector availability and existence of
134 favorable conditions for the multiplication of sand flies in peridomiciliary environments favor the maintenance
135 of *Leishmania* spp. cycle, resulting in a negative impact on One Health. More studies should be conducted to
136 increase the knowledge about *L. longipalpis* and other vectors involved in the transmission of leishmaniasis in
137 southern Brazil.

138

139 **Funding**

140 This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -
141 Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

142

143 **Conflicts of interest**

144 The authors declare that they have no conflict of interest.

145

146 **Availability of data and material**

147 Not applicable.

148

149 **Authors' contributions**

150 All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and
151 analysis were performed by [Vanessa Osmari], [Maurício Tatto], [Andrey José de Andrade], [Fabiana Raquel
152 Ratzlaff], [Jaíne Soares de Paula Vasconcellos], [Sônia de Avila Botton], [Fernanda Silveira Flores Vogel], and
153 [Luís Antônio Sangioni]. The first draft of the manuscript was written by [Vanessa Osmari] and all authors
154 commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

155

156 **Ethics approval**

157 Not applicable.

158

159 **Consent to participate**

160 Informed consent was obtained from all individual participants (owners of evaluated locations) included
161 in the study.

162

163 **Consent for publication**

164 The participant has consented to the submission of the case report to the journal.

165

166 **References**

- 167 Barata RA, Peixoto JC, Tanure A, Gomes ME, Apolinário EC, Bodevan EC, de Araújo HS, Dias ES, da Costa
168 Pinheiro A (2013) Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in
169 Minas Gerais State, Brazil. *Biomed Res Int* 2013:405083. <https://doi.org/10.1155/2013/405083>
- 170 Brasil (2014) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância
171 Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1. ed., 5. reimpr. Brasília, DF. 120 p.
172 http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf.
- 173 Accessed 02 May 2022
- 174 Center for Disease Control (2020). Biology. <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Accessed
175 18 May 2022
- 176 Deboni SC, Barbosa M, Ramos RR (2011) Leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul. *Bol Epidemiol* 13(1):1–
177 8. <https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201812/27124724-n-1-marco.pdf>. Accessed 10 May 2022

- 178 Galati EAB (2018) Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): classification, morphology and terminology of adults
179 and identification of American taxa. In: Rangel EF, Shaw JJ (eds) Brazilian sand flies: biology, taxonomy,
180 medical importance and control. Springer, Gewerbestrasse, pp 9–212. [https://doi.org/10.1007/](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_2)
181 [978-3-319-75544-1_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_2)
- 182 Gardiner CH, Fayer R, Dubey, JP (1988) An atlas of protozoan para- sites in animal tissues. United States
183 Department of Agriculture. <https://naldc.nal.usda.gov/download/CAT89916886/PDF>
- 184 Ibge (2021) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades e Estados.
185 <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/rs/santa-maria.html>. Accessed 18 May 2022
- 186 Lainson R, Rangel EF (2005) *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral
187 leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 100(8):811–827.
188 <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000800001>
- 189 Macedo-Silva VP, Martins DR, De Queiroz PV, Pinheiro MP, Freire CC, Queiroz JW, Dupnik KM, Pearson RD,
190 Wilson ME, Jeronimo SM, Ximenes M de FFM (2014) Feeding preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:
191 Psychodidae), the sand fly vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). J Med Entomol
192 51(1):237–244. <https://doi.org/10.1603/me12131>
- 193 OPAS (2017). Organização Pan-americana da Saúde. Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas:
194 Washington: Organização Pan-Americana da Saúde. www.paho.org/leishmaniasis. Accessed 10 May 2022
- 195 Pasquali AKS, Baggio RA, Boeger WA, González-Britez N, Guedes DC, Chaves EC, Thomaz-Soccol V (2019)
196 Dispersion of *Leishmania (Leishmania) infantum* in central-southern Brazil: evidence from an integrative
197 approach. PLOS Negl Trop Dis 13(8):e0007639. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007639>
- 198 Rêgo FD, Souza GD, Dornelles LFP, Andrade Filho JD (2019) Ecology and molecular detection of *Leishmania*
199 *infantum* Nicolle, 1908 (Kinetoplastida: Trypanosomatida) in wild-caught sand flies (Psychodidae:
200 Phlebotominae) collected in Porto Alegre, Rio Grande do Sul: a new focus of visceral leishmaniasis in Brazil. J
201 Med Entomol 56(2):519–525. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy175>
- 202 Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MMS, Rangel EF (2015) *Lutzomyia longipalpis*
203 urbanisation and control. Mem Inst Oswaldo Cruz 110(7):831–846. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150207>
- 204 Silva FT, Silva GO, Azevedo GHM, De Sá CBN, Coutinho OMVC, Arrais BM, Silva RS (2019) Aspectos
205 Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral no Estado do Tocantins no Período de 2007 a 2017. Ver Patol
206 Tocantins 6(2):5–9. <https://doi.org/10.20873/uft.2446-6492.2019v6n2p5>

207 Souza GD, Santos E, Andrade Filho JD (2009) The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in
208 America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio
209 Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 104(8):1181–1182.
210 <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000800017>

211 Steindel M, Menin A, Evangelista T, Stoco PH, Marlow MA, Fleith RC, Pilati C, Grisard EC (2013) Outbreak of
212 autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. Pesq Vet Bras 33(4):490–496.
213 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000400013>

214 Wille J (2021a) Pela primeira vez, Santa Maria registra casos e óbito de humanos com leishmaniose. Diário de
215 Santa Maria. (a) [https://diariosm.com.br/not%C3%ADcias/sa%C3%BAde/v%C3%ADdeo-](https://diariosm.com.br/not%C3%ADcias/sa%C3%BAde/v%C3%ADdeo-pela-primeira-vez-santa-maria-registra-casos-e-%C3%B3bito-de-humanos-com-leishmaniose-1.2339002)
216 [pela-primeira-vez-santa-maria-registra-casos-e-%C3%B3bito-de-humanos-com-leishmaniose-1.2339002](https://diariosm.com.br/not%C3%ADcias/sa%C3%BAde/v%C3%ADdeo-pela-primeira-vez-santa-maria-registra-casos-e-%C3%B3bito-de-humanos-com-leishmaniose-1.2339002)
217 Accessed 12 December 2021a

218 Wille J (2021b) Desde 2017 foram pelo menos 116 casos de leishmaniose em animais em Santa Maria. Diário de
219 Santa Maria. (b) [https://diariosm.com.br/not%C3%ADcias/sa%C3%BAde/desde-](https://diariosm.com.br/not%C3%ADcias/sa%C3%BAde/desde-2017-foram-pelo-menos-116-casos-de-leishmaniose-em-animais-em-santa-maria-1.2339001)
220 [2017-foram-pelo-menos-116-casos-de-leishma-](https://diariosm.com.br/not%C3%ADcias/sa%C3%BAde/desde-2017-foram-pelo-menos-116-casos-de-leishmaniose-em-animais-em-santa-maria-1.2339001)
221 [niose-em-animais-em-santa-maria-1.2339001](https://diariosm.com.br/not%C3%ADcias/sa%C3%BAde/desde-2017-foram-pelo-menos-116-casos-de-leishmaniose-em-animais-em-santa-maria-1.2339001) Accessed 12 December 2021b

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237 Table 1 – *Lutzomyia longipalpis* collected by modified CDC light traps between January 2021 and January 2022,
 238 in the peridomicile of residence located the districts Nossa Senhora do Perpétuo Socorro(P1) and Presidente João
 239 Goulart(P2), Santa Maria, RS, Brazil.

Point	Collections	Specimens (%)	Genera	Total (%)
P1	25	3 (33.3%)	2 ♂	22.2%
			1 ♀	11.1%
P2	16	6 (66.7%)	2 ♂	22.2%
			4 ♀	44.4%

240 **4 CAPÍTULO II – Fauna and seasonality of sand flies (Diptera: Psychodidae:**
241 **Phlebotominae) from a leishmaniasis transmission area in the central region of Rio**
242 **Grande do Sul, Brazil**

243

244

245 Este capítulo originou um artigo científico que foi submetido para publicação na
246 Revista Parasitology Research.

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266 **Fauna and seasonality of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from a leishmaniasis**
267 **transmission area in the central region of Rio Grande do Sul, Brazil**

268

269 Vanessa Osmari¹; Maurício Tatto¹; Getúlio Dornelles Souza²; Fabiana Raquel Ratzlaff¹; Jaíne Soares de Paula
270 Vasconcellos¹; Sônia de Avila Botton¹; Fernanda Silveira Flores Vogel¹; Luís Antônio Sangioni^{1*}

271

272 ¹Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP),
273 Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, nº 1000, Prédio
274 63D, Bairro Camobi. CEP: 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

275 ²Laboratório de Reservatórios e Vetores, Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul. Avenida
276 Ipiranga, nº 5400, Bairro Jardim Botânico. CEP: 90610-030, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

277

278

279 Corresponding author: Luís Antônio Sangioni

280 Endereço: Av. Roraima, nº 1000, Prédio 63D, Bairro Camobi. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

281 Telephone: +55 (55) 3220-8633

282 E-mail: lasangioni@gmail.com

283 ORCID: 0000-0002-2364-1084

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

**Fauna and seasonality of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from a leishmaniasis
transmission area in the central region of Rio Grande do Sul, Brazil**

297

Abstract

Sand flies are insects in the Order Diptera, Family Psychodidae, and Subfamily Phlebotominae, which include hematophagous insect genera capable of transmitting *Leishmania* spp., which cause human visceral leishmaniasis (HVL), canine leishmaniasis (CVL), and American tegumentary leishmaniasis (ATL). In Santa Maria, in the central region of Rio Grande do Sul (RS), CVL has been recorded since 1985. However, since 2017, there has been an increase in the incidence of this disease in dogs. In 2021, two autochthonous cases of HVL were registered in the municipality, which is an area of disease transmission. The objective of this study was to identify the fauna of these vectors that may be involved in CVL and HVL transmission. Modified Centers for Disease Control (CDC) light traps were installed in three neighborhoods of the city where cases of CVL were previously reported, from January 2021 to December 2022. Of the 89 collections carried out, 119 sand flies of five species were captured: *Pintomyia fischeri* (76/119, 63.86%), *Migonemyia migonei* (23/119, 19.33%), *Lutzomyia longipalpis* (16/119, 13.45%), *Brumptomyia* sp. (2/119, 1.68%), and *Psathyromyia lanei* (2/119, 1.68%). Most insects were captured between February and April in 2021 and 2022. All female individuals were tested using polymerase chain reaction and were negative for *Leishmania* spp. The presence of these species in the environment constitutes the first report of dipterans in central RS. Although *Leishmania* spp. DNA was not detected in these vectors, these results reinforce the need to implement measures to reduce the proliferation of these insects.

315

Keywords: entomology, One Health, epidemiology, *Leishmania* spp., *Lutzomyia longipalpis*.

317

Introduction

There are 1,026 species of Phlebotominae known worldwide, 539 of which have been recorded in the Americas, 277 of which occur in Brazil (Shimabukuro et al. 2017; Galati 2018; Andrade et al. 2020), and 23 in Rio Grande do Sul (RS) (Dias et al. 1997; Silva and Grunewald 1999; Silva et al. 2004; Andrade Filho et al. 2007; Souza et al. 2009). Sand flies are insects in the order Diptera, subfamily Nematocera, family Psychodidae, and subfamily Phlebotominae. This subfamily includes several genera of blood-sucking insects of considerable importance in One Health, as some species have vectorial capacity for transmitting *Leishmania* spp.; these cause

325 human visceral leishmaniasis (HVL), canine visceral leishmaniasis (CVL), and American tegumentary
326 leishmaniasis (ATL) (Dantas-Torres 2009). These are among the most prevalent insect-transmitted endemic
327 diseases worldwide. Brazil has the highest number of cases in the American continent (PAHO 2010; WHO 2003,
328 2017).

329 In the Americas, visceral leishmaniasis (VL) is endemic in 12 countries, and from 2001 to 2017,
330 approximately 60,000 notifications were registered in humans, resulting in approximately 3,000 cases annually
331 on average, 96% of which were in Brazil (OPAS 2019). VL is primarily caused by *Leishmania infantum* in
332 Brazil, which is transmitted by *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* (Queiroz 2012). In addition, several
333 studies have also reported *Nyssomyia neivai*, *Pintomyia fischeri*, and *Migonemyia migonei* being involved in
334 disease transmission (Carvalho et al. 2010b; Salomón et al. 2010; Dias et al. 2013; Guimarães et al. 2016).

335 In urban areas, dogs (*Canis familiaris*) are the main infection reservoirs and sources. Canine enzooty
336 preceded human cases, and infection in dogs is more prevalent than that in humans. The best-known reservoirs in
337 the wild are foxes (*Dusicyon vetulus* and *Cerdocyon thous*) and marsupials (*Didelphis albiventris* and *Didelphis*
338 *marsupialis*) (Brasil 2014). Furthermore, studies involving *Leishmania* spp. and bats have demonstrated
339 mammalian involvement in the protozoan lifecycle (Savani et al. 2010; Shapiro et al. 2013; Ratzlaff et al. 2022).
340 In the state of Rio Grande do Sul, the first autochthonous cases occurred in dogs in 2008 and in humans the
341 following year. This was the first record of the main vector, *Lu. longipalpis*, in the municipality of São Borja,
342 RS. In 2008, the state was considered an area of disease transmission (Souza et al. 2009; Santos et. al. 2011,
343 Brasil 2014). In addition, in 2022, the occurrence of this sand fly was identified for the first time in the central
344 region of the state, which had an impact on the epidemiological change in the region, being considered an area of
345 transmission of the disease by the Brazilian Ministry of Health (Osmari et al. 2022).

346 According to the State Department of Health of Rio Grande do Sul, eight municipalities registered the
347 presence of *Lu. longipalpis* until 2017. However, the municipalities of Viamão, Porto Alegre, and Santa Cruz do
348 Sul did not register the main vector, with cases occurring in dogs and humans. The affected individuals lived
349 close to forest fragments, and transmission was attributed to sand flies belonging to wild fauna (Rio Grande do
350 Sul 2017). In Porto Alegre, 777 CVL cases were reported between 2010 and 2021, and 20 HVL cases were
351 confirmed between 2016 and 2021 (Rio Grande do Sul 2022). Although *Lu. longipalpis* is the most common *L.*
352 *infantum* vector in Brazil, it is not part of the sand fly fauna of Porto Alegre, suggesting that other species may
353 be responsible for transmission. Rêgo et al. (2019, 2020) identified *Pi. fischeri*, *Mg. migonei*, and *Lu. gaminarai*

354 containing *L. infantum* DNA in two districts of Porto Alegre using PCR, where there were autochthonous cases,
355 suggesting involvement of other species in the disease cycle.

356 Sporadic CVL cases have been reported in Santa Maria since 1985 (Pocai et al. 1998). However, as of
357 2017, there has been a considerable increase in CVL incidence (116 cases) and in 2021, two autochthonous
358 human cases were recorded, one of which contributed to the patient's death (Wille 2021 a, b).

359 Regarding ATL, in 2016 alone, 17 countries registered approximately 49,000 cases. Brazil has the
360 highest disease occurrence (12,690 cases) (OPAS 2019). It should be noted that in 2003, autochthony was
361 confirmed in all states (Brasil 2010). ATL is caused by the species *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia)*
362 *guyanensis*, *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) naiffi*, *L. (Viannia) shawi*, *L. (Viannia) lindenbergi*, and *L.*
363 *(Leishmania) amazonensis* (Brasil 2017). The main vectors reported in the cycle of this disease were:
364 *Bichromomyia flaviscutellata*, *Nyssomyia intermedia*, *Ny. neivai*, *Pi. fischeri*, *Mg. migonei*, and *Nyssomyia*
365 *whitmani* (Shimabukuro 2011).

366 Until 2000, there were no records of autochthonous ATL cases in Rio Grande do Sul. In 2001, three
367 cases were diagnosed: two in the city of Santo Antônio das Missões and one in the municipality of Viamão
368 (Santos et al. 2005). However, the first autochthonous confirmation of ATL was performed in 2002 (Souza et al.
369 2008). It should be noted that from 2002 to 2010, 23 autochthonous cases were reported in Porto Alegre (Rio
370 Grande do Sul 2018). The probable vectors related to ATL were *Ny. neivai*, *Pi. fischeri* and *Mg. migonei*
371 (Gonçalves 2003; Souza et al. 2008; Pita-Pereira et al. 2009). There is no record of ATL in humans in Santa
372 Maria; however, the presence of vectors is an important risk factor.

373 According to the VL and ATL Control Programs, recommended by the Brazilian Ministry of Health, the
374 objective of entomological investigations is to collect quantitative and qualitative information on transmitting
375 sand flies in order to obtain new knowledge of the bioecology of insect species pertinent to human health (Brasil
376 2014, 2017).

377 Therefore, this study aimed to identify sand fly fauna potentially involved in the transmission of
378 leishmaniasis, in a disease transmission area in the interior of the state of RS, and to present data related to the
379 seasonal behavior of the main species found.

380

381 **Materials and methods**

382 The municipality of Santa Maria is located in central Rio Grande do Sul, southern Brazil, at
383 29°41'02''S and 53°48'25''W and an altitude of 113 m. The city has an area of 1,780.194 km² and a population
384 of 285,159 inhabitants (IBGE 2021).

385 To capture the insects, modified CDC traps (HorstTM model) were installed in locations with previous
386 CVL notifications from the Environmental Surveillance of the Municipality of Santa Maria. These locations
387 were visited to request authorization from residents to install traps. Thus, three different locations were selected:
388 Nossa Senhora do Perpétuo Socorro in the North (P1), Presidente João Goulart in the Northeast (P2), and Cerrito
389 in the Center-East region (P3) (Table 1). Traps were installed according to the availability of residents to monitor
390 and on days with no precipitation or strong winds.

391 The traps were installed in the peridomicile, which were evaluated: the presence of domestic animals,
392 organic matter, undergrowth, and fruit trees with shaded areas. The collections were carried out in the period
393 between January 2021 and December 2022. The traps were placed approximately 1.5 m above the ground,
394 activated at dusk (06:00 pm), and removed at dawn the next day (06:00 am), remaining uninterrupted for 12 h,
395 coinciding with the feeding habits of sand flies. The devices were allocated at least once per month to each
396 selected household. The temperature, precipitation, and humidity for the study period were obtained from the
397 National Institute of Meteorology (INMET 2022).

398 After removing the traps, the collection bags were sent to the Laboratório de Doenças Parasitárias of the
399 Universidade Federal de Santa Maria for captured insect selection. To dispatch the captured arthropods, the
400 collection bag was stored in a freezer at -20°C for 30 min. After this, all insects were examined under a
401 stereoscopic microscope (Olympus®), and sand flies were screened according to external morphological
402 characteristics, including size, presence of bristles throughout the body, and lanceolate wings (Galati 2018). The
403 remaining insects were discarded.

404 The selected specimens were sent to the Laboratório de Reservatórios e Vetores do Laboratório Central
405 do Estado do Rio Grande do Sul for morphological identification according to the taxonomic key proposed by
406 Galati (2018). Gender abbreviations follow Marcondes (2007) proposal. The results were tabulated in Excel
407 spreadsheets, where sex, species, subspecies, locality of origin, climatic conditions, and environmental
408 characteristics were recorded.

409 For molecular analysis, female flies were separated according to the date, place, and species found in
410 each collection bag, then divided into individual samples or pools of up to 10 specimens (Rêgo et al. 2020). The
411 samples were extracted using the Purelink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, USA) following the

412 manufacturer's recommendations. After total DNA extraction, all samples were stored at -20°C until PCR was
413 performed.

414 The primers leishmini-F:5'-GGKAGGGCGTTCTGC-3' and leishmini-R:5'-
415 STATWTTACACCAACCCC-3' were used to amplify 120 pb kinetoplast DNA (kDNA) minicircles (Kocher et
416 al. 2018). The PCR reaction was prepared in a final volume of 10 µL containing 1 × buffer (Invitrogen, Carlsbad,
417 CA, USA), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs (Ludwig Biotec, Brazil), 0.2 µM of each primer (Exxtend
418 Biotecnologia, São Paulo, Brazil), 2 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Milli-Q water,
419 and approximately 20 ng of extracted DNA sample. Positive and negative controls were included in all reactions,
420 consisting of DNA extracted from *L. infantum* culture (MHOM/BR/1974/PP75) and Milli-Q water, respectively.

421 Amplification was performed in an automatic thermal cycler (T100, Bio-Rad, Singapore) following the
422 recommendations of Kocher et al. (2018) with the following conditions: initial denaturation at 95°C for 10 min,
423 denaturation at 95°C for 30 s, followed by 35 cycles of annealing at 52°C for 30 s, extension at 72°C for 20 s,
424 final extension at 72°C for 5 min, and a final PCR cycle at 4°C.

425 The amplification reaction products were subjected to electrophoresis in 3% agarose gel (Ludwig
426 Biotecnologia, Brazil), stained with SYBR safe DNA (Invitrogen, USA), stained with a UV transilluminator, and
427 photographed for analysis.

428 To confirm inhibition of the reaction in PCR-negative samples, 0.25 µL DNA from a positive control
429 sample was added to 0.25 µL DNA from a negative sample, and PCR was performed under the same conditions
430 mentioned above. Additionally, the positive control were also diluted in the serial dilutions from 1:10 to 1:10⁴
431 and retested, in order to determine the detection threshold.

432

433 **Results**

434 From January 2021 to December 2022, 89 collections were conducted: 32 in the Nossa Senhora do
435 Perpétuo Socorro neighborhood (P1), 28 in Presidente João Goulart (P2), and 29 in Cerrito (P3). The total
436 population of sand flies captured in the municipality of Santa Maria, RS during the study period is shown in
437 Table 2.

438 A total of 119 sand flies of five species were collected: *Pi. fischeri* (76/119, 63.86%), *Mg. migonei*
439 (23/119, 19.33%), *Lu. longipalpis* (16/119, 13.45%), *Brumptomyia* sp. (2/119, 1.68%), and *Psathyromyia lanei*
440 (2/119, 1.68%). Of these, 38 (31.94%) were male and 81 (68.06%) were female. Specimens of the genus

441 *Brumptomyia* could not be identified at the species level because of damage to morphological structures
442 necessary for identification.

443 In the Nossa Senhora do Perpétuo Socorro neighborhood (P1), there was a stream with vegetation on
444 the banks, abundant organic matter, humidity, and domestic cats; only *Lu. longipalpis* was found. The Presidente
445 João Goulart neighborhood (P2) collection site had an area shaded by bamboo (*Bambusa taquara*), organic
446 matter, and domestic dogs, one of which was seropositive for *Leishmania* spp. during the study. Although this
447 disease was not the primary cause of death, *Lu. longipalpis* and *Mg. migonei* were found. However, the Cerrito
448 neighborhood (P3) is adjacent to a vast, well-preserved residual Atlantic Forest, rich in organic matter and
449 containing both domestic and wild animals, including wild opossums (*Didelphis albiventris*) and pheasants
450 (*Phasianus colchicus*). In this locality, five species of sand flies were identified.

451 A graphic representation of the seasonal distribution of sand flies collected in Santa Maria, RS, in
452 relation to the average compensated temperature (°C) and total monthly precipitation between January 2021 and
453 December 2022 is shown in Figure 1.

454 The largest number (108/119, 90.75%) of specimens was collected in February, March, April, and
455 December 2021, as well as February, March, April, and May 2022. These periods preceded or coincided with
456 high rainfall and average temperatures > 20°C. However, in periods with little rain and consequently low relative
457 humidity or average temperatures < 20°C, the months with the lowest amount or no sand flies collected
458 occurred.

459 Of the 81 female flies captured and divided into 30 individual samples or pools, all were tested using
460 PCR and were negative for *Leishmania* spp. DNA.

461

462 **Discussion**

463 In the last 20 years, the southern region of Brazil has registered an increased number of CVL, and HVL
464 cases (Souza et al. 2009; Santos et al. 2011; Rio Grande do Sul 2022). Based on identification of the main vector
465 (*Lu. longipalpis*), Souza et al. (2008) observed that protozoa were transmitted autochthonously in western Rio
466 Grande do Sul. Furthermore, Rêgo et al. (2019, 2020) showed that in Porto Alegre, *Pi. fischeri*, *Mg. migonei*, and
467 *Lu. gaminarai* may be associated with disease transmission in areas without *Lu. longipalpis*.

468 In Santa Maria, VL cases have been reported since 1985, and two HVL cases were reported in 2021.
469 However, until entomological studies were carried out, no sand fly species had been described in the region. In
470 our study, all captured species were recorded in the state of RS; among these, *Mg. migonei* and *Pi. fischeri* are

471 epidemiologically important because they have been implicated in *L. braziliensis* transmission, the main
472 etiological agent of TL in Brazil (Shimabukuro 2011). In several additional studies, they were implicated in
473 infection with the etiological agent of VL, *L. infantum* (Carvalho et al. 2010a; Salomón et al. 2010; Dias et al.
474 2013; Guimarães et al. 2016).

475 In this study, *Pi. fischeri* (76/119, 63.86%) was the most frequently found species; however, it was only
476 captured in the P3 ecotope, which is adjacent to a native forest environment. According to Rangel and Laison
477 (2003), *Pi. fischeri* has wild habitats, and its highest occurrence has been observed in areas of recent
478 deforestation, especially where human habitation occurs. The species was naturally infected with *Leishmania*
479 (*Viannia*) (Young and Duncan 1994; Pita-Pereira et al. 2011) and *L. braziliensis* (Lana et al. 2015). Rêgo et al.
480 (2019, 2020) reported the first molecular detection of *L. infantum* on *Pi. fischeri* and Galvis-Ovallos et al. (2020)
481 confirmed its natural infection with *L. infantum* promastigotes, focusing on CVL and HVL in Porto Alegre; this
482 suggests it is a vector of this etiological agent.

483 The second most common species was *Mg. migonei* (23/119, 19.32%), captured in ecotope P2, a
484 predominantly urbanized environment, and P3, adjacent to native forest. This proves the ambience of this
485 species, which was previously predominantly wild in urban environments. Guimarães et al. (2016) stated that
486 this species is highly susceptible to *L. infantum* development, making it a permissive vector. According to
487 Rangel and Lainson (2003), *Pi. fischeri* and *Mg. migonei* are notably anthropophilic, and according to Aguiar
488 and Medeiros (2003), can also be captured in residual forests in marginal areas of cities, in annexes for domestic
489 animals, and internal walls of human homes.

490 The main VL-transmitting species in Brazil, *Lu. longipalpis*, was the third most abundant in this study
491 (16/119, 13.44%), and the only one found in all three surveyed ecotopes. According to Brazil (2013), it is widely
492 distributed in several ecological niches, especially in urban and rural areas, where it has successfully established
493 and proliferated, mainly due to anthropological environmental changes.

494 According to Aguiar and Medeiros (2003), *Brumptomyia* species are not important in leishmaniasis
495 epidemiology. These sandflies are usually found in wild environments with leaves lying on the ground and
496 reported in Dasipodidae (armadillo) burrows due to their food preferences. In our study, only two specimens of
497 this genus were captured in the P3 ecotope.

498 *Pa. lanei* (2/119, 1.68%) has wild and semi-domestic characteristics, inhabiting hollows and treetops in
499 marginal areas and annexes of domestic animals. It is not associated with leishmaniasis transmission (Aguiar and
500 Medeiros 2003). This species was found only in P3, which has all of these favorable conditions for its survival

501 Regarding insect seasonality, climatic factors, such as temperature, humidity, and rainfall, have a
502 variable influence on sand fly populations, depending on the area studied (Dias et al. 2007). According to Souza
503 et al. (2017), the temperature tends to be lower at the beginning of winter, causing a drop in the sand fly
504 populations. This aligns with our results, in which no sand flies were captured in months with an average
505 temperature < 20 °C. It should be noted that in January 2021 and 2022, when average temperatures were close to
506 25°C, sand flies were absent. One potential explanation is “La Niña” phenomenon, which occurred both in 2021
507 and 2022 in RS, triggering long periods of drought, with rainfall below the historical average for the period. This
508 may have negatively influenced the vector density, where the immature stages of these insects need organic
509 matter and moisture to develop (Franke et al. 2002).

510 PCR analysis indicated that the natural infection rate in sand flies may be low due to many factors, for
511 example, resisting digestion by interfering with digestive enzymes (Sant'anna et al. 2009; Telleria et al. 2010). In
512 addition, *Leishmania* spp. secrete a myoinhibitory peptide that interrupts hindgut peristalsis, delays fecal
513 elimination, and increases the persistence of the parasite within the insect (Vaidyanathan 2004). *Leishmania* spp.
514 cause damage to the stomodeal valve, interfering with the blood ingestion process, which can often lead to vector
515 death (Schlein et al. 1992; Volf et al. 2004).

516 This study reinforces the evidence of autochthonous transmission of both VL and HVL and includes the
517 municipality as a possible transmission area for ATL, although such cases have not yet been reported. Based on
518 this, we recommend carrying out entomological surveys covering more areas of the city and reinforce that
519 preventive measures be adopted by public authorities, such as vector control, and by dog owners, such as using
520 repellent collars.

521

522 **Conclusion**

523 This study verified that the sand fly fauna in the municipality of Santa Maria, central RS, is diverse. We
524 found specimens of epidemiological interest that have not been previously described in the region, with a
525 predominance of *Pi. fischeri*, *Mg. migonei*, and *Lu. longipalpis*. Although the PCR results were negative, it is
526 important to highlight that the study of these vectors is essential for understanding disease epidemiology in the
527 region. Based on these results and the detection of three sand fly species associated with VL and ATL
528 transmission, Santa Maria, RS represents an important focus for these diseases, both in dogs and humans. It is
529 therefore important that sanitary measures are adopted, with the aim of providing information to the inhabitants
530 of the region, as well as the implementation of public policies aimed at reducing insect proliferation, such as

531 vector control and the intensification of basic sanitation. In addition, measures may include health education in
532 all neighborhoods, provision of repellent collars, as well as responsible ownership and custody of dogs and
533 implementation of policies to prevent, control and combat the disease through the Sistema Único de Saúde.

534

535 **Funding**

536 This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil
537 (CAPES) - Finance Code 001.

538

539 **Conflict of interest**

540 The authors declare that they have no conflict of interest.

541

542 **Availability of data and materials**

543 Not applicable.

544

545 **Author contribution**

546 All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis
547 were performed by [Vanessa Osmari], [Maurício Tatto], [Getúlio Dornelles Souza], [Fabiana Raquel Ratzlaff],
548 [Jaíne Soares de Paula Vasconcellos], [Sônia de Avila Botton], [Fernanda Silveira Flores Vogel], and [Luís
549 Antônio Sangioni]. The first draft of the manuscript was written by [Vanessa Osmari] and all the authors
550 commented on the previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

551

552 **Ethical approval**

553 Not applicable.

554

555 **Consent to participate**

556 Informed consent was obtained from all individual participants (owners of evaluated locations) included in the
557 study.

558

559 **Consent for publication**

560 The participants have consented to the submission of the case report to the journal.

561

562 **References**

- 563 Aguiar GM, Medeiros WM (2003) Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In:
 564 Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro, Fiocruz, pp 207-255.
- 565 Andrade AJ, Chaves-Júnior SP, Morelli LC, Santos-Conceição M, Shimabukuro PHF (2020) Taxonomia e
 566 Sistemática de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) no Brasil e seus impactos na saúde pública In: Oliveira J,
 567 Alevi KCC, Camargo LMA, Meneguetti DUO “Atualidades em Medicina Tropical no Brasil” – Rio Branco:
 568 Stricto Sensu, 336 p. <https://doi.org.10.35170/ss.ed.9786586283051>. Accessed 12 December 2022
- 569 Andrade Filho JD, Souza GD, Falcão AL (2007) Description of a new phlebotomine species, *Evandromyia*
 570 *gaucha* sp. nov. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), from Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo
 571 Cruz 102(6):737- 740. <https://doi.org.10.1590/s0074-02762007005000079>
- 572 Brasil (2010) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose
 573 Tegumentar Americana. 2. ed. Brasília, DF. 180 p.
 574 https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf.
 575 Accessed 10 May 2022
- 576 Brasil (2014) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância
 577 Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1. ed., 5. reimpr. Brasília, DF. 120p.
 578 https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf.
 579 Accessed 04 December 2022
- 580 Brasil (2017) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças
 581 Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília, DF. 189p.
 582 https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Accessed 04
 583 December 2022
- 584 Brazil RP (2013) The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. Rev Soc Bras Med Trop 46(3): 263-
 585 264. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0101-2013>
- 586 Carvalho GML, Gontijo CMF, Falcão AL, Andrade Filho JD (2010a) Study of phlebotomine sand flies (Diptera:
 587 Psychodidae) collected in a *Leishmania*-endemic area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. J
 588 Med Entomol 47(6): 972-976. <https://doi.org.10.1603/me09127>
- 589 Carvalho MR, Valença HF, Silva FJ, Pita-Pereira D, Pereira TA, Britto C, Brazil RP, Filho SPB (2010b) Natural
 590 *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)

- 591 the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Trop* 116(1):108-110.
592 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.03.009>
- 593 Dantas-Torres F (2009) Canine leishmaniosis in South America. *Parasit Vectors* 2(Suppl 1):S1.
594 <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S1>
- 595 Dias ES, Falcão AL, Silva, JE (1997) Notes on the Sand Fly Fauna (Diptera:Psychodidae) in the State of Rio
596 Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92(3):329-332. [https://doi.org/10.1590/S0074-](https://doi.org/10.1590/S0074-02761997000300005)
597 [02761997000300005](https://doi.org/10.1590/S0074-02761997000300005)
- 598 Dias ES, França-Silva JC, Silva JC, Monteiro EM, Paula KM, Gonçalves CM, Barata RA (2007) Flebotomíneos
599 (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med*
600 *Trop* 40(1):49-52. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000100009>
- 601 Dias ES, Michalsky ÉM, Nascimento JC, Ferreira EC, Lopes JV, Fortes-Dias CL (2013) Detection of
602 *Leishmania infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis, in *Lutzomyia neivai*, a putative vector of
603 cutaneous leishmaniasis. *J Vector Ecol* 38(1):193-196. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2013.12028.x>
- 604 Franke CR, Ziller M, Staubach C, Latif M (2002) Impact of El Niño/Southern Oscillation on Visceral
605 Leishmaniasis, Brazil. *Emerg Infec Dis* 8(9):914-917. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0809.010523>
- 606 Galati EAB (2018) Apostila de Bioecologia e Identificação de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) –
607 Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, Brasil. 127p
- 608 Galvis-Ovallos F, Ueta AE, Marques GO, Sarmento AMC, Araujo G, Sandoval C, Tomokane TY, Matta VLR,
609 Laurenti MD, Galati EAB (2020) Detection of *Pintomyia fischeri* (Diptera: Psychodidae) With *Leishmania*
610 *infantum* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) Promastigotes in a Focus of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *J*
611 *Med Entomol* 58(2):830–836. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa199>
- 612 Gonçalves BRD (2003) Identificação da fauna de flebotomíneos em função dos casos autóctones de LTA. *Bol*
613 *Epidemiol* 21(5):5. [http://proweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/cgvs/usu_doc/boletimepidemiologico-cgvs-](http://proweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/cgvs/usu_doc/boletimepidemiologico-cgvs-sms-pmpa-21.pdf)
614 [sms-pmpa-21.pdf](http://proweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/cgvs/usu_doc/boletimepidemiologico-cgvs-sms-pmpa-21.pdf). Accessed 17 December 2022
- 615 Guimarães VCFV, Pruzinova K, Sadlova J, Volfova V, Myskova J, Brandão Filho SP, Volf P (2016) *Lutzomyia*
616 *migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. *Parasit Vectors* 9:159.
617 <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1444-2>
- 618 Ibge (2021) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades e Estados. [https://www.ibge.gov.br/cidades-](https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/rs/santa-maria.html)
619 [e-estados/rs/santa-maria.html](https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/rs/santa-maria.html). Accessed 10 November 2022
- 620 Inmet (2022) Instituto Nacional de Meteorologia. <https://portal.inmet.gov.br>. Accessed 07 December 2022

- 621 Kocher A, Valière S, Bañuls AL, Muriene J (2018) High-throughput sequencing of kDNA amplicons for the
622 analysis of *Leishmania* minicircles and identification of Neotropical species. *Parasitology* 145(5):585-594.
623 <https://doi.org/10.1017/S0031182017002013>
- 624 Lana RS, Michalsky EM, Fortes-Dias CL, França-Silva JC, Lara-Silva FO, Lima ACVMR, Avelar DM, Martins
625 JCD, Dias ED (2015) Phlebotomine sand fly fauna and *Leishmania* infection in the vicinity of the Serra do Cipó
626 National Park, a natural Brazilian heritage site. *Biomed Res Int* 2015:38549.
627 <https://doi.org/10.1155/2015/385493>
- 628 Marcondes CB (2007) A proposal of generic and subgeneric abbreviations of phlebotomines sandflies (Diptera:
629 Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomol News* 118(4):351–356. [https://doi.org/10.3157/0013-
630 872X\(2007\)118\[351:APOGAS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3157/0013-872X(2007)118[351:APOGAS]2.0.CO;2)
- 631 Opas (2019). Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas:
632 Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51738>.
633 Accessed 10 June 2022
- 634 Osmari V, Tatto M, Andrade AJ, Ratzlaff FR, Vasconcellos JSP, Botton SA, Vogel FSF, Sangioni LA (2022)
635 First identification of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in central Rio
636 Grande do Sul State, southern Brazil. *Parasitol Res* 121:3327–3330. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07647-9>
- 637 Paho (2010) Pan American Health Organization. Avanços para superar o impacto global de doenças tropicais
638 negligenciadas: primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas.
639 <https://iris.paho.org/handle/10665.2/7680> Accessed 17 May 2022
- 640 Pita-Pereira D, Souza GD, Zwetsch A, Alves CR, Britto C, Rangel EF (2009) First report of *Lutzomyia*
641 (*Nyssomyia*) *neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania* (*Viannia*)
642 *braziliensis* in a periurban area of South Brazil using a multiplex PCR assay. *Am J Trop Med Hyg* 80(4):593-
643 595. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19346382/>
- 644 Pita-Pereira D, Souza GD, Pereira TA, Zwetsch A, Britto C, Rangel EF (2011) *Lutzomyia* (*Pintomyia*) *fischeri*
645 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of american cutaneous leishmaniasis: detection of
646 natural infection by *Leishmania* (*Viannia*) DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS),
647 Brazil, using multiplex PCR assay. *Acta Trop* 120(3):273-275. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.09.004>
- 648 Pocai EA, Frozza L, Headley SA, Graça DL (1998) Leishmaniose visceral (Calazar): cinco casos em cães de
649 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cien Rural* 28(3):501-505. [https://doi.org/10.1590/S0103-
650 84781998000300025](https://doi.org/10.1590/S0103-84781998000300025)

651 Queiroz MFM, Varjão JR, Moraes SC, Salcedo GE (2012) Analysis of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Barra
652 do Garças, State of Mato Grosso, Brazil, and the influence of environmental variables on the vector density of
653 *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). Rev Soc Bras Med Trop 45(3):313-317.
654 <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000300007>

655 Rangel EF, Lainson R (2003) Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 367 p.

656 Ratzlaff FR, Fernandes FD, Osmari V, Silva D, Vasconcellos JSP, Bräunig P, Vogel FSF, Botton SA, Santos
657 HF, Cargnelutti JF, Caldart ET, Campos A, Mello Filho JA, Soares JF, Fagundes-Moreira R, Witt AA, Pacheco
658 SM, Sangioni LA (2022) Prevalence and molecular detection of *Leishmania* spp. in bats from Rio Grande do Sul
659 state, Brazil. Parasitol Res 121(11):3193-3202. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07639-9>

660 Rêgo FD, Souza GD, Dornelles LFP, Andrade-Filho JD (2019) Ecology and Molecular Detection of *Leishmania*
661 *infantum* Nicolle, 1908 (Kinetoplastida: Trypanosomatida) in Wild-Caught Sand Flies (Psychodidae:
662 Phlebotominae) Collected in Porto Alegre, Rio Grande do Sul: A New Focus of Visceral Leishmaniasis in
663 Brazil. J Med Entomol 56(2): 519-525. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy175>

664 Rêgo FD, Souza GD, Miranda JB, Peixoto LV, Andrade-Filho JD (2020) Potential Vectors of *Leishmania*
665 Parasites in a Recent Focus of Visceral Leishmaniasis in Neighborhoods of Porto Alegre, State of Rio Grande do
666 Sul, Brazil. J Med Entomol 57(4):1286-1292. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa036>

667 Rio Grande Do Sul (2017). Secretaria Estadual da Saúde. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Nota
668 Informativa: Situação Epidemiológica da Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
669 <https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201712/08165117-nota-informativa-lvh-30-12-2017.pdf>. Accessed
670 10 November 2022

671 Rio Grande do Sul (2018) Secretaria Municipal de Saúde. Diretoria de Vigilância em Saúde, Leishmaniose
672 Tegumentar Americana. Porto Alegre.
673 http://www2.portoalegre.rs.gov.br/cgvs/default.php?reg=7&p_secao=1619. Accessed 10 November 2022

674 Rio Grande do Sul (2022) Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde. Secretaria Municipal de Saúde de Porto
675 Alegre (org.). Monitoramento ambiental Leishmaniose Visceral - Porto Alegre/RS.
676 [https://www.google.com/maps/d/u/0/viewer?mid=1XVNC7vqYnN-X-d7fxfh1PUUgAYc&ll=-](https://www.google.com/maps/d/u/0/viewer?mid=1XVNC7vqYnN-X-d7fxfh1PUUgAYc&ll=-30.1023569668537%2C-51.10358235030905&z=11)
677 [30.1023569668537%2C-51.10358235030905&z=11](https://www.google.com/maps/d/u/0/viewer?mid=1XVNC7vqYnN-X-d7fxfh1PUUgAYc&ll=-30.1023569668537%2C-51.10358235030905&z=11) Accessed 10 September 2022

678 Salomón OD, Quintana MG, Bezzi G, Morán ML, Betbeder E, Valdéz DV (2010) *Lutzomyia migonei* as putative
679 vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. Acta Trop 113(1):84-87.
680 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.08.024>

- 681 Sant'anna MRV, Diaz-Albiter H, Mubarak M, Dillon RJ, Bates PA (2009) Inhibition of trypsin expression in
 682 *Lutzomyia longipalpis* using RNAi enhances the survival of *Leishmania*. *Parasit Vectors* 2(1):62.
 683 <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-62>
- 684 Santos E, Almeida MAB, Souza GD, Rangel S, Lammerhirt CB, Cruz LL, Bercht DB, Fonseca DF, Neto RA
 685 (2005) Situação da leishmaniose Tegumentar Americana no Rio Grande do Sul. *Bol Epidemiol* 7(2):1-3.
 686 <https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201904/16133145-n-2-junho.pdf>. Accessed 17 November 2022
- 687 Santos E, Silva FD, Souza GD (2011) Vigilância entomológica. Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Sul.
 688 *Bol Epidemiol* 13(1):6-8. <https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201812/27124724-n-1-marco.pdf>.
 689 Accessed 17 November 2022
- 690 Savani ESMM, Almeida MF, Camargo MCGO, D'Auria SRN, Silva MMS, Oliveira ML, Sacramento D (2010)
 691 Detection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Brazilian
 692 bats. *Vet Parasitol* 168(1–2): 5-10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.10.019>
- 693 Schlein Y, Jacobson RL, Messer G (1992) *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly
 694 vector and implement parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(20): 9944–9948.
 695 <https://doi.org/10.1073/pnas.89.20.9944>
- 696 Shapiro JT, Costa Lima Junior MS, Dorval ME, Oliveira França A, Cepa Matos MF, Bordignon MO (2013) First
 697 record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. *Acta Trop*
 698 128(1):171-174. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.07.004>
- 699 Shimabukuro PHF, Galati EAB (2011) Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de
 700 São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotrop* 11(suppl 1):685-704.
 701 <https://doi.org/10.1590/S1676-06032011000500033>
- 702 Shimabukuro PHF, Andrade AJ, Galati EAB (2017) Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae,
 703 Phlebotominae): genera, species, and their distribution. *ZooKeys* (660):67-106.
 704 <https://doi.org/10.3897/zookeys.660.10508>
- 705 Silva OS, Grunewald J (1999) Contribution to the sandfly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul,
 706 Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(5):579-582.
 707 <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000500002>
- 708 Silva OS, Blazius RD, Romão PRT (2004) Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) coletados em galinheiros no
 709 Rio Grande do Sul, Brasil. *Entomol Vect* 11:283-289.

- 710 Souza GD, Gonçalves BRD, Flores C, Rangel S, Santos E, Vilela M, Azevedo A, Rangel EF (2008)
711 Monitoramento entomológico dos flebotômíneos (Diptera: Psychodidae) do município de Porto Alegre, RS. Bol
712 Epidemiol 39:5-6. [http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/cgvs/usu_doc/boletimepidemiologico-cgvs-](http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/cgvs/usu_doc/boletimepidemiologico-cgvs-sms-pmpa-39.pdf)
713 [sms-pmpa-39.pdf](http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/cgvs/usu_doc/boletimepidemiologico-cgvs-sms-pmpa-39.pdf) Accessed 28 November 2022
- 714 Souza GD, Santos E, Andrade Filho JD (2009) The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in
715 America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio
716 Grande do Sul, Brazil. Mem Instit Oswaldo Cruz 104(8):1181-1182. [https://doi.org/10.1590/S0074-](https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000800017)
717 [02762009000800017](https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000800017)
- 718 Souza GD, Kunz Junior LF, Carvalho RMJS, Fetzer LO, Cracco EB, Cardoso A, Santos CM, Peixoto LV,
719 Lunkes C, Mazzilli DB, Trespach JQA, Ulbrich LA, Souza PCC, Cunda MR, Carpes WW, Esméris RE,
720 Fernandes PTK (2017) Estudo dos Flebotômíneos (Diptera: Psychodidae) em área com Leishmaniose Visceral
721 Humana no Bairro Morro Santana - Porto Alegre - RS. Bol Epidemiol 65:5-7.
722 http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/cgvs/usu_doc/boletimespecial_leish_65.pdf Accessed 28
723 November 2022
- 724 Telleria EL, Araujo APO, Secundino NF, d'Avila-Levy CM, Traub-Cseko YM (2010) Trypsin-like serine
725 proteases in *Lutzomyia longipalpis* – expression, activity and possible modulation by *Leishmania infantum*
726 *chagasi*. PLoS One 5(5): e10697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010697>
- 727 Vaidyanathan R (2004) *Leishmania* parasites (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) reversibly inhibit visceral
728 muscle contractions in hemimetabolous and holometabolous insects. J Invertebr Pathol 87(2-3):123–128.
729 <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.09.001>
- 730 Volf P, Hajmova M, Sadlova J, Votycka J (2004) Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar
731 mechanism of transmission in two trypanosomatid models. Int J Parasitol 34(11):1221–1227.
732 <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.07.010>
- 733 Young DG, Duncan MA (1994) Guide to the identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sand Flies
734 in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Associated Publishers.
735 American Entomological Institute, Gainesville, Florida, USA, 881p
736 <https://apps.dtic.mil/sti/pdfs/ADA285737.pdf>
- 737 Who (2003) World Health Organization. Leishmaniasis. <http://www.who.int/> Accessed 17 May 2022
- 738 Who (2017) World Health Organization. Leishmaniasis. [https://www.who.int/news-room/fact-](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis)
739 [sheets/detail/leishmaniasis](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis) Accessed 26 June 2022

740 Wille J (2021a) Pela primeira vez, Santa Maria registra casos e óbito de humanos com leishmaniose. Diário de
741 Santa Maria. [https://diariosm.com.br/not%C3%ADcias/sa%C3%BAde/v%C3%ADdeo-pela-primeira-vez-santa-](https://diariosm.com.br/not%C3%ADcias/sa%C3%BAde/v%C3%ADdeo-pela-primeira-vez-santa-maria-registra-casos-e-%C3%B3bito-de-humanos-com-leishmaniose-1.2339002)
742 [maria-registra-casos-e-%C3%B3bito-de-humanos-com-leishmaniose-1.2339002](https://diariosm.com.br/not%C3%ADcias/sa%C3%BAde/v%C3%ADdeo-pela-primeira-vez-santa-maria-registra-casos-e-%C3%B3bito-de-humanos-com-leishmaniose-1.2339002) Accessed 12 December 2021a
743 Wille J (2021b) Desde 2017 foram pelo menos 116 casos de leishmaniose em animais em Santa Maria. Diário de
744 Santa Maria. [https://diariosm.com.br/not%C3%ADcias/sa%C3%BAde/desde-2017-foram-pelo-menos-116-](https://diariosm.com.br/not%C3%ADcias/sa%C3%BAde/desde-2017-foram-pelo-menos-116-casos-de-leishmaniose-em-animais-em-santa-maria-1.2339001)
745 [casos-de-leishmaniose-em-animais-em-santa-maria-1.2339001](https://diariosm.com.br/not%C3%ADcias/sa%C3%BAde/desde-2017-foram-pelo-menos-116-casos-de-leishmaniose-em-animais-em-santa-maria-1.2339001) Accessed 12 December 2021b

746

747 **Figure 1** - Seasonal distribution of sand flies (un), in relation to Average Compensated Temperature (°C) and
748 Total Precipitation (mm), in the period between January 2021 and December 2022, in the municipality of Santa
749 Maria, RS, Brazil.

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

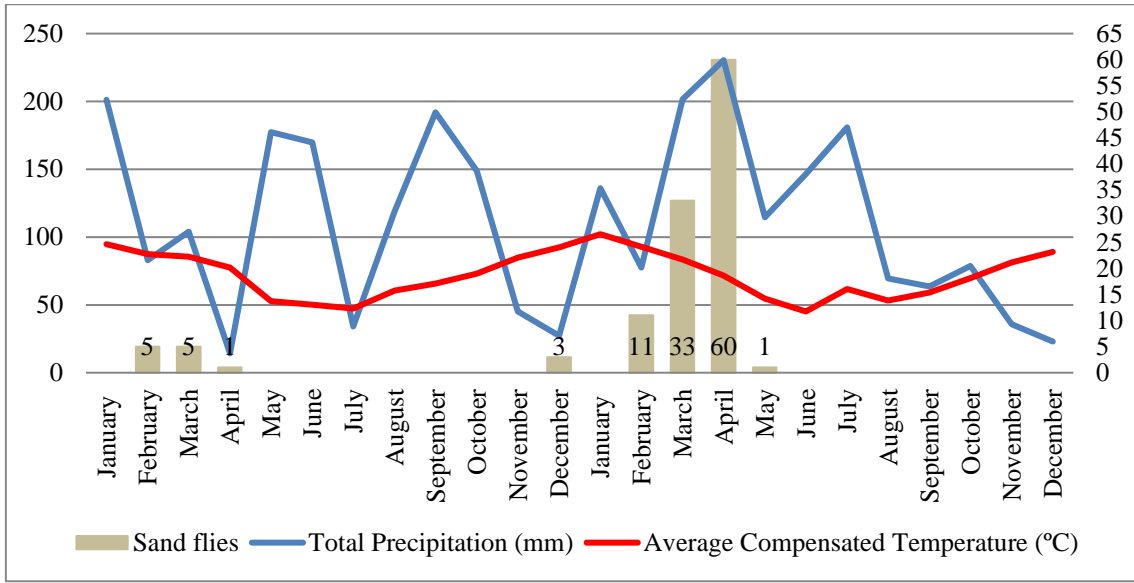
766

767

768

769

770 **Figure 1**



771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789

790 **Table 1** - Description of sampling points and species of sand flies captured in the neighborhoods Nossa Senhora
 791 do Perpétuo Socorro, Presidente João Goulart and Cerrito in Santa Maria, RS, Brazil.

792

Sampling location	Geographic coordinates	Environment description	Neighborhood/Region	Captured species
P1	29°40'29.03"S 53°48'38.04"W	Predominantly urbanized environment, peridomicile with the presence of a stream surrounded by residual vegetation, abundant organic matter, humidity and presence of domestic cats	Nossa Senhora do Perpétuo Socorro (North Region)	<i>Lutzomyia longipalpis</i>
P2	29°40'47.92"S 53°47'29.07"W	Predominantly urbanized environment, peridomicile with area shaded by bamboo trees (<i>Bambusa taquara</i>), organic matter and domestic dogs.	Presidente João Goulart (Northeast Region)	<i>Lutzomyia longipalpis</i> <i>Migonemyia migonei</i>
P3	29°41'58.59"S 53°47'60.87"W	Peridomicile, adjacent to a vast area of well-preserved residual Atlantic Forest, rich in organic matter and the presence of both domestic animals and pheasants, as well as occasionally wild mammals (<i>Didelphis albiventris</i>).	Cerrito (Central-East Region)	<i>Pintomyia fischeri</i> <i>Migonemyia migonei</i> <i>Lutzomyia longipalpis</i> <i>Brumptomyia</i> sp. <i>Psathyromyia lanei</i>

793

Table 2 - Species of sand flies collected with light traps of the CDC type from January 2021 to December 2022, in the neighborhoods Nossa Senhora do Perpétuo Socorro (P1), Presidente João Goulart (P2) and Cerrito (P3), Santa Maria, RS, Brazil.

Species	P1		P2		P3		Total (%)
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
<i>Pintomyia fischeri</i>	0	0	0	0	18	58	76 (63,86)
<i>Migonemyia migonei</i>	0	0	1	0	11	11	23 (19,33)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	3	2	2	4	1	4	16 (13,45)
<i>Brumptomyia</i> sp.	0	0	0	0	2	0	2 (1,68)
<i>Psathyromyia lanei</i>	0	0	0	0	0	2	2 (1,68)

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este estudo demonstrou que a fauna de flebotomíneos no município de Santa Maria, na região central do Rio Grande do Sul, é diversa. Encontramos espécimes de interesse epidemiológico ainda não descritas na região, com predominância de *Pintomyia fischeri*, *Migonemyia migonei* e *Lutzomyia longipalpis*.

Desde 2017 houve um aumento considerável na incidência da LVC e em 2021 dois casos autóctones de LVH foram notificados. A partir desse cenário e da identificação do principal vetor, *Lu. longipalpis* em 2022, o município teve seu status epidemiológico alterado, sendo configurado como área de transmissão da enfermidade.

Essas constatações epidemiológicas podem ser impactadas com as próprias características da área de estudo, por se tratar de um município relevante na região central do estado, que recebe inúmeros estudantes universitários advindos de várias localidades e por comportar um dos maiores contingentes militares do país. Essas situações por vezes acabam servindo como um fator de risco para a disseminação de agentes, uma vez que, esses indivíduos levam consigo seus animais de estimação vindos de diferentes áreas do território.

Reforça-se ainda que os pontos de coleta escolhidos para a captura dos flebotomíneos eram locais com casos de LVC notificados anteriormente o que implica em uma maior possibilidade de encontro dessas espécies. Além disso, os locais amostrados continham todas as condições propícias ao desenvolvimento e manutenção dos flebotomíneos no ambiente como: presença de matéria orgânica, umidade, abrigo e fontes alimentares.

Embora os resultados da detecção molecular não tenham demonstrado a presença de *Leishmania* spp., é importante ressaltar que esse modelo de estudo é uma ferramenta valiosa para o entendimento da epidemiologia e dispersão da doença na região.

Com base na detecção de três espécies de flebotomíneos associadas à transmissão de LV e LTA, o município representa um importante foco para essas doenças, tanto em cães quanto em humanos. Portanto, é importante que medidas sanitárias sejam adotadas, com o objetivo de fornecer informações aos habitantes da região, bem como a implementação de políticas públicas voltadas para a redução da proliferação de insetos, como controle de vetores e saneamento básico. Além disso, as medidas podem incluir educação em saúde nos bairros afetados, fornecimento de coleiras repelentes, bem como posse e guarda responsável de cães e implementação de políticas de prevenção, controle e combate à doença por meio do Sistema Único de Saúde.

Sugere-se que mais estudos sejam realizados para uma maior e melhor caracterização da fauna e sazonalidade dos vetores, com a ampliação e a espacialização dos locais de amostragem e um maior período de avaliação.

6 CONCLUSÃO

- Identificou-se pela primeira vez a presença do principal vetor da leishmaniose, *Lu. longipalpis* no município, caracterizando-o como área de transmissão da enfermidade por possuir além do vetor, casos humanos e caninos notificados.

- Adicionalmente, outras espécies de flebotomíneos de importância sanitária foram identificadas, incluindo: *Migonemyia migonei* e *Pintomyia fischeri* e espécies não relacionadas a transmissão de leishmaniose como: *Psathyromyia lanei* e *Brumptomyia* sp.

- Embora os resultados do diagnóstico molecular não tenham detectado *Leishmania* spp., é importante ressaltar que esse modelo de estudo é importante para o entendimento da epidemiologia da LV na região, bem como da dinâmica e dispersão dos vetores.

REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, Mohammad *et al.* *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 57, p. 1-29, 2017. DOI: 10.1016/j.mam.2016.11.012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28159546/>. Acesso em: 17 dezembro 2022.
- ALCOLEA, Pedro Jose *et al.* Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: High down-regulation rate in the amastigote stage. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 13, p. 1497-1516, 2010. DOI: 10.1016/j.ijpara.2010.05.013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20654620/>. Acesso em: 02 janeiro 2023.
- ALEXANDER, Bruce; YOUNG, David G. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 3, p. 397-403, 1992. DOI: 10.1590/S0074-02761992000300010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02761992000300010>. Acesso em: 17 dezembro 2022.
- ALEXANDER, Bruce. Sampling methods for phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 14, n. 2, p. 109-122, 2000. DOI: 10.1046/j.1365-2915.2000.00237.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10872855/#:~:text=Sandflies%20can%20be%20collected%20during,bait%20animals%2C%20CO2%20or%20light>. Acesso em: 12 agosto 2022.
- ALEXANDER, Bruce *et al.* Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1480-1485, 2002. DOI: 10.3201/eid0812.010485. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12498667/>. Acesso em: 12 agosto 2022.
- ALVAR, Jorge *et al.* Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004. DOI: 10.1016/S0065-308X(04)57001-X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15504537/>. Acesso em: 23 janeiro 2023.
- ALVAR, Jorge *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0035671. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22693548/>. Acesso em: 17 dezembro 2022.
- ANDRADE, Andrei José *et al.* Taxonomia e Sistemática de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) no Brasil e seus impactos na saúde pública *In*: OLIVEIRA, Jader, *et al.* “**Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores**” - Rio Branco: Stricto Sensu, 263 p, 2020 DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283129. Disponível em: <https://sseditora.com.br/wp-content/uploads/Atualidades-em-Medicina-Tropical-no-Brasil-Vetores.pdf>. Acesso em: 12 dezembro 2022.
- ANTOINE, Jean-Claude. Co-stimulatory activity of *Leishmania* infected macrophages. **Parasitology Today**, v. 11, n. 7, p. 242-243, 1995. DOI: 10.1016/0169-4758(95)80198-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15275333/>. Acesso em: 17 setembro 2022.
- BAHIA, Ana C. *et al.* Ultrastructural comparison of the external morphology of the immature stages of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* and *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Diptera:

Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis, by scanning electron microscopy. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 6, p. 903-914, 2007. DOI: 10.1603/0022-2585(2007)44[903:ucoemo]2.0.co;2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18047187/>. Acesso em: 17 setembro 2022.

BANETH, Gad *et al.* Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n.7, p. 324-330, 2008. DOI: 10.1016/j.pt.2008.04.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18514028/>. Acesso em: 23 janeiro 2023.

BASIMIKE, Mulenda; MUTINGA, Mutuku J; KUMAR, Ray. Distribution of Sandflies (Diptera: Psychodidae) in Three Vegetation Habitats in the Marigat area, Baringo District, Kenya. **Journal of Medical Entomology**, v. 28, n. 3, p. 330-333, 1991. DOI: 10.1093/jmedent/28.3.330. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1875361/>. Acesso em: 12 dezembro 2022.

BELO, Vinícius Silva *et al.* Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, p. e2182, 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002182. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23638203/>. Acesso em: 27 dezembro 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed., 3. reimpr. Brasília, DF, 2006. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer_al.pdf. Acesso em: 12 outubro 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed., 5. reimpr. Brasília, DF, 120 p, 2014. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer_al_1edicao.pdf. Acesso em: 12 outubro 2022.

BRAZIL, Reginaldo Peçanha *et al.* Chicken house as a resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. **Parassitologia**, n. 33, p. 113-117, 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1841199/>. Acesso em: 10 setembro 2022.

BRAZIL, Reginaldo Peçanha; BRAZIL, Beatriz Gomes. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: RANGEL, Elizabeth F; LAINSON, Ralph. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 257-274. 2003.

BRAZIL, Reginaldo Peçanha; RODRIGUES, Andressa A Fuzzari; FILHO, José D Andrade. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas – a mini review. **Entomology, Ornithology and Herpetology**, v. 4, n. 2, 2015. DOI: 10.4172/2161-0983.1000144. Disponível em: <https://www.longdom.org/open-access/sand-fly-vectors-of-leishmania-in-the-americas--a-mini-review-2161-0983-1000144.pdf>. Acesso em: 02 janeiro 2023.

CAMPOS, Roseane *et al.* Epidemiological aspects and spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil. **Geospatial Health**, v.

12, n. 1, p. 503, 2017. DOI: 10.4081/gh.2017.503. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28555473/>. Acesso em: 10 janeiro 2023.

CARDIM, Marisa Furtado Mozini *et al.* Introduction and expansion of human American visceral leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil, 1999-2011. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 4, p. 691-700, 2013. DOI: 10.1590/S0034-8910.2013047004454. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24346660/>. Acesso em: 07 janeiro 2023.

CARLSEN, Eric D *et al.* Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 182, n. 2, p. 109-118, 2015. DOI: 10.1111/cei.12674. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26126690/>. Acesso em: 10 dezembro 2022.

CHANIOTIS, Byron N *et al.* Horizontal and vertical movements of phlebotomine sandflies in a Panamanian rain forest. **Journal of Medical Entomology**, v. 11, n. 3, p. 369-375, 1974. DOI: 10.1093/jmedent/11.3.369. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4852289/>. Acesso em: 17 maio 2022.

COMER, James A; BROWN, John. Use of hollow trees as diurnal resting shelter by *Lutzomyia shannoni* (Diptera, Psychodidae) on Ossabaw island, Georgia. **Environmental Entomology**, v. 22, n. 3, p. 613-617, 1993. DOI: 10.1093/ee/22.3.613. Disponível em: <https://academic.oup.com/ee/article-abstract/22/3/613/2394531?redirectedFrom=PDF>. Acesso em: 10 setembro 2022.

CRUZ, Carolina Fordellone Rosa CRUZ, Mariza Fordellone Rosa; GALATI, Eunice Aparecida Bianchi. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in rural and urban environments in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 303-311, 2013. DOI: 10.1590/S0074-02762013000300008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23778669/>. Acesso em: 10 setembro 2022.

DANTAS-TORRES, Filipe. Canine leishmaniasis in South America. **Parasites & Vectors**, v. 2, n: S1, p. 1-8, 2009. DOI: 10.1186/1756-3305-2-S1-S1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19426440/>. Acesso em: 17 janeiro 2023.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. **O Hospital**, v. 45, p. 419-421, 1954.

DIAS, Edelberto Santos *et al.* Sandflies (Diptera: Psychodidae) in an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 49-52, 2007. DOI: 10.1590/s0037-86822007000100009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17486253/>. Acesso em: 17 setembro 2022.

ECKERT, Janina; SOUZA, Getúlio Dornelles. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no município de Estrela e primeiro registro de *Lutzomyia pascalei* (Coutinho e Barreto) no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 4, p. 399-402, 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/333488904_Flebotomíneos_Diptera_Psychodidae_Phlebotominae_no_município_de_Estrela_e_primeiro_registro_de_Lutzomyia_pascalei_Coutinho_Barreto_no_Rio_Grande_do_Sul. Acesso em: 12 outubro 2022.

ESPINOSA, Omar Ariel *et al.* An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 430-442, 2016. DOI: 10.1017/S0031182016002092. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27976601/>. Acesso em: 10 setembro 2022.

FAIMAN, Roy; CUÑO, Ruben; WARBURG, Alon. Comparative efficacy of three suction traps for collecting phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in open habitats. **Journal of Vector Ecology**, v. 34, n. 1, p. 114-118, 2009. DOI: 10.1111/j.1948-7134.2009.00014.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20836811/>. Acesso em: 10 setembro 2022.

FORATTINI, Oswaldo Paulo; RABELLO, Ernesto Xavier; GALATI, Eunice Aparecida Bianchi. Novos encontros de flebotomíneos no Estado de São Paulo, Brasil, com especial referência à *Lutzomyia longipalpis*. **Revista de Saúde Pública**, v. 10, n. 1, p. 125-128, 1976. DOI: 10.1590/S0034-89101976000100012. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rsp/article/view/22783>. Acesso em: 27 outubro 2022.

GALATI, Eunice Aparecida Bianchi. Morfologia e taxonomia: morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. *In*: RANGEL, Elisabeth Ferreira; LAINSON, Ralph. (Orgs.). **Flebotomíneos do Brasil**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 53-175, 2003.

GALATI, Eunice Aparecida Bianchi *et al.* Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the speleological province of the Ribeira Valley: 2. Parque Estadual do Alto Ribeira (PETAR), São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, n. 3, p. 477-487, 2010. DOI: 10.1590/S0085-56262010000300020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbent/a/WQY8L3kq4tpnp97GBbQY75G/?lang=en>. Acesso em: 12 outubro 2022.

GALATI, Eunice Aparecida Bianchi. **Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): classificação, morfologia, terminologia e identificação de adultos**. Vol. 1. São Paulo: USP, CDC, 132p, 2016. Disponível em: http://www.fsp.usp.br/egalati/wp-content/uploads/2018/07/Nova-Apostila-Vol-I_2018.pdf. Acesso em: 12 outubro 2022.

GALATI, Eunice Aparecida Bianchi. **Apostila de Bioecologia e Identificação de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae)** - Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, Brasil. 127 p, 2018.

GARDINER, C. H.; FAYER, Ronald; DUBEY, Jitender P. **An atlas of protozoan parasites in animal tissues**. United States Department of Agriculture, 83 p, 1988. Disponível em: <https://naldc.nal.usda.gov/download/CAT89916886/PDF>. Acesso em: 12 dezembro 2022.

GOMES, Almério de Castro; GALATI, Eunice Aparecida Bianchi. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. Capacidade vetorial flebotomínea em ambiente florestal primário do Sistema da Serra do Mar, região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 23, n. 2, p. 136-42, 1989.

GORAYEB Inocência de Souza. Uma nova armadilha ventilada para coleta de mosquitos com ou sem atração humana. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 8, n.1, p. 97-109, 2013. Disponível em: <https://repositorio.museu-goeldi.br/bitstream/mgoeldi/885/1/B%20MPEG%20C%20Nat%208%281%29%202013%20armadilha%28gorayeb%29.pdf>. Acesso: em 04 janeiro 2023.

GOSSAGE, Sharon M; ROGERS, Matthew E; BATES, Paul A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027-1034, 2003. DOI: 10.1016/s0020-7519(03)00142-5. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13129524/>. Acesso em: 11 novembro 2022.

GUIMARÃES, Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso *et al.* Molecular detection of *Leishmania* in Phlebotomine sand flies in a cutaneous and visceral leishmaniasis endemic area in northeastern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 357-360, 2014. DOI: 10.1590/s0036-46652014000400015. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25076439/>. Acesso em: 19 janeiro 2023.

GRIMALDI, Gabriel Júnior; TESH, Robert B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, p. 230-250, 1993. DOI: 10.1128/CMR.6.3.230. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8358705/>. Acesso em: 12 novembro 2022.

HONG, Ayhun *et al.* One Health Approach to Leishmaniasis: Understanding the Disease Dynamics through Diagnostic Tools. **Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 809, 2020. DOI: 10.3390/pathogens9100809. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7599840/>. Acesso em: 09 março 2023.

KILLICK-KENDRICK, Robert. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review.

Medicine Veterinary Entomology, v. 4, n.1, p. 1-24, 1990. DOI: 10.1111/j.1365-2915.1990.tb00255.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2132963/>. Acesso em: 04 setembro 2022.

KILLICK-KENDRICK, Robert. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279-289, 1999. DOI: 10.1016/s0738-081x(99)00046-2.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10384867/>. Acesso em: 04 setembro 2022.

KWEIDER, Mahmoud *et al.* Development of metacyclic *Leishmania* promastigotes is associated with the increasing expression of GP65, the major surface antigen. **Parasite Immunology**, v. 11, n. 3, p. 197-209, 1989. DOI: 10.1111/j.1365-3024.1989.tb00659.x.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2771426/>. Acesso em: 24 agosto 2022.

LAINSON, Ralph; SHAW, Jeffrey Jon. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: LUMSDEN W. H. R.; EVANS D. A. **Biology of the Kinetoplastida**. London: Academic Press. p. 1-116, 1979.

LAINSON, Ralph *et al.* Leishmaniasis in Brazil XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 2, p. 223-226, 1985. DOI: 10.1016/0035-9203(85)90340-2. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4002291/>. Acesso em: 24 agosto 2022.

LAINSON, Ralph; SHAW, Jeffrey Jon. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W; KILLICK-KENDRICK, Robert. **The leishmaniasis in Biology and Medicine**, 1987. p. 1-120.

LAINSON, Ralph; RANGEL, Elisabeth Ferreira. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005. DOI: 10.1590/S0074-02762005000800001. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/7qNzZ67fX9gksRZLYry6wnH/>. Acesso em: 24 agosto 2022.

LEWIS, David Jhon. The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 19, p. 363-384, 1974. DOI: 10.1146/annurev.en.19.010174.002051. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4592891/>. Acesso em: 27 agosto 2022.

LINDHOLZ, Catieli Gobetti. Identificação e caracterização das espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), infectadas por *Leishmania* spp., na localidade Praia das Pombas, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. 2015. 54 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2015. Disponível em: <https://tede2.pucrs.br/tede2/handle/tede/7177>. Acesso em: 08 janeiro 2023.

MAROLI, Michele *et al.* Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013. DOI: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22924419/>. Acesso em: 27 novembro 2022.

MARZOCHI, Mauro Célio A; MARZOCHI, Keyla Belízia F. Tegumentary and visceral leishmanioses in Brazil – emerging anthrozoosis and possibilities for their control. **Caderno de Saúde Pública**, v. 10, n. 2, p. 359-375, 1994. DOI: 10.1590/S0102-311X1994000800014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csp/a/F4x3rRxLgZyChgDX9LHrN6q/?lang=en>. Acesso em: 19 outubro 2022.

MEMMOTT, Jane. Sandflies distribution and abundance in a tropical rain forest. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 5, n. 4, p. 403-411, 1991. DOI: 10.1111/j.1365-2915.1991.tb00568.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1773118/>. Acesso em: 26 agosto 2022.

MISSAWA, Nanci Akemi; LOROSA, Elias Seixas; DIAS, Edelberto Santos. Feeding preference of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in transmission area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 365-368, 2008. DOI: 10.1590/S0037-86822008000400008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/v3fQhpbfr9tz6YwJjny68v/abstract/?lang=en>. Acesso em: 29 agosto 2022.

NEVES, David Pereira *et al.* **Parasitologia humana**. 13ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 559p, 2016.

OLIVEIRA, Cláudia Di Lorenzo *et al.* Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994- 1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 5, p. 1231-1239, 2001. DOI: 10.1590/S0102-311X2001000500023. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csp/a/bZYRNHgTnj4vxVGjhRtfgPp/?lang=en>. Acesso em: 30 agosto 2022.

OLIVEIRA-PEREIRA, Yrla Nívea *et al.* Preferência alimentar sanguínea de flebotomíneos da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 9, p. 2183-2186, 2008. DOI: 10.1590/S0102-311X2008000900024. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csp/a/BRWBDp9NSNVmY9kWPDbR9ym/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 23 outubro 2022.

OLIVEIRA, Beatriz C *et al.* American Tegumentary Leishmaniasis and Flow Cytometry: A Review. **Journal of Medical Microbiology & Diagnosis**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2016. DOI: 10.4172/2161-0703.1000222. Disponível em: <https://www.hilarispublisher.com/open-access/american-tegumentary-leishmaniasis-and-flow-cytometry-a-review-2161-0703-1000222.pdf>. Acesso em: 18 outubro 2022.

PAHO. Unprecedented progress against neglected tropical diseases reported. **Pan American Health Organization**, 2017. Disponível em: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13172:unprecedented-progress-against-neglected-tropical-diseases-reported&Itemid=0&lang=en#gsc.tab=0. Acesso em: 10 janeiro 2023.

PAHO. Epidemiological report of the Americas. **Pan American Health Organization**, n. 10, p. 1-10, 2021. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386>. Acesso em: 17 janeiro 2023.

PENNISI, Maria Grazia; PERSICHETTI, Maria Flaminia. Feline leishmaniosis: is the cat a small dog? **Veterinary Parasitology**, v. 251, p. 131-137, 2018. DOI: 10.1016/j.vetpar.2018.01.012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401718300190?via%3Dihub>. Acesso em: 09 março 2023.

PETERSON, A Townsend *et al.* Influences of climate change on the potential distribution of *Lutzomyia longipalpis sensu lato* (Psychodidae: Phlebotominae). **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 10-11, p. 667-674, 2017. DOI: 10.1016/j.ijpara.2017.04.007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28668326/>. Acesso em: 20 agosto 2022.

PRADO, Patrícia Fernandes do *et al.* Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 561-566, 2011. DOI: 10.1590/s0037-86822011000500006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22031070/>. Acesso em: 19 janeiro 2023.

QUINNEL, Rupert J; DYE, Christopher; SHAW, Jeffrey Jon. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. **Medical Veterinary Entomology**, v. 6, n. 3, p. 195- 200, 1992. DOI: 10.1111/j.1365-2915.1992.tb00606.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1421498/>. Acesso em: 27 outubro 2022.

RAMOS, Walkyria Rodrigues *et al.* Anthropoc effects on sand fly (Diptera: Psychodidae) abundance and diversity in an Amazonian rural settlement, Brazil. **Acta Tropica**, v. 139, p. 44-52, 2014. DOI: 10.1016/j.actatropica.2014.06.017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25009952/>. Acesso em: 19 janeiro 2023.

RANGEL Elisabeth Ferreira; SHAW, Jeffrey Jon. **Brazilian Sand Flies: Biology, Taxonomy, Medical Importance and Control**. Fiocruz. Springer, 2018. 521p. DOI: 10.1007/978-3-319-75544-1.

READY, Paul D *et al.* The ecology of *Lutzomyia umbratilis* Ward & Fraiha (Diptera: Psychodidae), the major vector to man of *Leishmania braziliensis guyanensis* in north-eastern Amazonian Brazil, **Bulletin of Entomological Research**, v. 76, n. 1, p. 21-40, 1986. DOI: 10.1017/S0007485300015248. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/bulletin-of-entomological-research/article/abs/ecology-of-lutzomyia-umbratilis-ward-fraiha-diptera-psychodidae-the-major-vector-to-man-of-leishmania-braziliensis-guyanensis-in-northeastern-amazonian-brazil/C919EC7D0D7B45E9D61419389A74AB46>. Acesso em: 28 agosto 2022.

READY, Paul D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 227-250, 2013. DOI: 10.1146/annurev-ento-120811-153557. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23317043/>. Acesso em 12 agosto 2022.

REBÊLO, José Manuel Macário *et al.* Flutuação sazonal dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área de colonização recente do município de Buriticupu, Amazônia maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 45, p. 11-16, 2001.

RÊGO, Felipe Dutra *et al.* Ecological aspects of the Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in the Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 220, 2014. DOI: 10.1186/1756-3305-7-220. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24886717/>. Acesso em: 19 janeiro 2023.

RÊGO, Felipe Dutra *et al.* Ecology and Molecular Detection of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 (Kinetoplastida: Trypanosomatida) in Wild-Caught Sand Flies (Psychodidae: Phlebotominae) Collected in Porto Alegre, Rio Grande do Sul: A New Focus of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 2, p. 519-525, 2019. DOI: 10.1093/jme/tjy175. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30321358/>. Acesso em: 27 agosto 2022.

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, 2020. DOI: 10.1093/jme/tjaa036. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32112089/>. Acesso em: 27 agosto 2022.

RIBEIRO, Raul Rio *et al.* Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 3296893, 2018. DOI: 10.1155/2018/3296893. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29789784/>. Acesso em: 23 novembro 2022.

ROQUE, André Luiz R; JANSEN, Ana Maria. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014. DOI: Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25426421/>. Acesso em: 17 dezembro 2022.

SACKS, David L; PERKINS, Peter V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223, n. 4643, p. 1417–1419, 1984. DOI: 10.1126/science.6701528. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6701528/>. Acesso em: 26 setembro 2022.

SACKS, David L; LAWYER, Phillip; KAMHAWI, Shaden. The Biology of *Leishmania*-sand fly interactions. In: Myler, Peter J, Fasel, Nicolas. (Eds.). **Leishmania: After the Genome**. UK: Caister Academic Press Norfolk. p. 205-238, 2008. DOI: 10.21775/9781910190272. Acesso em: 27 setembro 2022.

SALOMÓN, Oscar Daniel *et al.* *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 7, p. 831–846, 2015. DOI: 10.1590/0074-02760150207. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26517497/>. Acesso em: 17 janeiro 2023.

SANTOS, Demilson Rodrigues dos. Curso de Capacitação para Coleta e Identificação de Flebotomíneos. **Companhia Paranaense de Energia**, COLÍDER/MT, 251p, 2014. Disponível em: [https://www.copel.com/uhecolider/sitearquivos2.nsf/arquivos/apostila_curso_flebotomineos/\\$FILE/APOSTILA%20Curso%20de%20Identifica%C3%A7%C3%A3o%20de%20Flebotom%C3%ADneos.pdf](https://www.copel.com/uhecolider/sitearquivos2.nsf/arquivos/apostila_curso_flebotomineos/$FILE/APOSTILA%20Curso%20de%20Identifica%C3%A7%C3%A3o%20de%20Flebotom%C3%ADneos.pdf). Acesso em: 26 novembro 2022.

SANTOS, Eric Fabrício Marialva. Bionomia de *Migonemyia migonei* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) em condições experimentais. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Leônidas e Maria Deane, Manaus, AM, 2019. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/32458/Disserta%E7%E3o%20Eric%20Marialva.pdf;jsessionid=58E46FF635BF6796F883680B3F94196B?sequence=2>. Acesso em: 03 outubro 2022.

SCHLEIN, Yosef. *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitology Today**, v. 9, n. 7, p. 255-258, 1993. DOI: 10.1016/0169-4758(93)90070-v. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15463772/>. Acesso em: 17 agosto 2022.

SCOTT, Phillip; NOVAIS, Fernanda O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016. DOI: 10.1038/nri.2016.72. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27424773/>. Acesso em: 17 agosto 2022.

SHAW, Jeffrey Jon. The leishmaniasis - Survival and expansion in a changing world. A mini review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 541–547, 2007. DOI: 10.1590/s0074-02762007000500001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17899628/>. Acesso em: 12 agosto 2022.

SILVA, Onilda Santos; GRUNEWALD, Jörg. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania* (*Viannia*) infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5; p. 579-582, 1999. DOI: 10.1590/S0074-02761999000500002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/57qqCdXcfd7CX6Dkv3mPQ5q/?lang=en>. Acesso em: 14 março 2023.

SILVA, Onilda Santos. Studies on sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Parque Estadual do Turvo, RS, Brazil, and their role in *Leishmania* transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 3, p. 124, 2000. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rimtsp/article/view/30433/32317>. Acesso em: 14 março 2023.

SINAN. Leishmaniose visceral - Casos confirmados notificados. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**, 2022. Disponível em: <tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>. Acesso em: 17 janeiro 2023.

SOARES, Bárbara Ribeiro *et al.* Seroconversion of sentinel chickens as a biomarker for monitoring exposure to visceral leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 3, p. 2352, 2013. DOI: 10.1038/srep02352. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23912591/>. Acesso em: 12 agosto 2022.

SOUZA, Getúlio Dornelles; SANTOS, Edmilson; ANDRADE FILHO, José Dilermando. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1181-1182, 2009. DOI: 10.1590/S0074-02762009000800017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/ry8DNNK7nr9RBDws5Z7PH4Q/abstract/?lang=en>. Acesso em: 17 dezembro 2022.

SPADA, Eva *et al.* Feline *Leishmania* spp. Infection in a Non-endemic area of Northern Italy. **Animals**, v. 10, n. 5, p. 817. 2020. DOI: 10.3390/ani10050817. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/5/817>. Acesso em: 09 março 2023.

TEIXEIRA-NETO, Rafael Gonçalves *et al.* Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 485, 2014. DOI: 10.1186/s13071-014-0485-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25326767/>. Acesso em: 17 agosto 2022.

TELES, Ana Paula Silva *et al.* Fatores de risco associados à ocorrência da leishmaniose visceral na área urbana do município de Campo Grande/MS. **Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 11, n. 21, p. 35-48, 2015. DOI: 10.14393/Hygeia1129627. Disponível em: <https://seer.ufu.br/index.php/hygeia/article/view/29627>. Acesso em: 02 junho 2022.

TESH, Robert B *et al.* Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 20, n. 1, p. 150-156, 1971. DOI: 0.4269/ajtmh.1971.20.150. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5567741/>. Acesso em: 12 julho 2022.

URSINE, Renata Luiz *et al.* Human and canine visceral leishmaniasis in an emerging focus in Araçuaí, Minas Gerais: spatial distribution and soci-environmental factors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 8, p. 505-511, 2016. DOI: 10.1590/0074-02760160133. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27384080/>. Acesso em: 17 agosto 2022.

WAITE, Robyn C *et al.* Integration of water, sanitation and hygiene for the control of neglected tropical diseases: a review of progress and the way forward. **International Health**,

v. 8, n. 1, p. i22–i27, 2016. DOI: 10.1093/inthealth/ihw003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26940306/>. Acesso em: 10 julho 2022.

WHO. Report of the Consultative Meeting on Cutaneous Leishmaniasis. **World Health Organization**, 2008. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331813>. Acesso em: 26 novembro 2022.

WHO. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. **World Health Organization**, 2012. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/77472>. Acesso em: 26 novembro 2022.

WHO. Neglected tropical diseases. **World Health Organization**, 2022. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1. Acesso em: 10 janeiro 2023.