

Rede de Vigilância de Vetores - Flebótomos: a importância da vigilância de um vetor menos conhecido

Vector Surveillance Network - sandflies: the importance of the surveillance of a lesser-known vector

Fátima Amaro¹, Hugo Osório¹, Manuel Silva¹, Inês Campos Freitas¹, Patrícia Soares¹, Anabela Vilares², Susana Martins², Tânia Reis², Maria João Gargaté², Maria João Alves¹; Equipa REVIVE³

fatima.amaro@insa.min-saude.pt

(1) Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Águas de Moura, Portugal

(2) Laboratório Nacional de Referência de Infecções Parasitárias e Fúngicas. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(3) Administrações Regionais de Saúde do Algarve, Alentejo, Centro, Lisboa e Vale do Tejo e Norte, Portugal

_Resumo

O programa REVIVE (Rede de Vigilância de Vetores) resulta de colaboração entre a Direção-Geral da Saúde, as Administrações Regionais de Saúde do Algarve, Alentejo, Centro, Lisboa e Vale do Tejo e Norte, a Direção Regional da Saúde da Madeira, a Direção Regional da Saúde dos Açores e o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. No âmbito do REVIVE é realizada a vigilância entomológica, a nível nacional, de mosquitos (Culicidae) desde 2008, carraças (Ixodidae) desde 2011 e flebótomos (Psychodidae) desde 2016.

Para se determinar o risco de emergência de doenças transmitidas por flebótomos é indispensável desenvolver procedimentos para uma vigilância entomológica sistematizada. Desta forma, anualmente, de maio a outubro, técnicos colhem, com armadilhas luminosas CDC, flebótomos em todo o território de Portugal continental. Os insetos provenientes das colheitas são enviados para o Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, para identificação de espécies e deteção de agentes patogénicos, nomeadamente flebovírus e *Leishmania* spp. Contrariamente ao que aconteceu com os culicídeos a partir de 2008 ou com os ixodídeos, a partir de 2011, a vigilância dos flebótomos tem vindo a ser implementada de uma forma gradual desde 2016. Verifica-se que a monitorização destes vetores, apesar de ter sofrido constrangimentos devido à pandemia, tem vindo a aumentar substancialmente nos últimos anos.

O objetivo deste trabalho é apresentar, de uma forma sucinta, os resultados obtidos na vigilância de flebótomos em 2023, e no período que decorreu 2016 a 2022, em Portugal continental, realçando os principais riscos em saúde pública relacionados com este vetor em Portugal.

_Abstract

The REVIVE programme (Vector Surveillance Network) is the result of a collaboration between the General Directorate of Health, the Regional Health Administrations of the Algarve, Alentejo, Centro, Lisbon and Tagus Valley and North, the Regional Health Directorate of Madeira, the Regional Health Directorate of the Azores and the National Institute of Health Dr Ricardo Jorge. Within the scope of REVIVE, entomological surveillance is carried out at national level for mosquitoes (Culicidae) since 2008, ticks (Ixodidae) since 2011 and sandflies (Psychodidae) since 2016.

To determine the risk of emergence of diseases transmitted by sandflies, it is essential to develop procedures for systematized entomological surveillance. Therefore, every year, from May to October, technicians collect sandflies throughout mainland Portugal using CDC light traps. The collected insects are sent to the Centre for Vectors and Infectious Diseases Research, National Institute of Health Dr Ricardo Jorge, for species identification and detection of pathogens, namely phleboviruses and *Leishmania* spp. Contrary to what happened with culicids or with ixodids, the surveillance of sandflies has been implemented gradually, since 2016. It appears that the monitoring of these vectors, despite having suffered constraints due to the pandemic, has been increasing substantially in recent years.

The objective of this work is to succinctly present the results obtained in the surveillance of sandflies in 2023, and in the period from 2016 to 2022, in mainland Portugal, highlighting the main public health risks related to this vector in Portugal.

_Introdução

Os flebótomos são insetos que pertencem ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera, subordem Nematocera e família Psychodidae. Esta família divide-se em duas subfamílias: Psychodinae e Phlebotominae. A subfamília Psychodinae engloba as denominadas moscas-do-esgoto, comuns em instalações sanitárias. Não picam os humanos e não transmitem agentes patogénicos, podendo, no entanto, ser transmissoras oportunistas de miíases ⁽¹⁾. Os insetos da subfamília Phlebotominae são conhecidos por flebótomos e entre eles encontram-se algumas espécies reconhecidas vetoras de agentes causadores de doença.

Estão descritas mais de 1000 espécies de flebótomos (1028 atualmente existentes, 32 extintas), distribuídas por quase todo o mundo, à exceção dos pólos, Nova Zelândia, ilhas do Pacífico e Sudeste asiático ^(2,3). Das 1028 espécies que

existem presentemente, 538 encontram-se no hemisfério ocidental e 490 no hemisfério oriental (2,4). As regiões onde existem mais espécies são a América, mais propriamente, as Américas Central e do Sul e a região que compreende a Europa, Ásia e Norte de África.

As espécies com maior importância médica na Eurásia e África pertencem ao género *Phlebotomus* e nas Américas ao género *Lutzomyia* (4,5). Em Portugal estão descritas, até ao momento, cinco espécies de flebotomos, pertencentes a dois géneros, nomeadamente, *Phlebotomus ariasi*, *Ph. papatasi*, *Ph. perniciosus*, *Ph. sergenti* e *Sergentomyia minuta*.

Os agentes patogénicos com maior importância médica e veterinária transmitidos pelos flebotomos são várias espécies de protozoários intracelulares obrigatórios do género *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), dos quais estes insetos são os vetores exclusivos. A leishmaníase, doença infecciosa resultante da infecção por *Leishmania* spp., é das mais importantes doenças emergentes causadas por protozoários transmitidos por vetores, sendo somente ultrapassada, em termos de números de pessoas afetadas, pela malária (6). A doença atinge populações mais pobres e encontra-se associada a malnutrição, deslocação de populações, um fraco sistema imunitário e falta de recursos (7). A infeção humana é causada por 21 a 30 espécies de *Leishmania*, transmitidas por cerca de 90 espécies de flebotomos. Estas incluem o complexo *L. donovani* com 3 espécies (*L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*); o complexo *L. mexicana* com 3 espécies principais (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*); *L. tropicalis*; *L. maior*; *L. aethiopica*; e o subgénero *Viannia* com 4 espécies principais (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana*).

Leishmania donovani, *L. infantum* e *L. chagasi* causam doenças viscerais agudas, as duas primeiras em todo o mundo na área de distribuição dos flebotomos e a última no norte e nordeste do Brasil existindo alguns focos na América latina; *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* causam a maioria das leishmaníases cutâneas crónicas na Europa, Ásia e África, e as leishmaníases cutâneas e mucocutâneas crónicas são causadas por *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana* nas Américas (8). *L. infantum* é a principal causa de leishmaníase visceral na

Bacia Mediterrânica (incluindo Portugal) e no Médio Oriente. Os cães são considerados os principais hospedeiros para estes parasitas e consequentemente o maior reservatório da leishmaníase visceral humana. Desta forma, para evitar a propagação da transmissão humana, as infeções nestes animais domésticos devem ser contidas (9).

Entre os agentes transmitidos por flebotomos encontram-se também alguns vírus do género *Phlebovirus* (Bunyivirales, Phenuiviridae). Estes vírus têm vindo a ganhar importância em saúde pública, uma vez que o número de novos agentes descritos tem vindo a aumentar e, por outro lado, diversos estudos de seroprevalência em áreas endémicas indicam circulação significativa de flebovírus transmitidos por flebotomos com o potencial de emergência como sérios causadores de doença humana (10).

Os vírus Nápoles (*Phlebovirus napolense*) e Sicília (*Phlebovirus siciliaense*) e as suas variantes são os mais associados à denominada febre por flebotomos (também conhecida por febre dos três dias ou febre de pappataci) e já foram identificados em vários países da Bacia do Mediterrâneo e do Médio Oriente. Até ao momento não existe mortalidade conhecida associada a estes vírus, no entanto, encontram-se em circulação e causam surtos de doença febril nos países endémicos (11).

O vírus Toscana (vTOS, *Phlebovirus toscanaense*) é o flebovírus transmitido por flebotomos mais importante em termos médicos. O vTOS, tal como acontece com outros arbovírus, pode causar infeções assintomáticas, ou doença ligeira (síndrome febril) mas apresenta neurotropismo, podendo também causar doença neurológica aguda como meningite ou meningoencefalite. Apesar da existência de casos atípicos com consequências graves, o facto de, por vezes, a infeção por vTOS ser assintomática e não necessitar de hospitalização pode conduzir a uma subestimativa das taxas de infeção. Não obstante, em 2012, foi referida a primeira morte por encefalite causada por vTOS num doente que viajou na região da Toscana e em 2021, foram reportados mais cinco casos fatais que ocorreram na Roménia (12,13). O vírus Toscana é uma importante causa de meningites assépticas durante o verão na Bacia do Mediterrâneo.

Apesar de os flebótomos não apresentarem características invasoras como algumas espécies de mosquitos, a sua distribuição está a alargar-se presentemente e é expectável que a área de transmissão dos agentes por eles transmitidos siga o mesmo rumo. A dispersão reportada poderá dever-se não só ao facto de estarem a ser descobertos flebótomos onde antes não eram procurados, mas também devido a uma verdadeira expansão resultante de alterações climáticas e ambientais.

_Objetivo

O objetivo deste trabalho foi apresentar, de uma forma sucinta, os resultados obtidos na vigilância de flebótomos em 2023, e no período que decorreu 2016 a 2022, em Portugal continental, realçando os principais riscos em saúde pública em Portugal.

_Material e métodos

Os programas que envolvem a investigação e vigilância de espécies de flebótomos são focados no estudo da fase adulta do inseto. Assim, no âmbito do REVIVE, os flebótomos foram colhidos pelas equipas nas regiões recorrendo a armadilhas tipo CDC (*Center for Disease Prevention and Control*) com saco coletor modificado, iscadas, sempre que possível, com CO₂.

Apesar de não se poder excluir a possibilidade da ocorrência de flebótomos noutros períodos do ano devido às alterações climáticas, as colheitas foram realizadas, maioritariamente, de maio a outubro, época de maior atividade destes vetores. As amostras foram enviadas ao laboratório, acondicionadas em caixas refrigeradas, seguindo a metodologia de *triple packaging* e até o máximo três dias após o início do trabalho de campo.

Os flebótomos machos recebidos no laboratório foram identificados à espécie com técnicas clássicas baseadas em características morfológicas e utilização de chaves taxonómicas. No caso das fêmeas, quando só existiu um espécime por captura e sempre que possível, foi realizada a identificação molecular da espécie.

A pesquisa de agentes patogénicos, *Leishmania* spp. e flebovírus, foi realizada em *pools* até um máximo de 35 espécimes, de acordo com a data e local de colheita, por extração de ácidos nucleicos totais e pesquisa da presença de DNA por *nested*-PCR e de RNA por RT-PCR respetivamente (14,15).

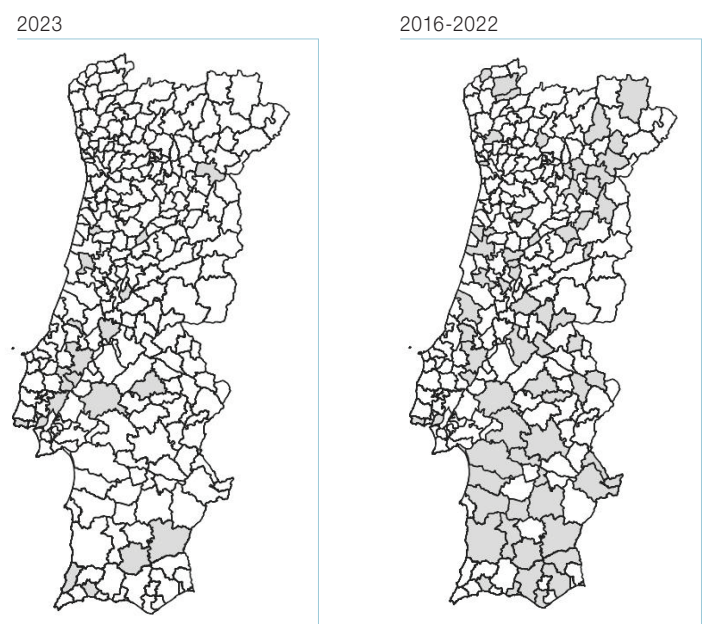
_Resultados

Concelhos

Em 2023, foi realizado esforço de captura de flebótomos pelas Administrações Regionais de Saúde do Algarve, Centro, Lisboa e Vale do Tejo e Norte, tendo sido efetuadas 207 colheitas que abrangeram 41 concelhos. A presença de flebótomos foi detetada em 18 dessas colheitas (8,7%) que resultaram num total de 101 espécimes. No mesmo período ocorreram ainda 15 colheitas acidentais de flebótomos, ou seja, colheitas dirigidas a mosquitos nas quais se obtiveram flebótomos, em 12 concelhos pertencentes às regiões do Algarve, Alentejo, Centro e Lisboa e Vale do Tejo. Destas colheitas resultaram 660 espécimes.

No período de 2016-2022 foram realizadas 294 colheitas de flebótomos num total de 71 concelhos de Portugal continental tendo sido colhidos 192 flebótomos. Adicionalmente foram colhidos 624 flebótomos em 141 colheitas acidentais efetuadas em 65 concelhos (figura 1).

Figura 1: Portugal continental - Concelhos onde foram realizadas colheitas de flebótomos em 2023 e em 2016-2022.



Espécies identificadas

No caso dos flebotomos, uma vez que a sua identificação é muito morosa, nem todos os espécimes são identificados à espécie, privilegiando-se a pesquisa de agentes patogénicos. Por este motivo existe discrepância entre o número de flebotomos identificados e o número total de flebotomos colhidos. Desta forma, a abundância relativa das espécies não é discutida. Na **figura 2** encontra-se assinalada a distribuição total de *Phlebotomus* spp.

Os mapas representam a cinzento os concelhos onde foram realizadas colheitas e a azul os concelhos onde foram identificadas as espécies. Para cada espécie foram elaborados dois mapas, o primeiro diz respeito às colheitas realizadas no ano 2023 e o segundo representando os dados acumulados no âmbito do REVIVE Flebotomos entre 2016 e 2022.

Num total de 761 flebotomos colhidos em 2023, foram identificados nos laboratórios do Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge 125 flebotomos pertencentes a quatro espécies, nomeadamente *Ph. ariasi*, *Ph. perniciosus*, *Ph. sergenti* e *Sergentomyia minuta*.

Nos flebotomos colhidos entre 2016 e 2022, num total de 1284, foram identificados 348 espécimes pertencentes às 5 espécies referenciadas para o território português: *Ph. ariasi*, *Ph. papatasi*, *Ph. perniciosus*, *Ph. sergenti* e *Se. minuta*. Seguidamente apresentam-se os resultados por espécie.

Phlebotomus ariasi Tonnoir, 1921

Em 2023, foram identificados oito espécimes de *Phlebotomus ariasi*, em cinco concelhos, entre maio e setembro. Nos anos anteriores, entre 2016 e 2022, foram identificados 66 espécimes, tendo sido a sua presença registada em 19 concelhos (**figura 3**).

Figura 2: Portugal continental - Distribuição de *Phlebotomus* spp.

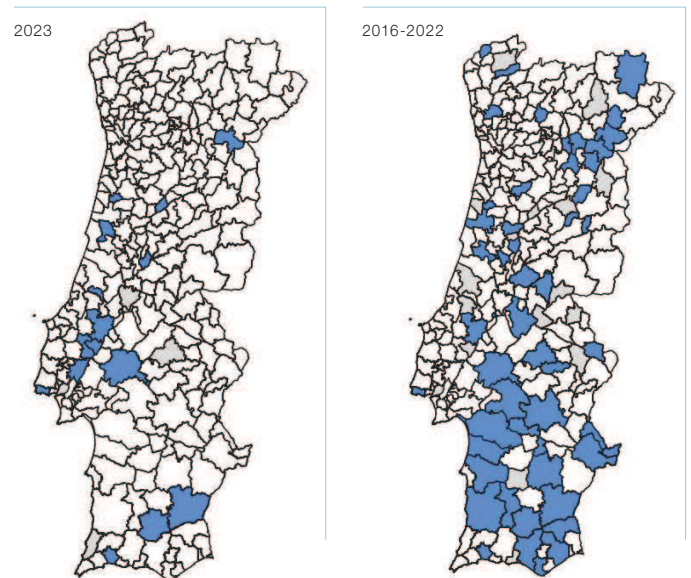


Figura 3: Portugal continental - Distribuição geográfica de *Phlebotomus ariasi*

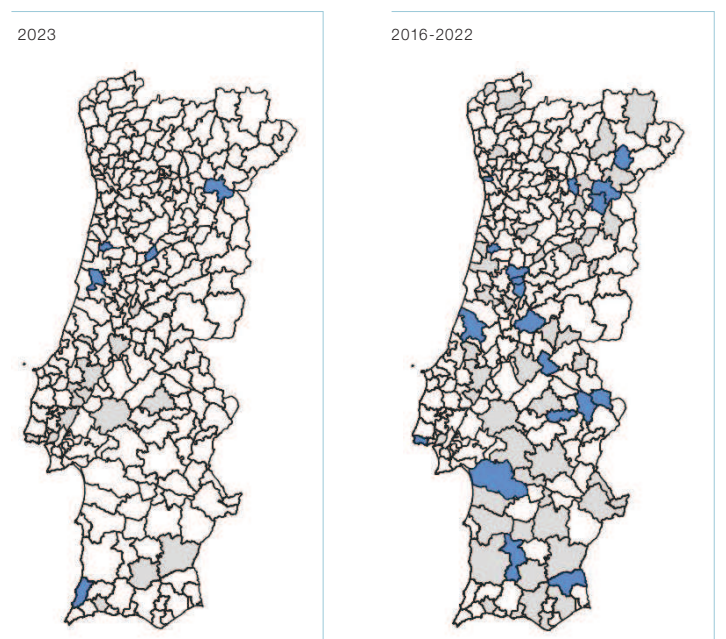


Figura 4: Portugal continental - Distribuição geográfica de *Phlebotomus papatasi*.

Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi Scopoli, 1786

No âmbito do REVIVE, foi registado um exemplar macho de *Ph. papatasi*, colhido no concelho de Alcoutim, em setembro de 2016. Em Portugal, a presença de *Ph. papatasi* é escassa. (figura 4)

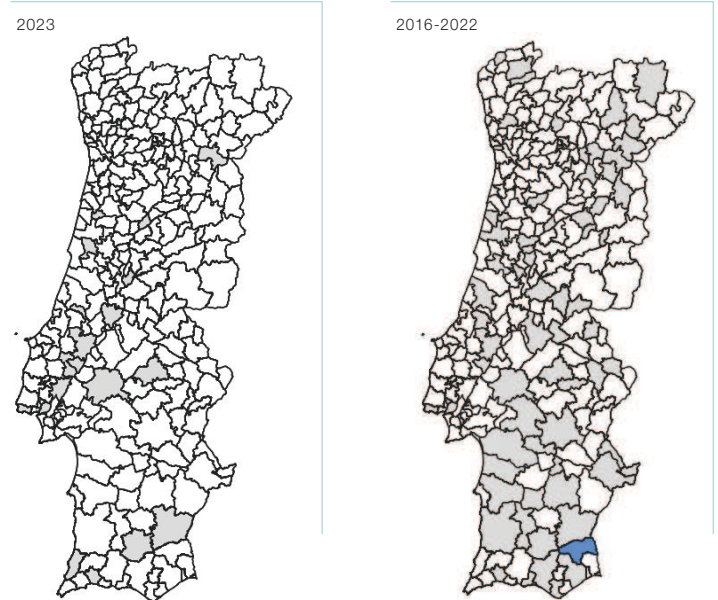


Figura 5: Portugal continental - Distribuição geográfica de *Phlebotomus perniciosus*.

Phlebotomus (Larroussious) perniciosus Newstead, 1911

Em 2023 foram identificados 115 exemplares de *Phlebotomus perniciosus* distribuídos por 12 concelhos, entre maio e outubro. No período de 2016 a 2022 a sua presença foi assinalada em 48 concelhos, tendo sido identificados 244 espécimes entre os meses de maio e outubro (figura 5).

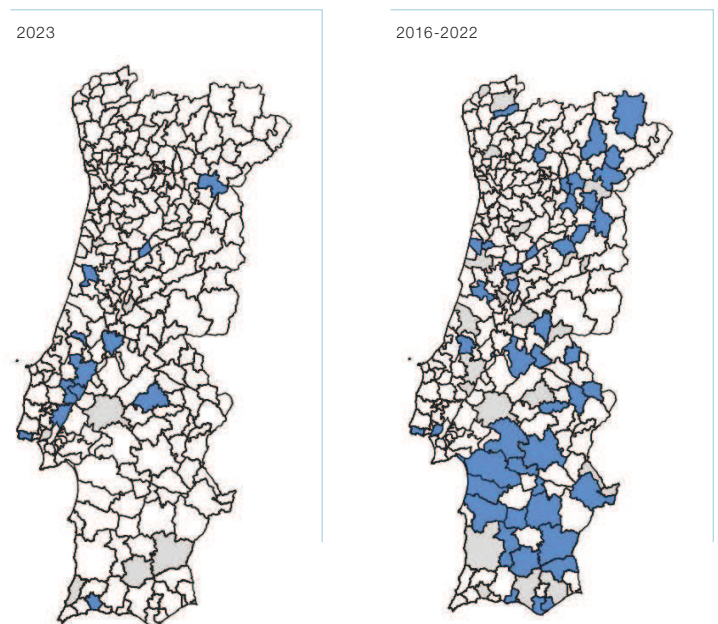


Figura 6: Portugal continental - Distribuição geográfica de *Phlebotomus sergenti*.

Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti Parrot, 1917

Em setembro de 2023 foi identificado um exemplar da espécie *Phlebotomus sergenti* proveniente de Portimão. Nas colheitas que decorreram de 2016 a 2022, foram identificados oito espécimes em quatro concelhos, nos meses de junho e julho (figura 6).

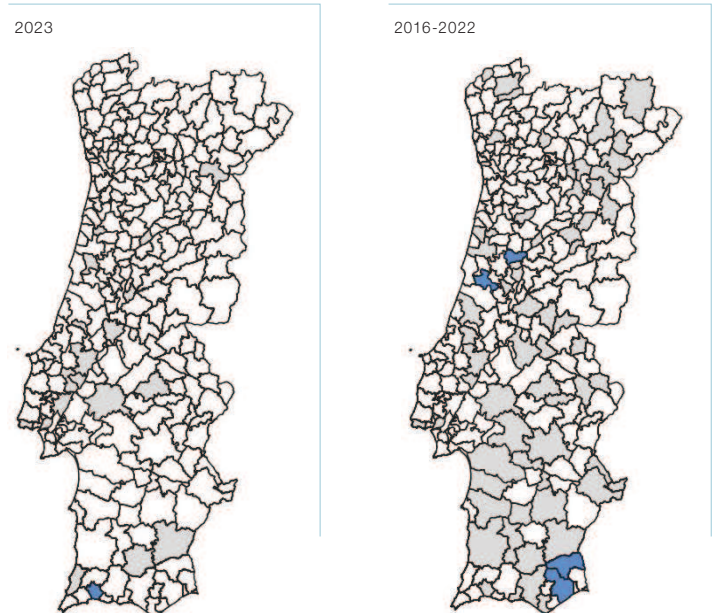
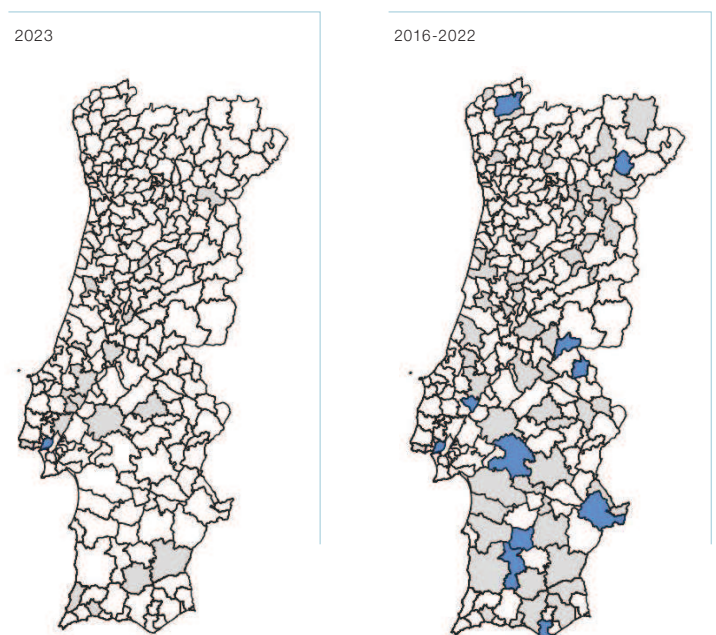


Figura 7: Portugal continental - Distribuição geográfica de *Sergentomyia minuta*.

Sergentomyia (Sergentomyia) minuta Rondani, 1843

A única espécie do género *Sergentomyia* existente em Portugal foi identificada, em 2023 no concelho de Lisboa em setembro (1 exemplar) e, durante os anos de 2016 a 2022, foram identificados 29 indivíduos em 12 concelhos, entre os meses de maio a setembro (figura 7).



Pesquisa de agentes patogénicos

Para a deteção de agentes patogénicos, em 2023, entre colheitas dedicadas e colheitas acidentais, foram pesquisados 645 flebotomos (55 e 590, respetivamente), para a presença de flebovírus e de *Leishmania*, tendo sido identificada a presença de ambos os agentes em dois pools diferentes, cada um deles composto por 30 flebotomos fêmeas, mas provenientes de uma mesma colheita ocorrida, em setembro, no concelho de Portimão. Nestas colheitas foram identificadas as espécies *Ph. perniciosus* e *Ph. sergenti*.

Esta foi a primeira vez que se detetaram agentes patogénicos em flebotomos no âmbito do REVIVE e a primeira vez que se detetou vTOS em flebotomos em Portugal.

Entre 2016 e 2022 foram pesquisados 495 flebotomos, não tendo sido detetado qualquer agente patogénico.

_Discussão

No que diz respeito às espécies de flebotomos colhidas, *Phlebotomus ariasi* é vetor comprovado do flebovírus Sicília e de *Leishmania infantum* (16). Em Portugal esta espécie já foi encontrada parasitada por *Leishmania* spp. e acredita-se que seja um dos seus vetores (17). *Phlebotomus papatasi* é uma das espécies mais estudadas não só por ter uma ampla distribuição geográfica, mas também pela importância médica. É o vetor principal de *Leishmania major* que causa leishmaníase zoonótica cutânea no norte do Saara, sendo que também é transmissor do flebovírus Sicília. Adicionalmente foi encontrado infetado com vTOS (18-21). Em Portugal, devido à sua escassez, será pouco provável que assuma um papel importante na transmissão de agentes. *Phlebotomus perniciosus* desempenha um papel muito importante na epidemiologia da leishmaníase visceral humana e da leishmaníase canina, uma vez que é o principal vetor de *Leishmania infantum* na Bacia do Mediterrâneo (22,23). É também o vetor principal do vTOS (24). Em Portugal esta é a espécie mais ubíqua e já foi encontrada infetada por *Leishmania infantum* pelo que se supõe que seja o seu principal vetor (25,26). A espécie *Ph. sergenti* pode ser encontrada em Portugal continental e na Ilha da Madeira, tendo sido reportada no Funchal (27). É vatora de *Leishmania*

tropica (28) e também já foi encontrada infetada com vTOS (28). No que concerne aos flebotomos do género *Sergentomyia*, estes apresentam uma preferência trófica por répteis e são vetores comprovados de espécies de leishmania que os infetam. Desta forma, tem sido geralmente aceite que não podem transmitir agentes patogénicos aos humanos (29). Contudo, várias espécies do género já foram encontradas após terem efetuado refeições em humanos, e o vTOS e *Leishmania major* foram detetados em *Sergentomyia minuta* em França e em Portugal, respetivamente. Desconhece-se, por enquanto, se esta espécie terá ou não algum papel na transmissão destes agentes ao Homem (30,31).

Relativamente aos agentes patogénicos em estudo, em 2023, no âmbito do REVIVE, foi realizada a primeira deteção de vTOS em flebotomos em Portugal, em espécimes colhidos no Algarve. O primeiro registo de casos humanos de infeção por vTOS em Portugal data de 1983 e tratou-se de um casal sueco que visitou a região de Albufeira (32). Estudos retrospectivos de seroprevalência realizados em pacientes entre 2004 e 2008 (33) indicaram a presença de anticorpos (IgG e/ou IgM) em indivíduos no distrito de Faro. Adicionalmente, em pedidos de diagnóstico, foram igualmente confirmadas infeções recentes (presença de IgM) nos anos de 2010 e de 2012 na mesma região (34). Desta forma, podemos afirmar que, ainda que com baixa incidência, ou, pelo menos, com baixa taxa de deteção, este vírus continua a circular na zona.

A deteção de *Leishmania infantum* em flebotomos era expectável uma vez que o Algarve é reconhecido como zona endémica e todos os anos são detetados numerosos casos de leishmaníase canina. Apesar de na colheita REVIVE não ter sido possível a identificação da espécie de flebotomo infetada, estudos anteriores confirmaram *Ph. perniciosus* como o principal vetor de parasitas de *Leishmania* na região do Algarve (35,36).

Nas colheitas de 2023, não só foram encontrados ambos os agentes pesquisados, como se verificou a sua circulação simultânea na mesma população de flebotomos. A co-circulação de *L. infantum* e flebovírus em populações de flebotomíneos na região do Mediterrâneo já havia sido relatada em estudos anteriores em países como a Tunísia, Chipre e Portugal (36-38).

_Conclusões

Os flebotomos são conhecidos vetores de agentes com importância clínica. Nas últimas décadas a sua distribuição tem vindo a aumentar na Europa, particularmente na Bacia do Mediterrâneo. No entanto, os dados sobre estes vetores continuam a ser escassos em Portugal.

A vigilância realizada no REVIVE Flebotomos é um instrumento valioso para conhecer a ecologia e distribuição das espécies e para a determinação dos agentes patogénicos a eles associados e em circulação em Portugal. Estes dados são importantes para conhecer a epidemiologia das doenças transmitidas por estes vetores e para determinar medidas de controlo e prevenção, caso se justifique.

O facto de *Ph. perniciosus* ser a espécie mais ubíqua no país, reconhecido vetor de ambos os agentes patogénicos encontrados em 2023 e de não se não se poder excluir a possibilidade da ocorrência de co-infecções em humanos, com consequências ainda desconhecidas, reforça a importância da vigilância.

Agradecimento:

A todos os profissionais do país envolvidos no projeto REVIVE, pela colaboração no trabalho de campo e de registo.

Lista completa da equipa disponível em:

REVIVE – *Culicídeos, Ixodídeos e flebotomos: relatório 2023*.

<https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/9172>

Referências bibliográficas:

- (1) Schulz-Stübner S, Danner K, Hauer T, et al. Psychodidae (drain fly) infestation in an operating room. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015 Mar;36(3):366-7. <https://doi.org/10.1017/ice.2014.43>
- (2) Galati EAB, Rodrigues BL. A Review of Historical Phlebotominae Taxonomy (Diptera: Psychodidae). *Neotrop Entomol*. 2023; 52(4):539-59. <https://doi.org/10.1007/s13744-023-01030-8>
- (3) Armed Forces Pest Management Board. Regional disease vector ecology profile. Defense pest management information analysis center. Forest Glen section. Washington DC: Walter Reed Army Medical Center, 2001.
- (4) Maroli M, Feliciangeli MD, Arias J. Metodos de captura, conservacion y montaje de los flebotomos (Diptera: Psychodidae). Organización Panamericana de la Salud, 1997.
- (5) Léger N, Depaquit J. Phlebotominae. In: Rippert C (coord.). *Epidemiologie des maladies parasitaires : arthropodes et affections qu'ils provoquent ou qu'ils transmettent* : Tome 4. Cachan: Editions medicales internationales, 2007, pp. 159-75.
- (6) World Health Organization. Health Topic - Leishmaniasis [online]. (consult. 11/4/2024). https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1
- (7) World Health Organization. Fact Sheet – Leishmaniasis [online]. (consult. 11/4/2024). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- (8) European Centre for Disease Prevention and Control. Facts about leishmaniasis [online]. (consult. 11/4/2024). <https://www.ecdc.europa.eu/en/search?s=facts+about+leishmaniasis>
- (9) Amaro F, Vilares A, Martins S, et al. Co-circulation of Leishmania parasites and phlebotomines in a population of sand flies collected in the South of Portugal. *Trop Med Infect Dis*. 2023; 9(1):3. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9010003>
- (10) Alkan C, Bichaud L, de Lamballerie X, et al. Sandfly-borne phlebotomines of Eurasia and Africa: epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral Res*. 2013;100(1):54-74. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.005>
- (11) Armed Forces Pest Management Board. Regional disease vector ecology profile. Defense pest management information analysis center. Forest Glen section. Washington DC: Walter Reed Army Medical Center, 2001.
- (12) Bartels S, de Boni L, Kretzschmar HA, et al. Lethal encephalitis caused by the Toscana virus in an elderly patient. *J Neurol*. 2012;259(1):175-77. <https://doi.org/10.1007/s00415-011-6121-y>
- (13) Popescu CP, Cotar AI, Dinu S, et al. Emergence of Toscana Virus, Romania, 2017-2018. *Emerg Infect Dis*. 2021 May;27(5):1482-85. <https://doi.org/10.3201/eid2705.204598>
- (14) Lambert AJ, Lanciotti RS. Consensus amplification and novel multiplex sequencing method for S Segment species Identification of 47 Viruses of the Orthobunyavirus, Phlebotomus, and Nairovirus genera of the family Bunyaviridae. *J Clin Microbiol*. 2009;47(8):2398-404. <https://doi.org/10.1128/JCM.00182-09>
- (15) Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, et al.; Spanish HIV-Leishmania Study Group. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring Leishmania infantum infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96(Suppl 1):S185-9. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(02\)90074-x](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(02)90074-x)
- (16) Benallal KE, Garni R, Harrat Z, et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Maghreb region: A systematic review of distribution, morphology, and role in the transmission of the pathogens. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022 Jan 6;16(1):e0009952. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009952>
- (17) Pires CA. Les Phlébotomes du Portugal. I-Infestation naturelle de Phlebotomus ariasi Tonnoir, 1921 et Phlebotomus perniciosus Newstead, 1911, par Leishmania dans le foyer zoonotique de Arrábida (Portugal). *Ann Parasitol Hum Comp*. 1984;59(5):521-4.
- (18) Hamarshah O. Distribution of Leishmania major zymodemes in relation to populations of Phlebotomus papatasi sand flies. *Parasit Vectors*. 2011 Jan 25;4:9. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-9>

artigos breves_ n. 8

- (19) Schmidt Jr, Schmidt ML, McWilliams JG. Isolation of phlebotomus fever virus from *Phlebotomus papatasi*. *Am J Trop Med Hyg.* 1960 Jul;9:450-4. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1960.9.450>
- (20) Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, et al. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro Surveill.* 2010 Mar 11;15(10):19507. <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.15.10.19507-en>
- (21) Es-Sette N, Ajaoud M, et al. Épidémiologie moléculaire des phlebovirus dans quatre provinces du Maroc [Molecular epidemiology of phlebovirus in four provinces in Morocco]. *Bull Soc Pathol Exot.* 2016;109(3):143-50. <https://doi.org/10.1007/s13149-016-0498-x>
- (22) Tabbabi A. Review of Leishmaniasis in the Middle East and North Africa. *Afr Health Sci.* 2019;19(1):1329-37. <https://doi.org/10.4314/ahs.v19i1.4>
- (23) Izri MA, Belazzoug S, Boudjebba Y, et al. *Leishmania infantum* MON-1 isolé de *Phlebotomus perniciosus*, en Kabylie (Algérie) [*Leishmania infantum* MON-1 isolated from *Phlebotomus perniciosus*, in Kabylia (Algeria)]. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1990;65(3):151-2.
- (24) Verani P, Ciufolini MG, Nicoletti L, et al. Studi ecologici ed epidemiologici del virus Toscana, un arbovirus isolato da flebotomi [Ecological and epidemiological studies of Toscana virus, an arbovirus isolated from *Phlebotomus*]. *Ann Ist Super Sanita.* 1982;18(3):397-9.
- (25) Pires CA. Les Phlébotomes du Portugal. I-Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, par *Leishmania* dans le foyer zoonotique de Arrábida (Portugal). *Ann Parasitol Hum Comp.* 1984;59(5):521-4.
- (26) Maia C, Afonso MO, Neto L, et al. Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve region, Portugal. *J Vector Borne Dis.* 2009 Dec;46(4):268-72.
- (27) Alves-Pires C, Capela RA. Phlébotomes du Portugal VIII- Première mention de *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *sergenti* Parrot, 1917 à île de Madère. *Parasite.* 1996;3:94.
- (28) Es-Sette N, Ajaoud M, Bichaud L, et al. *Phlebotomus sergenti* a common vector of *Leishmania tropica* and Toscana virus in Morocco. *J Vector Borne Dis.* 2014 Jun;51(2):86-90. https://journals.lww.com/jvbd/fulltext/2014/51020/phlebotomus_sergenti_a_commonvector_of_leishmania.3.aspx
- (29) Maia C, Depaquit J. Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? *Parasite.* 2016;23:55. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016062>
- (30) Campino L, Cortes S, Dionísio L, et al. The first detection of *Leishmania major* in naturally infected *Sergentomyia minuta* in Portugal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2013;108:516-18.
- (31) Charrel RN, Izri A, Temmam S, et al. Toscana virus RNA in *Sergentomyia minuta* flies. *Emerg Infect Dis.* 2006 Aug;12(8):1299-300. <https://doi.org/10.3201/eid1708.060345>
- (32) Ehrnst A, Peters CJ, Niklasson B, et al. Neurovirulent Toscana virus (a sandfly fever virus) in Swedish man after visit to Portugal. *Lancet.* 1985 May 25;1(8439):1212-3. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(85\)92886-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(85)92886-7)
- (33) Amaro F, Luz T, Parreira P, et al. Vírus Toscana na população Portuguesa: vigilância sero-epidemiológica e casos clínicos. *Acta Med Port.* 2011 Dec;24(Suppl 2):503-8. <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/1443/1031>
- (34) Amaro F, Zé-Zé L, Luz MT, et al. Toscana Virus: Ten Years of Diagnostics in Portugal. *Acta Med Port.* 2021 Oct 1;34(10):677-681. <https://doi.org/10.20344/amp.13308>
- (35) Maia C, Afonso MO, Neto L, et al. Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve region, Portugal. *J Vector Borne Dis.* 2009 Dec;46(4):268-72.
- (36) Amaro F, Vilares A, Martins S, et al. Co-Circulation of *Leishmania* Parasites and Phleboviruses in a Population of Sand Flies Collected in the South of Portugal. *Trop Med Infect Dis.* 2023 Dec 20;9(1):3. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9010003>
- (37) Fares W, Dachraoui K, Barhoumi W, et al. Co-circulation of Toscana virus and *Leishmania infantum* in a focus of zoonotic visceral leishmaniasis from Central Tunisia. *Acta Trop.* 2020 Apr;204:105342. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105342>
- (38) Ergunay K, Kasap OE, Orsten S, et al. Phlebovirus and *Leishmania* detection in sandflies from eastern Thrace and northern Cyprus. *Parasit Vectors.* 2014 Dec 12;7:575. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0575-6>