

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**LEISHMANIOSES NO MUNICÍPIO DE VÁRZEA DA PALMA, MINAS GERAIS,  
BRASIL: ESTUDO DOS FLEBOTOMÍNEOS E DA LEISHMANIOSE CANINA.**

por

Cristiani de Castilho Sanguinette

Belo Horizonte

Fevereiro/2011

**DISSERTAÇÃO MDIP-CPqRR**

**C.C. SANGUINETTE**

**2011**

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**LEISHMANIOSES NO MUNICÍPIO DE VÁRZEA DA PALMA, MINAS GERAIS,  
BRASIL: ESTUDO DOS FLEBOTOMÍNEOS E DA LEISHMANIOSE CANINA.**

por

**Cristiani de Castilho Sanguinette**

Dissertação apresentada com vistas à  
obtenção do Título de Mestre em Ciências na  
área de concentração Doenças Infecciosas e  
Parasitárias.

Orientação: Célia Maria Ferreira Gontijo

José Dilermando Andrade Filho

Belo Horizonte

Fevereiro/2011

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S225l Sanguinette, Cristiani de Castilho.  
2011

Leishmanioses no município de Várzea da Palma,  
Minas Gerais, Brasil: Estudo dos flebotomíneos e da  
leishmaniose canina / Cristiani de Castilho Sanguinette.  
– Belo Horizonte, 2011.

XXI, 139 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 128-160

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção  
do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós -  
Graduação em Ciências da Saúde do Centro de  
Pesquisas René Rachou. Área de concentração:  
Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose/epidemiologia 2.  
Phlebotominae/parasitologia 3. Cães/parasitologia 4.  
Reação em Cadeia da Polimerasa/métodos I. Título. II.  
Gontijo, Célia Maria Ferreira (Orientação). III. Andrade  
Filho, José Dilermando

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**LEISHMANIOSES NO MUNICÍPIO DE VÁRZEA DA PALMA, MINAS GERAIS,  
BRASIL: ESTUDO DOS FLEBOTOMÍNEOS E DA LEISHMANIOSE CANINA.**

por

**Cristiani de Castilho Sanguinette**

Foi avaliado pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo (Presidente)

Dr. José Dilermando Andrade Filho

Dr. Reginaldo Peçanha Brazil

Dra. Carina Margonari de Souza

Suplente: Rodrigo Pedro Pinto Soares

**Dissertação defendida e aprovada em: 23/02/2011**

Este trabalho é dedicado à Gustavo de Assis Alexandre, aos meus familiares e a todos que contribuíram para a sua realização.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar pelos bons caminhos e me dar forças para nunca desistir.

A minha mãe Wilma, maior exemplo de perseverança na busca do conhecimento e que apesar das dificuldades soube transmitir toda sua sabedoria e apoio constante. Amo você!

A minha orientadora, Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo, por me aceitar com tranquilidade, competência e confiabilidade como sua aluna. Obrigada pelo apoio, amizade, ensinamentos, além de sua dedicação e especial atenção nas revisões e sugestões, fatores fundamentais para a realização deste trabalho. Foi um prazer tê-la como minha orientadora!

Ao meu orientador, Dr. José Dilermando Andrade Filho, por ter assumido a co-orientação e posteriormente a orientação deste trabalho. Agradeço pela incansável paciência nos ensinamentos da sistemática dos flebotomíneos, pelas valiosas sugestões e pela convivência harmoniosa. Obrigada por tudo!

A Pesquisadora Alda Lima Falcão que me mostrou os primeiros passos da pesquisa científica e o amor pelos flebotomíneos.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, atualmente na pessoa do diretor Rodrigo Corrêa, pelo apoio financeiro e logístico durante a realização deste projeto.

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, CPqRR/FIOCRUZ, pela oportunidade de desenvolver este projeto e pelo conhecimento transmitido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq) pela concessão de bolsa para a realização deste trabalho.

A Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, na pessoa de Maria Norma Melo, pelo apoio na realização dos testes sorológicos.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Aos moradores de Várzea da Palma, MG, por disponibilizarem suas casas para que pudéssemos realizar este trabalho. Obrigada pela confiança e espero que estes resultados possam beneficiá-los.

Agradeço à Secretaria Municipal de Saúde de Várzea da Palma, setor de Zoonoses, em nome de Luiz Antônio Pulchério Bastos, Gilberto Patrício da Silva, Deusdete de Oliveira Silva e Roberto Euzébio de Castro pelo apoio logístico e empenho para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Prefeitura Municipal de Várzea da Palma/Secretaria Municipal de Saúde: Juliana Fagundes, Junio, Antônio, Sílvio e Carlos Euvécio por toda colaboração.

Ao veterinário Plínio Batista Rocha Júnior pela colaboração e apoio durante a coleta de material biológico e na realização dos exames clínicos.

A Danúbia Lacerda pela assessoria nas análises estatísticas.

Ao Programa de Desenvolvimento de Ferramentas Tecnológicas em Saúde-PDTIS/FIOCRUZ pela utilização de suas instalações.

A Edelberto Santos Dias, chefe do Laboratório de Leishmanioses.

A Silvane Murta do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular e a Edward e Luciana do Laboratório de Pesquisas Clínicas por disponibilizarem o espaço físico e os equipamentos para a realização das extrações de DNA.

Ao amigo Helbert Antônio Botelho pela amizade e parceria imprescindível na realização de todas as etapas deste trabalho. Obrigada pela paciência, dedicação e empenho. Te Adoro!

A Eduardo de Castro Ferreira pelos ensinamentos de biologia molecular, pela tranquilidade transmitida e por iluminar meu caminho em direção ao conhecimento.

A Daniela Gonçalves e Juliana Faustino pelo empenho como estudante de iniciação científica, pelo esforço e iniciativa.

A Gustavo Mayr, Mariana Ramos, Paula Cavalcante, Ana Paula Zenóbio e Rogério pela alegria do convívio diário e por todo apoio nas viagens e na realização deste projeto. Obrigada meninas por me manterem jovem e atualizada. Vocês bombaram!!!

A Cynthia (Pedrinho e Luisa), Shara, Luciana Moura, Débora Silveira, Daphne, Érika, Laura e todos os colegas do Laboratório de Leishmanioses pelo apoio, disponibilidade e pelo carinho.

Agradeço ao Augusto, Gilvan, Kleber e Alex por me conduzirem com segurança nas viagens e pela agradável convivência.

As minhas grandes amigas, Regina e Deborah, pela maravilhosa e espontânea amizade, estímulo, momentos divertidos, compreensão e incentivo. Amo vocês.

Aos queridos amigos Daise, Gustavo, Claudinéia, Cristiano, Natália, Luiz Eduardo (Wlad), Fabiana Matrangolo, Marina Barroso, Claudia Ríos, Thaís e Fabiana pelos momentos de diversão afastando o cansaço e as tensões durante a realização deste trabalho.

Ao casal Guilherme e Christiana, seus lindos filhos Eric e Henrique e a Mary por todo carinho e pelos momentos agradáveis que me proporcionam.

A Luciana Lemos por cuidar da minha casa e da minha família para que eu pudesse realizar este trabalho.

A família Assis por me aceitar em suas vidas, especialmente a Leila, Estevão, Arthur, Márcio, Maria das Graças, Maria Clara, João Lúcio, Ronaldo, Letícia, Leone e Lucy.

A Luciara e Jurandir pelo carinho, apoio e compreensão.

Aos meus irmãos, Douglas e Fernando, pela cumplicidade, carinho, confiança e união. Obrigada por fazerem parte da minha história. A minha cunhada Andréia pela amizade.

A Zinha e Vô Zé por me ensinarem a amar a natureza, por todo o carinho, cuidado e por me darem a liberdade necessária para uma infância saudável e feliz.

Ao Tio Gute e Simone pela dedicação, carinho, incentivo e diversos momentos agradáveis do nosso convívio.

Ao meu afilhado André pelas gostosas risadas, pela educação e por ser uma criança amável e cativante. Amo você meu lindo!

As minhas meninas, Aika e Nina, pela beleza e alegria que me recebem diariamente e por estarem ao meu lado em todos os momentos. Obrigada pelas brincadeiras, ladidos, roncões, olhares verdadeiros e companheirismo.

Agradeço a todas as pessoas que torceram por mim e acreditaram nesta conquista.

A todos os animais que foram eutanasiados para a realização deste trabalho.

Ao meu Gu por acreditar nos meus sonhos e estar ao meu lado dando apoio e carinho. Obrigada pelo amor, confiança, boas risadas e por me fazer tão feliz. Amo você!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XVIII
RESUMO.....	XX
ABSTRACT.....	XXI
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
1.1 Leishmanioses.....	22
1.2 Flebotomíneos e sua importância médica.....	24
1.3 Leishmaniose canina (LC).....	26
1.4 Diagnóstico da infecção por <i>Leishmania</i> em cães.....	27
1.5 O ambiente antrópico e as leishmanioses.....	30
1.6 As Leishmanioses no município de Várzea da Palma, Minas Gerais.....	32
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>34</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
3.1 Objetivo Geral.....	35
3.2 Objetivos Específicos.....	35
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
4.1 Área de estudo.....	36
4.2 Estudo da Fauna Flebotomínica.....	39
4.2.1 Coletas sistematizadas com armadilhas luminosas automáticas.....	39
4.2.2 Coletas não sistematizadas.....	39
4.2.3 Processamento dos flebotomíneos coletados.....	40
4.2.4 Identificação dos flebotomíneos.....	40
4.2.5 Sazonalidade.....	40
4.2.6 Estudo das anomalias em <i>Lu. longipalpis</i> .....	41
4.3 Estudo da infecção canina.....	41

4.3.1	Amostra de cães.....	41
4.3.2	Procedimentos éticos.....	42
4.3.3	Avaliação clínica dos cães.....	42
4.3.4	Soroprevalência canina.....	43
4.4	Métodos sorológicos.....	43
4.4.1	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	43
4.4.2	Ensaio Imunoenzimático – ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	44
4.5	Métodos moleculares para o estudo de <i>Leishmania</i> nos flebotomíneos e nos cães.....	46
4.5.1	Extração do DNA.....	46
4.5.2	Confirmação da extração de DNA.....	47
4.5.3	<i>Nested</i> PCR (LnPCR) para o gene SSUrRNA de <i>Leishmania</i> em amostras de DNA extraídas de flebotomíneos e cães .....	47
4.6	Identificação da espécie de <i>Leishmania</i> .....	48
4.7	Isolamento de amostras de <i>Leishmania</i> .....	50
4.7.1	A partir de flebotomíneos.....	50
4.7.2	A partir de amostras de cães.....	51
4.8	Normas de Biossegurança.....	51
4.9	Análise estatística.....	51
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
5.1	Coletas sistematizadas.....	53
5.2	Capturas não sistematizadas.....	63
5.3	Anomalias em flebotomíneos.....	64
5.4	Estudo da infecção natural em fêmeas de flebotomíneos.....	70
5.4.1	Casos humanos x espécies de flebotomíneos encontradas naturalmente infectadas.....	77
5.4.1.1	LV x fêmeas de flebotomíneos naturalmente infectadas com <i>Le. chagasi</i> .....	77
5.4.1.2	LT x fêmeas de flebotomíneos naturalmente infectadas com <i>Le. braziliensis</i> .....	79
5.5	Estudo da infecção canina.....	81

5.5.1 Avaliação clínica e caracterização dos cães estudados.....	81
5.5.2 Detecção da infecção por <i>Leishmania</i> .....	85
5.5.2.1 Inquérito sorológico.....	85
5.5.2.2 Diagnóstico molecular.....	86
5.5.3 Concordância entre os métodos diagnósticos.....	88
5.5.4 Avaliação dos métodos diagnósticos de acordo com os parâmetros clínicos dos cães.....	89
5.5.5 Avaliação clínica dos cães eutanasiados e mudança do perfil clínico .....	94
5.5.6 Isolamento e caracterização de <i>Leishmania</i> sp. de amostras provenientes de cães.....	96
5.5.7 Casos humanos de LV x fêmeas de flebotomíneos naturalmente infectadas com <i>Le. chagasi</i> x cães infectados com <i>Le. chagasi</i> .....	97
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>100</b>
6.1 Fauna flebotomínica.....	100
6.2 Infecção natural de flebotomíneos.....	104
6.3 Anomalias em machos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	110
6.4 A leishmaniose canina no município de Várzea da Palma, MG.....	112
6.5 Diagnóstico da leishmaniose canina.....	115
6.6 Epidemiologia das leishmanioses em Várzea da Palma, MG.....	121
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>124</b>
<b>8 ANEXO.....</b>	<b>126</b>
8.1 Anexo I – Ficha Clínica Epidemiológica (canina).....	126
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>128</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Município de Várzea da Palma – Norte de Minas Gerais. Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/varzeadapalma>..... 36
- Figura 2:** Microrregião de Pirapora - Número 10 - Várzea da Palma. Fonte: <http://webcarta.net/carta/mapa>..... 36
- Figura 3:** Mapa de Várzea da Palma, MG, evidenciando as localidades onde as armadilhas de flebotomíneos foram expostas..... 38
- Figura 4:** Alinhamento das sequências do fragmento do gene SSUrRNA de espécies de *Leishmania*, depositadas no GenBank..... 50
- Figura 5:** Porcentagem de flebotomíneos por espécie, coletados no município de Várzea da Palma, MG, no período de abril de 2009 a março de 2010..... 54
- Figura 6:** Total de flebotomíneos por espécie, coletados no município de Várzea da Palma, MG, no período de abril de 2009 a março de 2010, segundo localidade de estudo..... 57
- Figura 7:** Ocorrência de *Lutzomyia longipalpis* e *Nyssomyia intermedia* segundo localidade de estudo no município de Várzea da Palma, MG, no período de abril de 2009 a março de 2010..... 58
- Figura 8:** Porcentagem de flebotomíneos coletados no período de abril de 2009 a março de 2010, no município de Várzea da Palma, MG..... 58
- Figura 9:** Porcentagem de flebotomíneos capturados mensalmente no município de Várzea da Palma, MG, em comparação com a temperatura média mensal, no período de abril de 2009 a março de 2010..... 62
- Figura 10:** Porcentagem de flebotomíneos capturados mensalmente no município de Várzea da Palma, MG, em comparação com os parâmetros climáticos:

pluviosidade total e da média da umidade relativa do ar, no período de abril de 2009 a março de 2010.....	62
<b>Figura 11:</b> Média de flebotomíneos machos e fêmeas capturados mensalmente com armadilha luminosa HP, no município de Várzea da Palma, MG, no período de abril de 2009 a março de 2010.....	63
<b>Figura 12:</b> Distribuição das espécies capturadas nas coletas não sistematizadas no município de Várzea da Palma, MG.....	64
<b>Figura 13:</b> Parâmero padrão dos machos de <i>Lu. longipalpis</i> .....	65
<b>Figura 14:</b> Parâmero de <i>Lu. longipalpis</i> com anomalia unilateral tipo 1.....	66
<b>Figura 15:</b> Parâmero de <i>Lu. longipalpis</i> com anomalia unilateral tipo 2.....	66
<b>Figura 16:</b> Parâmero de <i>Lu. longipalpis</i> com anomalia unilateral tipo 3.....	66
<b>Figura 17:</b> Parâmero de <i>Lu. longipalpis</i> com anomalia unilateral tipo 4.....	67
<b>Figura 18:</b> Parâmero de <i>Lu. longipalpis</i> com anomalia unilateral tipo 5.....	67
<b>Figura 19:</b> Parâmero de <i>Lu. longipalpis</i> com anomalia unilateral tipo 6.....	67
<b>Figura 20:</b> Comparação entre o comprimento do parâmero (CP) e a distância entre a base do parâmero e os espinhos normais (BN) entre os machos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> da localidade tipo e os machos com anomalia Tipo 1, 3 e 4 coletados no município de Várzea da Palma, MG.....	68
<b>Figura 21:</b> Parâmero de <i>Lu. longipalpis</i> com anomalia bilateral simétrica. Bar = 100µm.....	69
<b>Figura 22:</b> Parâmero de <i>Lu. longipalpis</i> com anomalia bilateral assimétrica. Bar = 100µm.....	70

<b>Figura 23:</b> Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados da LnPCR (Primers R3 e R4) de amostras de fêmeas coletados no município de Várzea da Palma, MG. Canaletas: PM - peso molecular ØX174; CP - controle positivo (DNA de <i>L. (V.) braziliensis</i> ); CN - controle negativo; 01 a 06 - amostras de <i>Lu. longipalpis</i> ; 07 a 17 - amostras de <i>Ny. intermedia</i> .....	73
<b>Figura 24:</b> Distribuição das espécies de flebotomíneos naturalmente infectadas, por ponto de coleta, no município de Várzea da Palma, Minas Gerais.....	76
<b>Figura 25:</b> Casos humanos de LV notificados no período de janeiro de 2009 a abril de 2010 no município de Várzea da Palma, MG, e fêmeas de flebotomíneos encontradas naturalmente infectadas com <i>Le.chagasi</i> no período de abril de 2009 a março de 2010, segundo localidade de estudo.....	78
<b>Figura 26:</b> Casos de humanos com LT notificados no período de janeiro de 2009 a abril de 2010 no município de Várzea da Palma, MG, e fêmeas de flebotomíneos encontradas naturalmente infectadas com <i>Le.braziliensis</i> no período de abril de 2009 a março de 2010, segundo localidade de estudo.....	80
<b>Figura 27:</b> Distribuição por faixa etária dos cães amostrados no município de Várzea da Palma, MG, no ano de 2010.....	81
<b>Figura 28:</b> Distribuição por raça dos cães amostrados no município de Várzea da Palma, MG, no ano de 2010.....	82
<b>Figura 29:</b> Comparação entre as amostras biológicas utilizadas no diagnóstico molecular de cães do município de Várzea da Palma, MG, no ano de 2010.....	88
<b>Figura 30:</b> Comparação dos resultados obtidos nos testes RIFI, ELISA e LnPCR de sangue periférico em cães sintomáticos do município de Várzea da Palma, MG, no ano de 2010.....	92

<b>Figura 31:</b> Comparação dos resultados obtidos nos testes RIFI, ELISA e LnPCR de sangue periférico em cães assintomáticos do município de Várzea da Palma, MG, no ano de 2010.....	92
<b>Figura 32:</b> Comparação dos resultados obtidos na PCR utilizando amostras clínicas de sangue, pele e medula em cães soropositivos sintomáticos do município de Várzea da Palma, MG, no ano de 2010.....	93
<b>Figura 33:</b> Comparação dos resultados obtidos na PCR utilizando amostras clínicas de sangue, pele e medula em cães soropositivos assintomáticos do município de Várzea da Palma, MG, no ano de 2010.....	94
<b>Figura 34:</b> Classificação do perfil clínico (CS: Cães sintomáticos; CA: Cães assintomáticos) dos cães soropositivos do município de Várzea da Palma, MG, ano 2010, em dois momentos.....	95
<b>Figura 35:</b> Cão (número 97) do município de Várzea da Palma, MG, de raça indefinida com seis anos de idade, fêmea, apresentando esplenomegalia.....	96
<b>Figura 36:</b> Cão (número 193) do município de Várzea da Palma, MG, de raça indefinida com dois anos de idade, macho, apresentando hepatomegalia.....	96
<b>Figura 37:</b> Casos humanos de LV notificados no período de janeiro de 2009 a abril de 2010 no município de Várzea da Palma, MG, fêmeas de flebotomíneos e cães com <i>Le.chagasi</i> durante o período de abril de 2009 a março de 2010, segundo localidade de estudo.....	99

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Número de casos de Leishmaniose Tegumentar no Município de Várzea da Palma, MG, segundo ano de notificação, bairro, distritos e zona rural. (Fonte: Secretaria Municipal de Saúde de Várzea da Palma, MG)..... 33
- Tabela 2:** Número de casos de Leishmaniose Visceral no Município de Várzea da Palma, MG, segundo ano de notificação, bairro, distritos e zona rural. (Fonte: Secretaria Municipal de Saúde de Várzea da Palma, MG)..... 33
- Tabela 3:** Espécies de flebotomíneos capturadas no Município de Várzea da Palma, MG, no período de abril de 2009 a março de 2010..... 54
- Tabela 4:** Flebotomíneos coletados, por sexo e localidade de estudo, no município de Várzea da Palma, MG, no período de abril de 2009 a março de 2010..... 56
- Tabela 5:** Flebotomíneos coletados mensalmente por espécie, no município de Várzea da Palma, MG, no período de abril de 2009 a março de 2010..... 60
- Tabela 6:** Resultado do teste de correlação entre o total de flebotomíneos coletados e as variáveis climáticas, no município de Várzea da Palma, MG, no período de abril de 2009 a março de 2010..... 61
- Tabela 7:** Resultados das coletas não sistematizadas, no município de Várzea da Palma, MG, nos meses de julho e outubro 2009 e janeiro e março de 2010.....64
- Tabela 8:** Medidas, em micrometros, dos machos de *Lu. longipalpis* com anomalias unilaterais coletados no município de Várzea da Palma, MG, no período de abril de 2009 a março de 2010, em comparação com espécimes da localidade tipo (Padrão), Além Paraíba, MG..... 68
- Tabela 9:** Número de fêmeas de flebotomíneos analisadas, por espécie, de acordo com o número de espécimes presente em cada amostra processada..... 72

<b>Tabela 10:</b> Resultado da infecção natural de fêmeas de flebotomíneos coletadas nos meses pares do período de abril de 2009 a março de 2010, no município de Várzea da Palma, MG.....	75
<b>Tabela 11:</b> Caracterização dos cães sintomáticos do município de Várzea da Palma, MG, amostrados no ano de 2010, segundo sinais da doença, sexo, idade e raça.....	83
<b>Tabela 12:</b> Resultados dos testes sorológicos realizados em cães do município de Várzea da Palma, MG, no ano de 2010.....	86
<b>Tabela 13:</b> Diagnóstico molecular em amostras biológicas de cães do município de Várzea da Palma, MG, no ano de 2010.....	87
<b>Tabela 14:</b> Coeficientes de concordância <i>Kappa</i> entre os métodos de diagnóstico. .....	89
<b>Tabela 15:</b> Critérios para a interpretação do índice <i>Kappa</i> .....	89
<b>Tabela 16:</b> Resultado dos métodos diagnósticos para leishmaniose canina de acordo com a classificação clínica, de cães do município de Várzea da Palma, MG, em 2010.....	91
<b>Tabela 17:</b> Características dos animais que alteraram o status clínico, após 45 dias da coleta de sangue, do município de Várzea da Palma, MG, ano 2010.....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

OMS: Organização Mundial de Saúde  
LV: Leishmaniose Visceral  
LT: Leishmaniose tegumentar  
Le: *Leishmania*  
Lu: *Lutzomyia*  
LVC: Leishmaniose Visceral Canina  
RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta  
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay  
DAT: Teste de Aglutinação Direta  
PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)  
DNA: Ácido desoxirribonucléico  
MG: Minas Gerais  
Km<sup>2</sup>: Quilômetro quadrado  
SES/MG: Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais  
SINAN: Sistema Nacional de Agravos Notificados  
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz  
CRNIF: Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos  
CEMIG: Companhia Energética de Minas Gerais  
mg: miligramas  
NaCl: Cloreto de Sódio  
PBS: Phosphate buffered saline  
ml: mililitro  
pH: Potencial hidrogeniônico  
Aum: Aumento  
µl: microlitro  
µm: micrômetro  
min: minutos  
°C: Grau centígrado  
IgG: Imunoglobulina G  
SSUrRNA: Small subunit Ribosomal RNA  
nm: nanômetros  
U: unidade  
pb: pares de bases

NNN: Nicolle, Novy & Neal

CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

Bar: Barra

CA: Cão assintomático

CS: Cão sintomático

mM: milimolar

dNTP: Deoxinucleosídeos trifosfatos

IC: Intervalo de Confiança

SDS: Sodium Dodecyl Sulphate

g: gravidade

WHO: World Health Organization

mm<sup>3</sup>: milímetros cúbicos

## RESUMO

A importância das leishmanioses reside na alta incidência, ampla distribuição geográfica, possibilidade de assumir formas graves, com altas taxas de mortalidade nos casos não tratados de leishmaniose visceral (LV) e alta morbidade nos casos de leishmaniose tegumentar (LT). A principal forma de transmissão do parasito ocorre pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas e o cão é considerado o principal reservatório doméstico. O objetivo deste trabalho foi estudar aspectos epidemiológicos das leishmanioses relacionados à infecção canina e aos flebotomíneos no município de Várzea da Palma, MG. Foram realizadas coletas sistematizadas mensais para captura de flebotomíneos durante um ano, utilizando armadilhas luminosas HP e não sistematizadas, com capturas manuais utilizando capturador de Castro. As fêmeas coletadas foram identificadas e submetidas à verificação de infecção natural pela dissecação e detecção de DNA do parasito (LnPCR) em amostras específicas contendo até 20 fêmeas cada. A densidade total de flebotomíneos foi correlacionada com dados climatológicos. No estudo da infecção canina foi verificada a soroprevalência utilizando as técnicas sorológicas RIFI e ELISA. Ainda como método diagnóstico amostras clínicas de medula óssea, pele (de 41 cães sorologicamente positivos) e sangue periférico (207 cães) foram utilizadas na técnica da LnPCR. O isolamento e caracterização do parasito foram realizados utilizando amostras positivas da cultura de aspirado de medula óssea e amostras clínicas positivas dos 41 cães reativos na sorologia. Foram coletados 18.154 machos e 7.180 fêmeas de flebotomíneos, pertencentes a quinze espécies, sendo a mais prevalente *Nyssomyia intermedia* (52%) seguida por *Lutzomyia longipalpis* (41%), importantes vetoras de LT e LV respectivamente. Neste estudo foram identificados seis tipos de anomalias unilaterais e duas bilaterais, todas no parâmero de machos de *Lu. longipalpis*. Foi observada correlação estatisticamente significativa entre densidade total de flebotomíneos e a temperatura média durante o período de estudo. Nenhuma forma flagelada foi encontrada pela técnica da dissecação. Foi detectada a infecção natural nas seguintes espécies: *Evandromyia evandroi* (10,0%), *Evandromyia lenti* (5,0%), *Evandromyia sallesi* (2,8%), *Evandromyia termitophila* (16,7%), *Lu. longipalpis* (2,14%), *Ny. intermedia* (1,0%) todas infectadas com *Leishmania chagasi*. *Ev. lenti* e *Lu. longipalpis* apresentaram a taxa de infecção para *Leishmania braziliensis* de 5,0% e 0,6% respectivamente e *Nyssomyia neivai*, *Psathyromyia shannoni* e *Micropygomyia quinquefer* mostraram positividade para *Leishmania* sp. A soroprevalência canina foi de 24,6% sendo a maioria dos cães de raça indefinida e idade variando entre dois e cinco anos. Os testes sorológicos mostram-se mais eficazes em detectar os animais sintomáticos. Quanto às amostras clínicas, o sangue foi o menos eficiente em detectar a infecção no grupo dos 41 cães com sorologia positiva. A amostra de medula óssea foi a mais eficaz na detecção de animais positivos independentemente da sintomatologia e também foi capaz de identificar dentre o grupo de cães assintomáticos o maior número de animais positivos em relação as demais amostras biológicas utilizadas na LnPCR. Diante do encontro de cães infectados exclusivamente por *Le. chagasi* vivendo em áreas onde foram registrados casos humanos de LV e flebotomíneos infectados por este parasito fica demonstrado um ciclo ativo da *Le. chagasi* por todo o território urbano do município de Várzea da Palma, devendo as autoridades responsáveis manter uma constante realização de inquéritos caninos e vigilância entomológica para um melhor direcionamento e eficácia das medidas de controle.

## ABSTRACT

The importance of leishmaniasis is the high incidence, the wide geographical distribution and the ability to take severe forms with high mortality rates in untreated cases of visceral leishmaniasis (VL) and high morbidity in cases of cutaneous leishmaniasis (CL). The main form of parasite transmission occurs through the bite of infected sandflies females and the dog is the main domestic reservoir. This paper aimed to study epidemiological aspects of leishmaniasis related to canine infection and sandflies in the city of Várzea da Palma, Minas Gerais State. Systematic collections were monthly performed to capture sand flies over one year, using HP light traps, and unsystematic collections were performed as manual captures using Castro catcher. Collected females were identified and submitted to natural infection verification by dissection and detection of parasite's DNA (LnPCR) in specific samples containing up to 20 females each. The total density of sandflies was correlated with climatological data. In the canine infection study, the seroprevalence was verified using the serological techniques IFA and ELISA. Even as a diagnostic method, clinical samples of bone marrow, skin (of 41 serologically positive dogs) and peripheral blood (207 dogs) were used in LnPCR technique. Isolation and characterization of parasite were performed using positive samples from the culture of aspirated bone marrow and positive clinical samples from 41 reactive dogs in serology. We collected 18.154 males and 7.180 females sand flies, belonging to 15 species of sandflies, which the most prevalent is *Nyssomyia intermedia* (52%) followed by *Lutzomyia longipalpis* (41%), both important vectors of CL and VL, respectively. This study identified 6 types of unilateral abnormalities and 2 types of bilateral, all of them in the paramere of *Lu. longipalpis* males. We observed statistically significant correlation between total density of sandflies and the average of temperature during the period of study. No flagellate form was found by the technique of dissection. Natural infection was detected in the following species: *Evandromyia evandroi* (10,0%), *Evandromyia lenti* (5,0%), *Evandromyia sallesi* (2,8%), *Evandromyia termitophila* (16,7%), *Lu. longipalpis* (2,1%), *Ny. intermedia* (1,0%), all infected by *Leishmania chagasi*. *Ev. lenti* and *Lu. longipalpis* showed infection rate for *Leishmania braziliensis* of 5,0% and 0,6%, respectively, and *Nyssomyia neivai*, *Psathyromyia shannoni* and *Micropygomyia quinquefer* showed positivity for *Leishmania* sp. Canine seroprevalence was 24,6% with most of them mongrel dogs and ages ranging from two to five years. Serological tests were more effective in detecting symptomatic animals. As for clinical samples, blood was the least effective in detecting infection in the group of 41 dogs with positive serology. The bone marrow sample was most effective in detecting positive animals regardless of symptoms and was also able to identify among the group of asymptomatic dogs the highest number of positive animals when compared with other biological samples used in LnPCR. Against the finding of infected dogs exclusively by *Le. chagasi* living in areas where human cases of VL were recorded and infected sandflies by this parasite, is demonstrated an active cycle of *Le. chagasi* in the entire urban territory of Várzea da Palma, about what the authorities should maintain a constant canine surveys and entomological surveillance for better targeting and effectiveness of control measures.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), com grau variável de especificidade pelo hospedeiro invertebrado (Gontijo & Melo, 2004). A principal forma de transmissão do parasito para o homem e outros hospedeiros mamíferos ocorre pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas. A multiplicidade de espécies do parasito, de insetos vetores e reservatórios, convivendo em diferentes ambientes, entre outros fatores, propiciam a existência de várias modalidades clínico-epidemiológicas desta parasitose (Young & Lawyer, 1987; Ashford, 1992).

Uma grande variedade de mamíferos pode atuar como hospedeiros, sendo os mais comuns os roedores e os canídeos. Outros grupos podem albergar a infecção tais como: edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados e primatas (Shaw, 2003).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera as leishmanioses como um importante problema de saúde pública mundial, com ocorrência de casos em 88 países de quatro continentes, e estima que cerca de 350 milhões de indivíduos estejam expostos ao risco de infecção e que cerca de 12 milhões de pessoas se encontram infectadas.

No Novo Mundo, a leishmaniose humana apresenta duas formas clínicas básicas: a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT). A importância das leishmanioses neste continente reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas graves, com altas taxas de mortalidade nos casos não tratados de LV e alta morbidade nos casos de LT, que podem muitas vezes levar a lesões destrutivas e desfigurantes. A LV é uma doença infecciosa sistêmica, que acomete órgãos internos como fígado, baço, linfonodos e medula e caracteriza-se por febre irregular, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e alterações biológicas como anemia, hipergamaglobulinemia, leucopenia, trombocitopenia e hipoalbuminemia.

Esta é a forma mais grave da doença e se não tratada pode levar a morte. A LT é uma doença de caráter zoonótico de grande importância dermatológica pela frequência com que ocorre e pela dificuldade terapêutica observada em algumas de suas manifestações. É conhecida como a forma mais comum da doença. As manifestações apresentadas pelo homem podem ser classificadas de acordo com seus aspectos clínicos, patológicos, imunológicos e epidemiológicos, causando normalmente lesões na pele e raramente na mucosa nasal.

No Brasil, as leishmanioses ocorrem em todos os estados. Nos últimos anos o Ministério da Saúde registrou uma média anual de 35 mil novos casos de LT e quatro mil de LV. Ultimamente tem sido observado um aumento da incidência de ambas as leishmanioses em todas as regiões geográficas do país (Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde/Centro Nacional de Epidemiologia, 2001). Provavelmente devido a sua baixa taxa de mortalidade a LT não tem recebido tanta atenção das autoridades públicas como a LV. Esta última, ainda assim, apresenta alta taxa de mortalidade, e ambas estão incluídas entre as seis grandes endemias a serem estudadas com prioridade pela OMS.

A LV é causada por protozoários do complexo *Leishmania donovani*, sendo que a forma clínica da doença no Brasil é causada pelo agente etiológico *Leishmania (Leishmania) chagasi*, como descrito primeiramente por Evandro Chagas em 1936, espécie semelhante à *Leishmania infantum* encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia. Uma questão importante é a origem da LV no Novo Mundo, pois não se sabe se ela foi introduzida na época da colonização européia e causada pela espécie *Leishmania infantum*, ou há vários milhões de anos, juntamente com a introdução dos canídeos, devendo a espécie ser classificada como *Leishmania chagasi*. Os achados de altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia sugerem a origem autóctone (Lainson *et al.* 1987). Entretanto, estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *Leishmania chagasi* e a *Leishmania infantum* uma única espécie e aceitam a hipótese da introdução recente nas Américas (Mauricio *et al.*, 2000). A principal espécie vetora da LV é a *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912. Há relatos de casos de visceralização provocada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Barral *et al.*, 1991) e por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em pacientes imunossuprimidos (Gontijo *et al.*, 2002).

Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras da LT humana e oito espécies descritas, somente em animais. No entanto, no Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lindenbergl* e *Leishmania (Viannia) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste. Nas últimas duas décadas tem sido observado o crescimento da endemia, principalmente em magnitude e expansão geográfica, com surtos epidêmicos nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Norte. Algumas espécies de flebotomíneos vetoras de LT no Brasil são: *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926), *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), *Bichromomyia flaviscutellata* (Mangabeira, 1942), *Evandromyia migonei* (França, 1920), *Psychodopygus davisii* (Root, 1934), *Pintomyia fisheri* (Pinto, 1926) e *Nyssomyia umbratilis* (Ward & Fraiha, 1977).

## 1.2 Flebotomíneos e sua importância médica

A família Psychodidae engloba algumas subfamílias, dentre as quais se encontra a Phlebotominae que inclui insetos de importância médica. Estes insetos são dípteros de pequeno porte medindo de dois a três milímetros, apresentando em seu corpo intensa pilosidade. Como todos dípteros, são insetos holometábolos tendo em seu ciclo vital as fases de ovo, larva, que compreende quatro estádios, pupa e, finalmente, adultos. Distinguem-se, entretanto, dos demais insetos dessa família, por apresentarem corpo mais delgado, pernas mais longas e finas, além de suas fêmeas necessitarem de sangue para a produção de ovos, razão pela qual foram agregados pelos taxonomistas na subfamília Phlebotominae (Brazil & Gomes, 2003).

Pouco se sabe a respeito dos criadouros dos flebotomíneos, sendo atualmente as medidas de controle destinadas apenas as formas adultas. As larvas se desenvolvem em matéria orgânica, apresentam grande mobilidade ao se deslocar em busca de alimento e uma infinidade de ecótopo serve como abrigo (Andrade Filho *et al.*, 1998). Estas são algumas das razões pela quais os criadouros naturais

dos flebotomíneos são difíceis de serem encontrados e que contribuem para um maior enfoque na pesquisa de ações direcionadas ao inseto adulto visando o controle das leishmanioses (Sherlock, 2003; Alencar, 2007).

A importância em estudar a fauna flebotomínica reside tanto na capacidade desses insetos de transmitir patógenos, tais como *Leishmania*, *Bartonella bacilliformis* e algumas arboviroses, quanto na competência que estes possuem de afetar diretamente o homem com suas picadas, causando dor e desconforto que podem desencadear reações alérgicas.

Os flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia*, *Nyssomyia* e *Psychodopygus*, dentre outros, (no Novo Mundo) e *Phlebotomus* Rondani & Berté 1840 (no Velho Mundo) são os hospedeiros invertebrados de espécies do gênero *Leishmania* Ross 1903, que causam as leishmanioses em humanos e outros mamíferos. Os flebotomíneos machos não são hematófagos e o mecanismo de transmissão da *Leishmania* nas condições naturais e de importância epidemiológica ocorre pelas fêmeas no momento do repasto sanguíneo onde são inoculadas as formas promastigotas infectantes, presentes em sua probóscide.

Existem cerca de 460 espécies de flebotomíneos nas Américas (Galati, 2003) e no Brasil estes insetos estão presentes em grande número, por todo o território nacional onde cerca de 40 espécies são comprovadas ou suspeitas de transmitirem leishmanioses.

É essencial para incriminação de um flebotomíneo como vetor que este satisfaça todos os critérios estabelecidos para a competência vetorial, essencialmente o caráter antropofílico, a sobreposição da distribuição espacial destes insetos com os casos humanos da doença, além da identificação da infecção natural em flebotomíneos por *Leishmania* (Killick-Kendrick, 1990; Lainson *et al.*, 1998; Lainson *et al.*, 2005; Rangel & Vilela, 2008).

Diante da complexidade da relação parasito/vetor/hospedeiro é necessário realizar estudos sobre a fauna flebotomínica e seus aspectos ecológicos em cada área de interesse na tentativa de empregar medidas de controle direcionadas e minimizar a expansão desta doença (Almeida *et al.*, 2010).

### 1.3 Leishmaniose canina (LC)

Os cães são comprovadamente hospedeiros de diferentes espécies de *Leishmania*. A existência da LC é relatada por um grande número de estudos epidemiológicos que levam em conta o contato íntimo entre flebotomíneos e hospedeiros vertebrados infectados, permitindo o desenvolvimento do ciclo biológico das espécies de *Leishmania* (Gontijo *et al.*, 2002; Quaresma *et al.*, 2009).

Seu papel como reservatório do parasito causador da LV é amplamente aceito, entretanto, sua participação como reservatório no ciclo de transmissão da LT é uma questão polêmica. Alguns autores consideram o cão apenas um hospedeiro acidental (Lainson & Shaw 1970; Le Pont *et al.*, 1989), outros avaliam o papel do cão como um importante elo entre a infecção de animais silvestres e o homem (Coutinho *et al.*, 1985, Pirmez *et al.*, 1988).

Apesar de ser uma zoonose originalmente silvestre, a LT causada pela *L. (V.) braziliensis* tem ocorrido em ambientes domésticos, tendo sido aventada a possibilidade que animais domésticos e peridomésticos, e em especial o cão, seriam importantes fontes de infecção para os vetores nesses locais (Falqueto *et al.*, 1986; Marzochi & Marzochi, 1994; Pirmez *et al.*, 1988). A LT nesses animais pode apresentar-se como uma doença crônica com manifestações semelhante as da doença humana (Pirmez *et al.*, 1988; Padilla *et al.*, 2002; Madeira *et al.*, 2005).

O cão é apontado como o mais importante reservatório doméstico da LV desde a descoberta da leishmaniose visceral canina (LVC) em um inquérito canino realizado na Tunísia (Nicolle & Comte, 1908). Neste estudo foram examinados esfregaços de medula óssea de 147 cães, e destes três mostraram-se positivos, ficando assim registrado o primeiro foco de calazar canino no mundo.

As primeiras observações feitas no Brasil sobre a LVC foram realizadas por Chagas *et al.* (1937 e 1938), na região Norte. Porém a doença só foi caracterizada quando estudada por Deane (1956) em área endêmica do Estado do Ceará. A LVC, assim como a doença humana, está bastante difundida no país e algumas localidades endêmicas revelam altas taxas de prevalência com a presença abundante do vetor (Brasil, 2006).

A infecção por *Le. chagasi* pode causar nos cães uma doença sistêmica grave, que pode comprometer a vida destes animais. Os sinais clínicos são bastante variados em consequência de numerosos processos patológicos, em diversos sistemas e aparelhos, da virulência do protozoário e da eficácia da resposta imunitária do hospedeiro (Ferrer, 1999). Alguns autores fizeram observações sobre o estado clínico de cães com o parasito, verificando a ocorrência de febre, emagrecimento, alopecia, onicogribose, descamação ou ulcerações preferencialmente no focinho, orelhas, patas e cauda. Em fases mais adiantadas pode ocorrer hepatoesplenomegalia, conjuntivite, queratite, edema das patas, diarreia e dificuldade de defecação. Na fase final, verifica-se a ocorrência de paralisia das patas posteriores e caquexia. Alterações histopatológicas foram observadas na pele, linfonodos, fígado, baço, intestinos, rim e medula óssea (Deane & Deane, 1955; Brener, 1957; Koutinas *et al.*, 1999).

Cães severamente afetados não sobrevivem à doença. Entretanto, mais da metade dos animais infectados permanecem assintomáticos. Existem vários estudos sugerindo que a taxa de infecção canina é muito superior aquela encontrada em investigações sorológicas (Solano-Gallego *et al.*, 2001).

A porcentagem de cães infectados vivendo em áreas onde a LC é endêmica tem grandes implicações em saúde pública. Alguns autores mostraram que cães infectados, mesmo assintomáticos, são fontes do parasito para flebotomíneos vetores sugerindo um papel ativo destes cães na transmissão de *Leishmania* (Molina *et al.*, 1994; Guarga *et al.*, 2000). Porém, são necessários mais estudos para certificar o potencial de cães assintomáticos em transmitir *Leishmania* aos flebotomíneos vetores.

#### 1.4 Diagnóstico da infecção por *Leishmania* em cães

O diagnóstico da infecção canina por *Le. chagasi* é um pré-requisito para o manejo clínico de animais infectados e, em simultâneo, uma potencial medida de vigilância e controle da LV humana (Gradoni, 2002). Considerando que aparentemente, mais de 50% dos cães infectados são assintomáticos (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2004b) e quando presentes, os sinais clínicos de LVC podem ser similares a diversas doenças infecciosas e não infecciosas

(Ciaramella *et al.*, 1997), o diagnóstico preciso e precoce se faz necessário e deve abranger aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais.

A análise epidemiológica e o exame clínico servem, sobretudo para estabelecer uma eventual suspeita que deverá ser confirmada por métodos específicos de diagnóstico (Martínez-Moreno *et al.*, 1999), uma vez que já foi demonstrado que cães infectados, mesmo assintomáticos, são fonte de infecção para os flebotomíneos e, conseqüentemente, tem papel ativo na transmissão de *Leishmania* (Palatnick *et al.*, 2001).

De modo geral, os testes utilizados para o diagnóstico específico da infecção por *Leishmania* podem ser divididos em: parasitológicos (demonstração do parasito), moleculares (detecção do DNA) e imunológicos (detecção de anticorpos anti-*Leishmania*). Além da sensibilidade e da especificidade, um bom teste diagnóstico deve apresentar facilidade e rapidez de execução e de interpretação, bem como baixo custo.

O diagnóstico parasitológico baseia-se na detecção da *Leishmania* por isolamento em meio de cultura, inoculação em animais de laboratório ou por coloração de esfregaço ou cortes histológicos de baço, linfonodos, medula óssea, fígado e pele (Deane & Deane, 1955; Brener, 1957; Marsdem & Jones, 1985; Mohammed *et al.*, 1986; Genaro *et al.*, 1988). Este método, apesar de simples e conclusivo, apresenta algumas desvantagens, pois a punção ou a biopsia de órgãos é considerada invasiva e traumática podendo causar danos, quando não realizada de maneira eficiente. Além disso, a observação de parasitos pelo exame parasitológico é difícil quando a carga parasitária é baixa e depende da avaliação de profissional treinado (Marsdem & Jones, 1985; Ashford, 1995).

A busca por métodos diagnósticos que fossem menos invasivos e mais práticos deu início a estudos de métodos sorológicos. Atualmente os métodos mais utilizados são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e os testes de aglutinação direta com base em antígenos liofilizados e comercialmente disponíveis (DAT) (Ferreira *et al.*, 2007). Estes testes apresentam índices satisfatórios de sensibilidade, mas a especificidade pode variar de acordo com o antígeno empregado na técnica (Alvar *et al.*, 2004).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é utilizada desde a década de 60 (Genaro, 2000) e atualmente vem sendo amplamente utilizada para detectar anticorpos circulantes anti-*Leishmania* spp., apresentando 90 a 100% de sensibilidade e 80 a 100% de especificidade (Alves & Bevilacqua, 2004). A especificidade desse teste é prejudicada devido à presença de reações cruzadas com outros tripanosomatídeos (Mohammed *et al.*, 1986; Costa *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 2007). A utilização de formas amastigotas de *Le. donovani* como antígeno na RIFI aumenta significativamente a sensibilidade, sem perder a especificidade do teste, resultando numa maior precocidade do diagnóstico frente a animais assintomáticos ou oligossintomáticos (Fernández-Pérez *et al.*, 1999). Devido a sua alta sensibilidade, o seu uso torna-se justificável quando o objetivo é detectar cães infectados em programas de controle para posterior eutanásia. A RIFI é o teste sorológico recomendado pelo Ministério da Agricultura (Brasil, 2006) e o método de eleição utilizado em inquéritos epidemiológicos, pois reúne uma série de vantagens, tais como: facilidade de execução, rapidez, baixo custo e a sensibilidade e especificidade adequadas em relação a outras técnicas (Ikeda-Garcia & Feitosa, 2006). Contudo, os dados obtidos em inquérito realizado pela técnica da RIFI não devem ser usados como indicadores de prevalência da infecção canina por *Leishmania*, mas sim da taxa de infecção por tripanosomatídeos (Costa *et al.*, 1991).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi descrito por Engvall *et al.* (1971) e utiliza como fonte de antígenos, parasitos intactos, lisados ou ainda antígenos recombinantes, o que o torna mais sensível e específico (Hommel *et al.*, 1978; Burns *et al.*, 1993). É um teste prático e rápido e quando comparado à RIFI, é mais sensível, porém menos específico podendo não detectar casos subclínicos e assintomáticos (Evans *et al.*, 1990). A técnica apresenta ainda reações cruzadas com outros tripanosomatídeos (Badaró *et al.*, 1986; Mancianti *et al.*, 1996; Sundar & Raí, 2002).

O teste de aglutinação direta (DAT) foi descrito pela primeira vez em 1975 e adaptado para o diagnóstico da infecção humana e canina no final da década de 80 (Safi & Evans, 1989). Estudos mostram que a sensibilidade e especificidade do teste variam entre 91-100% e 72-100% respectivamente. É um método simples e de baixo custo, mas apresenta problemas na padronização e controle de qualidade do antígeno (Boelaert *et al.*, 1999; Gontijo & Melo, 2004).

Desde o advento de métodos moleculares de diagnóstico para infecções por protozoários, eles vêm sendo desenvolvidos para a identificação de grupos e espécies de *Leishmania* em variadas amostras clínicas, isolados de cultura, bem como em flebotomíneos (Michalsky *et al.*, 2002; Schönian *et al.*, 2003; Carvalho, 2006), destacando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR – polymerase chain reaction).

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), possibilitou a identificação de material genético de *Leishmania*, mesmo em pequenas quantidades de DNA do parasito (Fu *et al.*, 1998; Oliveira-Pereira *et al.*, 2006). Trabalhos utilizando essa metodologia têm sido realizados no diagnóstico da leishmaniose (Oliveira *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2002; Oliveira-Pereira *et al.*, 2006) bem como na identificação de reservatórios animais (Lhanos-Cuentas *et al.*, 1999), detectando parasitos independentemente da abundância, estágio, local e transmissibilidade (Ferreira *et al.*, 2007; Quaresma *et al.*, 2009). A alta sensibilidade e especificidade, a habilidade de detectar e identificar o protozoário envolvido, e o fato de poder ser aplicada diretamente em amostras clínicas, produzindo um resultado confiável dentro de poucas horas, são vantagens indiscutíveis da PCR em relação aos métodos de diagnóstico tradicionais (Ikonomopoulos *et al.*, 2003).

Apesar dos avanços tecnológicos, os métodos de amplificação de DNA apresentam limitações que incluem resultados falso-positivos, decorrentes de contaminação do DNA, e resultados falso-negativos, relacionados com a presença de inibidores da PCR (Yang & Rothman, 2004). Boas práticas de laboratório e separação física das áreas de pré-amplificação e pós- amplificação podem reduzir os riscos de contaminação. O uso de métodos baseados na irradiação ultravioleta, tratamento químico ou digestão enzimática também são úteis para evitar tais contaminações (Carrol *et al.*, 1999; Corless *et al.*, 2000).

## 1.5 O ambiente antrópico e as leishmanioses

As leishmanioses sofreram fortes modificações em seu perfil epidemiológico nos últimos anos, passando de uma doença tipicamente de áreas silvestres para áreas urbanas, ocupando grandes centros como Belo Horizonte e Campo Grande e

outras áreas em expansão demográfica como Natal e Montes Claros, principalmente com relação a LV (Gontijo & Melo, 2004). Essa mudança epidemiológica trouxe consigo alterações nos componentes envolvidos na cadeia epidemiológica da doença. Fatores importantes como o crescimento desordenado da população, condições precárias de saneamento, proximidade entre as moradias, novas formas de ocupação do ambiente como os assentamentos, suscetibilidade da população a infecção, aumento de co-infecções, entre elas *Leishmania*/HIV, demonstram a complexidade da transmissão das leishmanioses no ambiente urbano e consequentemente o desafio no controle, diagnóstico e tratamento da doença.

Aliado a estes fatos deve-se considerar a eficiência de espécies vetoras na adaptação a estes novos ambientes e também o papel das espécies de mamíferos que estão atuando como reservatórios do parasito.

*Lu. longipalpis*, principal espécie vetora da LV no Brasil, está bem adaptada ao ambiente peridomiciliar, alimentando-se em aves, homem e animais domésticos e sinantrópicos. A alta densidade populacional desta espécie tem sido proposta como fator de risco para a transmissão da LV em áreas urbanas (Gontijo & Melo, 2004; Oliveira *et al.*, 2006; Maia-Elkhoury *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2010). Outras espécies como *Nyssomyia intermedia* e *Nyssomyia whitmani*, importantes vetoras de LT no Brasil, demonstram este padrão de adaptação e considerável grau antropofílico (Gomes & Neves, 1998; Rangel *et al.*, 1984; Gontijo *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2003; Andrade Filho *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008).

O cão é considerado um importante reservatório doméstico, antecedendo muitas vezes os casos humanos de LV (Oliveira *et al.*, 2001; Bevilacqua *et al.*, 2001). Além disso, este reservatório tem um papel fundamental na expansão da doença em áreas endêmicas, podendo contribuir para a mudança no perfil epidemiológico nos centros urbanos (Marzochi *et al.*, 1994; Santos *et al.* 2005). Com modificações no meio ambiente os reservatórios sinantrópicos vêm invadindo casas, ou convivendo próximo a estas, podendo servir de fonte de infecção para os vetores bem adaptados a este ambiente. Além de contribuir para a manutenção do parasito na enzootia silvestre os roedores e marsupiais são importantes no elo entre os ciclos silvestre e urbano (Cabrera *et al.*, 2003).

Compreender a interação entre as mudanças ambientais e urbanas, cães, e flebotomíneos vetores é um pré-requisito para o direcionamento de estratégias apropriadas de medidas de controle e prevenção das leishmanioses (Costa *et al.*, 1999). Faz-se necessário o envolvimento político e sócio-econômico para garantia de melhores resultados no combate a uma doença que permanece negligenciada.

## 1.6 As Leishmanioses no município de Várzea da Palma, Minas Gerais

A cidade de Várzea da Palma está inserida na região do Alto São Francisco, com a sede localizada a 515 metros acima do nível do mar. Foi elevada a distrito em 1948 e em 1953 tornou-se município. Atualmente, a zona urbana apresenta uma população estimada de 35.804 habitantes (IBGE/2010) além dos distritos da Barra do Guaicuí e Buritis das Mulatas. O crescimento expressivo da cidade nos últimos anos, associado à falta de informação sobre a fauna flebotomínica e consequente ausência de vigilância entomológica, são fatores importantes para o surgimento e disseminação das leishmanioses no município.

Em Minas Gerais é possível observar, segundo dados do DATASUS, que no período de 2001 a 2006 tem se registrado um aumento no número de casos de leishmaniose, com 6,01% de casos confirmados para LT e 11,61% de LV.

Em Várzea da Palma, no período de janeiro de 2003 a abril de 2010, foram registrados 158 casos humanos autóctones de LT e 25 casos de LV (Tabelas 1 e 2). De acordo com o manual de LV (Brasil, 2006) o município é considerado de transmissão moderada, sendo os anos de 2008 e 2009 responsáveis pelo maior número de casos registrados (60%). Devido a esta característica é importante valorizar e incentivar novas investigações e pesquisas aplicadas como fontes importantes de informações para subsidiar o programa de controle das leishmanioses na região.

**Tabela 1:** Número de casos de Leishmaniose Tegumentar no Município de Várzea da Palma, MG, segundo ano de notificação, bairro, distritos e zona rural. (Fonte: Secretaria Municipal de Saúde de Várzea da Palma, MG).

Bairro	2003	2004	2005	2006	2007	2008*	2009	2010*
Centro	3	1	1	2	2	0	0	1
Progresso	2	6	0	1	0	0	0	0
Planalto	0	1	0	1	0	0	0	0
Caiçara I	0	1	0	1	0	0	0	0
Caiçara II	0	3	0	0	1	0	0	0
Serrinha	0	1	0	0	0	1	1	2
Lameirão	0	3	3	4	1	2	0	0
Lameirão II	1	1	0	0	2	1	0	0
Paulo VI	2	4	3	3	7	0	5	0
Pinlar	0	2	0	0	0	0	1	0
Nossa Senhora de Fátima	2	2	3	3	4	3	1	0
Pedras Grandes	0	1	1	0	3	0	0	1
Nova Esperança	0	2	2	1	2	1	0	0
Princesa	0	3	0	1	2	0	1	0
Princesa II	0	0	0	0	1	0	0	0
Jardim das Palmeiras	0	1	0	0	0	0	0	0
Jardim América	0	1	3	0	1	1	0	0
Jardim América II	0	3	0	0	0	0	1	0
Jardim Itália	2	0	1	1	1	0	0	0
Assentamento Corrente	1	0	0	0	0	2	0	0
Conjunto Palmas	0	0	1	1	2	0	0	0
<b>DISTRITOS</b>	<b>0</b>	<b>0</b>						
Buritis das Mulatas	1	1	0	0	0	0	0	1
Barra do Guaicui	1	2	0	1	0	0	0	1
<b>ZONA RURAL</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>TOTAL</b>	<b>16</b>	<b>40</b>	<b>20</b>	<b>23</b>	<b>30</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>6</b>

\* janeiro a abril

**Tabela 2:** Número de casos de Leishmaniose Visceral no Município de Várzea da Palma, MG, segundo ano de notificação, bairro, distritos e zona rural. (Fonte: Secretaria Municipal de Saúde de Várzea da Palma, MG).

Bairro	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010*
Centro	0	0	0	0	0	02	0	0
Progresso	0	0	0	01	0	0	0	0
Planalto	01	0	0	0	0	0	0	0
Caiçara I	0	0	0	0	0	0	3	0
Caiçara II	0	0	0	0	0	0	1	0
Jardim Itália	0	0	0	0	0	02	0	0
Serrinha	0	0	0	01	0	01	0	1
Conjunto Palmas	0	0	0	0	0	0	0	0
Paulo VI	0	0	0	0	0	0	0	1
Morada do Sol	0	0	0	0	0	01	0	0
<b>DISTRITO</b>	<b>0</b>							
Barra do Guaicui	0	0	01	02	0	02	03	2
<b>ZONA RURAL</b>	<b>0</b>							
<b>TOTAL</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>4</b>

\* janeiro a abril

## 2 JUSTIFICATIVA

As estratégias de controle das leishmanioses no Brasil, especialmente em relação à LV, têm sofrido constantes adequações em virtude de sua ineficiência em conter o avanço da doença. Neste contexto, as áreas consideradas de transmissão esporádica e moderada têm assumido um papel importante na tentativa de barrar esta expansão.

O aumento do número de casos de leishmanioses registrados nos anos recentes no município de Várzea da Palma, associado à ausência de estudos na área, aponta para a necessidade de estudos sobre a epidemiologia das leishmanioses na região, incluindo aspectos relacionados aos possíveis vetores e reservatórios dessas doenças. O registro de casos em bairros da área urbana, distritos e zona rural, mostram a expansão da área de ocorrência da doença e a capacidade de adaptação dos vetores aos diferentes ambientes.

Estudos considerando a ocorrência de *Leishmania* nas diferentes espécies de flebotomíneos e nos cães são essenciais para uma melhor compreensão da eco-epidemiologia das leishmanioses. Esses conhecimentos, aliados ao entendimento do comportamento das espécies de flebotomíneos em função das variáveis bioclimáticas, biogeográficas e surgimento dos casos humanos da doença, fornecerão dados importantes para o desenvolvimento de estratégias de controle mais específicas e conseqüentemente mais eficientes.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Estudar aspectos da epidemiologia das leishmanioses no município de Várzea da Palma, Minas Gerais, relacionados aos flebotomíneos e à infecção canina.

#### 3.2 Objetivos Específicos

Identificar as espécies de flebotomíneos presentes no município de Várzea da Palma.

Determinar o período de atividade das espécies de flebotomíneos mais abundantes.

Analisar a flutuação sazonal das espécies relacionadas à transmissão das leishmanioses.

Verificar a infecção natural nas fêmeas de flebotomíneos capturadas.

Detectar a infecção canina.

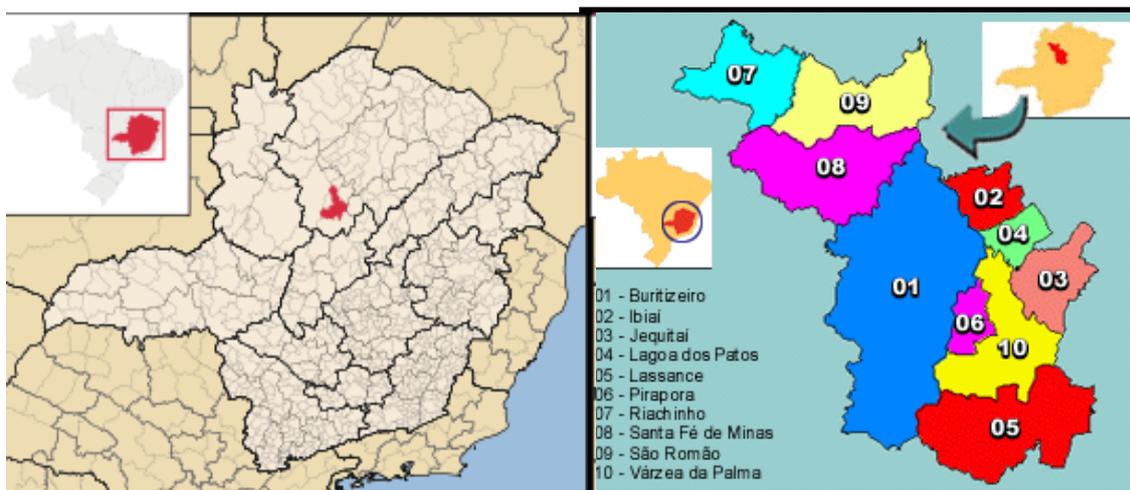
Isolar amostras de *Leishmania* dos flebotomíneos e dos cães.

Identificar a(s) espécie(s) de *Leishmania* detectada(s) em flebotomíneos e nos cães.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Área de estudo

O município de Várzea da Palma está localizado no Norte de Minas Gerais (Figura 1), na microrregião de Pirapora, também conhecida como microrregião do Médio São Francisco. É representado por uma área de 2.195,653 km<sup>2</sup> e uma população estimada em 35.804 habitantes. A microrregião de Pirapora é formada por 10 municípios (Figura 2) banhados pelas Bacias do Rio São Francisco, Rio das Velhas, Jequitaiá e Paracatu. Nessa microrregião foram registrados 157 casos de LT no período de 2006 a 2010 e 20 casos de LV (Brasil, 2008), porém esses números não expressam a realidade atual dos municípios, pois apenas para Várzea da Palma já foram registrados, segundo a Secretaria de Saúde do município, 23 casos de LV de janeiro de 2006 a abril de 2010.



**Figura 1** – Município de Várzea da Palma – Norte de Minas Gerais. Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/varzeadapalma>

**Figura 2** – Microrregião de Pirapora – Número 10 – Várzea da Palma. Fonte: <http://webcarta.net/carta/mapa>

O município de Várzea da Palma é dividido em cinco zonas político-administrativas. A Zona 01 é composta pelos bairros Centro, Planalto, Progresso e Nossa Senhora da Aparecida. Esta área é a parte mais urbanizada do município, contando com a presença de casas, comércio e pouca ou nenhuma área verde.

A Zona 02 é composta pelos bairros Lameirão I, Lameirão II, Nossa Senhora de Fátima e Paulo XI. Esta localidade mantém uma área com características rurais, com a presença de mata preservada, coleção de água e criações de galinhas,

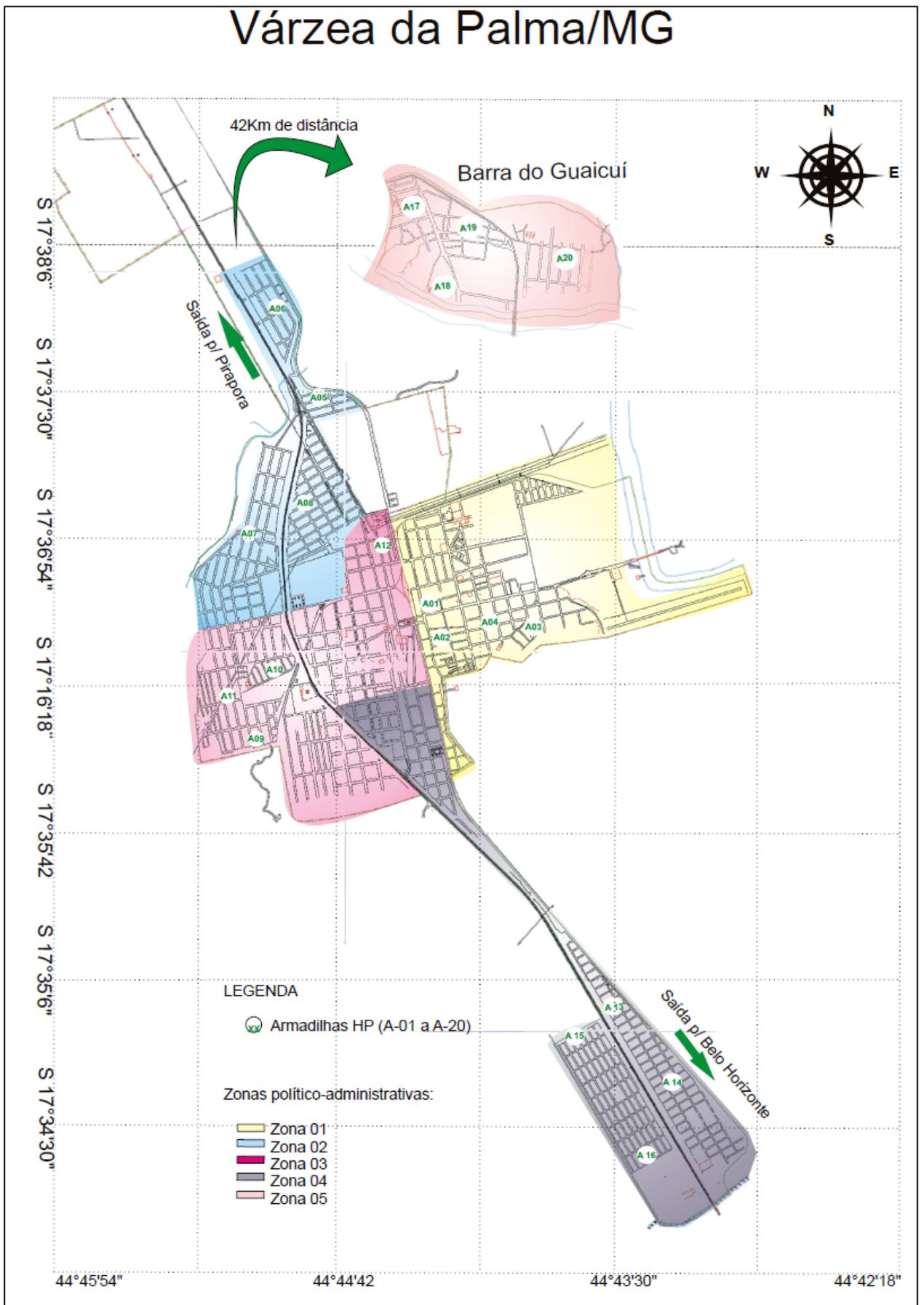
porcos e cavalos. Nos últimos anos vêm sofrendo um intenso processo de urbanização, com casas localizadas bem próximas ao ambiente silvestre.

A Zona 03 compreende os bairros Jardim América I, Jardim América II, Jardim Itália I, Jardim Itália II, Pinlar I e Princesa. Esta é uma região residencial composta por famílias de baixa renda.

A Zona 04 é constituída pelos bairros Caiçara, Pedras Grandes e Nova Esperança. Esta área é considerada como periferia do município, sendo possível observar intenso desmatamento no seu entorno.

A Zona 05 é representada pelo distrito da Barra do Guaicuí. Uma característica peculiar desta região é o encontro das águas do Rio das Velhas com o Rio São Francisco, uma importante bacia hidrográfica do Brasil. Esta Zona caracteriza-se pela presença de mata preservada e intenso processo de urbanização nos últimos anos.

O estudo dos flebotomíneos e da infecção canina foi realizado em domicílios selecionados nas cinco zonas que compõem o município (Figura 3). A seleção das casas foi realizada por conveniência considerando aquelas onde houve registro de caso de leishmaniose visceral ou leishmaniose tegumentar nos últimos cinco anos.



**Figura 3:** Mapa de Várzea da Palma, MG, evidenciando as localidades onde as armadilhas de flebotomíneos foram expostas.

## 4.2 Estudo da fauna flebotomínica

### 4.2.1 Coletas sistematizadas com armadilhas luminosas automáticas

As coletas sistematizadas dos flebotomíneos foram realizadas durante o período de abril de 2009 a março de 2010, com capturas mensais, destinadas ao estudo da fauna e demais aspectos ecológicos pertinentes, bem como à observação da infecção natural nas fêmeas. Devido ao grande número de espécimes capturados, foi designado, aleatoriamente, que as fêmeas coletadas nos meses pares seriam destinadas a pesquisa da infecção natural. As armadilhas utilizadas foram luminosas automáticas, modelo HP (Pugedo *et al.*, 2005), que utilizam a luz como isca para os flebotomíneos, quatro pilhas grandes como fonte de energia para a luz e motor e uma gaiola de filó onde os flebotomíneos ficam acondicionados.

Foram expostas quatro armadilhas luminosas, por zona político-administrativa, no peridomicílio das casas e, quando presente, em anexos como galinheiro, chiqueiro ou canil, totalizando vinte armadilhas que abrangeram toda a área urbana do município. A exposição das armadilhas foi realizada durante três dias consecutivos das 18:00 às 6:00 horas, totalizando 36 horas de esforço amostral por armadilha.

### 4.2.2 Coletas não sistematizadas

Estas coletas tiveram como objetivo aumentar a diversidade de espécies de flebotomíneos que constituem a fauna local. Para isto, foram realizadas coletas com armadilha de Shannon (Shannon, 1939) na Zona 01, que consiste de uma armação central em forma retangular, com duas superfícies externas igualmente de pano. No campo, a armadilha permaneceu suspensa e fixada por meio de corda em quatro pontos amarrados em árvores ou estacas. Em seu interior foi colocado como atrativo uma fonte de luz. Os insetos atraídos foram coletados nas paredes da armadilha, através do capturador de Castro (ou tubo aspirador). Verificou-se a presença de um grande número de flebotomíneos em um local próximo a armadilha de Shannon onde havia galinhas, assim foi utilizado o capturador manual de Castro para a coleta direta neste ponto. As capturas foram realizadas a cada três meses, contemplando as quatro estações climáticas do ano.

#### 4.2.3 Processamento dos flebotomíneos coletados

As armadilhas foram retiradas a cada exposição para a realização da triagem e sexagem dos flebotomíneos. Os machos foram retirados das armadilhas utilizando o capturador de Castro, em seguida foram acondicionados em tubos de ensaio contendo álcool a 70° e posteriormente preparados, montados e identificados, de acordo com as técnicas de rotina adotadas pelo Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos (CRNIF) do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ. As fêmeas, capturadas nas coletas não sistematizadas, foram acondicionadas em potes próprios para a criação de flebotomíneos, contendo em seu fundo uma camada de gesso e tampados com tecido filó, onde foi oferecida solução açucarada as mesmas. Estas foram levadas ao laboratório e destinadas à pesquisa de infecção natural.

#### 4.2.4 Identificação dos flebotomíneos

Todos os insetos provenientes das capturas realizadas foram identificados ao nível de espécie através de microscopia óptica, dando prioridade à observação de estruturas que seguem a proposta do Grupo Cipa (1991) e seguindo-se a classificação proposta por Galati (2003). As fêmeas utilizadas para a pesquisa de infecção natural foram identificadas através das espermatecas, utilizando-se para isto, o último segmento do abdômen. Também foi utilizada como caracter taxonômico na identificação específica, a visualização do cibário das fêmeas, mantendo no momento da dissecação a parte ventral da cabeça voltada para cima. A abreviação do nome das espécies neste estudo segue a proposta de Marcondes (2007).

#### 4.2.5 Sazonalidade

O estudo da sazonalidade dos flebotomíneos foi realizado através da correlação dos dados de captura, com dados climatológicos (temperatura, umidade, precipitação) fornecidos pela estação climática da CEMIG presente no município de Buritizeiro, Minas Gerais. Esta estação está localizada entre o município de Várzea

da Palma e o distrito de Barra do Guaicuí, sendo, portanto, representativa para o estudo.

#### 4.2.6 Estudo das anomalias em *Lu. longipalpis*

Para melhor descrever as anomalias encontradas nos machos pertencentes à espécie *Lu. longipalpis* os insetos foram medidos, examinados, fotografados e ilustrados utilizando o microscópio óptico com o auxílio da ocular micrométrica, câmera Sony com resolução de 10.1 mega pixels e câmara clara. Os caracteres analisados foram os seguintes: número de espécimes com a anomalia localizada na terminália direita (PD), número de espécimes com a anomalia localizada na terminália esquerda (PE), o comprimento do parâmero (CP), distância entre a base do parâmero e os espinhos normais (BN) e a distância entre os espinhos normais e o espinho anômalo (DNA).

Foram analisados quatro exemplares de *Lu. longipalpis* da localidade tipo, Além Paraíba, Minas Gerais, como critério de comparação, uma vez que não existe o holótipo desta espécie. Na análise dos dados não foi considerada a lateralidade da anomalia, apenas a posição do espinho anômalo no parâmero, independente de estar no lado direito ou esquerdo.

### 4.3 Estudo da infecção canina

#### 4.3.1 Amostra de cães

O cálculo do número de cães a serem amostrados foi realizado com base nos dados obtidos pelo senso canino anual realizado pela prefeitura de Várzea da Palma para a campanha de vacinação contra a raiva. Para calcular a amostra foram considerados os seguintes parâmetros de acordo com o “Cálculo de amostra para determinar prevalência” (WHO, 1995):

- prevalência esperada da infecção canina na área de estudo de 50% (este valor foi estimado uma vez que não se dispõe de dados de prevalência e porque com 50% se obtém o maior “n” possível);

- número total de cães (estimado através da última campanha de vacinação contra a raiva);
- intervalo de confiança a 95% com precisão de 0,1.

A partir destes dados ficou definido o número mínimo de 95 cães a ser trabalhado na área. Para a realização do estudo foram amostrados 207 animais residentes nas casas onde foram colocadas as armadilhas para coleta de flebotomíneos. No caso de não haver cão no domicílio foram selecionados os animais residentes em casas próximas a estes domicílios.

Os animais receberam um número de identificação de acordo com a ordem de entrada no estudo. Os mesmos números foram utilizados para a identificação das amostras coletadas. Durante a coleta foi preenchida uma ficha clínico-epidemiológica com dados como o nome do cão, sexo, idade, raça, além do nome do proprietário e endereço (Anexo 1). Os resultados dos testes sorológicos e moleculares foram transcritos para as fichas nos campos destinados ao diagnóstico laboratorial.

#### 4.3.2 Procedimentos éticos

Para a realização do projeto não foi necessário a autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ, pois todos os procedimentos foram realizados pelo veterinário do município de Várzea da Palma, MG, dentro do programa de controle das leishmanioses. Todos os procedimentos de coleta de amostras dos animais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

#### 4.3.3 Avaliação clínica dos cães

Os 207 animais amostrados foram submetidos à avaliação clínica no momento da coleta de sangue e, aqueles cujo resultado da sorologia foi positivo, foram avaliados também antes da eutanásia. O exame clínico foi realizado pelo veterinário da Secretaria Municipal de Saúde do município de Várzea da Palma. Qualquer alteração observada foi registrada, com atenção especial para os sinais

sugestivos da LVC como: linfadenopatia localizada ou generalizada, esplenomegalia, hepatomegalia, alopecia, ulceração cutânea ou lesão de pele, onicogribose, emaciação, lesões oculares e epistaxe.

#### 4.3.4 Soroprevalência canina

A soroprevalência da infecção canina na área foi calculada através de estudo seccional no início dos trabalhos. A presença de anticorpos anti-*Leishmania* no soro dos cães foi determinada através dos testes de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e a reação imunoenzimática (ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Para a realização da sorologia foram coletadas amostras de sangue total periférico, pela punção veno-cefálica utilizando seringas e agulhas descartáveis para a colheita de cinco a dez mililitros de sangue de cada animal. Uma alíquota das amostras de sangue dos cães foi utilizada para o diagnóstico sorológico e outra alíquota foi utilizada no diagnóstico molecular.

Os testes sorológicos foram realizados pelo Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. As amostras foram encaminhadas codificadas, sem informações sobre o status clínico dos animais.

Os resultados dos exames sorológicos dos cães foram repassados para a gerência de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Várzea da Palma, para que fossem tomadas as medidas profiláticas recomendadas pelo Ministério da Saúde, entre elas a remoção e eutanásia dos cães soropositivos.

#### 4.4 Métodos sorológicos

##### 4.4.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Para a obtenção do título desejado, os soros a serem testados foram diluídos na razão dois, a partir de 1:40, em solução tampão fosfato (PBS) constituída de 850mg de NaCl (Merck, Alemanha), 132mg de NaHPO<sub>4</sub> (Merck, Alemanha), 15,6mg de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (Merck, Alemanha), dissolvidos em 100mL de água destilada e pH ajustado para 7.4.

Foram transferidos 25 µL desta solução sobre cada região demarcada de uma lâmina de vidro, na qual foi previamente fixado o antígeno, constituído por formas íntegras de promastigotas de *Le. chagasi*, cepa MHOM/BR/1967/BH46, rotineiramente utilizada pelo Laboratório de Sorologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais. As lâminas foram submetidas à incubação em câmara úmida por 30min em estufa a 37°C e, a seguir foram lavadas com PBS e cobertas com a solução tampão por 5 min, seguida de lavagem em água destilada e secagem sob ventilação artificial (Ventilador Britânia B20, Brasil). Em cada região demarcada da lâmina foi acrescentado 25µl do conjugado diluído a seu título em PBS, com Tween 2% (v/v) (Tween<sup>®</sup> 20, Merck, Alemanha), acrescido de Azul de Evans 1% (Evans Blue<sup>®</sup>, Sigma Aldrich Inc., EUA). O conjugado, constituído por anti IgG de cão, marcado com Isotiocianato de Fluoresceína (Bethyl Lab. Inc., EUA) foi diluído na proporção de 1:1500. Após a adição do conjugado foi realizada nova incubação, lavagem com PBS e secagem. A lâmina foi então coberta com glicerina (Merck, Alemanha) tamponada e lamínula, e a leitura foi realizada em microscópio de luz ultravioleta (Olympus BX 41<sup>®</sup>, Olympus Optical Co., Japão). Para cada soro foi determinado a diluição reativa final, ou seja, a maior diluição que apresentar reatividade. Todas as reações foram realizadas em duplicata, e amostras de soros sabidamente positivos e negativos foram usados na mesma lâmina como controles da reação. Animais que apresentaram titulação igual ou superior a 1:40 foram considerados positivos para leishmaniose canina.

#### 4.4.2 Ensaio Imunoenzimático - ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

A dosagem de IgG total foi determinada através da técnica de ELISA, de acordo com Voller *et al.* (1979) com modificações. Os antígenos utilizados foram obtidos a partir de formas promastigotas de *Le. chagasi* MHOM/BR/1967/BH46, após ruptura por ultra som (Branson 1510<sup>®</sup>, Branson Ultrasonics Co., EUA) e centrifugação (Centrífuga Excelsa Baby II<sup>®</sup>, FANEM, Brasil) a 1360g por 10min. A quantidade de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), e ajustada para 20µg/mL em PBS e armazenado em freezer a -20°C em alíquotas, até o momento de uso.

Para a realização da técnica de ELISA foi utilizado o conjugado anti-IgG de cão no título de 1/10000 marcado com Peroxidase VI (Bethyl Lab. Inc., EUA), de acordo com Silva (2007). As reações foram realizadas em microplacas de polietileno (BD Falcon, Becton, Dickison and Company, EUA) de 96 orifícios e fundo plano. Cada orifício da placa foi sensibilizado com 2µg do antígeno diluído em 100µL de tampão carbonato, constituído por 0,159% p/v de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck, Alemanha) e 0,293% p/v NAHCO<sub>3</sub> (Merck, Alemanha), diluídos em água destilada. As placas foram incubadas a 4°C por 24h para sensibilização. A seguir, o excesso de antígeno foi removido com cinco lavagens sucessivas, utilizando uma solução de 0,9% p/v NaCl e 0,05mL v/v Tween<sup>®</sup> 20, diluídos em água destilada. Após as lavagens, as placas foram secadas por inversão sobre papel absorvente, e foram adicionados 150µL por orifício da solução de bloqueio de sítios inespecíficos, constituída por caseína 2% p/v (Sigma Aldrich, EUA) diluída em PBS com pH ajustado para 7.6. Seguiu-se incubação a 37°C por 30min. Para retirada do excesso de solução de bloqueio foram realizadas duas lavagens sucessivas, com secagem das placas por inversão sobre papel absorvente. Os soros a serem testados foram diluídos em tampão de incubação, composto de caseína 0,25% p/v e 0,05% Tween<sup>®</sup> 20 diluídos com PBS em pH 7.6, e foram aplicados 100µL dessa solução por orifício da placa, em duplicata. Segue uma nova incubação a 37°C por 45min, e retirada de excesso da solução por uma série de cinco lavagens. Após a secagem das placas, uma alíquota de 100µL do conjugado diluído a seu título foi acrescentada em cada orifício. Após nova incubação a 37°C por 45min, o excesso de conjugado foi retirado por nova série de cinco lavagens. Após as lavagens foi acrescentado em cada orifício 100µL de solução do substrato, composta por 10mg de cromógeno *orthophenylenediamine* (OPD, Sigma Aldrich, EUA) mais 4µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30v (Merck, Alemanha) diluídos em 10mL de solução tampão do substrato, composta por 0,719 % p/v de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,519% ácido cítrico (Merck, Alemanha) diluídos em água destilada. Após a reação transcorrer por 10min em temperatura ambiente e no escuro, esta foi interrompida pela adição de 25µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N (Merck, Alemanha) por orifício. As reações foram lidas em leitor de ELISA (BioRad modelo 550, Brasil) a 495 nm e os resultados expressados em valores de absorbância.

Para cada placa, o ponto de corte ou “cut off” foi estabelecido a partir da média das leituras de absorbância de oito soros de cães não infectados procedentes de região não endêmica para a doença, mais duas vezes o desvio padrão.

4.5 Métodos moleculares para o estudo de *Leishmania* nos flebotomíneos e nos cães.

#### 4.5.1 Extração do DNA

As fêmeas capturadas, que não apresentavam sinais de repasto sanguíneo em seu abdômen, foram identificadas e separadas para detecção da infecção por *Leishmania*. Cada “pool” ou amostra foi constituído de até 20 fêmeas, todas pertencentes à mesma espécie, localidade e data de coleta.

Após a eutanásia dos cães foram coletadas amostras de pele da face interna da orelha e medula óssea para a tentativa de isolamento do parasito e estudos moleculares visando à caracterização da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção. As amostras de sangue total periférico, conservadas e acondicionadas adequadamente e os fragmentos de pele e medula coletados e acondicionados em álcool etílico absoluto a -20°C foram submetidos à extração do DNA.

Os flebotomíneos e os tecidos coletados dos cães foram macerados em 150 µl de tampão NET10, 20 µl SDS 10% e 1 µl de proteinase K (20mg/ml) em tubos de 1,5 ml, vortexados por 10 segundos e incubados “overnight” a 56 °C sob agitação. Após a incubação foi dado um pulso na centrífuga para baixar o conteúdo suspenso nas paredes do tubo, acrescido 250 µl de fenol/clorofórmio e misturado 10 vezes por inversão. Após centrifugação por 6 minutos a 20 000 g, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml, contendo 250 µl de clorofórmio/álcool isoamílico e misturado 10 vezes por inversão. Foi realizada outra centrifugação por 6 minutos a 20 000 g. A fase aquosa foi transferida para um outro tubo de 1,5 ml contendo 400 µl de etanol absoluto e 15 µl de acetato de sódio 3M e misturado 10 vezes por inversão. Após incubação de 20 minutos a -70 °C o conteúdo foi novamente centrifugado por 6 minutos a 20 000 g. O sobrenadante foi descartado e no mesmo

tubo foi acrescentado 500 µl de etanol a 70% e misturado 10 vezes por inversão, seguido de outra centrifugação por 6 minutos a 20 000 g. Por fim o sobrenadante foi descartado, o tubo seco por exposição ao ambiente e o DNA eluído em 50 µl de água própria para PCR.

#### 4.5.2 Confirmação da extração de DNA

Foi realizada a dosagem de moléculas de DNA em todas as amostras, tanto de flebotomíneos quanto de cães, para confirmar a extração verificando a presença, concentração e a qualidade das amostras de ácidos nucleicos. Para este procedimento utilizou-se um espectrofotômetro, aparelho NanoDrop®-1000, conforme recomendações do fabricante. A relação entre absorvância em 260 e 280 nanômetros (nm) foi utilizada para avaliar a pureza do DNA. A proporção de 1,4 a 1,8 é geralmente aceita como "pura" de DNA. Se a proporção é significativamente menor, isso pode indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente em ou perto de 280 nm.

#### 4.5.3 *Nested* PCR (LnPCR) para o gene SSUrRNA de *Leishmania* em amostras de DNA extraídas de flebotomíneos e cães

A LnPCR – SSUrRNA amplifica um fragmento do gene SSUrRNA que é uma região conservada entre todas as espécies de *Leishmania*. Esta técnica é utilizada para a detecção direta, sem a necessidade de isolamento do parasito, a partir de diferentes amostras biológicas (Van Eys *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 2002 e 2006). Tal metodologia, adaptada e modificada por Cruz *et al.* (2002), permite a amplificação inicial de um fragmento de aproximadamente 603 pb, pela utilização dos iniciadores R1: 5' GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG 3' e R2: 5' GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG 3', seguida da amplificação de um fragmento de aproximadamente 353 pb, a partir do produto amplificado da primeira reação, pela utilização dos iniciadores R3: 5' TCC CAT CGC AAC CTC GGT T 3' e R4: 5' AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3'. A primeira reação foi preparada para um volume final de 50µl contendo 10µl de DNA da amostra a ser testada, 5 µl da solução tampão 10x - 15mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de dNTPs a 10mM, 1µl do iniciador R1 a 15µM, 1 µl do iniciador R2 a 15µM, 1,4 µl de Tth DNA polimerase a 1U/ µl (Biotools) e 30,6 µl de H<sub>2</sub>O destilada estéril. Em tubos

contendo 1 ml de H<sub>2</sub>O foram diluídos 25 µl de produto da primeira reação, para serem utilizados como “template” da segunda PCR. Esta foi preparada para um volume final de 25 µl contendo 10µl do produto amplificado diluído, 2,5 µl da solução tampão 10x - 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de dNTPs a 10mM, 0,5µl do iniciador R3 a 15µM, 0,25 µl do iniciador R4 a 15µM, 0,7 µl de Tth DNA polimerase a 1U/ µl (Biotools) e 10,55 µl de H<sub>2</sub>O destilada estéril. As amplificações foram processadas em aparelho termociclador automático (AB9800®) utilizando os seguintes ciclos: 1ª reação - desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguido de 30 repetições de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, 2ª reação - desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguido de 30 repetições de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. A extensão final foi a 72°C por cinco minutos para ambas as reações.

Em todas as reações foi utilizado controle positivo com 20 ng de DNA extraído de cultura de *Le. infantum* (cepa JPC), e como controle negativo água destilada estéril como “template”. Nas reações com DNA extraído dos flebotomíneos os controles positivos foram constituídos de fêmeas de *Lu. longipalpis* e DNA extraído de culturas de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *Le. infantum* (MHOM/BR/70/BH46).

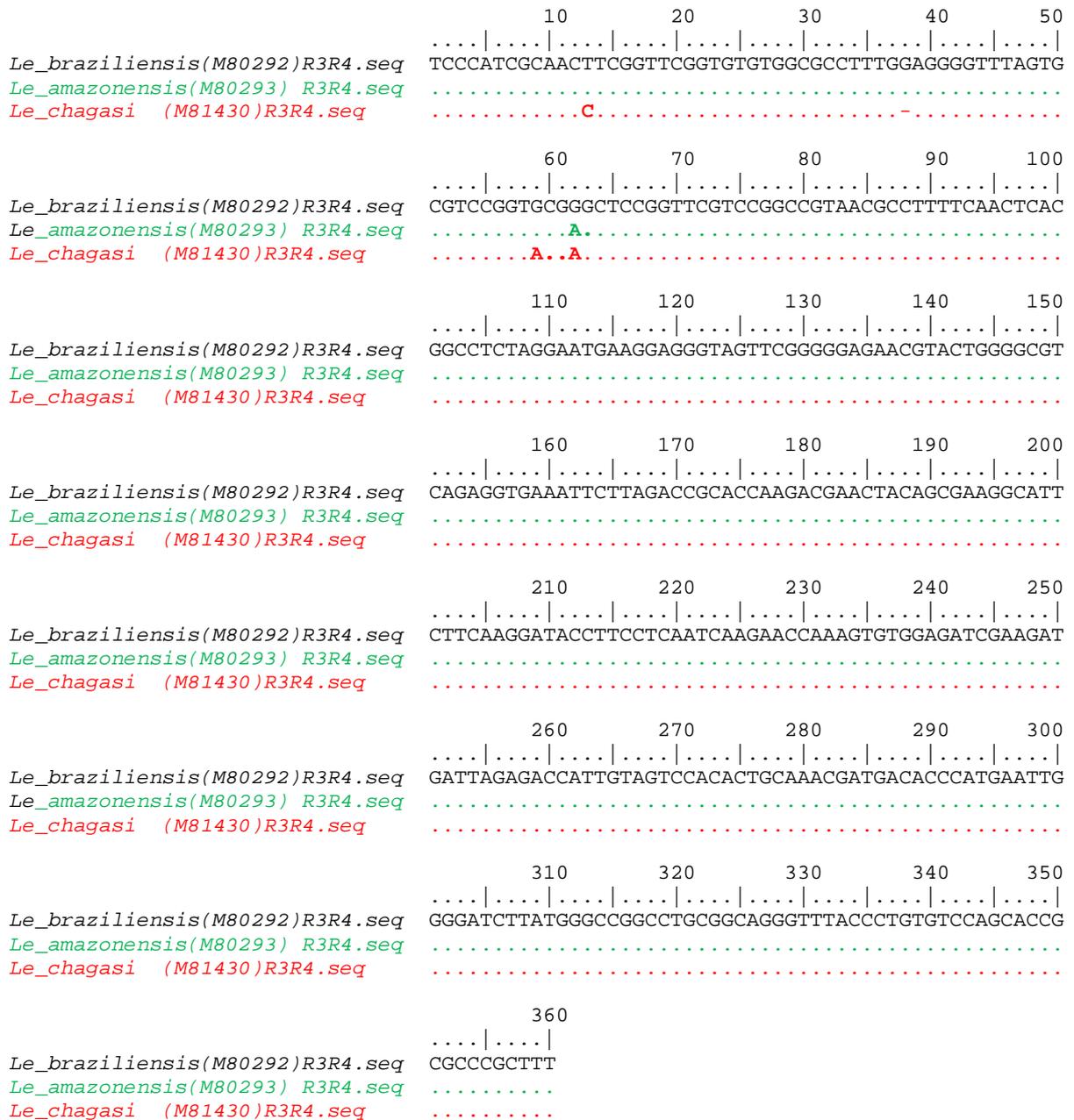
Os resultados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio e examinados em exposição à luz ultravioleta (UV), com o PM de 100 pb, sendo considerados positivos aqueles que apresentaram bandas de peso molecular correspondente ao esperado, 603 pb e 353pb, na primeira e na segunda reação respectivamente.

#### 4.6 Identificação da espécie de *Leishmania*

A identificação das espécies de *Leishmania* foi realizada através do seqüenciamento do produto amplificado da segunda reação da LnPCR (fragmento esperado de aproximadamente 353pb). As bandas de 353 pb com intensidade considerável foram cortadas e purificadas usando kit comercial próprio para este fim

(QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN) de acordo com as especificações do fabricante.

O produto amplificado e purificado, eluído em 20 µl de H<sub>2</sub>O destilada e estéril foi então utilizado como template para uma amplificação, anterior ao processo de sequenciamento. A reação de PCR para o sequenciamento foi preparada para um volume final de 10 µl, formada por 4 µl do PREMIX (BigDye® Terminator v3.1 Cycle), 1 µl do iniciador na concentração de 3,2 pmol e 5 µl do produto de PCR. Este mix foi colocado em um termociclador (AB9800®) utilizando o seguinte programa: 94°C por três minutos, seguido de 25 ciclos de: 96°C por um segundo, 65°C por 5 segundos (esta temperatura depende da temperatura de anelamento do iniciador utilizado) e 60°C por quatro minutos. O sequenciamento propriamente dito foi realizado no seqüenciador automatizado *ABI PRISM 377 DNA sequencer (Applied Biosystems)*. A análise bioinformática das seqüências obtidas foi realizada utilizando os programas *Lasergene® sequence analysis software (DNASTAR)* e o BIOEDIT. Estas análises incluem a edição, alinhamento e a busca de sítios de restrição das seqüências estudadas. O alinhamento das seqüências editadas com aquelas depositadas no GenBank permite a identificação de três espécies de interesse na área de estudo; *Le. braziliensis*, *Le. amazonensis* e *Le. chagasi* (Figura 4).



**Figura 4:** Alinhamento das sequências do fragmento do gene SSUrRNA de espécies de *Leishmania*, depositadas no GenBank.

## 4.7 Isolamento de amostras de *Leishmania*

### 4.7.1 A partir de flebotomíneos

As fêmeas capturadas nas coletas não sistematizadas foram dissecadas para a pesquisa da infecção natural. A dissecação consistiu em retirar o tubo digestivo

dos insetos em salina tamponada com o auxílio de dois estiletos entomológicos. Tal procedimento foi realizado a partir da cabeça até o final do abdômen, sobre uma lâmina de microscopia. Após a dissecação o material foi recoberto com lamínula e feita à pesquisa de parasitos ao microscópio óptico. Durante o exame microscópico foi realizada a identificação específica dos flebotomíneos, principalmente com base nas espermatecas.

#### 4.7.2 A partir de amostras de cães

Para o isolamento do parasito, fragmentos de medula óssea foram armazenados em geladeira (4°C) durante 24 horas em solução salina com antibióticos (estreptomicina 100µg/ml e penicilina 500U/ml). Após este período as amostras foram inoculadas em meio de cultura NNN (Novy-Mc Nel- Nicolle) enriquecido com Schneider e mantidas à 25°C ± 1°C. O exame da cultura foi realizado semanalmente e considerado positivo quando se observou a presença de formas promastigotas de *Leishmania*. Depois de quatro semanas as amostras onde não foi possível observar a presença de promastigotas, o resultado foi considerado negativo. As amostras isoladas foram criopreservadas e depositadas no banco de cepas do Laboratório de Leishmanioses do CPqRR, para posterior caracterização.

#### 4.8 Normas de Biossegurança

Os experimentos realizados neste estudo seguiram as normas ABNT NBR ISO/IEC 17025, sobre requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração e o manual interno de biossegurança do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz.

#### 4.9 Análise estatística

Os dados foram organizados em planilhas e as análises descritivas foram registradas no programa Microsoft Excel® (Office 2003).

Os coeficientes de Pearson foram utilizados para avaliar a correlação entre o total de flebotomíneos coletados e as variáveis climáticas (temperatura média, pluviosidade total e umidade relativa do ar média). O teste Mann-Whitney foi utilizado para verificar a diferença entre o número de machos e fêmeas capturadas. A ANOVA e o teste t-student foram realizados na análise das anomalias presentes nos machos de *Lu. longipalpis*. Os testes citados acima foram realizados utilizando o software SPSS 15.0.

Para comparação da proporção de cães positivos nos testes sorológicos e moleculares, nas diferentes amostras, utilizou-se o teste Qui-quadrado pelo software R 2.12.0 e as comparações múltiplas foram realizadas utilizando a metodologia de Bonferroni. O nível de significância utilizado para todas as análises foi de 5%.

O coeficiente *Kappa* foi realizado para avaliar a concordância entre os testes diagnósticos (RIFI, ELISA, LnPCR de sangue, medula e pele), sempre comparando os testes dois a dois utilizando o software SPSS 15.

## 5 RESULTADOS

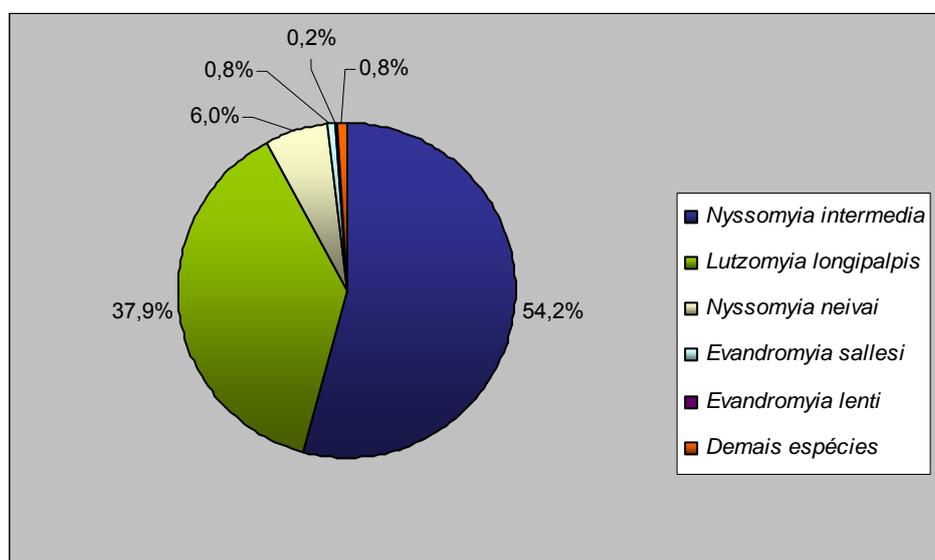
### 5.1 Coletas sistematizadas

Foram realizadas doze coletas de flebotomíneos no município de Várzea da Palma, Minas Gerais no período de abril de 2009 a março de 2010.

O número de flebotomíneos capturados por espécie e sexo é apresentado na tabela 3. De um total de 24.241 espécimes de flebotomíneos, foram identificadas quinze espécies pertencentes a sete gêneros: *Brumptomyia*, *Evandromyia*, *Lutzomyia*, *Micropygomyia*, *Nyssomyia*, *Psathyromyia* e *Sciopemyia*. As espécies capturadas foram *Brumptomyia avellari* (Costa Lima, 1932), *Evandromyia evandroi* (Costa Lima & Antunes, 1936), *Evandromyia lenti* (Mangabeira, 1938), *Evandromyia sallesi* (Galvão & Coutinho, 1939), *Evandromyia termitophila* (Martins, Falcão & Silva, 1964), *Evandromyia walkeri* (Newstead, 1914), *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *Micropygomyia acanthopharynx* (Martins, Falcão & Silva, 1962), *Micropygomyia quinquefer* (Dyar, 1929), *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926), *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), *Psathyromyia shannoni* (Dyar, 1929) e *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927).

**Tabela 3:** Espécies de flebotomíneos capturadas no Município de Várzea da Palma, MG, no período de abril de 2009 a março de 2010.

Espécie	N° de flebotomíneos coletados		
	Machos	Fêmeas	Total
<i>Nyssomyia intermedia</i>	7906	5241	13147
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	7847	1335	9182
<i>Nyssomyia neivai</i>	1139	326	1465
<i>Evandromyia sallesi</i>	86	97	183
<i>Evandromyia lenti</i>	27	32	59
<i>Nyssomyia whitmani</i>	52	1	53
<i>Psathyromyia shannoni</i>	48	5	53
<i>Evandromyia evandroi</i>	7	14	21
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	15	6	21
<i>Brumptomyia avellari</i>	19	4	23
<i>Evandromyia termitophila</i>	5	8	13
<i>Evandromyia walkeri</i>	6	4	10
<i>Micropygomyia acanthopharyns</i>	6	0	6
<i>Sciopemyia sordellii</i>	3	1	4
<i>Psathyromyia lutziana</i>	1	0	1
<b>Total</b>	<b>17.167</b>	<b>7.074</b>	<b>24.241</b>

**Figura 5:** Porcentagem de flebotomíneos por espécie, coletados no município de Várzea da Palma, MG, no período de abril de 2009 a março de 2010.

Conforme apresentado na figura 5, a espécie *Ny. intermedia* correspondeu a 54,2% do total de exemplares coletados na área de estudo, seguida de *Lu. longipalpis* com 37,9%. O número de machos (17.167) foi maior

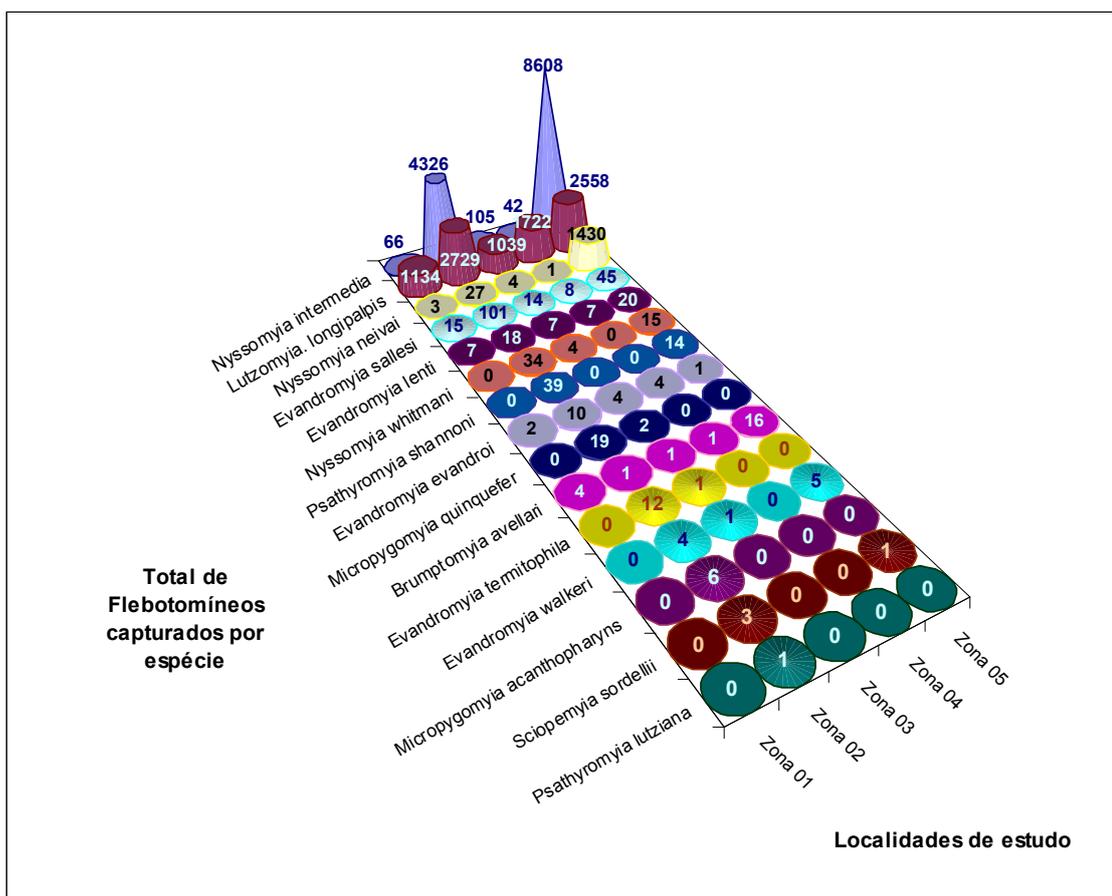
do que o de fêmeas (7.074), sendo a razão macho: fêmea = 2,43: 1.0. Ao realizar o teste de Mann-Whitney foi possível constatar uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre o número de machos e fêmeas coletados.

A tabela 4 e a figura 6 mostram a distribuição das espécies capturadas de acordo com os pontos de coleta. Os dados apresentados correspondem ao somatório de quatro armadilhas expostas em cada uma das zonas político-administrativas do município de Várzea da Palma, MG.

As coletas referentes à Zona 05 representaram 52,4% do total geral de exemplares, seguida pela Zona 02 com 30,2% e as demais localidades foram responsáveis por 17,4% do número de flebotomíneos capturados. Em todas as zonas as espécies *Ny. intermedia* e *Lu. longipalpis* foram as mais prevalentes. Somente na Zona 05, a espécie *Ny. neivai* também apresentou uma ocorrência mais expressiva (Tabela 4).

**Tabela 4:** Flebotomíneos coletados, por sexo e localidade de estudo, no município de Várzea da Palma, MG, no período de abril de 2009 a março de 2010.

Espécie	Localidade de estudo										Total
	Zona 01		Zona 02		Zona 03		Zona 04		Zona 05		
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
<i>Nyssomyia intermedia</i>	29	37	2873	1453	64	41	24	18	4916	3692	13147
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	1021	113	2417	312	909	130	1441	281	2059	499	9182
<i>Nyssomyia neivai</i>	1	2	10	17	4	0	1	0	1123	307	1465
<i>Evandromyia sallesi</i>	5	10	52	49	9	5	5	3	15	30	183
<i>Evandromyia lenti</i>	3	4	8	10	6	1	1	6	9	11	59
<i>Nyssomyia whitmani</i>	0	0	34	0	4	0	0	0	14	1	53
<i>Psathyromyia shannoni</i>	0	0	35	4	0	0	0	0	13	1	53
<i>Evandromyia evandroi</i>	0	2	2	8	0	4	4	0	1	0	21
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	0	0	15	4	0	2	0	0	0	0	21
<i>Brumptomyia avellari</i>	4	0	1	0	1	0	1	0	12	4	23
<i>Evandromyia termitophila</i>	0	0	4	8	1	0	0	0	0	0	13
<i>Evandromyia walkeri</i>	0	0	2	2	1	0	0	0	3	2	10
<i>Micropygomyia acanthopharyns</i>	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	6
<i>Sciopemyia sordellii</i>	0	0	2	1	0	0	0	0	1	0	4
<i>Psathyromyia lutziana</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>Total</b>	1063	168	5462	1868	999	183	1477	308	8166	4547	24241



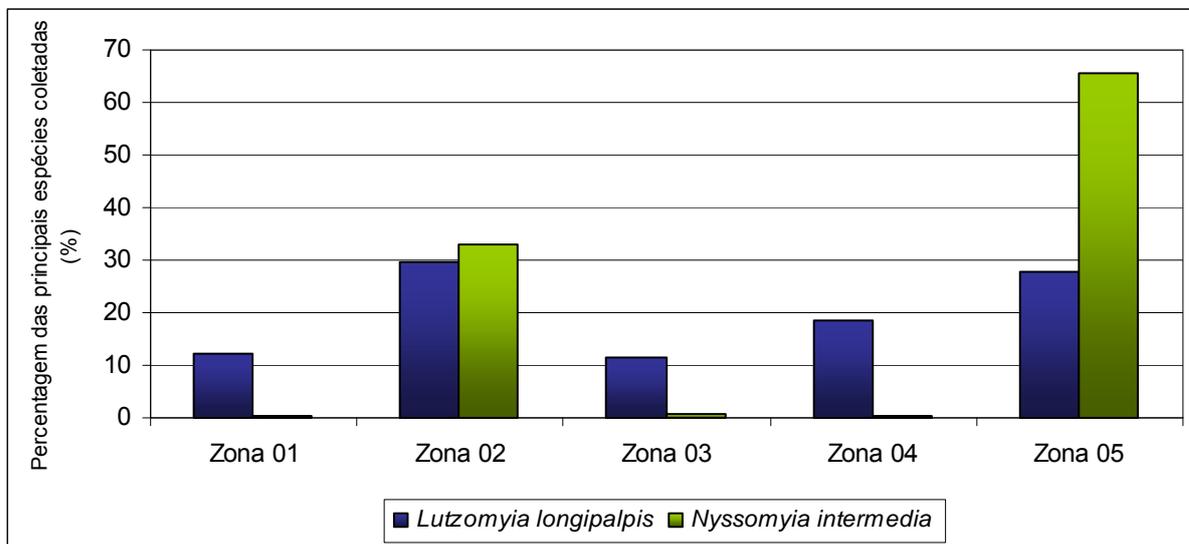
**Figura 6:** Total de flebotomíneos por espécie, coletados no município de Várzea da Palma, MG, no período de abril de 2009 a março de 2010, segundo localidade de estudo.

As espécies *Br. avellari*, *Ev. evandroi*, *Ev. lenti*, *Ev. sallesi*, *Lu. longipalpis*, *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* foram coletadas em todas as localidades de estudo. As espécies *Ev. walkeri* e *Ny. whitmani* foram encontradas em três das localidades de estudo, enquanto *Ev. termitophila*, *Mi. quinquefer*, *Pa. shannoni* e *Sc. sordellii* foram encontradas apenas em duas destas. *Mi. acanthopharynx* e *Pa. lutziana* foram capturadas em apenas uma das localidades de coleta.

A Zona 02 apresentou maior riqueza de espécies coletadas. Este foi o único local de estudo para o qual as quinze espécies relatadas foram coletadas. A Zona 03 e 05 apresentaram onze das quinze espécies capturadas. As demais localidades apresentaram no máximo sete espécies.

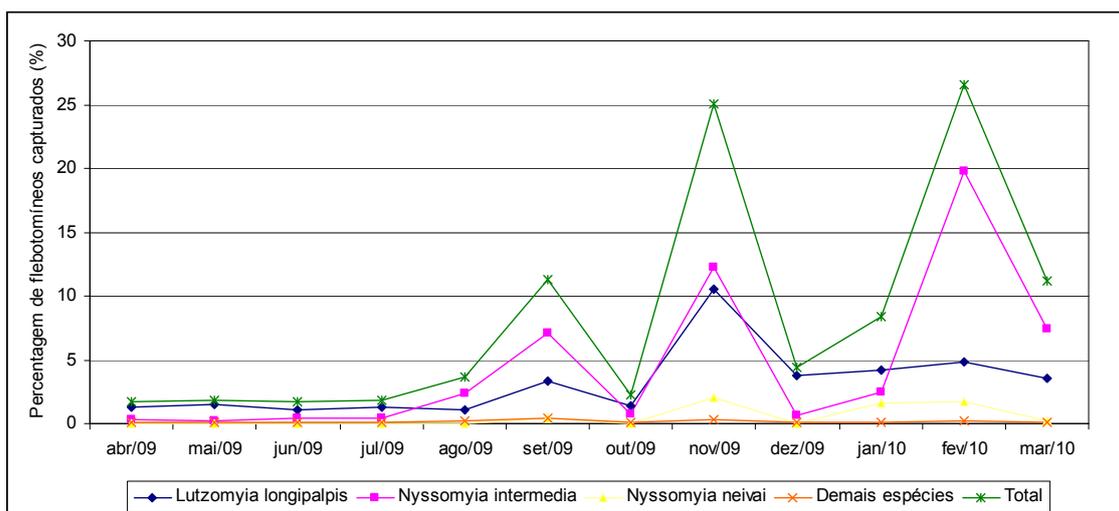
A figura 7 destaca a porcentagem das duas espécies mais frequentes, *Ny. intermedia* e *Lu. longipalpis*, segundo a localidade de estudo. A *Ny. intermedia* foi

mais prevalente nas Zonas 05 (65,5%) e 02 (32,9%), com baixa ocorrência nas outras áreas (1,6%). Nas demais localidades (Zonas 01, 03 e 04) prevaleceu a espécie *Lu. longipalpis*.



**Figura 7:** Ocorrência de *Lutzomyia longipalpis* e *Nyssomyia intermedia* segundo localidade de estudo no município de Várzea da Palma, MG, no período de abril de 2009 a março de 2010.

A figura 8 e a tabela 5 mostram a distribuição de flebotomíneos capturados mensalmente no município de Várzea da Palma, Minas Gerais.



**Figura 8:** Percentagem de flebotomíneos coletados no período de abril de 2009 a março de 2010, no município de Várzea da Palma, MG.

Os meses de novembro e fevereiro apresentaram o maior percentual de flebotomíneos coletados (51,7%), seguidos de setembro e março.

As espécies *Ev. sallesi*, *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia* foram as únicas coletadas em todos os meses de estudo. A espécie *Ny. neivai* só não esteve presente na captura do mês de dezembro.

Analisando o padrão apresentado pelas espécies mais prevalentes observamos que *Ny. neivai* registrou picos de ocorrência nos meses de setembro, novembro, janeiro e fevereiro, *Lu. Longipalpis* mostrou um aumento importante no número de exemplares capturados no mês de novembro e *Ny. intermedia* apresentou três picos de ocorrência nos meses de setembro, novembro e fevereiro (Figura 8).

**Tabela 5:** Número e porcentagem de flebotomíneos coletados por mês e espécie, no município de Várzea da Palma, MG, no período de abril de 2009 a março de 2010.

Espécie	Mês/Ano												Total N(%)
	Abr/09 N(%)	Mai/09 N(%)	Jun/09 N(%)	Jul/09 N(%)	Ago/09 N(%)	Set/09 N(%)	Out/09 N(%)	Nov/09 N(%)	Dez/09 N(%)	Jan/10 N(%)	Fev/10 N(%)	Mar/10 N(%)	
<i>Nyssomyia intermedia</i>	70 (0,29)	62 (0,26)	114 (0,47)	101 (0,42)	583 (2,4)	1714 (7,07)	173 (0,7)	2974 (12,27)	147 (0,61)	611 (2,5)	4807 (19,83)	1790 (7,384)	<b>13146</b> (54,23)
<i>Lutzomyia. Longipalpis</i>	316 (1,3)	365 (1,51)	271 (1,11)	317 (1,31)	260 (1,07)	817 (3,37)	348 (1,44)	2546 (10,5)	909 (3,75)	1013 (4,2)	1171 (4,83)	849 (3,5)	<b>9182</b> (37,88)
<i>Nyssomyia neivai</i>	5 (0,021)	2 (0,008)	1 (0,004)	3 (0,012)	3 (0,012)	92 (0,38)	1 (0,004)	498 (2,05)	0 (0)	378 (1,56)	429 (1,77)	53 (0,22)	<b>1465</b> (6,04)
<i>Evandromyia sallesi</i>	6 (0,025)	13 (0,054)	5 (0,021)	5 (0,021)	14 (0,058)	72 (0,3)	10 (0,041)	18 (0,074)	9 (0,037)	4 (0,017)	16 (0,066)	11 (0,045)	<b>183</b> (0,76)
<i>Evandromyia lenti</i>	6 (0,025)	3 (0,012)	4 (0,017)	2 (0,008)	4 (0,017)	8 (0,033)	3 (0,012)	15 (0,062)	8 (0,033)	0 (0)	6 (0,025)	0 (0)	<b>59</b> (0,243)
<i>Nyssomyia whitmani</i>	2 (0,008)	3 (0,012)	2 (0,008)	0 (0)	14 (0,058)	7 (0,029)	0 (0)	10 (0,041)	1 (0,004)	7 (0,029)	5 (0,021)	2 (0,008)	<b>53</b> (0,22)
<i>Psathyromyia shannoni</i>	4 (0,017)	0 (0)	4 (0,017)	8 (0,033)	3 (0,012)	6 (0,025)	0 (0)	6 (0,025)	2 (0,008)	14 (0,058)	6 (0,025)	0 (0)	<b>53</b> (0,22)
<i>Evandromyia evandroi</i>	3 (0,012)	2 (0,008)	4 (0,017)	1 (0,004)	2 (0,008)	5 (0,021)	1 (0,004)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0,017)	0 (0)	<b>22</b> (0,091)
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	1 (0,004)	1 (0,004)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,004)	8 (0,033)	3 (0,012)	3 (0,012)	2 (0,008)	2 (0,008)	<b>21</b> (0,087)
<i>Brumptomyia avellari</i>	3 (0,012)	1 (0,004)	6 (0,025)	1 (0,004)	3 (0,012)	0 (0)	0 (0)	7 (0,029)	0 (0)	0 (0)	2 (0,008)	0 (0)	<b>20</b> (0,083)
<i>Evandromyia termitophila</i>	0 (0)	1 (0,004)	0 (0)	0 (0)	5 (0,021)	2 (0,008)	0 (0)	1 (0,004)	2 (0,008)	0 (0)	2 (0,008)	0 (0)	<b>13</b> (0,054)
<i>Evandromyia walkeri</i>	2 (0,008)	2 (0,008)	1 (0,004)	1 (0,004)	1 (0,004)	3 (0,012)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>10</b> (0,041)
<i>Micropygomyia acanthopharyns</i>	1 (0,004)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0,008)	3 (0,012)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>6</b> (0,025)
<i>Sciopemyia sordellii</i>	1 (0,004)	0 (0)	1 (0,004)	0 (0)	0 (0)	1 (0,004)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,004)	0 (0)	<b>4</b> (0,017)
<i>Psathyromyia lutziana</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,004)	0 (0)	0 (0)	<b>1</b> (0,004)
<b>Total</b>	<b>420</b> (1,73)	<b>455</b> (1,88)	<b>413</b> (1,70)	<b>439</b> (1,81)	<b>892</b> (3,68)	<b>2.729</b> (11,26)	<b>540</b> (2,23)	<b>6083</b> (25,10)	<b>1081</b> (4,46)	<b>2031</b> (8,38)	<b>6451</b> (26,6)	<b>2707</b> (11,17)	<b>24241</b> (100)

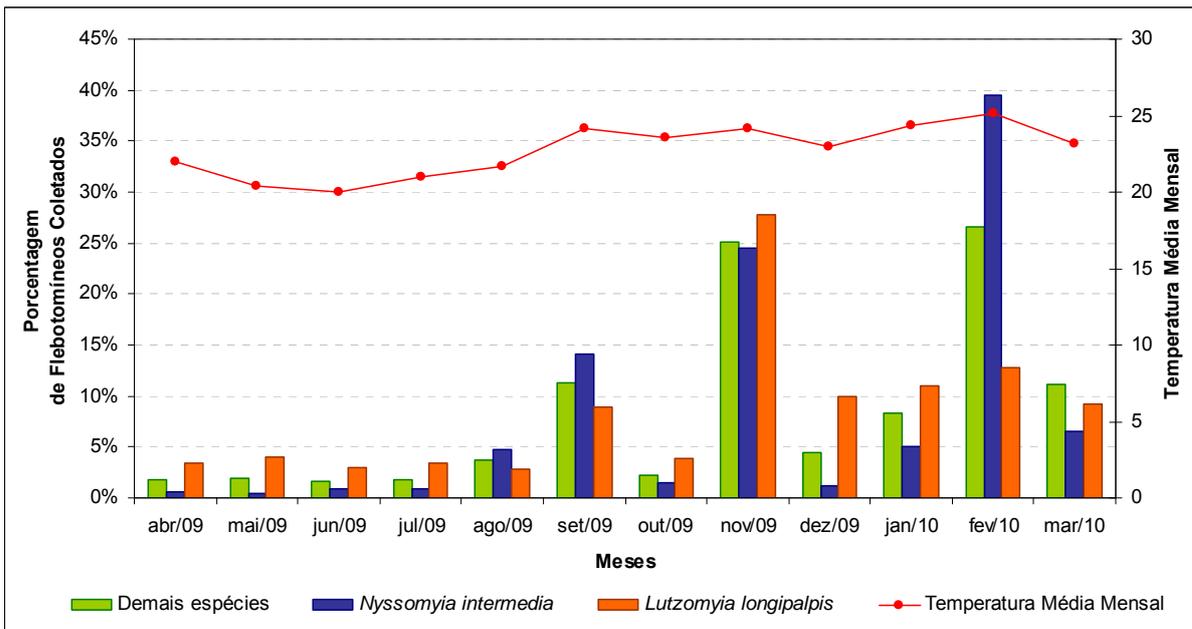
As temperaturas médias durante o período de estudo variaram entre 20,0°C e 25,2°C. Este foi o único parâmetro que apresentou correlação estatisticamente significativa com a variação mensal de espécimes de flebotomíneos capturados (Tabela 6).

Os valores médios de precipitação variaram entre 0,0mm<sup>3</sup> e 79,0mm<sup>3</sup> e a umidade relativa do ar variou entre 56,8% e 87,3%. Ao nível de significância de 5% estes valores não apresentaram correlação significativa com o número de flebotomíneos coletados (Tabela 6).

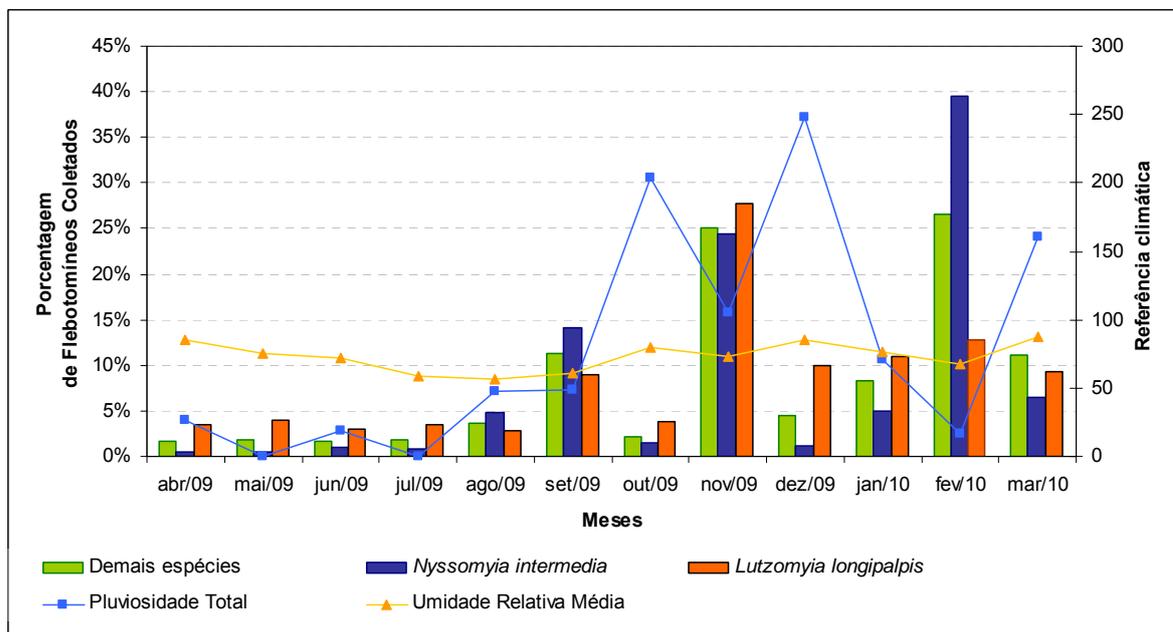
**Tabela 6:** Resultado do teste de correlação entre o total de flebotomíneos coletados e as variáveis climáticas, no município de Várzea da Palma, MG, no período de abril de 2009 a março de 2010.

Total de flebotomíneos coletados	Temperatura Média	Pluviosidade Total	Umidade Relativa do Ar Média	
	0,742	-0,007	-0,077	Coefficiente de Pearson
	0,006	0,982	0,813	P-valor

As figuras 9 e 10 mostram a relação entre as variáveis climáticas: temperatura média mensal, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica e a variação mensal das espécies de flebotomíneos capturadas.

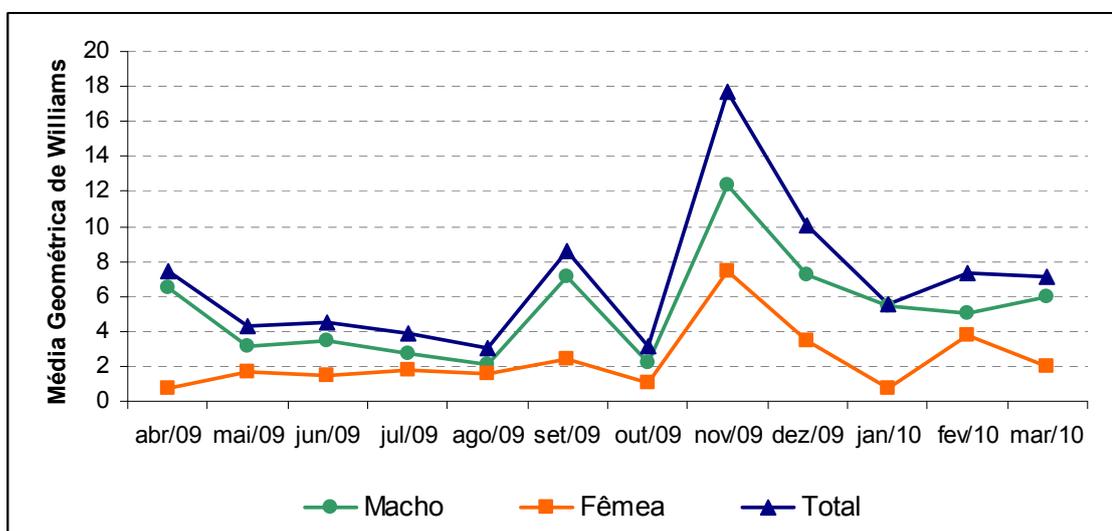


**Figura 9:** Porcentagem de flebotomíneos capturados mensalmente no município de Várzea da Palma, MG, em comparação com a temperatura média mensal, no período de abril de 2009 a março de 2010.



**Figura 10:** Porcentagem de flebotomíneos capturados mensalmente no município de Várzea da Palma, MG, em comparação com os parâmetros climáticos: pluviosidade total e média da umidade relativa do ar, no período de abril de 2009 a março de 2010.

Houve um maior número de insetos coletados durante os meses mais quentes do ano para o município de Várzea da Palma, MG. O período chuvoso antecedeu os picos de maior captura de flebotomíneos (outubro e dezembro de 2009 e março de 2010). Ao realizar a média geométrica de Williams no intuito de verificar a frequência e a regularidade das espécies nas coletas (Haddow, 1960) permitindo avaliar a atividade das espécies mais abundantes, foi possível confirmar os maiores picos de ocorrência de flebotomíneos nos meses de setembro e novembro de 2009 e fevereiro de 2010. O cálculo foi realizado a partir do número total de machos e fêmeas capturados mensalmente com as armadilhas luminosas automáticas HP (Figura 11).



**Figura 11:** Média de flebotomíneos machos e fêmeas capturados mensalmente com armadilha luminosa HP, no município de Várzea da Palma, MG, no período de abril de 2009 a março de 2010.

## 5.2 Capturas não sistematizadas

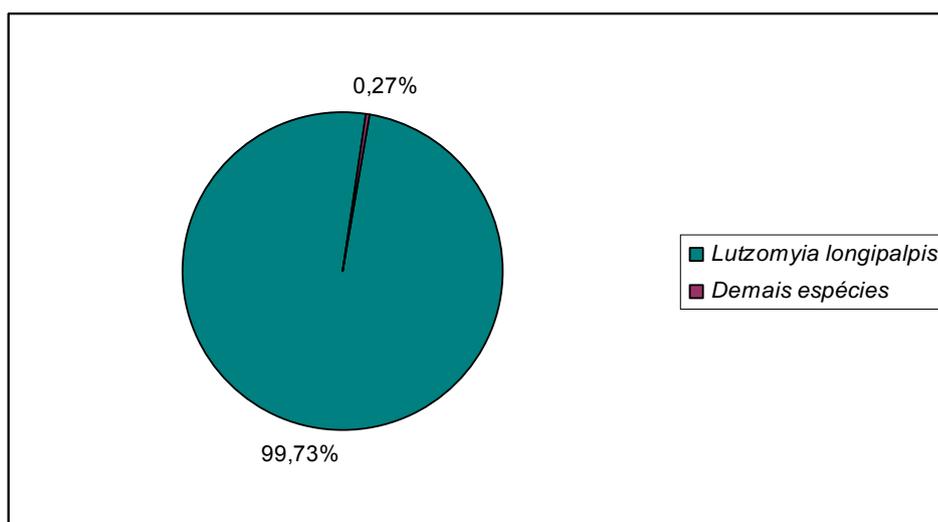
Apenas as espécies *Ev. lenti*, *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia* foram coletadas durante as capturas não sistematizadas. O resultado destas capturas encontra-se na tabela 7 e na figura 12.

Foram realizadas coletas referentes às estações primavera, verão, outono e inverno. As coletas realizadas no verão e outono, janeiro e março de 2010 respectivamente, foram responsáveis pela quase totalidade dos exemplares coletados (85%), sendo 926 espécimes de *Lu. longipalpis*. Nas demais coletas, julho

e outubro de 2009, foram coletados 164 (15%) espécimes de *Lu. longipalpis*, dois de *Ny. intermedia* e um espécime fêmea de *Ev. lenti*.

**Tabela 7:** Resultados das coletas não sistematizadas, no município de Várzea da Palma, MG, nos meses de julho e outubro 2009 e janeiro e março de 2010.

Espécie	Estação do ano								Total	
	Inverno Jul/2009		Primavera Out/2009		Verão Jan/2010		Outono Mar/2010			
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	135	13	16	0	561	65	273	27	985	105
<i>Nyssomyia intermedia</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0
<i>Evandromyia lenti</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<b>Total</b>	136	13	17	1	561	65	273	27	987	106



**Figura 12:** Distribuição das espécies capturadas nas coletas não sistematizadas no município de Várzea da Palma, MG.

### 5.3 Anomalias em flebotomíneos

Do total de 8.832 machos pertencentes à espécie *Lu. Longipalpis* analisados, 41 (0,5%) apresentaram anomalias no parâmero. Os machos de *Lu. longipalpis* apresentam, dentre outras características morfológicas, dois espinhos curvados implantados na porção basal do parâmero (Figura 13). Neste estudo foram

identificados seis tipos de anomalias unilaterais e duas bilaterais, todas no parâmero, sendo descritas a seguir.

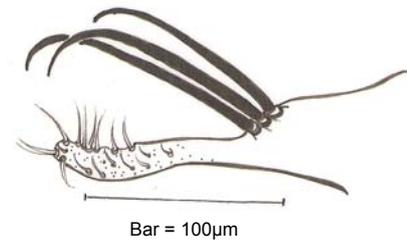
A anomalia tipo 1 se caracteriza pela presença de um espinho adicional implantado ao mesmo nível dos espinhos normais na porção basal do parâmero (Figura 14). A anomalia tipo 2 apresenta um espinho adicional na porção mediana do parâmero (Figura 15). A anomalia tipo 3 é representada por um espinho adicional, localizado próximo aos espinhos característicos da espécie *Lu. longipalpis* (Figura 16), enquanto a anomalia tipo 4 tem um espinho adicional em posição intermediária às anomalias tipo 3 e 2 (Figura 17). A anomalia tipo 5 está localizada na mesma posição da anomalia tipo 3, porém com o espinho anômalo menos espesso (Figura 18). O mesmo ocorre com a anomalia tipo 6, cujo espinho está na mesma posição da anomalia 4 diferindo apenas pelo sua espessura mais delgada (Figura 19).



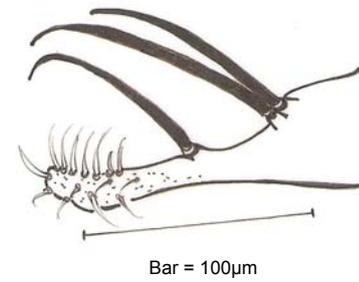
**Figura 13:** Parâmero padrão dos machos de *Lu. longipalpis*.



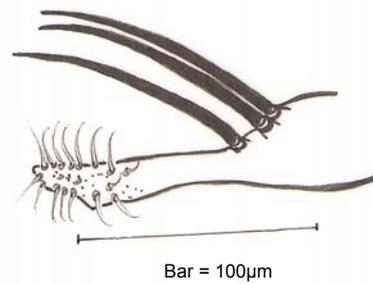
**Figura 14:** Parâmero de *Lu. longipalpis* com anomalia unilateral tipo 1.

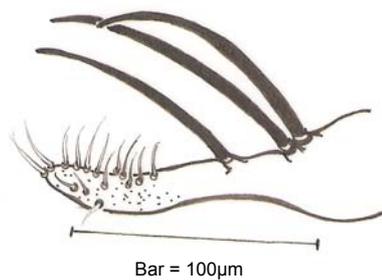


**Figura 15:** Parâmero de *Lu. longipalpis* com anomalia unilateral tipo 2.

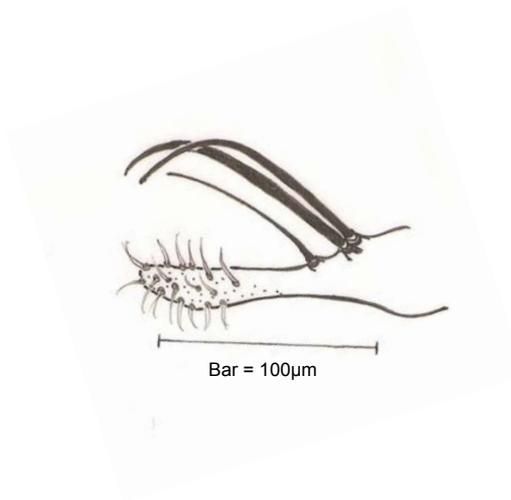


**Figura 16:** Parâmero de *Lu. longipalpis* com anomalia unilateral tipo 3. Figura 400x





**Figura 17:** Parâmero de *Lu. longipalpis* com anomalia unilateral tipo 4.



**Figura 18:** Parâmero de *Lu. longipalpis* com anomalia unilateral tipo 5.



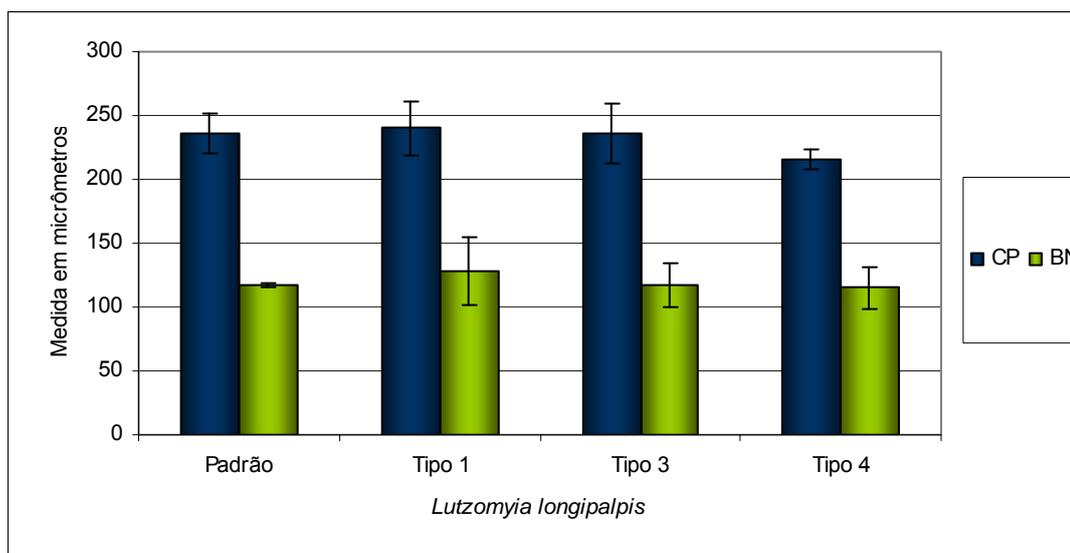
**Figura 19:** Parâmero de *Lu. longipalpis* com anomalia unilateral tipo 6.

A tabela 8 descreve as medidas dos flebotômíneos com anomalias unilaterais.

**Tabela 8:** Medidas, em micrometros, dos machos de *Lu. longipalpis* com anomalias unilaterais coletados no município de Várzea da Palma, MG, no período de abril de 2009 a março de 2010, em comparação com espécimes da localidade tipo (Padrão), Além Paraíba, MG.

Tipo de anomalia	PD	PE	CP		BN		DNA	
			Média	S	Média	S	Média	S
1	10	17	239,9	21,3	127,8	26,2	-	-
2	0	1	251,6*	-	166,6*	-	37,4*	-
3	3	3	236,2	23,3	117,3	9,6	16,9	2,6
4	2	1	216,2	8,0	115,0	23,8	15,9	0
5	0	1	220,8*	-	124,2*	-	17,0*	-
6	1	0	234,6*	-	112,2*	-	30,6*	-
Padrão	-	-	236,3	15,3	117,3	1,96	-	-

\* Valor absoluto. PD = Número de exemplares com anomalia no parâmetro direito, PE = Número de exemplares com anomalia no parâmetro esquerdo, CP = Comprimento do parâmetro, BN = Distância entre a base do parâmetro e os espinhos normais, DNA = Distância entre os espinhos normais e o espinho anômalo, S = Desvio padrão.



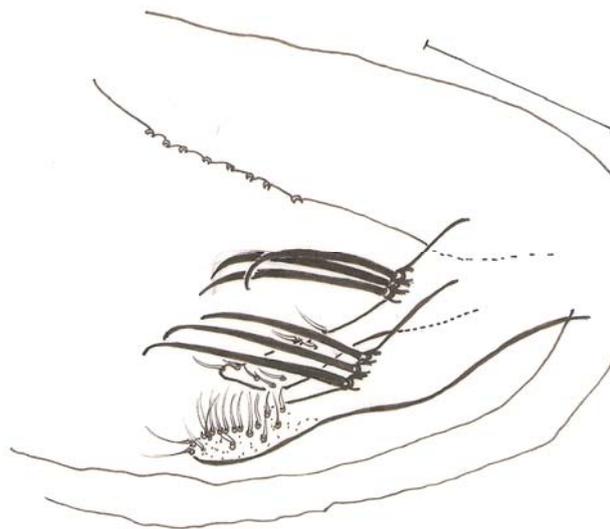
**Figura 20:** Comparação entre o comprimento do parâmetro (CP) e a distância entre a base do parâmetro e os espinhos normais (BN) entre os machos de *Lutzomyia longipalpis* da localidade tipo e os machos com anomalia Tipo 1, 3 e 4 coletados no município de Várzea da Palma, MG.

A figura 20 mostra semelhança entre o comprimento do parâmetro e a distância entre a base do parâmetro e os espinhos normais presentes nos exemplares machos da localidade tipo e os anômalos tipo 1, 3 e 4 coletados no município de Várzea da Palma. Não foi possível comparar as anomalias Tipo 2, 5 e

6 nesta análise, pelo fato de ter sido capturado apenas um exemplar de cada uma delas.

Ao comparar pela análise de variância (ANOVA) os exemplares que apresentavam a anomalia tipo 1, foi possível verificar semelhança em todas as medidas realizadas, com o valor de  $P > 0,005$ . Já o teste t-student permitiu separar as anomalias tipo 3 e 4, mostrando que houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre a distância dos espinhos normais e o espinho anômalo (DNA) presente nestas duas variações morfológicas.

As anomalias bilaterais foram divididas em dois tipos: assimétrica e simétrica. A anomalia tipo 7 apresenta a mesma posição dos espinhos da anomalia tipo 1, porém nos dois parâmeros (Figura 21). Esta anomalia foi considerada bilateral simétrica. A anomalia tipo 8 apresenta no parâmero direito características da anomalia tipo 5 e no parâmero esquerdo a anomalia tipo 3, sendo considerada como anomalia bilateral assimétrica (Figura 22).



**Figura 21:** Parâmero de *Lu. longipalpis* com anomalia bilateral simétrica. Bar = 100 µm.



**Figura 22:** Parâmetro de *Lu. longipalpis* com anomalia bilateral assimétrica. Bar = 100µm.

Os exemplares de *Lu. longipalpis* com a anomalia tipo 2 e 5 foram capturados na Zona 02 e o que apresentava a anomalia tipo 6 foi coletado na Zona 04. As demais anomalias foram encontradas em todas as localidades de estudo. A Zona 05 apresentou a maior frequência de exemplares anômalos (26,8%), seguida da Zona 01 (21,6%) e da Zona 02 (19,5%). A anomalia tipo 7 foi encontrada em um exemplar de *Lu. longipalpis* coletado na Zona 01 e a anomalia tipo 8 em um exemplar da Zona 05.

#### 5.4 Estudo da infecção natural em fêmeas de flebotomíneos

As 106 fêmeas capturadas nas coletas não sistematizadas foram dissecadas para verificar a presença de infecção natural por *Leishmania*. Foram analisadas sob microscópio óptico 105 (99,1%) fêmeas de *Lu. longipalpis* e uma (0,9%) de *Ev. lenti*. Utilizando este método, não foi encontrada nenhuma forma flagelada.

Devido ao grande número de flebotomíneos capturados nas coletas sistematizadas escolheu-se, de maneira aleatória, analisar no estudo da infecção

natural apenas as fêmeas não alimentadas coletadas nos meses pares e nas coletas sistematizadas.

Das 7.074 fêmeas capturadas nas coletas sistematizadas 3.957 (55,9%), referentes às coletas dos meses ímpares do período de estudo (maio, julho, setembro e novembro de 2009 e janeiro e março de 2010) foram preparadas e montadas.

As 2.892 (40,9%) fêmeas não alimentadas, coletadas nos meses pares (abril, junho, agosto, outubro e dezembro de 2009 e fevereiro de 2010) foram submetidas à pesquisa de DNA de *Leishmania* utilizando a *Nested* PCR (LnPCR) dirigida a uma região do gene SSUrRNA. As fêmeas submetidas à análise molecular foram agrupadas em 282 amostras ou “pools” como observado na tabela 09.

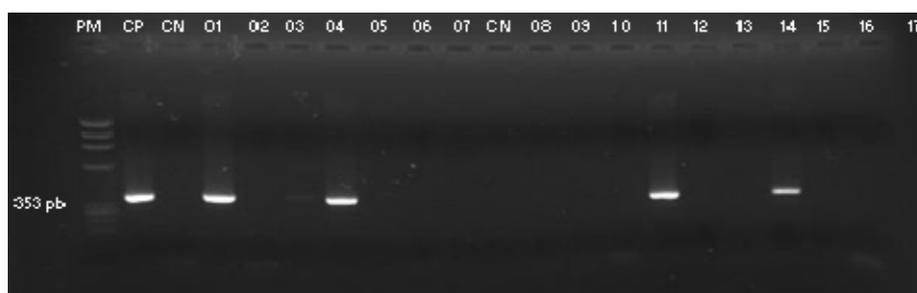
As 225 (3,2%) fêmeas que apresentavam sangue no intestino referente aos meses pares foram montadas e identificadas.

**Tabela 9:** Número de fêmeas de flebotomíneos analisadas, por espécie, de acordo com o número de espécimes presente em cada amostra processada.

Espécies	N° de espécimes por amostra													Total	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	14	17		20
	N° de amostras														
<i>Nyssomyia intermédia</i>	20	5	3	3	5	5	0	1	3	10	2	0	1	108	166
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	19	6	7	2	2	2	5	1	2	7	0	1	0	5	59
<i>Evandromyia sallesi</i>	12	3	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	18
<i>Evandromyia lenti</i>	10	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15
<i>Evandromyia evandroi</i>	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
<i>Nyssomyia neivai</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	5
<i>Evandromyia termitophila</i>	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Brumptomyia avellari</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Nyssomyia whitmani</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Psathyromyia shannoni</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Sciopemyia sordellii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>Total</b>	<b>77</b>	<b>23</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>19</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>114</b>	<b>282</b>

Considerando os resultados obtidos na dosagem de DNA realizada pelo espectrofotômetro podemos afirmar que todas as extrações de DNA foram realizadas com sucesso, uma vez que a média de pureza foi de 1,7 permanecendo todas as amostras no limiar de pureza 260/280 nm de 1,4 a 2,0. Foi obtida uma média 123,2 ng/µl de DNA nas amostras.

A presença do fragmento de 353 pb originado pela LnPCR foi observada a partir da utilização dos iniciadores R3 e R4 em 53 amostras (Figura 23), sendo 31 amostras pertencentes à espécie *Ny. intermedia*, 11 a *Lu. longipalpis*, quatro a *Ev. lenti*, duas a *Ev. sallesi* e uma amostra de cada uma das seguintes espécies: *Ev. evandroi*, *Ev. termitophila*, *Ny. neivai*, *Mi. quinquefer* e *Pa. shannoni*.



**Figura 23:** Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, mostrando produtos amplificados da LnPCR (Primers R3 e R4) de amostras de fêmeas coletados no município de Várzea da Palma, MG. Canaletas: PM - peso molecular ØX174; CP - controle positivo (DNA de *L. (V.) braziliensis*); CN - controle negativo; O1 a O6 - amostras de *Lu. longipalpis*; O7 a O17 - amostras de *Ny. intermedia*.

Para a identificação da espécie de *Leishmania* utilizou-se a técnica do sequenciamento. Em 39 (73,6%) das 53 amostras positivas esta técnica permitiu caracterizar as espécies *Le.chagasi* e *Le.braziliensis* nas fêmeas de flebotomíneos infectadas. Desta maneira, foram encontradas 24 amostras de *Ny. intermedia*, sete de *Lu. longipalpis*, uma de *Ev. sallesi*, uma de *Ev. termitophila*, uma de *Ev. evandroi* e uma de *Ev. lenti* com *Le.chagasi* e duas amostras de *Lu. longipalpis* e uma de *Ev. lenti* infectadas com *Le.braziliensis*.

A taxa mínima de infecção flebotomínica para o município de Várzea da Palma, durante o período de estudo, foi de 1,8%. A maior parte das infecções naturais encontradas foi por *Le.chagasi*. Para *Lu. longipalpis*, a principal vetora desta espécie, a taxa de positividade foi de 2,1% (7/327). A infecção por *Le.chagasi* também foi encontrada em espécies de flebotomíneos que não são consideradas vetoradas da mesma: *Ev. evandroi* apresentou 10,0% (1/10) de positividade, *Ev. lenti* 5,0% (1/20), *Ev. sallesi* 2,8% (1/36), *Ev. termitophila* 16,7% (1/6) e *Ny. intermedia* 1,0% (24/2442).

Para a infecção natural por *Le.braziliensis* as taxas de positividade foram as seguintes: *Ev. lenti* 5,0% (1/20) e *Lu. longipalpis* 0,6% (2/327). As espécies *Ny. neivai*, *Pa. shannoni* e *Mi. quinquefer* apresentaram positividade para *Leishmania* sp. A tabela 10 apresenta estes resultados em detalhes.

Não foi possível identificar a espécie de *Leishmania* presente em 15 (28,3%) amostras. Provavelmente, a pequena quantidade de DNA, e conseqüentemente a pequena quantidade de produto amplificado obtido, pode ter inviabilizado a técnica de sequenciamento, ou as espécies presentes em tais flebotomíneos não puderam ser identificadas pela técnica empregada.

**Tabela 10:** Resultado da infecção natural de fêmeas de flebotomíneos coletadas nos meses pares do período de abril de 2009 a março de 2010, no município de Várzea da Palma, MG.

Espécies	Total de fêmeas coletadas	Nº de amostras positivas	Nº de amostra(s) com <i>Le. chagasi</i>	Nº de amostra(s) com <i>Le. braziliensis</i>	Nº de amostra(s) com <i>Leishmania</i> sp.
<i>Nyssomyia intermedia</i>	2442	31	24 <sup>1,2,3,4,5</sup>	0	7 <sup>2,3,5</sup>
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	327	11	7 <sup>1,2,3,4</sup>	2 <sup>2,3</sup>	2 <sup>2,3</sup>
<i>Evandromyia sallesi</i>	36	2	1 <sup>5</sup>	0	1 <sup>2,4</sup>
<i>Evandromyia lenti</i>	20	4	1 <sup>2</sup>	1 <sup>4</sup>	2 <sup>4,5</sup>
<i>Evandromyia evandroi</i>	10	1	1 <sup>2</sup>	0	0
<i>Nyssomyia neivai</i>	44	1	0	0	1 <sup>5</sup>
<i>Evandromyia termitophila</i>	6	1	1 <sup>2</sup>	0	0
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	3	1	0	0	1 <sup>2</sup>
<i>Psathyromyia shannoni</i>	1	1	0	0	1 <sup>2</sup>
<b>Total</b>	<b>2889</b>	<b>53</b>	<b>35</b>	<b>3</b>	<b>15</b>

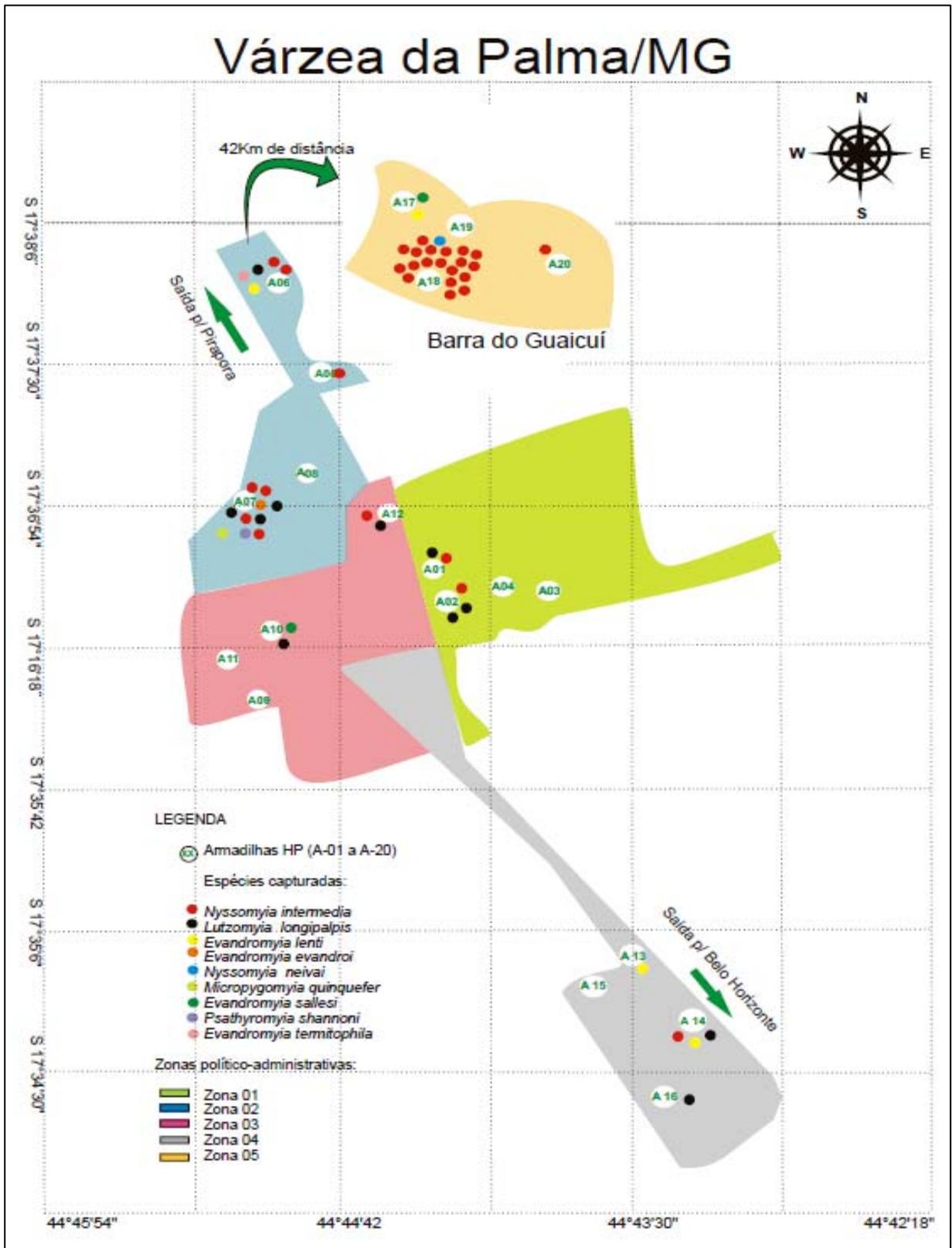
Os números sobrescritos referem-se às localidades onde a espécie foi capturada.

A figura 24 apresenta a distribuição das espécies de flebotomíneos encontradas infectadas por *Leishmania* segundo a localidade de estudo.

Nas cinco zonas político-administrativas que constituem o município de Várzea da Palma foram encontrados flebotomíneos infectados por *Leishmania*. A Zona 05 foi a que apresentou o maior número de amostras positivas e a Zona 02 foi a que apresentou a maior diversidade de espécies de flebotomíneos positivas.

Em todas as localidades de estudo, tanto em amostras contendo um espécime quanto em “pools” com vinte espécimes, foram encontradas amostras de *Ny. intermedia* positivas para *Leishmania*. A Zona 05 foi responsável por 54,2% (13/24) das amostras de *Ny. intermedia* positivas para *Le.chagasi*.

Amostras positivas contendo exemplares de *Lu. longipalpis* só não foram encontradas na Zona 05. Um exemplar de *Ny. neivai* foi encontrado infectado na Zona 05 e amostras positivas referente a espécie *Ev. lenti* foram encontradas nas Zonas 02, 04 e 05. A espécie *Ev. sallesi* foi encontrada infectada nas Zonas 02 e 05. As demais amostras positivas das espécies *Ev. evandroi*, *Ev. termitophila*, *Mi. quinquefer* e *Pa. shannoni* estavam presentes apenas na Zona 02.



**Figura 24:** Distribuição das espécies de flebotomíneos naturalmente infectadas, por ponto de coleta, no município de Várzea da Palma, Minas Gerais.

#### 5.4.1 Casos humanos x espécies de flebotomíneos encontradas naturalmente infectadas

##### 5.4.1.1 LV x fêmeas de flebotomíneos naturalmente infectadas por *Le. chagasi*

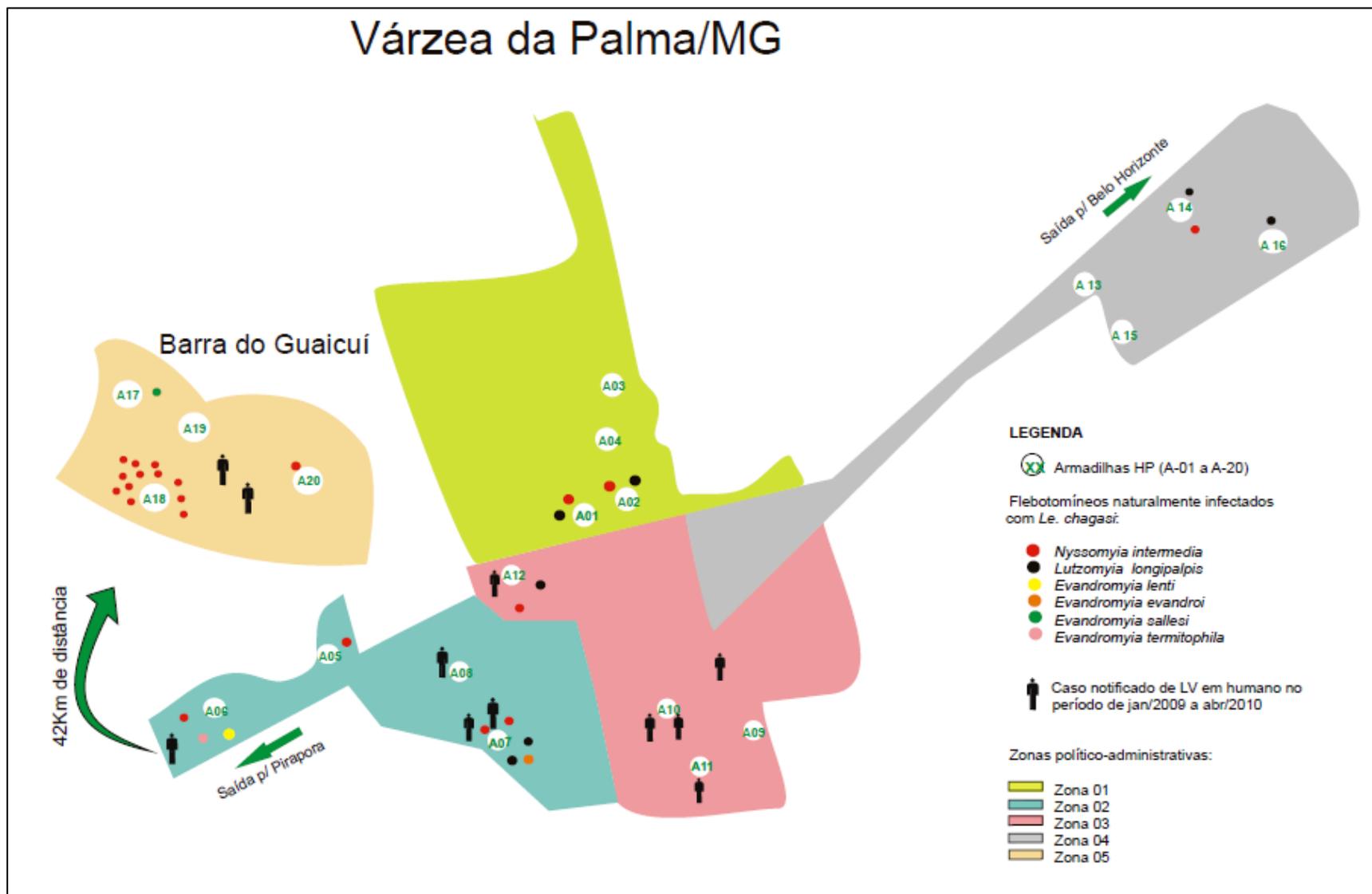
A figura 25 mostra a distribuição de casos humanos de LV e flebotomíneos encontrados naturalmente infectados por *Le. chagasi* durante o período de estudo. Nos anos de 2009 e 2010 foram notificados 11 casos humanos de LV no município de Várzea da Palma sendo cinco (46%) na Zona 03, quatro (36%) na Zona 02 e dois casos (18%) na Zona 05.

Na Zona 03 foi possível verificar durante o período de estudo, uma alta densidade populacional de *Lu. longipalpis* (88%) (Figura 6). Esta espécie, juntamente com uma fêmea de *Ny. intermedia*, foi encontrada naturalmente infectada por *Le.chagasi* nesta localidade.

A Zona 02 apresentou alta densidade de *Ny. intermedia* (59%) e *Lu. longipalpis* (37%). Além destas espécies foram encontradas fêmeas de *Ev. evandroi*, *Ev. lenti* e *Ev. termitophila* por *Le.chagasi*.

A Zona 05 mostrou alta densidade de *Ny. intermedia* (68%) seguida por *Lu. longipalpis* (20%), e apenas fêmeas de *Ny. intermedia* (13/24) foram encontradas infectadas nesta área.

Apesar de não ter notificação de humanos com LV nas Zonas 01 e 04 nos anos de 2009 e 2010, foram encontradas fêmeas de *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia* infectadas por *Le.chagasi*.



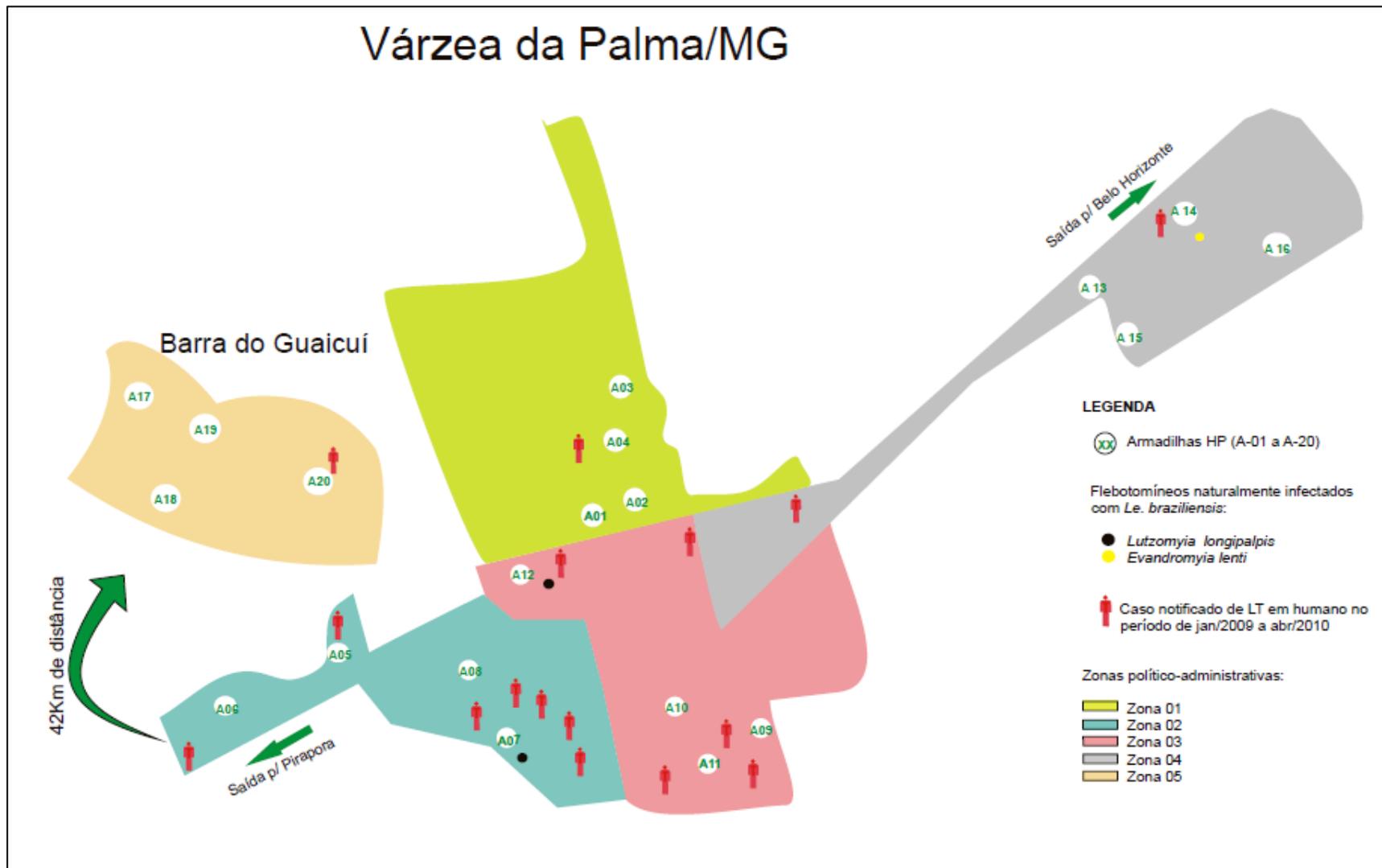
**Figura 25:** Casos humanos de LV notificados no período de janeiro de 2009 a abril de 2010 no município de Várzea da Palma, MG, e fêmeas de flebotomíneos encontradas naturalmente infectadas com *Le.chagasi* no período de abril de 2009 a março de 2010, segundo localidade de estudo.

5.4.1.2 LT x fêmeas de flebotomíneos naturalmente infectadas por *Le. braziliensis*

Em todas as localidades de estudo foram registrados casos de leishmaniose tegumentar nos anos de 2009 e 2010. Durante este período foram notificados 16 casos de LT sendo a Zona 02 a que apresentou o maior número de casos (44%), seguida pela Zona 03 (31%). *Ny. intermedia* foi a espécie que apresentou maior densidade populacional na Zona 02 e *Lu. longipalpis* na Zona 03 (Figura 6). Apesar dos casos notificados e da presença de *Ny. intermedia*, em cada uma dessas localidades foi encontrada apenas uma fêmea da espécie *Lu. longipalpis* infectada por *Le.braziliensis*.

As Zonas 01, 04 e 05 tiveram um caso de LT cada e apenas na Zona 04 foi encontrada uma fêmea de *Ev. lenti* infectada por *Le.braziliensis* (Figura 26).

Vale ressaltar que em 15 amostras de flebotomíneos positivas para *Leishmania* não foi possível a identificação da espécie do parasito.

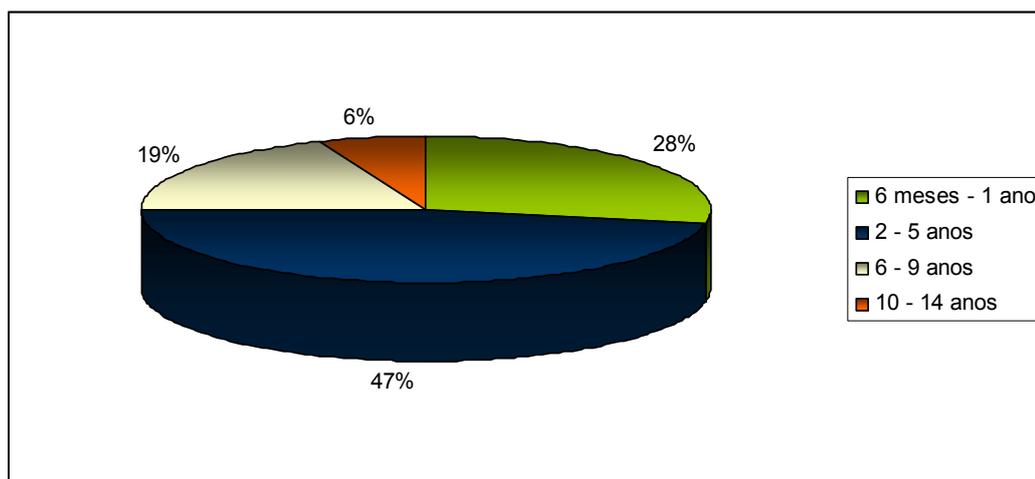


**Figura 26:** Casos de humanos com LT notificados no período de janeiro de 2009 a abril de 2010 no município de Várzea da Palma, MG, e fêmeas de flebotomíneos encontradas naturalmente infectadas com *Le. braziliensis* no período de abril de 2009 a março de 2010, segundo localidade de estudo.

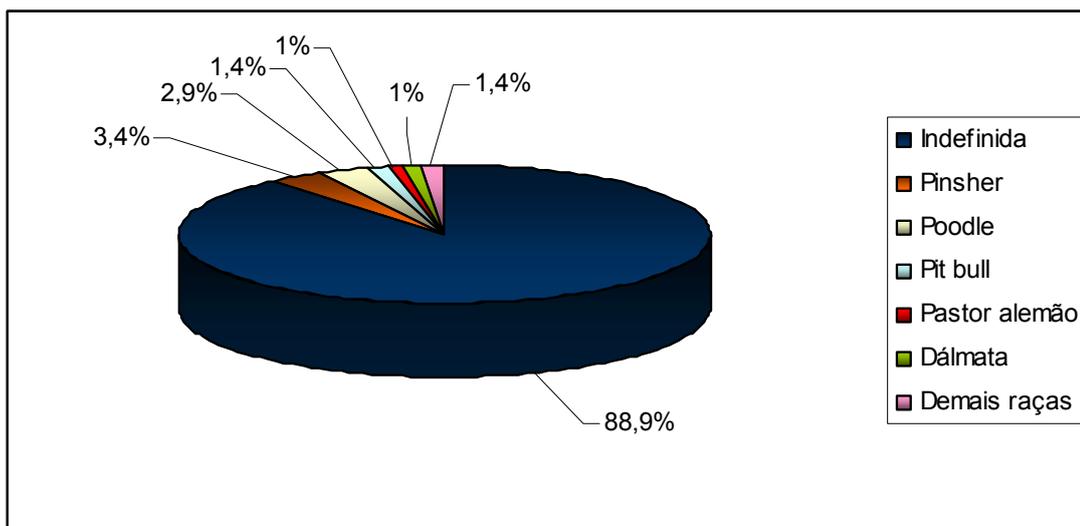
## 5.5 Estudo da infecção canina

### 5.5.1 Avaliação clínica e caracterização dos cães estudados

Durante a coleta de sangue dos 207 cães amostrados foi realizado o exame clínico dos animais, pelo veterinário da Secretaria Municipal de Saúde do município de Várzea da Palma, MG e preenchida a ficha clínico-epidemiológica. Um total de 116 cães machos (56%) e 91 fêmeas (44%) com idade variando entre seis meses e 15 anos (Figura 27) foi avaliado. A maioria dos animais (184 cães) era sem raça definida, e 23 distribuídos entre as raças pinsher (sete), poodle (seis), pit bull (três), pastor alemão (dois), dálmata (dois), akita (um), rotweiler (um) e labrador (um) (Figura 28).



**Figura 27:** Distribuição por faixa etária dos cães amostrados no município de Várzea da Palma, MG, no ano de 2010.



**Figura 28:** Distribuição por raça dos cães amostrados no município de Várzea da Palma, MG, no ano de 2010.

Os animais foram examinados para verificação da presença de sinais clínicos e observou-se que 150 (72%) cães não apresentavam sinais sugestivos para infecção por *Leishmania*, enquanto 57 (28%) apresentavam pelo menos um sinal sugestivo. Os sinais mais frequentemente observados nestes animais foram: úlceras ou lesões de pele (64,9%), onicogrifose (42,1%), alopecia (40,4%), emaciação (35%) e linfadenomegalia (12,3%). Em 34 animais estavam presentes um ou mais destes sinais, em um cão foi possível verificar a presença, em conjunto, de úlcera ou lesão de pele e esplenomegalia e em outro animal além destes sinais havia a presença de onicogrifose, alopecia, hepatomegalia e ceratoconjuntivite (Tabela 11).

**Tabela 11:** Caracterização dos cães sintomáticos do município de Várzea da Palma, MG, amostrados no ano de 2010, segundo sinais da doença, sexo, idade e raça.

Cão	Sinais da doença	Sexo	Idade	Raça
1	úlceras ou lesão na pele e esplenomegalia	M	12 anos	Indefinida
3	úlceras ou Lesão de pele	M	8 anos	Indefinida
5	úlceras ou lesão de pele	F	7 anos	Indefinida
12	úlceras ou lesão de pele e alopecia	M	1 ano e 6 meses	Indefinida
13	úlceras ou Lesão de pele	F	6 anos	Indefinida
14	úlceras ou lesão de pele, linfadenomegalia e alopecia	M	15 anos	Indefinida
15	Emaciação, úlceras ou lesão de pele	M	3 anos	Indefinida
30	emaciação e onicogribose	M	1 ano	Indefinida
41	Onicogribose	M	7 meses	Indefinida
42	úlceras ou lesão de pele, alopecia	M	1 ano	Indefinida
47	Onicogribose	F	1 ano	Indefinida
51	úlceras ou lesão de pele, onicogribose, alopecia	F	1 ano	Indefinida
52	emaciação e onicogribose	F	6 anos	Indefinida
58	Linfadenomegalia	F	1 ano	Indefinida
63	úlceras ou lesão de pele	M	10 anos	Indefinida
65	úlceras ou lesão de pele, onicogribose e alopecia	M	4 anos	Indefinida
75	úlceras ou lesão de pele	M	5 anos	Indefinida
76	úlceras ou lesão de pele	F	6 anos	Indefinida
87	úlceras ou lesão de pele	M	5 anos	Indefinida
96	emaciação, onicogribose e alopecia	F	2 anos	Indefinida
99	Alopecia	M	4 anos	Indefinida
113	úlceras ou lesão de pele	M	1 ano e 6 meses	Indefinida
114	emaciação, onicogribose e alopecia	M	1 ano	Indefinida
115	úlceras ou lesão de pele	M	1 ano	Indefinida
116	emaciação, onicogribose e alopecia	M	12 anos	Indefinida

**Tabela 11:** Caracterização dos cães sintomáticos do município de Várzea da Palma, MG, amostrados no ano de 2010, segundo sinais da doença, sexo, idade e raça.

continuação

<b>Cão</b>	<b>Sinais da doença</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Raça</b>
121	Emaciação	F	1 ano	Indefinida
122	úlceras ou lesão de pele e alopecia	M	2 anos	Indefinida
133	úlceras ou lesão de pele, onicogribose, alopecia, hepatomegalia, esplenomegalia e ceratoconjuntivite	M	5 anos	Indefinida
139	emaciação e alopecia	F	7 anos	Rotweiler
141	úlceras ou lesão de pele e emaciação	F	5 anos	Dálmata
144	úlceras ou lesão de pele	M	12 anos	Indefinida
146	úlceras ou lesão de pele, emaciação, onicogribose, alopecia, linfadenomegalia	M	2 anos	Indefinida
152	úlceras, ou lesão na pele, emaciação, linfadenomegalia	M	8 anos	Indefinida
157	emaciação e onicogribose	M	1 ano	Indefinida
160	úlceras ou lesão de pele, onicogribose, alopecia	M	6 anos	Indefinida
162	úlceras ou lesão de pele	M	6 anos	Indefinida
163	úlceras ou lesão de pele	M	5 anos	Indefinida
168	úlceras ou lesão de pele	M	4 anos	Indefinida
169	úlceras ou lesão de pele e emaciação	M	2 anos	Indefinida
170	úlceras ou lesão de pele	F	3 anos	Indefinida
171	úlceras ou lesão de pele, onicogribose e alopecia	M	3 anos	Indefinida
173	onicogribose e alopecia	M	2 anos	Indefinida
180	úlceras ou lesão na pele e alopecia	F	4 anos	Indefinida
181	úlceras ou lesão na pele	M	4 anos	Indefinida
182	emaciação, onicogribose e alopecia	M	5 anos	Indefinida
185	emaciação e onicogribose	M	1 ano	Indefinida

**Tabela 11:** Caracterização dos cães sintomáticos do município de Várzea da Palma, MG, amostrados no ano de 2010, segundo sinais da doença, sexo, idade e raça.

continuação

Cão	Sinais da doença	Sexo	Idade	Raça
186	úlceras ou lesão de pele, emaciação, onicogribose e alopecia	F	1 ano	Indefinida
188	Linfadenomegalia	M	2 anos	Indefinida
189	úlceras ou lesão de pele e onicogribose	M	3 anos	Indefinida
192	úlceras ou lesão de pele, emaciação e alopecia	F	2 anos	Indefinida
196	úlceras ou lesão de pele	M	5 anos	Indefinida
199	Onicogribose	M	8 anos	Indefinida
201	linfadenomegalia, onicogribose e alopecia	F	7 anos	Pinsher
203	emaciação, onicogribose e alopecia	F	6 anos	Pinsher
204	emaciação e alopecia	M	1 ano	Indefinida
205	úlceras ou lesão de pele, onicogribose, linfadenomegalia	F	8 meses	Indefinida
206	emaciação e onicogribose	F	9 anos	Akita

### 5.5.2 Detecção da infecção por *Leishmania*

#### 5.5.2.1 Inquérito sorológico

Participaram do inquérito sorológico 207 cães da área de estudo. Estes foram submetidos à coleta de sangue periférico e em seguida foram realizados os testes sorológicos RIFI e ELISA. Do total de 207 cães, 51 (24,6%) foram positivos para leishmaniose no teste da RIFI e 65 (31,4%) no teste de ELISA conforme apresentado na tabela 12. O grupo de 51 cães soropositivos seguiu o padrão da população amostrada apresentando as seguintes características: 30 (58,8%) machos e 21 (41,2%) fêmeas com idade variando entre 6 meses e 14 anos como descrito a seguir: 23 (45,1%) cães com idade de 2 a 5 anos, 16 (31,3%) de 6 meses a 1 ano, oito (16,7) de 6 a 9 anos e quatro (7,8%) com idade entre 10 e 14 anos de vida. Deste total 42 (82,4%) eram de raça indefinida, sendo os demais das raças pit bull (2), poodle (2), dálmata (2), akita (1), labrador (1) e pastor alemão (1).

**Tabela 12:** Resultados dos testes sorológicos realizados em cães do município de Várzea da Palma, MG, no ano de 2010.

RIFI	ELISA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	51	0	51
Negativo	14	142	156
<b>Total</b>	65	142	207

Para o cálculo da soroprevalência no município de Várzea da Palma, MG, levou-se em consideração os animais que apresentaram resultado positivo nos dois testes realizado. Assim a soroprevalência encontrada no período de estudo no município foi de 24,6% (51/207).

#### 5.5.2.2 Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular foi realizado pela *Nested* PCR (LnPCR) dirigida a uma região do gene SSUrRNA de *Leishmania* utilizando-se o sangue total dos 207 cães. Destes animais 39 (18,8%) foram positivos e 168 (81,2%) negativos para a presença de DNA de *Leishmania*. Entre os 39 cães com PCR positivo 30 foram negativos nos testes RIFI e ELISA e portanto não foram eutanasiados.

A análise molecular das amostras biológicas de pele e medula óssea foi realizada nos cães soropositivos nos dois testes RIFI e ELISA, após estes serem submetidos à eutanásia realizada pela Secretaria Municipal de Saúde do município observando as recomendações do Manual de Controle de Leishmaniose do Ministério da Saúde.

Do total de 51 cães soropositivos, oito animais morreram antes do recolhimento para eutanásia e dois proprietários recusaram entregar seus animais. Assim 41 amostras de medula óssea e pele foram submetidas à análise através da

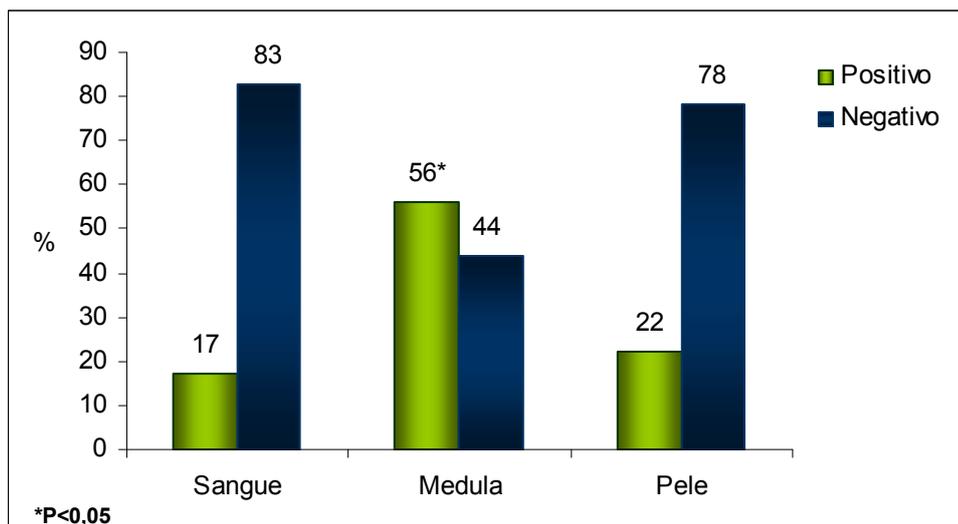
técnica da LnPCR e destas 23 (45,1%) foram positivas, quando se utilizou amostras de medula e 9 (17,6%) quando se utilizou amostras de pele.

Na tabela 13 é possível observar o resultado dos testes moleculares nos diferentes tecidos.

**Tabela 13:** Diagnóstico molecular em amostras biológicas de cães do município de Várzea da Palma, MG, no ano de 2010.

Resultado	LnPCR		
	Sangue	Medula	Pele
Positivo	39 (19%)	23 (56%)	9 (22%)
Negativo	168 (81%)	18 (44%)	32 (78%)
<b>Total</b>	207 (100%)	41 (100%)	41 (100%)

Ao comparar os resultados no grupo de 41 cães sorologicamente positivos de acordo com o tipo de amostra verificou-se diferença significativa ( $P < 0,01$ ). Na comparação múltipla foi possível identificar que a diferença ocorreu quando utilizadas amostras de medula em relação às demais ( $P < 0,01$ ). Este tecido foi considerado mais eficiente na detecção da infecção quando comparado com as amostras de pele e sangue no grupo avaliado (Figura 29).



**Figura 29:** Comparação entre as amostras biológicas utilizadas no diagnóstico molecular de cães do município de Várzea da Palma, MG, no ano de 2010

### 5.5.3 Concordância entre os métodos diagnósticos

Os testes foram analisados dois a dois utilizando-se o índice de concordância *Kappa*. Verificou-se que houve concordância ótima entre os testes RIFI e ELISA e entre RIFI e LnPCR sangue com o valor de  $k = 0,833$  e  $0,830$  respectivamente, sendo esta concordância estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ). A concordância entre ELISA e LnPCR sangue foi considerada boa ( $K = 0,673$ ) (Tabela 14 e 15). A concordância entre os demais métodos foi considerada ruim, fraca ou sofrível segundo os valores de  $K$  e não significativa com valor de  $P > 0,05$ .

Não foi possível comparar os resultados obtidos pela LnPCR utilizando amostras de pele e medula com os testes sorológicos, pois só foram coletadas estas amostras em cães com sorologia positiva (RIFI e ELISA).

**Tabela 14:** Coeficientes de concordância *Kappa* entre os métodos de diagnóstico.

	RIFI	ELISA	LnPCR Sangue	LnPCR Medula	LnPCR Pele
RIFI	-				
ELISA	<b>0,833*</b> (0,750 ; 0,916)	-			
LnPCR Sangue	<b>0,830*</b> (0,739 ; 0,922)	<b>0,673**</b> (0,562 ; 0,784)	-		
LnPCR Medula	-	-	<b>-0,051</b> (-0,324 ; 0,221)	-	
LnPCR Pele	-	-	<b>0,147</b> (-0,040 ; 0,333)	<b>0,361</b> (0,152 ; 0,570)	-

IC 95% \* Ótima concordância (P<0,05) \*\* Boa concordância (P<0,05)

**Tabela 15:** Critérios para a interpretação do índice *Kappa*.

<i>Kappa</i>	Concordância
0	Ruim
0,00 - 0,20	Fraca
0,21 - 0,40	Sofrível
0,41 - 0,60	Regular
0,61 - 0,80	Boa
0,81 - 0,99	Ótima
1	Perfeita

#### 5.5.4 Avaliação dos métodos diagnósticos de acordo com os parâmetros clínicos dos cães.

Do total de cães positivos na RIFI, 31 (61%) foram classificados como assintomáticos e 20 (39%) como sintomáticos, já no teste ELISA do total de 65 cães positivos, a classificação clínica foi de 40 (62%) assintomáticos e 25 (38%) sintomáticos. A tabela 16 apresenta os resultados dos testes sorológicos e molecular, de acordo com o status clínico dos animais.

Ao comparar os resultados dos testes RIFI e ELISA, segundo os grupos clínicos, foi possível observar que a porcentagem de cães positivos para LC foi maior no grupo de cães sintomáticos e em ambos esta diferença foi significativa (P<0,05). Assim os testes sorológicos utilizados neste estudo, foram mais eficientes

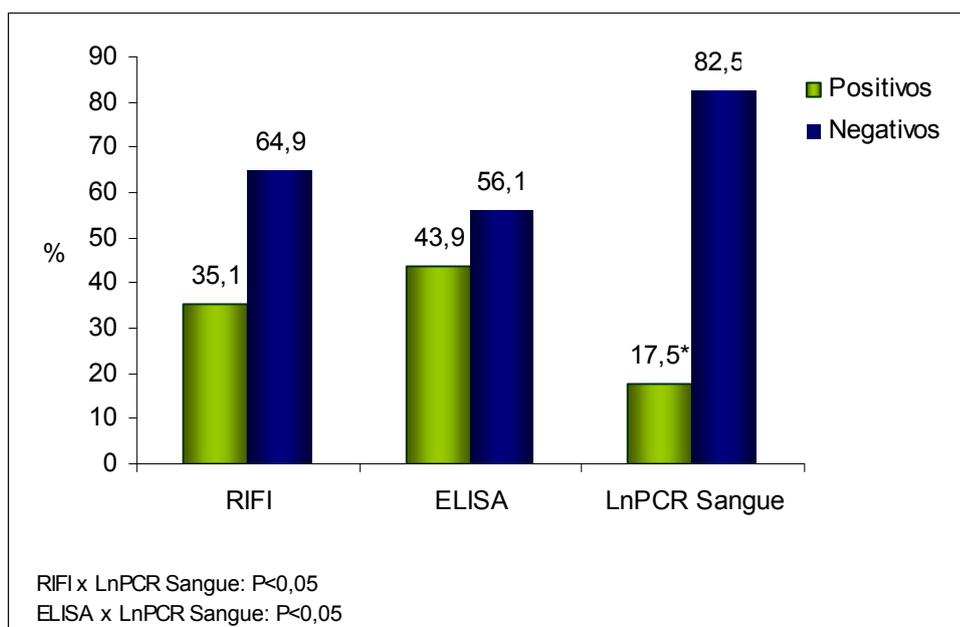
em detectar cães infectados quando estes já apresentavam sinais sugestivos da LVC. O mesmo ocorreu quando se utilizou amostra de pele para o diagnóstico pela LnPCR. As amostras de sangue e medula não apresentaram diferença significativa ( $P>0,05$ ), demonstrando estas serem eficazes tanto no diagnóstico de cães sintomáticos quanto de assintomáticos.

**Tabela 16:** Resultado dos métodos diagnósticos para leishmaniose canina de acordo com a classificação clínica, de cães do município de Várzea da Palma, MG, em 2010

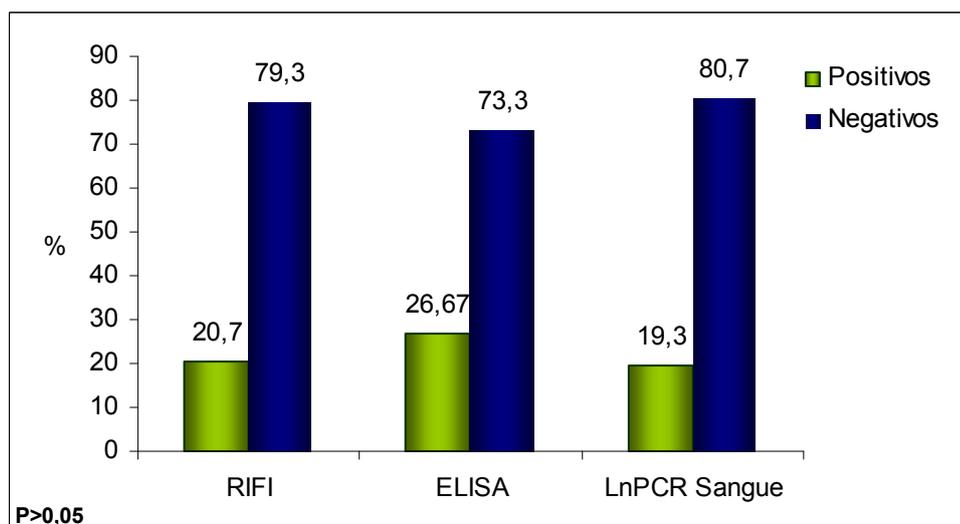
Classificação clínica	Resultado	Método diagnóstico				
		RIFI	ELISA	LnPCR		
				Sangue	Medula	Pele
CA	Positivo	31 21%	40 27%	29 19%	13 52%	2 8%
	Negativo	119 79%	110 73%	121 81%	12 48%	23 92%
Total CA		150	150	150	25	25
CS	Positivo	20 35%	25 44%	10 18%	10 63%	7 44%
	Negativo	37 65%	32 56%	47 82%	6 37%	9 56%
Total CS		57	57	57	16	16
<b>Total</b>		<b>207</b>	<b>207</b>	<b>207</b>	<b>41</b>	<b>41</b>

CA = cães assintomáticos; CS = cães sintomáticos.

Nas análises feitas considerando o grupo de 207 cães, nos quais foram realizados os métodos de RIFI, ELISA e LnPCR sangue, observou-se nos animais sintomáticos diferença significativa entre RIFI e LnPCR de sangue periférico ( $P < 0,05$ ) e entre ELISA e LnPCR de sangue ( $P < 0,05$ ) (Figura 30). Para os animais assintomáticos não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre o índice de positividade dos testes comparados (Figura 31).

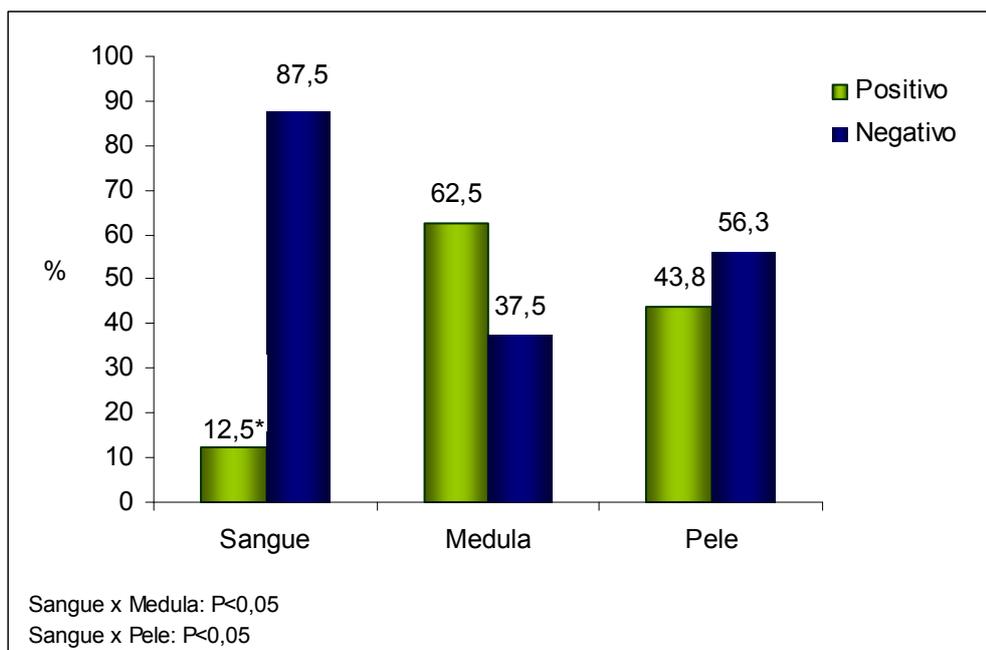


**Figura 30:** Comparação dos resultados obtidos nos testes RIFI, ELISA e LnPCR de sangue periférico em cães sintomáticos do município de Várzea da Palma, MG, no ano de 2010.



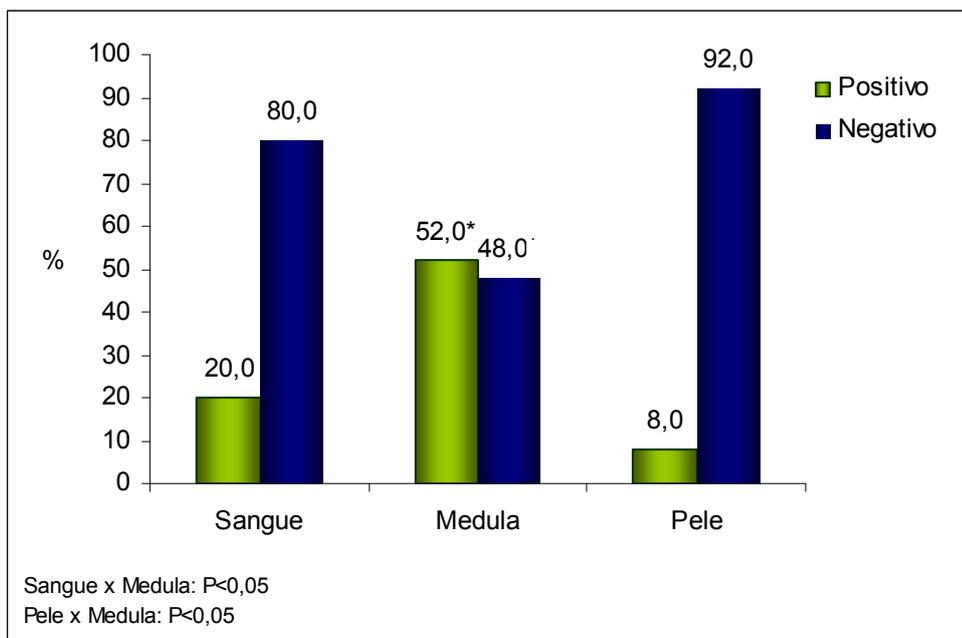
**Figura 31:** Comparação dos resultados obtidos nos testes RIFI, ELISA e LnPCR de sangue periférico em cães assintomáticos do município de Várzea da Palma, MG, no ano de 2010.

Na comparação dos resultados da LnPCR nas amostras de sangue, pele e medula dos animais soropositivos sintomáticos notou-se diferença significativa entre as amostras de sangue e medula e entre as amostras de sangue e pele ( $P < 0,05$ ), evidenciando que a amostra de sangue foi a menos eficiente na detecção de cães sintomáticos. Entre as amostras de medula e pele não houve diferença significativa (Figura 32).



**Figura 32:** Comparação dos resultados obtidos na PCR utilizando amostras clínicas de sangue, pele e medula em cães soropositivos sintomáticos do município de Várzea da Palma, MG, no ano de 2010.

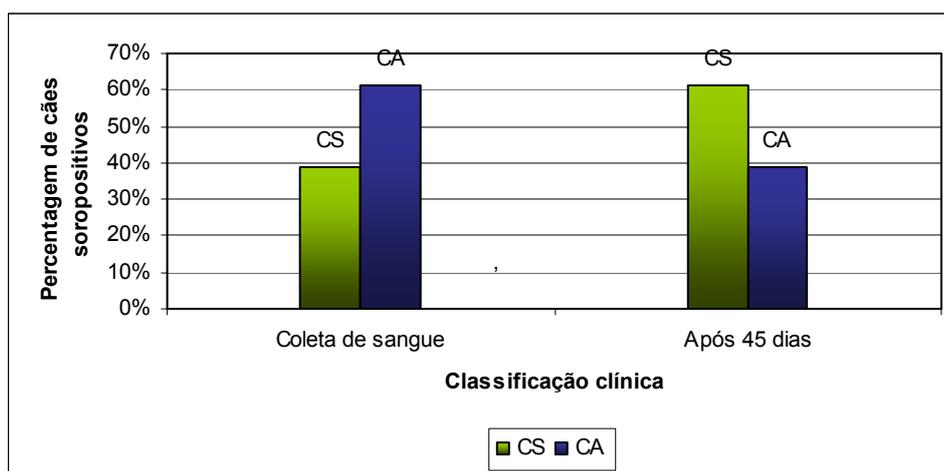
No grupo de cães assintomáticos (dentre os 41 animais soropositivos), observou-se diferença significativa na positividade quando comparadas as amostras de medula e sangue ( $P < 0,05$ ) e as amostras de medula e pele ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre sangue e pele ( $P > 0,05$ ). Neste grupo apenas a amostra de medula foi mais eficaz na detecção da infecção. (Figura 33).



**Figura 33:** Comparação dos resultados obtidos na PCR utilizando amostras clínicas de sangue, pele e medula em cães soropositivos assintomáticos do município de Várzea da Palma, MG, no ano de 2010.

#### 5.5.5 Avaliação clínica dos cães eutanasiados e mudança do perfil clínico

Os 41 cães soropositivos nos testes RIFI e ELISA no momento da coleta de sangue foram classificados em 25 animais assintomáticos e 16 sintomáticos. Após 45 dias da coleta de sangue, no momento do recolhimento para eutanásia, houve uma inversão entre o número de cães assintomáticos e sintomáticos. Este fato se deu pela mudança do perfil clínico de nove animais assintomáticos que passaram a apresentar sinais sugestivos para a LC (Figura 34). A descrição destes animais encontra-se na tabela 17.



**Figura 34:** Classificação do perfil clínico (CS: Cães sintomáticos; CA: Cães assintomáticos) dos cães soropositivos do município de Várzea da Palma, MG, ano 2010, em dois momentos

**Tabela 17:** Características dos animais que alteraram o status clínico, após 45 dias da coleta de sangue, do município de Várzea da Palma, MG, ano 2010.

Cão	Sinais da doença	Sexo	Idade	Raça
22	Onicogrifose e emaciação	M	12 anos	Indefinida
23	Onicogrifose e esplenomegalia	M	8 anos	Indefinida
46	Alopecia e onicogrifose	F	7 anos	Indefinida
84	Alopecia e úlceras ou lesão de pele	M	1 ano e 6 meses	Indefinida
97	Úlceras ou lesão de pele, emaciação e alopecia	F	6 anos	Indefinida
109	Emaciação e onicogrifose	M	15 anos	Indefinida
161	Emaciação, onicogrifose e alopecia	M	3 anos	Indefinida
172	Onicogrifose, alopecia, esplenomegalia e úlceras ou lesão de pele	M	1 ano	Indefinida
175	Onicogrifose	M	7 meses	Indefinida

Antes da eutanásia avaliou-se os sinais clínicos dos animais soropositivos e algumas alterações só foram evidenciadas após a necropsia, sendo elas: esplenomegalia (8/41) (Figura 35), hepatomegalia (2/41) (Figura 36), hepatoesplenomegalia (2/41) e linfadenomegalia (3/41).



**Figura 35:** Cão (número 97) do município de Várzea da Palma, MG, de raça indefinida com seis anos de idade, fêmea, apresentando esplenomegalia.



**Figura 36:** Cão (número 193) do município de Várzea da Palma, MG, de raça indefinida com dois anos de idade, macho, apresentando hepatomegalia.

#### 5.5.6 Isolamento e caracterização de *Leishmania* sp. de amostras provenientes de cães

A cultura foi realizada a partir do material coletado de punção de medula óssea do grupo dos cães sorologicamente positivos (n=41). Deste total, nove amostras (22%) foram positivas por apresentarem nas culturas formas promastigotas de *Leishmania* sendo possível o isolamento de quatro que se encontram depositadas no banco de cepas do Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR).

A caracterização da espécie de *Leishmania* foi realizada pela técnica do sequenciamento. Para as reações foi utilizado o DNA extraído de todas as amostras clínicas positivas na LnPCR (39 amostras de sangue, 23 amostras de medula e 9 de fragmento de pele) e das quatro amostras isoladas na cultura, do grupo dos 41 cães sorologicamente positivos. Foram analisadas 75 amostras sendo possível a identificação de 51 (68%) nos seguintes tecidos: medula óssea 20 (87%), sangue 25 (64%), pele 2 (22%) e cultura 4 (%).

Dos 41 cães avaliados 24 (59%) apresentaram pelo menos uma amostra identificada como *Le.chagasi*. Assim como ocorreu com os flebotomíneos, não foi possível identificar a espécie de *Leishmania* presente em algumas amostras biológicas de cães, provavelmente devido a pequena quantidade de DNA, e conseqüentemente a pequena quantidade de produto amplificado obtido, mesmo após realizar novas reações da LnPCR com estas amostras.

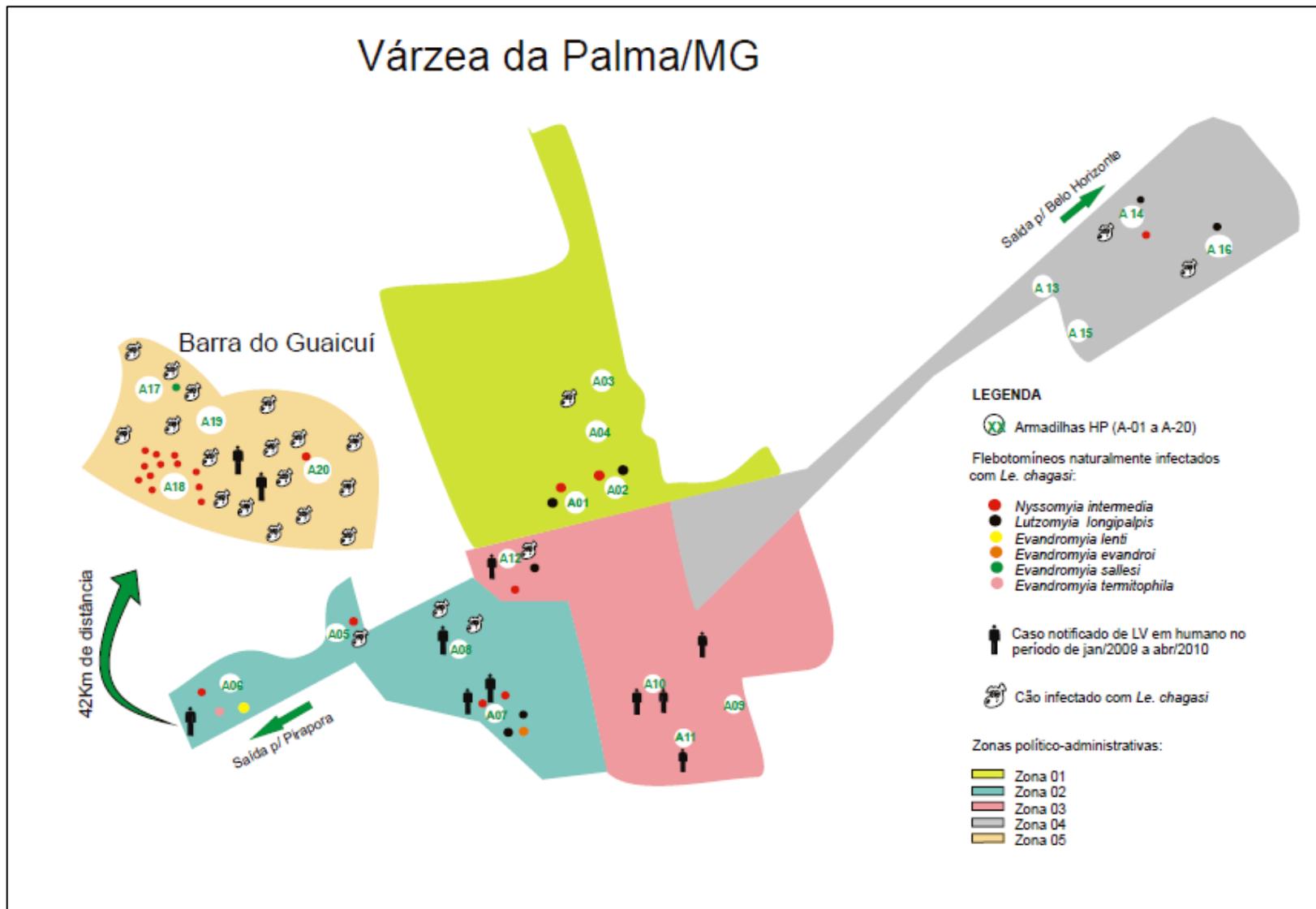
#### 5.5.7 Casos humanos de LV x fêmeas de flebotomíneos naturalmente infectadas com *Le. chagasi* x cães infectados com *Le. chagasi*.

Os 24 cães encontrados infectados por *Le. chagasi* no município de Várzea da Palma, no ano de 2010, estão distribuídos da seguinte maneira: 17 na Zona 05, três na Zona 02, dois na Zona 04 e um nas Zonas 01 e 03.

A Zona 05 apresentou o maior número de casos caninos (71%) juntamente com a maior taxa de infecção de *Ny. intermedia* por *Le. chagasi* (17/24). Além desta espécie *Ev. sallesi* também foi encontrada infectada por *Le. chagasi*. Vale ressaltar ainda a notificação de dois casos humanos de LV nesta localidade.

A Zona 03 apresentou o maior número de casos de LV (5) para os anos de 2009 e 2010 seguida pela Zona 02 com quatro casos notificados. Na primeira localidade citada uma fêmea de *Lu. longipalpis* e uma de *Ny. intermedia* foram encontradas infectadas por *Le. chagasi* e apenas um cão com *Le. chagasi*. Já na Zona 02 além destas espécies outras do gênero *Evandromyia* também foram encontradas infectadas juntamente com a presença de cães infectados por *Le. chagasi*. Também foram encontrados cães infectados com *Le. chagasi* e *Lu.*

*longipalpis* e *Ny. intermedia* nas Zonas 01 e 04, porém não houve notificação de humanos com LV nestas localidades (Figura 37).



**Figura 37:** Casos humanos de LV notificados no período de janeiro de 2009 a abril de 2010 no município de Várzea da Palma, MG, fêmeas de flebotomíneos e cães com *Le.chagasi* durante o período de abril de 2009 a março de 2010, segundo localidade de estudo

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Fauna flebotomínica

A fauna de flebotomíneos encontrada no município de Várzea da Palma mostrou-se diversificada e com predomínio de importantes espécies vetoras, como *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia*, espécie envolvida na veiculação da LV e LT respectivamente (Rangel & Lainson, 2003; Andrade Filho *et al.*, 2007). Além destas espécies merecem atenção *Ev. lenti*, *Ev. sallesi*, *Ny. neivai*, *Ny. whitmani* e *Pa. shannoni* espécies já encontradas infectadas naturalmente, sendo que algumas delas podem estar envolvidas no ciclo silvestre e/ou urbano das leishmanioses (Andrade Filho *et al.*, 2007; Saraiva *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2008; Margonari *et al.*, 2010; Pech-May *et al.*, 2010) ou já foram incriminadas como vetoras em diversas regiões das Américas. O número de machos foi mais numeroso (17.167) que as fêmeas (7.074), sendo o razão macho: fêmea = 2,43: 1.0. Este fato pode estar relacionado ao comportamento e atividades destes insetos, aos hábitos de seus hospedeiros domésticos entre outros fatores que precisam ser melhores elucidados. Outros autores demonstraram resultados semelhantes com a presença predominante de insetos machos nas coletas realizadas com diferentes tipos de armadilhas (Loiola *et al.*, 2007; Dorval *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010).

Nas coletas sistematizadas a espécie que apresentou maior densidade populacional foi *Ny. intermedia*, seguida de *Lu. longipalpis*. Estes resultados contrapõem-se aos encontrados por outros autores em estudos entomológicos realizados no Norte do estado de Minas Gerais, onde *Lu. longipalpis* foi apontada como a espécie predominante (Dias *et al.*, 2007; Monteiro *et al.*, 2005). Entretanto, nas coletas não sistematizadas e nas Zonas 01, 03 e 04 a espécie *Lu. longipalpis* foi prevalente com alta porcentagem de exemplares coletados em comparação com as demais espécies.

É conhecido que existe uma correlação entre a densidade de *Lu. longipalpis* e as condições observadas no peridomicílio e que esta espécie é frequentemente associada a presença de animais domésticos (Foratini, 1960; Sherlock & Guitton, 1969). Esta característica comportamental foi evidenciada neste estudo, uma vez que houve o predomínio desta espécie nas coletas não sistematizadas onde estes

dípteros foram capturados diretamente nos locais onde havia a presença de animais (galinhas). Como observado por Galati *et al.* (2003) e Dorval *et al.* (2009) *Lu. longipalpis* mostrou pouca atração à armadilha de Shannon.

Quanto às localidades onde *Lu. longipalpis* apresentou a maior abundância de espécimes coletados, nos últimos anos estas áreas sofreram intensa urbanização com a população quase sempre vivendo em condições precárias de moradia e saneamento, com a presença constante de animais domésticos. Desde a década de 30, quando o ciclo da LV começou a ser elucidado, diversos autores têm comprovado a adaptabilidade (Lainson & Rangel, 2005) e o papel constante de *Lu. longipalpis* como um elo essencial na cadeia de transmissão. Sua capacidade de alimentar com frequência em animais domésticos e sinantrópicos, bem como a sua antropofilia notável, contam a favor de *Lu. longipalpis* na adaptação aos ambientes modificados, permitindo a manutenção do ciclo de transmissão da LV na zona rural e a disseminação para áreas urbanizadas, conduzindo assim a transmissão com perfis diferenciados. Este avanço gradual das áreas periurbanas para o ambiente silvestre e a observação do evidente processo da urbanização é resultado da competência do vetor em colonizar áreas impactadas, destacando a importância da vigilância entomológica e monitoramento através de medidas qualitativas e quantitativas para avaliação do vetor.

Há uma necessidade de acrescentar novos conhecimentos sobre a biologia de *Lu. longipalpis*, especialmente considerando indicadores entomológicos, como a taxa de infecção, com vistas a medidas de vigilância (Rangel & Vilela, 2008). Foi possível comprovar o padrão de adaptação de *Lu. longipalpis* ao peridomicílio e ao ambiente modificado no município de Várzea da Palma pela presença desta espécie em todas as localidades (Zona 01, 02, 03, 04 e 05) e meses de estudo.

A espécie *Ny. intermedia* foi predominante durante os doze meses de coleta e duas das cinco localidades de estudo (Zonas 02 e 05) foram responsáveis por este maior número de espécimes capturados. *Ny. neivai* foi a segunda espécie mais frequente nas Zonas 02 e 05 e a terceira espécie mais capturada (6%). Este fato pode estar associado com as características destas localidades, onde há presença de mata preservada, ambiente com características rurais e áreas urbanizadas já que foi demonstrado que estas espécies apresentam comportamento similares, sendo

coletadas em áreas preservadas, e também em ambientes antrópicos, além de serem antropofílicas (Andrade Filho *et al.*, 2007) e já terem sido encontradas naturalmente infectadas por tripanosomatídeos (Forattini & Santos, 1952; Forattini *et al.*, 1972; Casanova *et al.*, 1995; Córdoba-Lanus *et al.*, 2006; Saraiva *et al.*, 2009).

Em Minas Gerais a distribuição de *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* segue aquela proposta por Marcondes *et al.* (1998). *Ny. intermedia* ocorre nas regiões do Jequitinhonha, Vale do Rio Doce, Metalúrgica e Zona da Mata, enquanto *Ny. neivai* ocorre nas regiões do Triângulo Mineiro e Sul. Nas regiões do Alto São Francisco e Noroeste as duas espécies são simpátricas. Estes dados corroboram os resultados encontrados no nosso estudo, já que o município de Várzea da Palma está inserido na região do Alto São Francisco. Andrade Filho *et al.* (2007) relatam a presença simpátrica de *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* nos municípios de Pirapora e Lassance, municípios estes limítrofes à cidade de Várzea da Palma onde também foi observado esta situação.

A ocorrência de uma espécie numa comunidade local é determinada parcialmente por suas adaptações às condições e recursos e parcialmente por interações competitivas com outras espécies (Ricklefs, 2003). O processo de seleção de *Ny. intermedia* e *Ny. neivai* foi demonstrado por Andrade Filho *et al.* (2007) e pode explicar o maior número de exemplares capturados de *Ny. intermedia*. Por serem muito próximas filogeneticamente, ambas devem utilizar os mesmos recursos ecológicos, e por competição, ocorre à supremacia de uma delas. Foi demonstrado que em Minas Gerais *Ny. intermedia* é prevalente ou bastante abundante em áreas de transmissão de LT. Gontijo *et al.* (2002) em trabalho realizado em um surto de LT no Vale do Jequitinhonha, descreveram a prevalência de *Ny. intermedia* na região, bem como sua preferência por ambientes com maior grau de modificação antrópica. Saraiva *et al.* (2008) encontrou resultados diferentes com prevalência da espécie *Ny. neivai* no município de Lassance, Minas Gerais. Estes dados demonstram a importância de se estudar a fauna flebotomínica em cada área, pois mesmo em áreas próximas geograficamente e com características ecológicas semelhantes às espécies de flebotomíneos coletadas apresentam um padrão de distribuição singular.

*Ny. intermedia* é considerada uma espécie de grande importância na transmissão de LT no Sudeste do Brasil (Marcondes *et al.*, 1997), e de acordo com a alta densidade populacional encontrada no nosso estudo pode estar participando do ciclo de transmissão da leishmaniose no município de Várzea da Palma.

No município de Várzea da Palma uma pequena porcentagem de *Ny. whitmani* foi capturada, principalmente em áreas onde havia vestígios ou mata primária preservada e onde houve captura de um grande número de exemplares de *Ny. intermedia*. Estes resultados vão de encontro com os dados de Forattini (1960) que sugeriu, para São Paulo, que esta espécie era dependente de mata primária, mas que poderia ser capturada no peridomicílio e até mesmo dentro das casas, em áreas cuja mata ainda estava mais preservada. Outro relato deste autor que se aplica aos nossos achados é a sugestão de coexistência de *Ny. whitmani* e *Ny. intermedia* em áreas recentemente invadidas pelo homem e a predominância da segunda espécie a medida que aumenta as alterações no meio ambiente.

Ao comparar as localidades de estudo do município de Várzea da Palma, observamos que a Zona 02 foi a única que apresentou as quinze espécies capturadas neste trabalho. Este fato se deve a diversidade de ecótopos e aos hábitos ecléticos das espécies capturadas, uma vez que das quatro casas amostradas pertencentes à Zona 02, duas estavam inseridas em ambientes com características rurais e presença de criação de animais domésticos e as demais pertenciam a áreas urbanizadas.

Nas coletas não sistematizadas, utilizando o capturador de Castro, apenas as espécies *Lu. longipalpis* (1.090), *Ny. intermedia* (2) e *Ev. lenti* (1) foram coletadas, o que concorda com autores que afirmam que os diferentes métodos de captura auxiliam na melhor descrição da fauna flebotomínica (Tabela 7).

Foram coletadas em todos os meses de estudo apenas as espécies *Lu. longipalpis*, *Ny. intermedia* e *Ev. sallesi*. Mesmo na época de chuvas mais intensas foram observados picos de ocorrência, ainda que discretos. As espécies coletadas no município de Várzea da Palma, no período de abril de 2009 a março de 2010, apresentaram picos de ocorrência nos meses de setembro e novembro de 2009 e

fevereiro de 2010. *Lu. longipalpis* foi mais freqüente no mês de novembro e *Ny. intermedia* no mês de fevereiro.

Na literatura, os fatores climáticos têm sido relatados por influenciar a população de flebotomíneos, dependendo da região em estudo. Estatisticamente, apenas a temperatura média apresentou correlação significativa com a variação sazonal dos flebotomíneos na cidade de Várzea da Palma, sendo os picos de ocorrência nos meses mais quentes. Apesar dos dados de pluviosidade e umidade relativa do ar não apresentarem influência na flutuação sazonal dos flebotomíneos, ao observar a figura 10, foi verificado um aumento expressivo do número de insetos capturados nos meses mais úmidos e após os períodos chuvosos. Tal resultado é compatível com a literatura, o qual registra uma maior densidade de flebotomíneos no período da seca na Costa Rica (Zeledón *et al.*, 1984) e em diversas localidades do Paraguai e da Argentina nos meses secos e úmidos (Salomón *et al.*, 2003; 2004). Análise sobre as influências do clima nas populações de flebotomíneo em Belo Horizonte não demonstrou uma tendência crescente no número de insetos, logo após os períodos chuvosos (Souza *et al.*, 2004). Em contrapartida, Rebêlo (2001) mostra que houve uma alta freqüência de *Lu. longipalpis* durante todo o ano na Ilha de São Luis, Maranhão, com uma tendência crescente nos períodos chuvosos, em relação aos períodos de seca. No estudo realizado por este autor a temperatura, umidade e precipitação não mostraram nenhuma influência na densidade mensal dos insetos. No entanto, a precipitação afetou a distribuição sazonal de *Lu. longipalpis*.

## 6.2 Infecção natural de flebotomíneos

A taxa de infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos relatada na maioria dos estudos é muito baixa, raramente atingindo 1%. Os métodos de detecção incluem a dissecação no âmbito do microscópio e técnicas de biologia molecular. Estudos recentes têm utilizado a PCR (Pérez *et al.*, 1994; Rodriguez *et al.*, 1999; Jorquera *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2005; Nascimento *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008), sendo esta uma ferramenta mais específica e sensível para a detecção e identificação de *Leishmania* spp. (Schonian *et al.*, 2003, Manna *et al.*, 2004; Galati *et al.*, 2006).

Os flebotomíneos coletados na cidade de Várzea da Palma foram analisados e a sensibilidade da técnica de LnPCR dirigida ao gene SSUrRNA foi confirmada. Neste estudo, a extração de DNA, a amplificação dos produtos da LnPCR e o sequenciamento deste produto amplificado mostraram-se eficazes em revelar a infecção por *Leishmania*, sendo possível identificar a infecção e a espécie de *Leishmania* desde amostra contendo apenas um exemplar de flebotomíneo até aquelas que continham vinte espécimes. Além deste fato, os controles negativo e positivo funcionaram em todas as reações. Este é o primeiro relato do emprego destas duas técnicas para identificação e caracterização de *Leishmania* em flebotomíneos naturalmente infectados.

Espécies capturadas entre abril de 2009 e março de 2010 foram encontradas infectadas por *Le. braziliensis* e *Le. chagasi*, exibindo uma taxa mínima de infecção de 1,8%. Nossos resultados concordam com os descritos por Silva *et al.* (2008), que apresentou uma taxa de infecção de 1,9% e Pita-Pereira *et al.* (2005) que demonstrou uma taxa de 2,0% em estudos realizados no Rio de Janeiro. As taxas de infecção encontradas aqui condizem também com observações anteriores, onde a infecção natural por *Leishmania* variou entre 0,2 e 2,0%, mesmo em áreas de alta transmissão (Rodriguez *et al.*, 1999; Miranda *et al.*, 2002; Gontijo *et al.*, 2005). Não foi encontrada nenhuma forma flagelada utilizando a dissecação como método de verificação da infecção natural das fêmeas capturadas nas coletas não sistematizadas.

A correta identificação das espécies de *Leishmania* em uma área endêmica é fundamental para obter uma compreensão da epidemiologia da doença e para que o apoio adequado possa ser fornecido quanto as medidas de prevenção e controle desta protozoose (Michalsky *et al.*, 2002). No presente estudo, relatamos a taxa de infecção por *Leishmania* sp. de 3,4% (11/327) para *Lu. longipalpis*, 1,3% (31/2.442) para *Ny. intermedia*, 2,3% (1/44) para *Ny. neivai*, 5,6% (2/36) para *Ev. sallesi*. Além destas espécies foram encontradas infectadas *Ev. evandroi* (1/10), *Ev. lenti* (4/20), *Ev. termitophila* (1/6), *Mi. quinquefer* (1/3) e *Pa. shannoni* (1/1).

A espécie *Lu. longipalpis* foi encontrada naturalmente infectada por *Le. chagasi* (7/327) nas Zonas 01, 02, 03 e 04 e por *Le. braziliensis* (2/327) nas Zonas 02 e 03. Em estudos realizados no estado do Mato Grosso, assim como no

município de Várzea da Palma, *Lu. longipalpis* foi encontrada naturalmente infectada por *Le. braziliensis* (Savani *et al.*, 2009; Paiva *et al.*, 2010).

O achado de infecção natural de *Ny. intermedia* exclusivamente por *Le. chagasi* (24/2442) torna-se bastante importante uma vez que no município de Várzea da Palma, nos últimos três anos houve uma diminuição na incidência de casos de LT e um aumento considerável de casos de LV. Outro fator relevante é a presença de fêmeas de *Ny. intermedia* infectadas, além das outras quatro localidades, na Zona 05 onde esta espécie foi prevalente e não houve registro do principal vetor de LV no Brasil, *Lu. longipalpis*, infectado. Assim baseado no alto grau de antropofilia de *Ny. intermedia* relatado por diversos autores, no registro de casos autóctones de LV e na abundância e distribuição espacial desta espécie coincidente com a área de ocorrência da doença, podemos afirmar a necessidade de estudos específicos para melhor compreender sua participação no ciclo de transmissão da LV no município de Várzea da Palma, seja como vetor primário no distrito de Barra do Guaiçuí (Zona 05) ou secundário nas demais localidades.

Especulações foram feitas sobre o possível papel de uma variedade de outras espécies de flebotomíneos na transmissão de *Le. chagasi*, Oliveira *et al.* (1959) na ausência de *Lu. longipalpis* em uma aldeia em Minas Gerais onde havia uma alta incidência de LV, suspeitou, principalmente de *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani*. Coelho *et al.* (1965) também não foram capazes de capturar *Lu. longipalpis* em um foco da doença em Goiás, onde os flebotomíneos mais freqüentes foram *Ny. intermedia*, *Ny. whitmani*, *Pa. shannoni* e *Psychodopygus davisii*. Entre outras possíveis "alternativas" de vetores para *Le. chagasi* Lainson e Rangel (2005), sugerem a inclusão de *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani*. *Ny. intermedia*, vetor de *Le. braziliensis* no sudeste do Brasil, compartilha de um habitat similar à de *Lu. longipalpis*, e é altamente antropofílico, alimenta-se de cães, além disso, tem sido experimentalmente infectados com *Le. chagasi* (Chagas, 1940; Paraense & Chagas, 1940) e recentemente foi encontrado naturalmente infectado por esta espécie de *Leishmania* na cidade de Belo Horizonte, MG (Saraiva *et al.*, 2010).

No Rio de Janeiro, *Ny. intermedia* é freqüente, sendo a espécie predominante em diversas áreas (Rangel *et al.*, 1990; Brazil *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 1995). No município de Várzea da Palma esta espécie foi encontrada infectada

em todas as localidades de estudo, inclusive as mais urbanizadas, sendo mais frequente em áreas que apresentavam mata preservada. Aguiar *et al.* (1987) encontrou um grande número de espécimes de *Ny. intermedia* em Itaguaí, sendo mais frequentemente capturados picando humanos. No Vale do Ribeira, uma área endêmica para LT, *Ny. intermedia* parece estar adaptado às alterações ambientais, sendo considerado o vetor da doença (Gomes *et al.*, 1980). Esta espécie ainda prevalece na floresta residual, na borda da floresta e em campo aberto (Gomes & Galati, 1987). Estes dados demonstram a capacidade de adaptação deste díptero aos diferentes ambientes e sugerem a preferência por áreas que ainda mantêm características silvestres.

Apesar de não ter verificado infecção em *Ny. intermedia* por *Le. braziliensis* neste estudo, não podemos desconsiderar o papel desta espécie como vetora da LT, já que em Minas Gerais ela é prevalente ou bastante abundante em áreas de transmissão (Andrade Filho *et al.*, 2007). Gontijo *et al.* (2002) em trabalho realizado em um surto de LT no Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais, descreveram a prevalência de *Ny. intermedia* na região, bem como sua preferência por ambientes com maior grau de modificação antrópica. Um resultado semelhante foi relatado em Alto Caparaó e Caparaó, onde esta espécie também foi implicada como o vetor de probabilidade (Saraiva *et al.*, 2006).

Além de *Lu. longipalpis*, *Ev. lenti* foi encontrada infectada tanto por *Le. chagasi* (1/20) quanto por *Le. braziliensis* (1/20), nas Zonas 02 e 04, respectivamente. Em Campo Grande, esta espécie estava intimamente associado com peridomicílio (Oliveira *et al.*, 2003) e com abrigos domésticos em zonas rurais de Mato Grosso do Sul (Galati *et al.*, 1996). A associação significativa entre este flebotomíneo e casos de LT no estado de Goiás foi encontrada (Martins *et al.*, 2002). Em trabalho realizado no Vale do Rio Doce, Mayrink *et al.* (1979) disseparam 50 fêmeas de *Ev. lenti*, sendo que em nenhuma delas foram encontrados flagelados, entretanto, Sherlock & Miranda (1992) relataram o encontro de infecção natural desta espécie por promastigotas. Recentemente foi registrada a ocorrência de *Ev. lenti*, capturada no peridomicílio infectada por *Le. braziliensis* em Campo Grande (Paiva *et al.*, 2010) e no Parque do Gafanhoto, cidade de Divinópolis (Margonari *et al.*, 2010). No presente trabalho relatamos pela primeira vez a infecção da espécie *Ev. lenti* por *Le. chagasi*.

As espécies *Ev. sallesi*, *Ev. termitophila* e *Ev. evandroi* foram encontradas naturalmente infectadas por *Le. chagasi*. O primeiro relato de infecção natural de *Ev. sallesi* com *Leishmania*, embora Mayrink *et al.* (1979) tenham observado infecções por tripanosomatídeos em amostras do leste de Minas Gerais, foi realizado por Saraiva *et al.* (2009). Apesar desta espécie ser comum em Minas Gerais (Carvalho *et al.*, 2009), não há registros da mesma picar o homem. No entanto, ela pode estar envolvida em um ciclo silvestre ou rural da transmissão entre outros hospedeiros vertebrados. O complexo *cortelezzii*, a qual *Ev. sallesi* faz parte, apresenta espécies com grande potencial como vetores em Minas Gerais, portanto, este encontro deve ser visto com atenção (Carvalho *et al.*, 2008; Saraiva *et al.*, 2010).

*Ev. termitophila* foi descrita em 1964, em Minas Gerais, quando teve sua ocorrência associada a ninhos de térmitas (Martins *et al.*, 1977). Esta espécie já foi registrada no município de Belo Horizonte, e é freqüentemente citada em levantamentos entomológicos no Estado de Minas Gerais (Loiola *et al.*, 2007), além de ter sido encontrada infectada por *Le. chagasi* (Saraiva *et al.*, 2010) nesta mesma localidade. Não há relatos de que a mesma possua importância epidemiológica no ciclo das leishmanioses.

*Ev. evandroi* está distribuída nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco, Maranhão, Minas Gerais, Goiás, Paraná e Alagoas (Martins *et al.*, 1978; Brazil & Ryan, 1984; Queiroz *et al.*, 1991, Young & Duncan, 1994). Brazil & Ryan (1984) relataram o encontro de gregarina *Ascocystis chagasi*, um nematódeo e um tripanosoma não identificado nesta espécie da Ilha de São Luis no Maranhão. Estudo realizado em Jacobina, Bahia, indicou que *Ev. evandroi* poderia estar envolvido na transmissão de *Le. chagasi* para cães (Sherlock, 1996). No Rio Grande do Norte, *Ev. evandroi* está amplamente distribuída e presente em áreas de LV e mucocutânea, no peri e intradomicílio. Este flebotomíneo apresenta a mesma distribuição geográfica de *Lu. longipalpis* e é a segunda espécie mais abundante neste estado, representando 11% de toda a fauna capturada (Ximenes *et al.*, 2000). Fêmeas de *Ev. evandroi* possivelmente alimentam-se em diferentes animais e escolhem os locais mais fechados para abrigo e descanso após a cópula e / ou alimentação (Ximenes *et al.*, 1999). Este é o primeiro relato de *Ev. evandroi* naturalmente infectado por *Le. chagasi*.

*Ny. whitmani* vetor confirmado de *Le. braziliensis* na região nordeste do Brasil (Loiola *et al.*, 2007; Rangel & Lainson 2003), é suspeito de estar envolvido na veiculação de LV em Minas Gerais e Goiás e não foi encontrado infectado neste estudo. Baseado nas evidências epidemiológicas, nos achados de infecção natural e no fato desta espécie ser altamente antropofílico não podemos desconsiderar o encontro de *Ny. whitmani* em três das localidades estudadas.

*Mi. quinquefer* foi encontrada naturalmente infectada por *Leishmania* sp., fato já relatado por Paiva *et al.* (2010) em estudo realizado no estado do Mato Grosso do Sul, onde esta espécie foi encontrada naturalmente infectada por *Le. braziliensis*. Entretanto, este encontro deve ser visto com ressalva, visto que as fêmeas de *Mi. quinquefer* alimentam-se em animais de sangue frio (Deane & Deane 1957; Andrade Filho & Brazil 2009). *Ny. neivai* e *Pa. shannoni* também foram encontradas infectadas por *Leishmania* sp..

Infecções experimentais de *Ny. neivai* com várias espécies de *Leishmania* tem sido realizadas para observar a distribuição de parasitos no intestino destes insetos e há possibilidade deste estar atuando como um vetor. *Ny. neivai* já foi encontrada naturalmente infectada com *Leishmania* spp. na Argentina (Córdoba-Lanús *et al.*, 2006) e com *Le. chagasi* em Lassance, Minas Gerais (Saraiva *et al.*, 2009). Esta espécie é altamente antropofílica, incluindo a população de fêmeas destes insetos de Lassance. Vários espécimes foram coletados dentro das casas pelo nosso grupo em ocasiões anteriores, às vezes picando os habitantes (Andrade Filho *et al.*, 2007).

*Psa. shannoni* esta amplamente distribuída em todo o continente americano e, embora não esteja associada com a transmissão da leishmaniose, foi coletada em ambientes antrópicos e em capturas com isca humana (Hashiguchi *et al.*, 1992; Galati *et al.*, 2003; Balbino *et al.*, 2005). A análise isoenzimática mostrou que esta espécie é parasitada por flagelados indistinguíveis de *Leishmania* de origem humana (Rowton *et al.*, 1991). Mais recentemente, Travi *et al.* (2002) demonstraram experimentalmente a infecção desta espécie por *Le. infantum* presente em cães infectados sugerindo sua participação na disseminação do parasito.

Segundo Killick-Kendrick (1988), para se confirmar uma espécie de flebotomíneo como vetora é preciso obedecer a cinco critérios: a espécie deve ser abundante no foco de leishmaniose, ser altamente antropofílica, mostrar o desenvolvimento de parasitos na ausência de sangue no intestino, mostrar a mais alta taxa de infecção natural dentre os flebotomíneos observados e o parasito isolado do flebotomíneo deve ser indistinguível daqueles isolados de casos humanos.

Encontramos no município de Várzea da Palma espécies reconhecidas como vetores das leishmanioses infectadas naturalmente, bem como espécies que não são consideradas vetoras ou que ainda não tiveram seu papel epidemiológico esclarecido. Ressaltamos que estes insetos provavelmente alimentaram-se em hospedeiros infectados e, embora possam ser parte da cadeia de transmissão da infecção, isso não significa que elas sejam capazes de transmitir o parasito aos seres humanos.

### 6.3 Anomalias em machos de *Lutzomyia longipalpis*

Anomalias morfológicas no parâmero foram observadas em 41 (0,5%) espécimes de *Lu. lutzomyia longipalpis* sensu lato (Lutz & Neiva 1912), em área de ocorrência de LV no município de Várzea da Palma, norte do estado de Minas Gerais, Brasil.

Nenhuma diferença significativa foi verificada ao se comparar as principais estruturas morfológicas dos espécimes anômalos com o espécime da localidade tipo, Além Paraíba, de *Lu. longipalpis* o que nos permitiu chegar a correta identificação dos exemplares (Tabela 8). Relatamos o encontro de oito anomalias no parâmero de machos da espécie *Lu. longipalpis*, sendo sete delas inéditas na literatura. A anomalia tipo 1 apresenta um espinho a mais implantado no parâmero ao mesmo nível dos espinhos característicos para a espécie. Este tipo de anomalia também unilateral já foi descrito por Ximenes *et al.* (2002) para o estado do Rio Grande do Norte. As demais anomalias caracterizam-se pela presença de um espinho adicional na porção mediana do parâmero (anomalia tipo 2), um espinho adicional, localizado próximo aos espinhos característicos da espécie *Lu. longipalpis* (anomalia tipo 3), um espinho adicional em posição intermediária às anomalias tipo 3

e 4, um espinho anômalo menos espesso localizado na mesma posição do espinho anômalo tipo 3 (anomalia tipo 5) e o mesmo ocorre com a anomalia tipo 6, cujo espinho está na mesma posição da anomalia 4 diferindo apenas pela sua espessura mais delgada. Estas anomalias são unilaterais e estão distribuídas tanto no parâmetro direito quanto no esquerdo. Além destas anomalias duas bilaterais foram encontradas, sendo nomeadas de anomalias tipo 7 e 8 e consideradas simétrica e assimétrica respectivamente. A anomalia tipo 7 apresenta nos dois parâmetros um espinho adicional implantado ao mesmo nível dos espinhos normais e a anomalia tipo 8 apresenta no parâmetro direito características da anomalia tipo 5 e no parâmetro esquerdo a anomalia tipo 3.

Os caracteres morfológicos da genitália de flebotomíneos são indicadores importantes para a correta identificação destes insetos. Várias anomalias que afetam a genitália masculina foram previamente descritas em outras espécies: *Ny. intermedia* (Lutz e Neiva, 1912) com anomalias no dististilo (Marcondes, 1999; Pinto *et al.*, 2010), *Micropygomyia trinidadensis*, *Micropygomyia atroclavata*, *Lutzomyia gomezi* e *Pifanomyia ovallesi* com anomalias na genitália dos machos capturados em ecótopos naturais no oeste da Venezuela (Cazorla *et al.*, 1991), *Micropygomyia schreiberi* com anomalia bilateral no dististilo (Andrade Filho *et al.*, 2004), *Sciopemyia sordelli* do município de Rio Claro, estado de São Paulo, com espinhos adicionais no dististilo (Cutolo *et al.*, 2009) e *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) (Scopoli, 1786) um importante vetor de *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), um agente causador da leishmaniose cutânea zoonótica no Velho Mundo, com malformação na genitália caracterizada pela presença anômala de espinhos no lobulo lateral e no dististilo (Guernaoui *et al.*, 2009). A função e a vantagem adaptativa de cada estrutura anômala frente a pressões seletivas do meio são desconhecidas.

Entre os flebotomíneos neotropicais a espécie *Lu. longipalpis* é reconhecida como vetora da *Le. chagasi*, o agente etiológico da LV. No entanto, *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) também tem sido implicada como um vetor da LV na região centro-oeste do Brasil (Santos *et al.*, 1998; Pita-Pereira *et al.*, 2008). Evidências morfológicas, genéticas e comportamentais sugerem que *Lu. longipalpis* representa um complexo de espécies (Ward *et al.*, 1988; Lanzaro *et al.*, 1993; Young & Duncan, 1994; Lampo *et al.*, 1999; Soto *et al.*, 2001; Bauzer *et al.*,

2002a, b; Arrivillaga *et al.*, 2002, 2003; Maingon *et al.*, 2003; Bottecchia *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2004; Hamilton *et al.*, 2005; Watts *et al.*, 2005; Coutinho-Abreu *et al.*, 2008; Maingon *et al.*, 2008). Recentemente, na Venezuela, diferenças morfológicas levaram à identificação de *Lutzomyia pseudolongipalpis* como a primeira espécie dentro do complexo longipalpis (Arrivillaga & Feliciangeli, 2001). No Brasil, a análise dos feromônios sexuais e sons emitidos durante a cópula produzidos pelos machos, combinado com o estudo molecular de polimorfismo do gene “period”, sugeriu a existência de um número de espécies irmãs, com diferentes níveis de divergência genética. A população brasileira de complexos podem ser divididas em dois grupos principais. Na primeira, os machos produzem o tipo burst de som no momento da cópula e cembrene-1 como feromônio com vinte carbonos. Estas populações estão intimamente relacionadas geneticamente e elas provavelmente representam uma única espécie. O segundo grupo é mais heterogêneo, os machos produzem diferentes padrões de sons tipo pulso e feromônios tanto com 16 (9-metil-germacreno-B e 3-metil-a-himachalene carbonos um himachalene) quanto 20 (Cembrene-1 e -2). Esse grupo de populações, provavelmente representa um número de espécies incipientes (Araki *et al.*, 2009).

Diante da complexidade e das diversas lacunas existentes a respeito da espécie *Lu. longipalpis* e baseado na importância deste flebotomíneo na cadeia de transmissão da LV, aliado a sua alta capacidade de adaptação a ambientes modificados pelo homem, ressaltamos o encontro de anomalias na tentativa de impedir a identificação errônea destes insetos e a descrição de novos táxons que venham a causar mais danos a taxonomia desse complexo de espécies.

#### 6.4 A leishmaniose canina no município de Várzea da Palma, MG.

Durante o estudo foram avaliados diferentes aspectos relacionados a infecção por *Leishmania* em 207 cães residentes no município de Várzea da Palma. Clinicamente, os cães infectados com *Le. infantum* (= *Le. chagasi*) foram classificados por Mancianti *et al.* (1998) em três grupos: assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Os assintomáticos são cães com ausência de sinais clínicos característicos de infecção por *Leishmania*, nos oligossintomáticos ocorrem até três sinais clínicos característicos da infecção. Os cães sintomáticos são aqueles que

apresentam mais de três sinais clínicos característicos da infecção, entre eles alopecia, dermatite furfurácea, úlceras, hiperqueratose, onicogrifose, emagrecimento, ceratoconjuntivite, adenopatia linfóide, opacificação das córneas e do pêlo. A distinção dos animais oligossintomáticos dos sintomáticos é complexa, difícil e depende de uma avaliação clínica muito criteriosa feita por veterinário experiente. Além disso, esta diferenciação tem importância maior quando se pretende estudar aspectos relacionados a evolução, prognóstico e resposta imunológica do animal frente a infecção por *Leishmania*.

Devido as características de nosso estudo optamos pela classificação dos cães apenas em dois grupos: sintomáticos, com pelo menos um sinal clínico sugestivo da LVC, e assintomáticos, com ausência de sinais clínicos. Assim 72% dos cães foram classificados como assintomáticos e 28% como sintomáticos. Sabe-se que em áreas onde a leishmaniose canina é endêmica uma alta proporção de cães infectados não apresenta sinal clínico da doença (Dantas-Torres *et al.*, 2006; Rondon *et al.*, 2008; Queiroz *et al.*, 2009). Esta constatação tem impacto direto nas ações de controle da LV pois os animais assintomáticos geralmente são mais difíceis de serem diagnosticados pelos métodos sorológicos convencionais empregados pelos órgãos de saúde pública. Desta forma, estes animais permanecem na área podendo servir como fonte de infecção para os vetores (Michalsky *et al.*, 2007; Costa-Val *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2011).

Na avaliação clínica dos animais, os sintomas mais observados foram úlceras ou lesões de pele (64,9%), onicogrifose (42,1%), alopecia (40,4%) e emaciação (35%), além da presença de linfadenomegalia. Albuquerque *et al.* (2007), avaliando 25 cães naturalmente infectados da região metropolitana de Recife, Pernambuco, também verificaram maiores prevalências de úlceras cutâneas (80%), com 90% destes animais apresentando-se soropositivos e 87,5% parasitologicamente positivos. Entretanto, Feitosa *et al.* (2000) e Moreira *et al.* (2007), avaliaram cães naturalmente infectados da região de Araçatuba, São Paulo, e encontraram com maior frequência a linfadenomegalia. Os sinais clínicos na LVC são muito discutidos na literatura e vêm sendo observados tanto em infecções naturais quanto em modelos de infecção experimental (Genaro, 1993; Reis, 2001; Poot *et al.*, 2005; Rodriguez-Cortez *et al.*, 2007). Acredita-se que a infecção evolui de um quadro

normal, sem sinais, para um estado grave e terminal apresentado pelos animais sintomáticos.

A apresentação clínica da LV em cães é consequência de interações complexas entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro (Santos-Gomes *et al.*, 2002). Diversos fatores podem estar relacionados com a forma clínica apresentada pelo cão durante a infecção por *Le.chagasi*. Muitos animais apresentam-se susceptíveis e desenvolvem uma doença ativa, enquanto outros se mostram resistentes à infecção e permanecem assintomáticos, além disso, o estado de saúde geral do animal pode influenciar diretamente no desenvolvimento da doença.

As variáveis sexo, idade e raça foram semelhantes nos cães soropositivos em relação ao total de cães amostrados. Em relação à idade, sexo e raça de cães infectados por *Leishmania* estudos realizados no Brasil têm mostrado informações divergentes (Franco Silva *et al.*, 2003; Gontijo & Melo, 2004; Dantas-Torres *et al.*, 2006; Rondon *et al.*, 2008), não sendo possível afirmar se o risco de infecção por *Leishmania* em cães está associado a alguma destas variáveis. No entanto, o estilo de vida dos cães pode aumentar o risco de exposição ao flebotomíneo, e finalmente colocá-los em maior risco de infecção por *Leishmania* (Dantas-Torres, 2009). Em nosso estudo observamos que a maioria dos cães tinham acesso livre para áreas florestadas, onde os flebotomíneos foram abundantes. Nesse âmbito, Uchôa *et al.* (2001) e Santos *et al.* (2005) afirmam que a ocupação desordenada do ambiente praticada pelo homem, principalmente próximo a encostas e/ou matas, acarreta desequilíbrios ambientais, favorecendo a instalação do ciclo extraflorestal da doença, beneficiando seu caráter peridomiciliar.

Nosso estudo registrou uma soroprevalência de 24,6%, considerada alta e de grande importância epidemiológica, já que é preconizado pelo ministério da saúde a eutanásia de cães com sorologia positiva. Para o cálculo da soroprevalência no município consideramos os cães que apresentaram resultados positivos nos dois testes sorológicos empregados (RIFI e ELISA). Nunes *et al.* (2001) observaram soropositividade semelhante (23,7%) em estudo realizado no Mato Grosso do Sul. Em inquérito sorológico realizado no período de janeiro a novembro de 2006, o Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande analisou amostras de 37.613 cães e constatou positividade em 9.052 (24%) animais (UCDB, 2006). Dantas-Torres

*et al.* (2005) avaliaram 322 cães em área endêmica de Pernambuco e destes, 130 (40,3%) foram sorologicamente positivos. Já em outras áreas a soroprevalência apresenta níveis bem inferiores (Oliveira *et al.*, 2010). As discordâncias entre as taxas de prevalência podem ser devido principalmente ao estágio da infecção nos animais, o número de amostras analisadas, a natureza do antígeno e o método sorológico utilizado no diagnóstico.

É importante ressaltar, no entanto, que as prevalências obtidas em centros de controle de zoonoses, em áreas endêmicas, são em geral mais elevadas, tendo em vista que a maioria dos cães eutanasiados nestes locais apresenta suspeita clínica para LV ou são identificados como sorologicamente positivos em inquéritos epidemiológicos em massa. Os cães amostrados em nosso estudo foram selecionados sem levar em consideração o status clínico ou resultados prévios de exames, apenas escolhemos animais que residiam próximo ou nas casas onde as armadilhas para a coleta de flebotomíneos foram expostas.

É extremamente importante identificar as espécies de *Leishmania* que circulam em um determinado foco de transmissão, principalmente quando o alvo do estudo é a epidemiologia da doença. Todas as amostras caracterizadas indicaram a *Le.chagasi* como responsável pela infecção indicando a importância do cão como reservatório para *Le.chagasi* no município de Várzea da Palma, como já observado em diversas áreas urbanas endêmicas do Brasil (Brasil, 2005). Estes resultados apontam que medidas de controle da LC devam ser implantadas, na tentativa de diminuir a incidência nos cães e conseqüentemente a expansão do número de casos humanos da LV, já que tem sido observada uma correlação entre o número de casos caninos e a ocorrência de casos humanos (Evans, 1990; Nunes *et al.*, 2010).

## 6.5 Diagnóstico da leishmaniose canina

Os testes sorológicos são freqüentemente utilizados para o rastreio de cães, principalmente o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o teste de imunofluorescência direta (RIFI). Entretanto, estas técnicas apresentam limitações em termos de reprodutibilidade e especificidade (Silva *et al.*, 2006). Às vezes eles falham devido aos baixos níveis de determinados anticorpos em alguns cães e reação cruzada com

doença de Chagas, rickettsioses, erliquiose e toxoplasmose (Barbosa de Deus *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2007).

Neste estudo foram seguidas as recomendações da OMS, que considera a RIFI como teste padrão (Michalick, 2003). E para evitar as reações cruzadas que podem ocorrer em títulos iguais ou inferiores a 1:40 (Savani *et al.*, 2003), foi também executado o ELISA para minimizar a ocorrência de falsos-resultados, pois, segundo o Ministério da Saúde (Brasil, 2003), a utilização de duas técnicas na busca de um único diagnóstico permite a execução de uma sorologia confiável. Nesse sentido, apenas os soros que reagiram aos dois testes foram considerados positivos. Ainda, Oliveira *et al.* (2005) sugerem que a adoção do teste de ELISA na rotina diagnóstica da LV canina seja uma recomendação válida com vista à otimização das ações de controle e monitoramento dessa zoonose em suas áreas de ocorrência.

Nossos resultados sorológicos mostraram uma soropositividade de 24,6% no teste RIFI e 31,4% quando se utilizou o teste ELISA. A soroprevalência quando considerados os animais positivos para os dois testes foi de 24,6% (Tabela 12). Um fato importante em relação aos resultados encontrados foi a ótima concordância entre os dois testes indicada pelo índice *Kappa*. Entretanto, foi possível observar que tanto a RIFI quanto o ELISA apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao status clínico dos cães. A análise dos resultados indicou que estes métodos foram mais eficientes na detecção da infecção quando os animais já apresentavam sinais clínicos sugestivos para a doença. Trabalhos realizados por Dye *et al.* (1993) mostraram que a RIFI foi menos sensível em animais assintomáticos, Quaresma *et al.* (2009) observou uma menor proporção de positividade em animais assintomáticos utilizando testes sorológicos e parasitológicos convencionais, Reis (2001) observou uma variação nos títulos de anticorpos tanto na RIFI quanto no ELISA em animais assintomáticos. Provavelmente, a menor sensibilidade na detecção de animais assintomáticos em testes sorológicos ocorre devido a uma maior imunidade mediada por células e uma menor resposta imune humoral (IgG) nestes animais (Bordoisseau *et al.*, 1997; Cabral *et al.*, 1998; Reis, 2001).

A sorologia detecta a maioria dos cães sintomáticos (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999) e uma proporção dos cães assintomáticos que representam

em torno de 50% da população canina soropositiva (Lanotte *et al.*, 1979; Gradoni *et al.*, 1980; Pozio *et al.*, 1981; Mancianti *et al.*, 1986, 1994; Abranches *et al.*, 1991, Fisa *et al.*, 1999; Sideris *et al.*, 1999). No modelo matemático compartimental da leishmaniose canina supunha-se que os cães assintomáticos não serviam como fonte de infecção para os flebotomíneos (Dye *et al.*, 1992; Hasibeder *et al.*, 1992). Entretanto, outros autores mostraram que a infecciosidade de cães com infecção por *Leishmania* não está exclusivamente relacionada com a fase sintomática da doença (Molina *et al.*, 1994). Nossos resultados se adequam a idéia de que cães assintomáticos devem ser considerados como fonte de infecção para os insetos vetores, pois 61% dos cães soropositivos para a RIFI e 62% para o ELISA eram saudáveis e vivendo em uma área onde a leishmaniose é endêmica.

Pelo exame clínico realizado no momento da coleta de sangue e 45 dias após, no momento do recolhimento dos animais soropositivos para eutanásia, foi possível verificar que uma porcentagem dos cães assintomáticos em pouco tempo passaram a apresentar sinais de infecção. Entretanto, precisar o período de incubação da doença é difícil uma vez que não se sabe há quando tempo o animal está infectado. Não houve relação entre a mudança no status clínico dos cães (de assintomático para sintomático) e a titulação de anticorpos por eles apresentada. Em um estudo de infecção experimental Poot *et al.* (2005) infectaram cães com *Le.chagasi* via intravenosa e notaram o aparecimento dos primeiros sinais sugestivos da infecção entre 15 e 20 semanas. Porém, os sinais mais sérios só tornaram-se evidentes 35 a 40 semanas após a infecção. Sabe-se que este período de incubação pode variar muito, desde poucos meses até vários anos (Cunha, 1938; Rioux *et al.*, 1979; Genaro, 1993). Este fato nos mostra a importância da realização de um diagnóstico preciso e a retirada rápida dos animais infectados na tentativa de impedir a continuidade do contato destes com os flebotomíneos vetores e consequentemente reduzir as chances de infecção para o humano. Mais estudos são necessários para se verificar de forma segura o potencial de cães assintomáticos em transmitir a *Leishmania* aos flebotomíneos vetores.

É sabido que cães com LVC podem permanecer assintomáticos por longos períodos e quando não diagnosticados a prevalência da infecção canina em uma área endêmica pode ser subestimada. Como consequência os animais

assintomáticos não são incluídos nos grupos a serem considerados para medidas de controle (Ferreira *et al.*, 2007).

Estudos têm apontado a PCR como um método altamente específico e mais sensível que os procedimentos clássicos para o diagnóstico da LV canina (Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Manna *et al.*, 2004; Oliva *et al.*, 2006). Diversas amostras biológicas podem ser utilizados para a PCR, tais como: baço, linfonodos, pele, biópsia conjuntival, sangue e medula óssea. Sangue e medula óssea geralmente são os tecidos mais utilizados (Ashford *et al.*, 1995; Lachaud *et al.*, 2002; Manna *et al.*, 2004). A sensibilidade da PCR pode ser aumentada pelo uso de iniciadores baseados em sequências que têm mais de uma cópia por célula, que em *Leishmania* incluem o cinetoplasto e famílias de genes de multicópias. A utilização destes iniciadores gera uma importante vantagem em estudos relacionados à detecção do parasito.

Entre os genes de multicópias, um dos mais estudado é o SSUrRNA, já tendo sido seqüenciado para mais de 100 espécies, incluindo os kinetoplastídeos *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Crithidia fasciculata*. A comparação de seqüências do SSUrRNA publicadas de humanos, artrópodes, e kinetoplastídeos indica que apenas uma região de aproximadamente 800 bases na parte central do gene mostra uma heterologia considerável e foi para essa região que Van Eys *et al.* (1992) desenharam os pares de iniciadores R221 e R332 (neste estudo R1 e R2) que amplificam uma região de 603 pb presente em kinetoplastídeos (menos específica); e R223 e R333 (neste estudo R3 e R4) que amplificam uma região de 353 pb somente de espécies do gênero *Leishmania* (menos sensível). Em 2002, Cruz *et al.* sugerem a combinação destes dois pares de iniciadores em uma *Nested* PCR para detectar *Leishmania* em humanos (diagnóstico e monitoramento), aumentando a sensibilidade e especificidade da reação.

Neste trabalho utilizamos para a detecção do parasito a *Nested* PCR dirigida ao gene SSUrRNA de *Leishmania* (LnPCR) e para a identificação da espécie o sequenciamento do produto amplificado na segunda reação da LnPCR. Esta identificação é feita até o nível de complexo devido a ausência de diferenças entre as seqüências de espécies pertencentes ao mesmo complexo. Estudo realizado por

Ferreira (2010) mostrou a eficácia da LnPCR seguida de sequeciamento em identificar espécies de *Leishmania* em cães.

Alguns estudos compararam o desempenho da PCR em amostras indicativas da disseminação da *Leishmania* (como linfonodos e medula óssea) com os resultados obtidos em técnicas sorológicas (RIFI e ELISA) e técnicas parasitológicas convencionais (demonstração do parasito pela microscopia e/ou cultura de linfonodos e medula óssea) (Roura *et al.*, 1999; Martín-Sanchez *et al.*, 2001; Fisa *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2001; Ikonopoulou *et al.*, 2003). As amostras analisadas eram provenientes de cães clinicamente saudáveis e de animais sintomáticos. A eficácia da PCR foi mais baixa ou similar à sorologia, mas sempre consistentemente mais alta que as técnicas parasitológicas convencionais empregadas. Resultado semelhante foi observado no nosso estudo que independente da sintomatologia, os testes RIFI e LnPCR sangue e ELISA e LnPCR sangue apresentaram concordância ótima e boa respectivamente. Estes dados também concordam com outros achados (Hu *et al.*, 2000; Maia *et al.*, 2009) que sugerem que amostra de sangue é uma fonte confiável para a detecção de DNA de *Leishmania* através da PCR.

Utilizamos para a realização da LnPCR além de amostras de sangue periférico de cães (n=207), amostras de medula e pele dos cães soropositivos eutanasiados. Com as amostras de sangue 19% dos cães foram positivos, com as de medula 56% e de pele 22%. Na análise dos resultados da LnPCR, levando em consideração o tipo de amostra em relação à forma clínica, não foi encontrada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) quando se comparou amostras de sangue e medula. Os resultados obtidos com as amostras de sangue e medula sugerem uma independência da forma clínica para a detecção de cães infectados. O contrário foi observado com os resultados obtidos com amostras de pele, sendo verificada uma maior eficiência em detectar os cães sintomáticos (Tabela 16). Estes dados devem ser analisados com ressalva, devido ao número considerado pequeno (n=9) de amostras de pele avaliadas, o que possivelmente influenciou no poder do teste estatístico utilizado para análise. Entretanto, alguns autores têm demonstrado que cães assintomáticos apresentam baixo parasitismo enquanto os cães sintomáticos apresentam alta carga parasitária em diferentes tecidos, incluindo a pele (Reis, 2001; Reis *et al.*, 2006a, b, c; Giunchetti *et al.*, 2006, 2008; Reis *et al.*, 2009).

Com relação a comparação do tipo de amostra clínica dentro do grupo dos 41 cães sorologicamente positivos, independente do status clínico dos animais, os resultados mostraram que as amostras de medula apresentaram maior positividade ( $P < 0,01$ ) em relação aos demais tipos de tecido (Figura 29). Quando a comparação foi realizada levando-se em consideração a sintomatologia dos cães, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) no grupo dos animais sintomáticos. Neste caso as amostras de medula e pele apresentaram uma maior proporção de cães positivos em comparação com as amostras de sangue (Figura 32). Já para o grupo de animais assintomáticos a diferença estatisticamente significativa foi verificada nas amostras de medula em comparação com as amostras de sangue e pele (Figura 33).

A pesquisa do parasito em diferentes tecidos infectados do hospedeiro mamífero pode contribuir para que o investigador escolha qual a amostra biológica mais adequada a ser analisada durante a realização do diagnóstico e prognóstico da infecção (Reis *et al.*, 2006b). Em nosso estudo a amostra de medula foi a mais eficaz na detecção de animais positivos independentemente da sintomatologia

Nossos resultados estão em acordo com os de Ashford *et al.* (1995) que constataram que a PCR utilizando medula óssea é um método diagnóstico extremamente eficiente. Leontides *et al.* (2002) realizou estudos na Grécia com cães clinicamente saudáveis e encontraram alta positividade na PCR utilizando como fonte de DNA a medula óssea (63%). Ainda segundo estes autores, um resultado positivo da PCR utilizando a medula óssea supõe a disseminação do parasito para órgãos internos depois da inoculação através da pele.

Solano-Gallego *et al.* (2001) demonstraram que a frequência de DNA do parasito não é homogênea nos diferentes tecidos. Em contrapartida, estes autores encontraram um baixo percentual de medula óssea positiva utilizando a técnica da PCR (17%) e sugeriram que a disseminação hematogênica para a medula óssea ocorre apenas em parte dos animais. Por outro lado, no mesmo estudo, foi demonstrado que metade dos cães foram positivos para a detecção do DNA do parasito na pele. Esse resultado indica que a pele é um tecido de reserva de parasitos importante em cães e que a PCR em biópsia de pele é um método bastante sensível para detectar a infecção. Há relatos de bons resultados obtidos a

partir da utilização de amostras de pele (Manna *et al.*, 2004; Quaresma *et al.*, 2009). Os resultados do nosso estudo concordam em parte com os achados descritos acima, já que quando utilizada a medula óssea foi encontrada alta porcentagem de cães infectados principalmente quando estes eram assintomáticos.

A técnica de cultura de aspirado de medula óssea dos 41 cães soropositivos não foi utilizada como método de diagnóstico e sim como um meio de isolamento de parasitos para posterior caracterização. Manna *et al.* (2004) observaram que apesar da cultura ser uma técnica ligeiramente mais sensível que o exame microscópico de biópsias de lesão e amostras histológicas é uma técnica mais laboriosa, cara e sujeita a contaminações microbiológicas o que limita a obtenção do resultado. Este fato também foi observado em nosso estudo, uma vez que entre as nove amostras positivas, cinco (56%) contaminaram não sendo possível a identificação da espécie do parasito.

#### 6.6 Epidemiologia das leishmanioses em Várzea da Palma, MG.

No Brasil as leishmanioses são consideradas zoonoses que inicialmente se estabeleceram nas áreas rurais do país. As mudanças ambientais e climáticas que vêm ocorrendo nos últimos anos em associação com a escassez de investimentos em saúde, educação, moradia e saneamento básico, a descontinuidade das ações de controle, a adaptação do vetor a ambientes modificados pelo homem, novos fatores imunossupressivos, como a infecção por HIV estão contribuindo para o processo de urbanização de diversas parasitoses (Gontijo & Melo, 2004). Neste contexto as leishmanioses assumem um papel importante como um sério problema de Saúde Pública.

O município de Várzea da Palma, localizado no norte do estado de Minas Gerais, ilustra o processo de urbanização das leishmanioses com o surgimento recente da doença, onde os primeiros casos autóctones de LV e LT foram registrados no ano de 2001, e o número crescente de casos registrados da forma visceral.

*Lu. longipalpis* é uma espécie que apresenta seu papel como vetora de *Le.chagasi* bem definido. O encontro de alta densidade populacional e a infecção natural desta espécie por *Le.chagasi*, bem como o seu encontro em áreas onde foram registrados casos humanos de LV e encontrados cães infectados com *Le.chagasi* deixa claro a participação desta espécie na cadeia de transmissão da LV na cidade de Várzea da Palma. Diante dos nossos resultados fica demonstrado um ciclo ativo da *Le.chagasi* por todo o território urbano do município de Várzea da Palma, Minas Gerais, devendo as autoridades responsáveis manter uma constante vigilância entomológica para um melhor direcionamento e eficácia das medidas de controle.

O distrito de Barra do Guaicuí apresentou um quadro epidemiológico diferente daquele classicamente descrito para a transmissão da LV. Durante todo o período de estudo a espécie mais abundante foi a *Ny. intermedia* que apresentou alta taxa de infecção natural por *Le.chagasi*. Nos domicílios ou próximos a estes onde os espécimes de *Ny. intermedia* foram coletados foram registrados casos humanos de LV e encontramos cães infectados por *Le.chagasi*. Entretanto não podemos afirmar a participação desta espécie como vetora de *Le. chagasi*, assim como outras espécies encontradas neste trabalho naturalmente infectadas, uma vez que é preciso atender a todos os critérios definidos por Killick-Kendric (1990) para a incriminação de um determinado flebotomíneo como vetor. Novos estudos precisam ser realizados para elucidar o papel das espécies de flebotomíneos encontradas naturalmente infectadas como possíveis vectoras na região.

O papel do cão como o principal reservatório doméstico da *Le.chagasi* implica na utilização de informações precisas obtidas através de ferramentas de diagnóstico que permitam a detecção segura da LVC para a implementação de medidas destinadas a controlar a propagação da doença (Ferreira *et al.*, 2007). O encontro de cães naturalmente infectados por *Le.chagasi* em todas as zonas político-administrativas demonstram a necessidade de uma vigilância ativa e constante com a realização de inquéritos caninos e retirada dos animais soropositivos, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde.

Apesar do número de casos de LT se manter constante nos últimos anos e de terem sido encontradas infectadas por *Le.braziliensis* apenas espécies de

flebotomíneos (*Lu. longipalpis* e *Ev. lenti*) que não são consideradas vetoras da mesma é preciso dar atenção ao controle desta doença, pois isso pode indicar apenas um período de baixa circulação do parasito.

A análise global de nossos resultados mostra claramente que o município de Várzea da Palma apresenta todas as características necessárias para a expansão das leishmanioses, visceral e tegumentar, apontando para necessidade urgente da implantação de medidas profiláticas adequadas a situação local. Na realidade este fenômeno já está ocorrendo pois Várzea da Palma em 2008 era considerado município de baixa transmissão para a LV e hoje já se encontra classificado como de média transmissão pelos critérios adotados pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2006)

Vale ressaltar que todas as informações relativas aos nossos resultados foram repassadas para a Secretaria de Saúde do município bem como foi realizada uma reunião com o setor de zoonoses da Secretaria Estadual de Saúde onde foram apresentados os resultados da pesquisa.

## 7 CONCLUSÕES

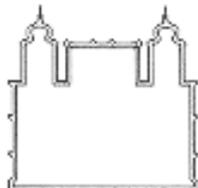
- 1- A fauna flebotomínica do município de Várzea da Palma, MG, apresentou quinze espécies, sendo as espécies mais prevalentes *Lu. longipalpis* e *Ny. intermedia*, importantes espécies vetoras de LV e LT, respectivamente.
- 2- A espécie *Lu. longipalpis* foi capturada em todas as localidades de estudo, mostrando uma maior abundância em áreas urbanizadas, enquanto a espécie *Ny. intermedia* foi mais numerosa nas localidades que mantinham vestígios ou matas preservadas.
- 3- A técnica da *Nested* PCR (LnPCR), dirigida a uma região do gene SSUrRNA, revelou-se exequível e prática na detecção da infecção por *Leishmania* em flebotomíneos e cães.
- 4- O achado de infecção natural de *Lu. longipalpis* por *Le.chagasi*, somado a abundância de espécimes capturados, sugere a possível participação desta espécie no ciclo de transmissão da LV na área de estudo.
- 5- O encontro de alta taxa de infecção natural por *Le.chagasi* em *Ny. intermedia*, indica a necessidade de estudos para elucidar o envolvimento desta espécie no ciclo de transmissão no distrito de Barra do Guaicuí.
- 6- Apesar da baixa taxa de infecção dos flebotomíneos por *Le. braziliensis* e das espécies encontradas infectadas não serem vetoras comprovadas deste parasito é preciso atenção, uma vez que casos autóctones de LT estão ocorrendo na área.
- 7- A *Le. chagasi* é a espécie responsável pela LVC no município de Várzea da Palma, MG.
- 8- Considerando o achado de cães e flebotomíneos naturalmente infectados por *Le.chagasi* no peridomicílio de residências com casos humanos de LV pode-se sugerir a participação do cão como reservatório doméstico da infecção.
- 9- Os resultados demonstram que as técnicas sorológicas utilizadas apresentam limitações no diagnóstico de cães assintomáticos o que pode comprometer a eficácia das ações de controle.
- 10- Para o diagnóstico da infecção canina em inquéritos epidemiológicos a amostra de sangue pode ser utilizada devido a facilidade de coleta, melhor aceitação por parte dos proprietários dos animais e sua alta taxa de positividade comparável à dos testes sorológicos.

- 11- A medula óssea parece ser a amostra mais indicada para o diagnóstico da LVC, pois a taxa de positividade foi superior a do sangue e da pele sendo eficaz na detecção dos animais sintomáticos e assintomáticos.
- 12- Dentre os cães sintomáticos, as amostras de medula e pele foram mais eficientes na detecção da infecção em comparação a amostra de sangue.
- 13- O uso da LnPCR no diagnóstico da LVC parece superar em grande parte os problemas dos testes sorológicos em detectar infecção em cães assintomáticos..
- 14- A agilidade na realização do diagnóstico e tomada das ações de controle é de suma importância, pois animais assintomáticos podem mudar seu perfil clínico e aumentar as chances de disseminação da doença.
- 15- Os resultados apresentados no nosso estudo sobre os flebotomíneos e a infecção canina podem contribuir para um melhor direcionamento das medidas de controle pelos órgãos competentes do município.

## 8 ANEXO

## 8.1 Anexo I – Ficha Clínica Epidemiológica (canina)

No. \_\_\_\_\_ Cod \_\_\_\_\_



**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Centro de Pesquisas René Rachou**  
**Laboratório de Leishmanioses**



## Ficha Clínica Epidemiológica (canina)

Data da coleta: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome do proprietário: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Tipo de residência: \_\_\_\_\_

## 1) Dados do animal

- Nome: \_\_\_\_\_
- Raça: \_\_\_\_\_
- Sexo: macho ( )    fêmea ( )
- Idade: \_\_\_\_\_
- Cor: \_\_\_\_\_
- Cão viajou nos últimos seis meses? \_\_\_\_\_
- Outras localidades onde residiu: \_\_\_\_\_ Tempo \_\_\_\_\_

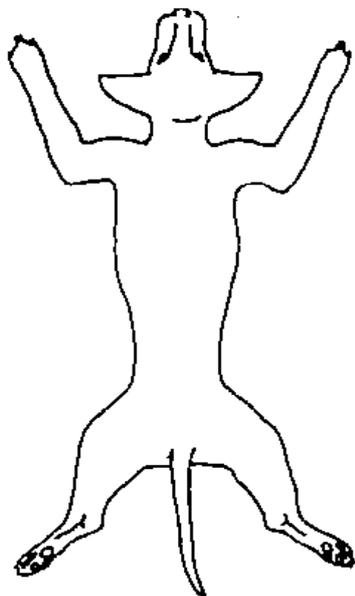
## 2) Sinais clínicos

- Úlceras ou lesão de pele            ( )
- Sem lesão                                ( )
- Alopecia                                 ( )
- Emaciação                               ( )
- Onicogrifose                            ( )
- Hepatomegalia                        ( )
- Esplenomegalia                       ( )
- Linfadenomegalia                    ( )
- Ceratoconjuntivite                    ( )

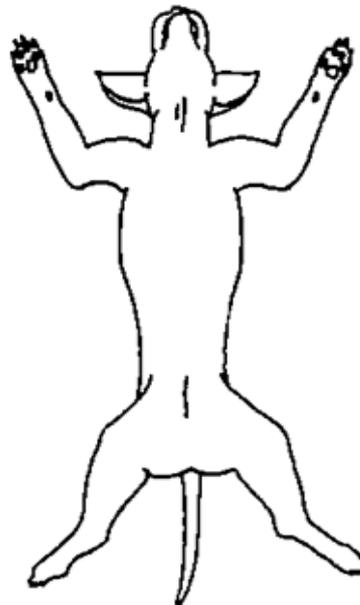
## 3) Amostra coletada

- Sangue periférico-veia cefálica ou jugular    ( X )

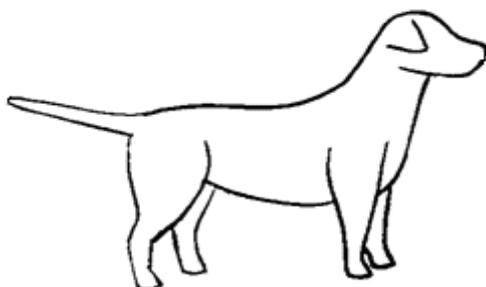
Exame dermatológico – localização e número de lesões



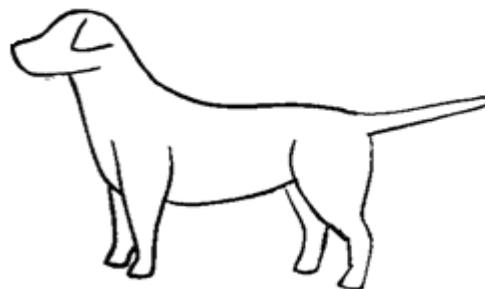
Dorsal



Ventral



Direito



Esquerdo

**EXAMES:**

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO:**

RIFI: \_\_\_\_\_

ELISA: \_\_\_\_\_

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR:**

Sangue: \_\_\_\_\_

Medula Óssea: \_\_\_\_\_

Pele: \_\_\_\_\_

**OBS:** \_\_\_\_\_

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abranches P, Silva Pereira MC, Conceição-Silva FM, Santos Gomes GM, Janz JG. Canine leishmaniosis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol* 1991; 77: 557-561.

Aguiar GM, Vilela ML, Lima RB. Ecology of the sand flies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; 82: 583-584.

Albuquerque AR, Aragão FR, Faustino MAG, Gomes YM, LIRA RA, Nakasawa M, Alves LC. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. *Rev Clín Vet* 2007; 71: 78-80.

Alencar RB. Emergência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em chão de floresta de terra firme na Amazônia Central do Brasil: uso de um modelo modificado de armadilha de emergência. *Acta Amaz* 2007; 37(2): 287-292.

Almeida PS, Nascimento JC, Ferreira AD, Minzão LD, Portes F, Miranda AM, Faccenda O, Andrade Filho JD. Espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) coletadas em ambiente urbano em municípios com transmissão de Leishmaniose Visceral do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Bras Entomol* 2010; 54(2): 304–310.

Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2004; 57.1 – 87.

Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad Saúde Pública* 2004; 20: 259-265.

Andrade Filho JD, Lima MLN, Falcão AL, Brazil RP. Sazonalidade dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) dos arredores da Gruta da Lapinha, município de Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil. Rev Bras Entomol 1998; 42: 93-95.

Andrade Filho JD, Carvalho GML, Saraiva L, Falcão AL. Bilateral anomaly in the style of *Micropygomyia schreiberi* (Martins, Falcão & Silva) (Diptera, Psychodidae). Rev Bras Entomol 2004; 48: 583-585.

Andrade Filho JD, Galati EAB, Falcão AL. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102: 481–487.

Andrade Filho JD, Brazil RP. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of Alagoas state, northeast of Brazil. Neotrop Entomol 2009; 38(5): 688-690.

Araki AS, Vigoder FM, Bauzer LG, Ferreira GE, Souza NA, Araújo IB, Hamilton JG, Brazil RP, Peixoto AA. Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). PLoS Negl Trop Dis 2009; 3(1): e365.

Arrivillaga JC, Feliciangeli MD. *Lutzomyia pseudolongipalpis*: the first new species within the *longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) complex from La Rinconada, Curarigua, Lara state, Venezuela. J Med Entomol 2001; 38: 783-790.

Arrivillaga JC, Norris DE, Feliciangeli MD, Lanzaro GC. Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. Inf Gen Evol 2002; 2: 83-95.

Arrivillaga J, Mutebi JP, Pinango H, Norris D, Alexander B, Feliciangeli MD, Lanzaro GC. The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. J Med Entomol 2003; 40: 615-627.

Ashford DA. Características clínicas e demográficas da leishmaniose visceral canina em Jacobina – Bahia – 1989-1991. In: Freire M, Miranda JC, David J, Badaró R,

editores. XXVIII Congresso Brasileiro de Medicina Tropical; 1992 Fev 13-17; Belém, Pará. Anais de Belém: s.n; 1992. P. 82.

Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulálio C, Lopes U, Fernandes O, Degraeve W, Barker-Jr RH, Badaró R, David JR. Comparison of the polymerase and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53(3): 251-255.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. Norma Brasileira de Regulamentação ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração: Errata 2. São Paulo: ABNT, 2005, 4 p. Disponível em: <http://www.abnt.org.br/Erratas/IEC17025-errata.pdf>. Acesso em: 18 maio 2011.

Badaró R, Jones TC, Lorencó R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, Rocha H, Teixeira R, Johnson-Jr WD. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis* 1986; 154: 639-649.

Balbino VQ, Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Marques da Silva W, Marcondes. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Atlantic Forest in Recife, Pernambuco State, Brazil: the species coming to human bait, and their seasonal and monthly variations over a 2-year period. *Ann Trop Med Parasitol* 2005; 99: 683-693.

Barbosa de Deus R, Mares-Guia ML, Nunes AZ, Costa KM, Junqueira RG, Mayrink W, Genaro O, Tavares CAP. *Leishmania major* like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin Diag Lab Immun* 2002; 9: 1356-1361.

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Jr G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaró R, Barral-Neto M, Carvalho EM, Johnson Jr WD. Leishmaniasis in Bahia, Brazil. Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44: 536-546.

Bauzer LG, Gesto JS, Souza NA, Ward RD, Hamilton JG, Kyriacou CP, Peixoto AA. Molecular divergence in the *period* gene between two putative sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Mol Biol Evol* 2002a; 19: 1624-1627.

Bauzer LG, Souza NA, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA. The *period* gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Mol Biol* 2002b; 11: 315-323.

Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2001; 53(1): 1-8.

Boelaert M, El Safi S, Jacquet D, Muynck A, Stuyft PV, Ray D. Operational validation of the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 126-134.

Bottecchia M, Oliveira SG, Bauzer LGSR, Souza NA, Ward RD, Garner KJ, Kyriacou CP, Peixoto AA. Genetic divergence in the *cacophony* IVS6 Intron among five Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. *J Mol Evol* 2004; 58: 754-761.

Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boheringer C, Stolle T, Chabanne L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopath* 1997; 145: 171-176.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose tegumentar. Brasília: Ed. MS, 2000. 62 p. Disponível em < [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manu\\_leishman.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manu_leishman.pdf) >. Acesso: 12 jul. 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: MS, 2003. 120 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 6. ed. Brasília: MS, 2005. 816 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 85-334-1047-6. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia\\_vig\\_epid\\_novo2.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_vig_epid_novo2.pdf). Acesso em: 19 maio 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ed. MS, 2006. 120 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 85-334-0742-4. Disponível em:

[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_leish\\_viscceral2006.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_viscceral2006.pdf). Acesso em: 19 maio 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Brasília: MS, 2008. Disponível em < <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/>>. Acesso: 09 fev 2010.

Brazil RP, Ryan L. Nota sobre a infecção de *Lutzomyia evandroi* (Diptera: Psychodidae) por *Ascocystis chagasi* (Adler & Mayrink, 1961) no Estado do Maranhão. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79: 375-376.

Brazil RP, Almeida DC, Brazil BG, Mamede SMPO. Chicken house as a resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. Parasitol 1991; 33: 113-117.

Brazil RP, Brazil BG. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In Rangel EF & Lainson R, editores. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. P. 257-274.

Brener Z. Calazar canino em Minas Gerais [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 1957.

Burns JM Jr., Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. Proc Natl Acad Sci U.S.A 1993; 90: 775-779.

Cabral M, O'grady Je, Gomes S, Souza JC, Thompson H, Alexander J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. Vet Parasitology 1998; 76: 173-180.

Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AVM, Jansen AM. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2003; 45: 79-83.

Cardoso L, Schallig HDFH, Francisco Neto, Kroom N, Rodrigues M. Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination test (FAST). *Acta Trop* 2004; 91: 95-100.

Carroll NM, Admson P, Okhravi N. Elimination of bacterial DNA from Taq DNA polymerases by restriction endonuclease digestion. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3402-4.

Carvalho, Gustavo Mayr de Lima. Flebotomíneos vetores e prevalência da Leishmaniose visceral canina, em área endêmica do município de Santa Luzia, região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais/Brasil. Belo Horizonte: [s.n.], 2006. 129 p. il. Orientação: Alda Lima Falcão; Co-orientação: Célia Maria Ferreira Gontijo. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa René Rachou. Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde. Disponível em: [http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/D\\_26.pdf](http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/D_26.pdf). Acesso em: 19 maio 2011.

Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcão AL, Lima ACVM, Gontijo CMF. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 8: 407-414.

Carvalho GML, Brazil RP, Falcão A, Andrade Filho JD. Distribuição Geográfica do Complexo *cortelezzii* (Diptera: Psychodidae:Phlebotominae) no Brasil. *Neotrop Entomol* 2009; 38(6): 876-879.

Carzorla D, Navas I, González R, Barazarte R. Anomalías en la genitalia masculina de flebotominos (Diptera: Psychodidae) del Estado Trujillo, Venezuela. *Bol Entomol Venez N.S* 1991; 6: 11-18.

Casanova C, Mayo RC, Rangel O, Mascarini LM, Pignatti MG, Galati EAB, Gomes AC. Natural *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva) infection in the Valley of the Mogi Guacu River, State of São Paulo, Brazil. Bol Dir Malariol San Amb 1995; 35(1): 77-84.

Chagas AW. Criação de flebótomos e transmissão experimental da leishmaniose visceral americana. Mem Inst Oswaldo Cruz 1940; 35: 327-333.

Chagas E. Visceral leishmaniasis in Brazil. Science 1936; 84: 397-8.

Chagas E, Cunha AM, Castro GO, Ferreira LC. Leishmaniose visceral americana: relatório dos trabalhos da comissão encarregada dos estudos da leishmaniose visceral americana em 1936. Mem Inst Oswaldo Cruz 1937; 32: 321-390.

Chagas E, Cunha AM, Ferreira LC, Deane L, Deane G, Guimarães FN, Von Paumgarten MJ, Sá B. Leishmaniose visceral americana (relatório dos trabalhos realizados pela Comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937). Mem Inst Oswaldo Cruz 1938; 33: 89-229.

Ciarabella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. Vet Rec 1997; 141: 539-543.

Coelho MV, Cunha AS, Falcão AR. Notas sobre um foco de calazar no sudoeste do Estado de Goiás. Rev Bras Malariol Doenças Trop 1965; 17: 143-148.

Córdoba-Lanús E, Grosso ML, Pineri JE, Valladares B, Salomón OD. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern argentina. Acta Trop 2006; 98: 1-5.

Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edward-Jones V, Kaczmanski EB, Fox AJ. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. J Clin Microbiol 2000; 38: 1747-1752.

Costa CA, Genaro O, Lana M, Magalhaes PA, Dias M, Michalick MSM. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. Rev Soc Bras Med Trop 1991; 21-25.

Costa CHN, Pereira HF, Pereira FCA, Tavares JP, Araujo MV, Gonçalves MJO. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil? Trans R Soc Trop Med Hyg 1999; 93: 464.

Costa-Val AP, Cavalcanti RR, Gontijo NF, Michalick MSM, Alexander B, Williams P, Melo MM. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, hematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. Vet J 2007; 174: 636-643.

Coutinho SG, Nunes MP, Morzochi MCA. A survey for american cutaneous leishmaniasis among dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where human diseases occur. Mem Inst Oswaldo Cruz 1985; 80: 17-22.

Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Fonseca JA, Melo MM, Balbino VQ, Ramalho-Ortigão M: *Lutzomyia longipalpis* s.l. in Brazil and the impact of the Sao Francisco River in the speciation of this sand fly vector. Parasit Vectors 2008; 1:16.

Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, Jiménez-Mejías M, Sirera G, Videla S, Alvar J. A Nested polymerase chain reaction (LnPCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in coinfecting patients with human immunodeficiency virus. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 96 (1): 185-189.

Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Cañavate C, Figueras MC, Alvar J. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol 2006; 44: 2343-2347.

Cunha AM. Infecções experimentais na Leishmaniose Visceral Americana. Bras Med 1938; 25: 571.

Cutolo AA, Zuben CJV, Galati EAB. Anomalia bilateral no gonóstilo de *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Ponte) (Diptera, Psychodidae). Rev Bras Parasitol Vet 2009; 18(3): 67-69.

Dantas-Torres F, Faustino MAG, Lima OC, Acioli RV. Epidemiologic surveillance of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Recife. Pernamb. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38: 444-445.

Dantas-Torres F, de Brito ME, Brandão-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban área of Brazil. Vet Parasitol 2006; 140(1-2): 54-60.

Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. Parasit Vectors 2009; 2(1): S1.

Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar, no Ceará. Hospital 1955; 48 (1): 79-97.

Deane LM, Deane MP. Observações sobre abrigos e criadouros de flebótomos no Noroeste do estado do Ceará. Rev Bras Malariol Doenças Trop 1957; 9: 225-246.

Deane LM. Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores no Estado do Ceará [Tese de doutorado]. Rio de Janeiro (RJ): Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro 1956.

Dias ES, França-Silva JC, Silva JC, Monteiro EM, Paula KM, Gonçalves CM, Barata RA, Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop 2007; 40(1): 49-52.

Dorval ME, Cristaldo G, Rocha HC, Alves TP, Alves MA, Oshiro ET, Brazil RP, Galati EA, Cunha RV. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of an endemic area in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104: 695-702.

Dye C, Killick-Kendrick R, Vitutia MM, Walton R, Killick-Kendrick M, Marith AE, Guy MW, Canavate MC, Hasibeder G. Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basis reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the Island of gozo. *Parasitol* 1992; 105: 35-41.

Dye C, Vidor E, Dereure J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol Infect* 1993; 103: 647-656.

Engvall E, Jonsson K, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta*, 1971; 251(3): 427-34.

Evans TG, Vasconcelos IAB, ima JW. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Assessment of serodiagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42: 118-123.

Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi FG, Sessa PA, Carias VRD, Jesus, AC, Alencar JTA. Participação do Cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986; 81: 155-163.

Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba-São Paulo (Brasil). *Rev Clín Vet* 2000; 28: 36-42.

Fernández-Pérez FJ, Méndez S, de la Fuente C, Gómez-Muñoz MT, Cuquerella M, Alunda JM. Improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 652-653.

Ferreira EC, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, Schallig H, Gontijo CM. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol* 2007; 146 (3-4): 235-241.

Ferreira, Eduardo de Castro. Estudo dos hospedeiros de *Leishmania* em área de ocorrência das leishmanioses no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Orientação: Célia Maria Ferreira Gontijo, Co-orientação: Aristóbolo Mendes da Silva. Belo Horizonte: [s.n.], 2010. 131 p. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Disponível em: [http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/T\\_20.pdf](http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/T_20.pdf). Acesso em: 19 maio 2011.

Ferrer LM. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Proceedings of the international canine leishmaniasis forum. Barcelona, Spain. Canine Leishmaniasis: an update. Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet, 1999. P. 6-10.

Fisa R, Gallego M, Castillejo MJ, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrio J, Gallego J, Portus M. Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain). The exemple of prirat focus. *Vet Parasitol* 1999; 83: 87-97.

Fisa R, Riera C, Gállego M, Manubens J, Portús M. *Nested* PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol* 2001; 99: 105-111.

Forattini OP, Santos MR – Nota sobre a infecção natural de *Phlebotomus intermedius* Lutz e Neiva, 1912, por formas em leptomonas, em um foco de leishmaniose tegumentar americana. *Arq Faculdade Hig Saude Publica Univ Sao Paulo* 1952; 17:171-4.

Forattini OP. Sobre os reservatórios naturais da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1960; 2: 195-200.

Forattini OP, Pattoli DBG, Rebello EX, Ferreira AO. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzootico de leishmaniose no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública* 1972; 6:431-433.

França-Silva JC, Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E. Epidemiology of canine visceral

leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 2003; 111: 161-173.

Fu G, Perona-Wright G, Barker DC. *Leishmania braziliensis*: characterization of a complex specific subtelomeric repeat sequence and its use in the detection of parasites. *Exp Parasitol* 1998; 90: 236-243.

Galati EAB, Nunes VLB, Dorval MEC, Oshiro ET, Cristaldo G, Espíndola MA, Rocha HC, Garcia WB. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Saúde Pública* 1996; 30: 115-128.

Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In Rangel EF & Lainson R, editores. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. P. 23–51.

Galati EAB. Morfologia e Taxonomia dos Flebotomíneos. In Rangel EF & Lainson R, editores. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. P. 23-206.

Galati EAB, Nunes VLB, Cristaldo G, Rocha HC. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Patol Trop* 2003; 32: 235-261.

Galati EAB, Nunes VL, Boggiani PC, Dorval MEC, Cristaldo G, Rocha HC, Oshiro ET, Damasceno-Júnior GA. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 175-193.

Genaro O, Mayrink W, Michalick MSM, Dias M, Costa CA, Melo MN. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; 83: 43.

Genaro O. *Leishmaniose Visceral Canina Experimental* [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 1993.

Genaro O, Michalick MSM . Leishmaniose visceral americana. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA, Editores. Parasitologia humana. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2000. P. 67-83.

Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Correia-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. J Comp Pathol 2006; 135: 100-107.

Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Carneiro CM, Mayrink W, Marques MJ, Tafuri WL, Correia-Oliveira R, Reis AB. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis, Vet Immunol Immunopathol 2008; 121: 23-33.

Gomes AC, Rabello EX, Santos JLF, Galati EAB. Estudo experimental da frequência de flebotomíneos a ecótopos artificiais com referência especial a *Psychodopygus intermedius*. Rev Saúde Pública 1980; 14: 540-556.

Gomes AC, Galati EAB. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 5. Estratificação da atividade especial e estacional de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) em áreas de cultura agrícolas da região do Vale do Ribeira, estado de São Paulo, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1987; 82: 467-473.

Gomes AC, Neves VLFC. Estratégia e perspectiva de controle da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop 1998; 6: 553-558.

Gontijo CMF, da Silva ES, de Fuccio MB, de Sousa MCA, Pacheco RS, Dias ES, Andrade Filho JD, Brazil RP, Melo MN. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. Acta Trop 2002; 81: 143-150.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol 2004; 7(3): 338-349.

Gontijo CMF, Silva ES, Pacheco RS, Dias ES, Oliveira FS, Michalsky EM, et al.

Epidemiologia molecular da leishmaniose tegumentar no Município de Aracuai, Minas Gerais, Brasil. Soc Ibero-Am Inf Cient 2005. Acesso em nov 2005. Disponível em: <http://www.siicsalud.com/des043/05623013.htm/>.

Gradoni L, Pozio E, Bettini S, Gramiccia M. Leishmaniosis in Tuscany (Italy). Part III. The prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto province. Trans R Soc Trop Med Hyg 1980; 74: 421-422.

Gradoni L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum; 2002 Feb 6-9; Sevilha, Spain. Boxmeer: The Netherlands; 2002. P. 7-14.

Grupo Cipa. Bermudes H, Dedet JP, Falcão AL, Feliciangeli D, Ferro C, Galati EAB, Gomes EL, Herrero MV, Hervas D, Lebbe J, Morales A, Oguzuku E, Perez E, Rangel EF, Sherlock IA, Torres M, Vignes R, Wolff M . Proposition of a standart description for Phlebotomine sand flies. Parasitol 1991; 33: 127-135.

Guarga JL, Lucientes J, Peribáñez MA, Molina R, Garcia MJ, Castillo JA. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. Acta Trop 2000; 77: 203-207.

Guernaoui S, Ramaoui K, Rahola N, Barnabe C, Sereno D, Boumezzough A. Malformations of the genitalia in male *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) (Diptera: Psychodidae). J Vector Ecol 2009; 35(1): 13-19.

Haddow AJ. Studies on the biting-habits and medical importance of East African mosquitos in the genus *Aedes*. I. Subgenera *Aedimorphus*, *Banksinella* and *Nunnius*. Bull Entomol Res 1960; 50: 759-779.

Hamilton JG, Maingon RD, Alexander B, Ward RD, Brazil RP. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. Med Vet Entomol 2005; 19: 480-488.

Hashiguchi Y, Chiller T, Inchausti A, Arias A, Kawabata M, Alexander JB. Phlebotomine sandfly species in Paraguay and their infection with *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* 1992; 86: 175-180.

Hasibeder G, Dye C, Carpenter J. Mathematical modelling and theory for estimating the basic reproduction number of canine leishmaniasis. *Parasitol* 1992; 105: 43-53.

Hommel M, Peters W, Ranque J, Quilici M, Lanotte G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1978; 72: 213-218.

Hu XS, Yang WT, Lu HG, Yan HP, Cheng JP, Ma Y, Jin BQ, Zhang T. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. *J Parasitol* 2000; 86(4): 822-826.

Ikeda-Garcia FA, Feitosa MM. Métodos de diagnósticos da leishmaniose visceral canina. *Clin Vet* 2006; 62:32-38.

Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet Parasitol* 2003; 113: 99-113.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades@: Minas Gerais - Belo Horizonte. Brasília: IBGE, 2010. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso: 17 jan. 2011.

Jorquera A, González R, Marchán-Marcano E, Oviedo M, Matos M. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in State of Sucre, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100 (1): 45-48.

Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopiña M, Marco JD, Barroso PA, Gomez EA, Mimori T, Korenaga M, Iwata H, Nonaka S, Hashigushi Y. Detection and

identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 2005; 72: 87-93.

Killick-Kendrick R. Studies and criteria for the incrimination of vector and reservoir hosts of the leishmaniasis. In: Proceeding of the International Workshop on Control Strategies for the leishmaniasis; 1987 Jun 1-4; Ottawa, Canadá. 1988. P. 272-280.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. Med Vet Entomol 1990; 4: 1-24.

Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). J Am Anim Hosp Assoc 1999; 35: 376-383.

Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, Dedet JP, Bastien P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. Parasitol 2002; 125: 197-207.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso state, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. Trans R Soc Trop Med Hyg 1970; 64 (5): 654-667.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1987; 81: 517.

Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis – The neotropical *Leishmania* species. In: Cox FEG, Kreier JP, Dwakelin. Topley & Wilson's, editores. Microbiology and Microbial Infections. London, Sydney, Auckland: S Arnold; 1998. P. 241-266.

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of american visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100(8): 811-827.

Lampo M, Torgerson D, Marquez LM, Rinaldi M, Garcia CZ, Arab A. Occurrence of sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Venezuela First evidence from reproductively isolated sympatric populations. Am J Trop Med Hyg 1999; 61:1004-9.

Lanotte G, Rioux JA, Perieres J, Vollhardt Y. Ecologie des leishmaniasés dans le sud de la France<sup>10</sup>. Les formes évolutives de la leishmaniose vésicérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. Ann Parasitol Hum Comp 1979; 54: 277-279.

Lanzaro PB, Ostrovska K, Herrero MV, Lawyer PG, Warburg A. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. Am J Trop Med Hyg 1993; 48(6):839-847.

Le Pont F, Mollinedo S, Mouchet J, Desjeux P. Leishmaniose en Bolivie. IV – Le chien dans les cycles des leishmanioses on Bolivie. Mem Inst Oswaldo Cruz 1989; 84: 391-392.

Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos Vasilios, Koutinas AF, Galatos AD, Mylonakis ME. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. Vet Parasitol 2002; 109: 19-27.

Llanos-Cuentas EA, Roncal N, Villaseca P, Paz L, Ogusuku E, Pérez JE, Cáceres A, Davies CR. Natural infections of *Leishmania peruviana* in animals in the Peruvian Andes. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999; 93: 15-20.

Loiola CF, Da Silva DA, Galati EA. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and species abundance in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102: 581-5.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275.

Lutz A, Neiva A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1912; 4: 84-95.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Serra CMB, Pereira SA, Figueiredo FB, Confort EM, Quintela LP, Marzochi MCA. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs. Parasitol 2005; 97: 73-76.

Maia C, Ramada J, Cristóvão J, Gonsalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. Vet J 2009; 179: 142-144.

Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Gomes MLS, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. Cad Saúde Pública 2008; 24(12): 2941-7.

Maignon RD, Ward RD, Hamilton JG, Noyes HA, Souza N, Kemp SJ, Watts PC. Genetic identification of two sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceara State, Brazil. Mol Ecol 2003; 12: 1879-1894.

Maignon RD, Ward RD, Hamilton JG, Bauzer LG, Peixoto AA. The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to *Leishmania* transmission? Trends Parasitol 2008; 24: 12-17.

Mancianti F, Gradoni L, Gramiccia M, Pieri S, Marconcini A. Canine leishmaniasis in the isle of Elba, Italy. Trop Med Parasitol 1986; 37: 110-112.

Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniosis control. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. Trans R Soc Trop Med Hyg 1988; 82: 566-567.

Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A. Comparasion between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. Vet Parasitol 1994; 59: 13-21.

Mancianti F, Pedonese F, Poli A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. Vet Parasitol 1996; 65: 1-9.

Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N, Gravino AE. Comparison of different sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. Vet Parasitol 2004; 125: 251-262.

Marcondes CB, Day JR, Ready PD. Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *Lu neivai* and *Lu whitmani*, and their roles as vectors of *Leishmania braziliensis*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1997; 91: 725-726.

Marcondes CB, Lozovei AL, Vilela JH. Geographic distribution of phlebotomine sandflies of the *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) complex (Diptera, Psychodidae). Rev Soc Bras Med Trop 1998; 31(1): 51-58.

Marcondes CB. Anomalies of *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94(3): 365-366.

Marcondes CB. A proposal of generic and subgeneric abbreviations of phlebotomines sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. Entomol News 2007; 118: 351–356.

Margonari C, Soares RP, Andrade Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL, Silva RA, Oliveira ME, Borges EC, Sanguinette CC, Melo MN. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* Infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. J Med Entomol 2010; 47(6):1212-9.

Marsden PD, Jones TC. Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis. In Chang KP & Bray RS, editors. Leishmaniasis. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers; 1985. P. 183-198.

Martínez-Moreno A, Moreno T, Martínez-Moreno FJ, Acosta L, Hernandez S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 48: 209-220.

Martins AV, Falcão AL, Silva JE. Estudo sobre os flebótomos do Estado de Minas Gerais. XIV: Descrição de *Lutzomyia termitophila*, Martins, Falcão & Silva, 1964 (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Rev Bras Biol* 1977; 37 (3): 645-647.

Martins AV, Williams P, Falcão AL. American Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Academia Brasileira de Ciências. Rio de Janeiro (RJ): Herman Lent; 1978.

Martins F, Silva IG, Bezerra WA, Maciel JM, Silva HHG, Lima CG, Cantuária PB, Ramos OS, Ribeiro JB, Santos AS. Diversidade e frequência da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em áreas de transmissão de leishmaniose no Estado de Goiás. *Rev Pat Trop* 2002; 31 (2): 211-224.

Martín-Sánchez J, Lopez-Lopez MC, Acedo-Sánchez C, Castro-Fajardo JJ, Pineda JA, Morillas-Marquez F. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. *Parasitol* 2001; 122: 607-615.

Marzochi MCA, Marzochi KBF, Carvalho RW. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitol Today* 1994; 10(1): 34-37.

Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmanioses in Brazil – Emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saúde Pública* 1994; 10: 359-375.

Mauricio IL, Stohard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 2000; 16: 188-189.

Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, da Costa CA, Falcão AR, Melo MN, Falcão AL. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 1979; 73: 123-137.

Michalick MSM. Leishmaniose visceral canina: diagnóstico. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2003; 40: 144-145.

Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFE, Secundino NFC, Dias ES. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2002; 44: 255-259.

Michalsky EM, Rocha MF, Lima ACVMR, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, Santos SL, Barata RA, Romanha AJ, Forte-Dias CL, Dias ES. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol* 2007; 147:67-76.

Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde/Centro Nacional de Epidemiologia. Leishmaniose Visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. *Bol Epidemiol* 2001; 6: 1-11.

Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Gonçalves M, Reis MG, Carvalho L, Fernandes O, Barral-Netto M, Barral A. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 185-188.

Mohammed AR, Wright EP, Abdel Rahman AM, Kolk A, Laarman JJ, Pondman KW. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparasion of ELISA immunofluorescence and indirect haemagglutination. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80: 271-274.

Molina R, Amela C, Nieto J, San Andres M, Gonzales F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Med Hyg* 1994; 88: 491-493.

Monteiro EM, França-Silva JC, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, Machado-Coelho GLL, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias ES. Leishmaniose visceral: Estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38: 147- 152.

Moreira MAB, Luvizotto MCR, Garcia JF, Corbett CEP, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. Vet Parasitol 2007; 145: 245-252.

Nascimento JC, Paiva BR, Malafronte RS, Fernandes WD, Galati EAB. Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a visceral-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 2007; 49: 119-122.

Nicolle C, Comte D. Origine Canine Du Kalazar. Bull Soc Pathol Exot 1908; 1: 299-301.

Nunes CM, Pires MM, Silva KM, Assis FD, Gonçalves Filho J, Perri SHV. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in na endemic área. Vet Parasitol 2010; 170: 131-133.

Nunes VLB, Galati EAB, Nunues DB, Zinezzi RO, Savani ESMM, Ishikawa E, Camargo MCGO, D'Áurea SRN, Cristaldo G, Rocha HC. Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 2001; 34(3): 301-302.

Oliva G, Scalone A, Manzillo VF, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and *Nested*-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. J Clin Microbiol 2006; 44: 1318-1322.

Oliveira AC, Batista SM, Falcão AL. Calazar em Minas Gerais. Revisão dos dados epidemiológicos obtidos até 1958. Hospital 1959; 56: 625-643.

Oliveira AG, Andrade Filho JD, Falcão AL, Brazil RP. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. *Cad Saúde Pública* 2003; 19: 933-944.

Oliveira AG, Galati EAB, Oliveira O, Oliveira GR, Espíndola IAC, Dorval MEC, Brazil RP. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 869–874.

Oliveira CI, Báfica A, Oliveira F, Favali CB, Correa T, Freitas LAR, Nascimento E, Costa JM, Barral A. Clinical utility of polymerase chain reaction – based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 149-153.

Oliveira CL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil, 1994-1997. *Cad Saúde Pública* 2001; 17(5): 1231-9.

Oliveira LCP, Araújo RR, Alves CR, Mouta-Confort E, López JÁ, Mendonça-Lima FW. Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Ávila, State of Bahia, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43(4): 400-404.

Oliveira LS, Julião FS, Souza VM, Freitas, Souza BMPS, Paule BJA, Aguiar PHP, Melo SMB, CR Franke. A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. *Ciência Animal Bras* 2005; 6(1): 41-47.

Oliveira SMP, Afonso RCH, Dias CMG, Brazil RP. Estudo da fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Santa Cruz, município do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Brasil Entomol* 1995; 39: 547-551.

Oliveira-Pereira YN, Rebelo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF. Molecular diagnosis of the natural infection rate due to *Leishmania* sp in sandflies (Psychodidae, *Lutzomyia*)

in the Amazon region of Maranhão, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39(6): 540-543.

Padilla AM, Marco JD, Diosque P, Segura MA, Mora MC, Fernández MM, Malchiodi EL, Basombrío MA. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission on American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina. Vet Parasitol 2002; 110: 1-10.

Paiva BR, Oliveira AG, Dorval MEMC, Galati EAB, Malafronte RS. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. Acta Trop 2010; 115: 126-130.

Palatinik-de-Souza CB, Santos WR, França-Silva JC, Costa RT, Reis AB, Palatinik M, Mayrink W, Genaro O, Palatinik-de-Souza CB. Am J Trop Med Hyg 2001; 65(5): 510-517.

Paraense L, Chagas AW. Transmissão experimental da leishmaniose visceral americana pelo *Phlebotomus intermedius*. Nota prévia. Bras Med 1940; 54: 179-180.

Pech-Maya, Escobedo-Ortegon FJ, Berzunza-Cruz M, Rebollar-Téllez EA. Incrimination of four sandfly species previously unrecognized as vectors of *Leishmania* parasites in Mexico. Med Vet Entomol 2010; 24: 150–161.

Pérez JE, Ogusuku E, Inga R, Lopez M, Monje J, Paz L, Nieto E, Arevalo J, Guerra H. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp in Peru. Trans R Soc Trop Med Hyg 1994; 88: 161-164.

Pinto IS, Santos CB, Ferreira AL, Falqueto A. Variations in the Gonostyle of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). Neotrop Entomol 2010; 39(5):732-735.

Pirmez C, Coutinho SG, Marzochi MC, Nunes MP, Grimaldi G Jr. Canine American cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania (braziliensis) braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. Am J Trop Med Hyg 1988; 38(1):52-8.

Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Figueiredo Barbosa AF, Britto CC. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania*(*Viannia*)*braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99: 905-913.

Pita-Pereira D, Cardoso MA, Alves CR, Brazil RP, Britto CC. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Trop* 2008; 107: 66-69.

Poot J, Rogers ME, Bates PA, Vermeulen A. Detailed analysis of an experimental challenge model for *Leishmania infantum* (JPC strain) in dogs. *Vet Parasitol* 2005; 130 (1-2): 41-53.

Pozio E, Gradoni S, Bettini M, Gramiccia M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Trop* 1981; 38: 383-393.

Pugedo H, Barata RA, França-Silva JC, Silva JC, Dias ES. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38(1): 70-72.

Quaresma PF, Murta SM, Ferreira EC, da Rocha-Lima AC, Xavier AA, Gontijo CM. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by realtime PCR. *Acta Trop* 2009; 111(3): 289-294.

Queiroz PV, Monteiro GR, Macedo VP, Rocha MA, Batista LM, Queiroz JW, Jerônimo SM, Ximenes MF. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. *Res Vet Sci* 2009; 86: 267-273.

Queiroz RG, Vasconcelos IAB, Sousa RN, Pessoa FAC, Alencar JE, David JR. Phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) fauna survey in an American

cutaneous leishmaniasis (ACL) focus in Baturité, Ceará State, northeast Brazil. *Parasitol* 1991; 33(1): 159-167.

Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF. Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 em área endêmica de leishmaniose tegumentar no estado do Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984; 79: 395-396.

Rangel EF, Azevedo ACR, Andrade CA, Souza NA, Wermelinger ED. Studies on sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990; 85: 39-45.

Rangel EF, Lainson R. Ecologia das Leishmanioses. In Rangel EF, Lainson R, editores. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. P. 291-309.

Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) e urbanização da leishmaniose visceral no Brasil. *Cad Saúde Pública* 2008; 24: 2948-2952.

Rebêlo JMM. Freqüência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil, *Cad Saúde Pública* 2001; 17: 221-227.

Reis AB. Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção. [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.

Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, Guerra LL, Andrade RA, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho AO. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissues parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 2206a; 112: 1012-6.

Reis AB, Martins-Filho AO, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Corrêa-Oliveira R. Parasite density and impaired

biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 2006b; 81: 68-75.

Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Guerra LL, Carvalho MG, Mayrink W, Genaro O, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho AO. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin Exp Immunol* 2006c; 146(2): 303-311.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL, Corrêa-Oliveira R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 128: 87-95.

Ricklefs RE. *A economia da natureza*. Rio de Janeiro (RJ): Editora Guanabara, Koogan; 2003.

Rioux JÁ, Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Yong CJ, Turner DP, Lanotte G, Bailly M. Écologie des leishmanioses dans le Sud de la France. La leishmaniose viscérale canine: Succès de la transmissions expérimentale. "Chien-phlébotome-chien" la piqure de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir. *Ann Parasitol* 1979; 54: 267.

Rodrigues EHG, Brito MEF, Mendonça MG, Werkhäuser RP, Coutinho EM, Souza WV, Albuquerque MFPM, Jardim ML, Abath FGC. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3572-6.

Rodriguez N, Aguillar CM, Barrios MA, Baker DC. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sand flies by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 47-49.

Rodriguez-Córtés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timón M, Altet L, Solano-Gallego L, Sanchez-Robert E, Francino O, Alberola JA. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol* 2007; 37(6): 683-93.

Rondon FC, Bevilacqua CM, Franke CR, Barros RS, Oliveira FR, Alcântara AC, Diniz AT. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. *Vet Parasitol* 2008; 155: 24-31.

Ross, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan Further notes on leishman's bodies. *Brit Med J* 1903; 2: 1261-1401.

Roura X, Sanchez L, Ferrer L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet Rec London* 1999; 144: 262-264.

Rowton E, Mata M, Rizzo N, Navin T, Porter C. Vectors of *Leishmania braziliensis* in the Petén, Guatemala. *Parasitol* 1991; 33: 501-504.

Safi SH, Evans DA. A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis of leishmaniasis in the Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83: 334 -337.

Salomón OD, Rossi GC, Cousiño B, Spinelli GR, Rojas de Arias A, López del Puerto DG Ortiz AJ. Phlebotominae sand flies in Paraguay. Abundance distribution in the southeastern region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 185-190.

Salomón OD, Wilson ML, Munstermann LE, Travi BL. Spatial and temporal patterns of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis focus in northern Argentina. *J Med Entomol* 2004; 41: 33-39.

Santos GPL, Sanavria A, Marzochi MCA, Santos EGOB, Silva VL, Pacheco RS, Mouta-Confort E, Espíndola CB, Souza MB, Ponte CS, Conceição NF, Andrade MV. Prevalence of canine infection from endemic areas of American cutaneous leishmaniasis in Paracambi District, Rio de Janeiro State, between 1992 and 1993. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38(2): 161-6.

Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1998; 12: 315-317.

Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romão P, Silveira H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 88: 21-30.

Saraiva L, Lopes JS, Oliveira GBM, Batista FA, Falcão AL, Andrade Filho JD. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39: 56-63.

Saraiva L, Carvalho GML, Sanguinette CC, Carvalho DAA, Falcão AL, Andrade Filho JD. Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) collected on the banks of the Velhas River in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103: 843-846.

Saraiva L, Carvalho GML, Gontijo CMF, Quaresma PF, Lima ACVMR, Falcão AL, Andrade Filho JD. Natural Infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J Med Entomol* 2009; 46(5): 1159-1163.

Saraiva L, Andrade Filho JD, Silva SO, Andrade ASR, Melo MN. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105(8): 1033-9.

Savani ES, Nunes VL, Galati EA, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM,. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Vet Parasitol* 2009; 160 (1-2): 18-24.

Savani ESMM, Schimonsky BV, Camargo MCGO, D'auria SRN. Vigilância da leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. *Rev Saúde Pública* 2003; 37(2): 260-262.

Schoönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, Jaffe C. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47: 349-358.

Shannon, RC. Methods for collecting and feeding mosquitoes in jungle yellow fever studies. Am J Trop Med Hyg 1939; 19: 131-148.

Shaw JJ. New world leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In Farrel J, editors. World Class Parasites: *Leishmania*. Vol 4. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers; 2003. P. 11-31.

Sherlock IA, Guitton H. Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia III. Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. Rev Bras Malariol Doenças Trop 1969; 21: 541-548.

Sherlock IA, Miranda JC. Is vector and reservoir control possible for visceral leishmaniasis? Rev Soc Bras Med Trop 1992; 25: 84.

Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91(6): 671-683.

Sherlock IA. Importância Médico-Veterinária: A importância dos flebotomíneos. In Rangel EF & Lainson R, editores. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. P. 15-21.

Sideris V, Papadopoulou G, Dotsika E, Karagouni E. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. Eur J Epidemiol 1999; 15: 271-276.

Silva EA, Andreotti R, Dias ES, Barros JC, Brazuna JCM. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Exp Parasitol 2008; 119: 343-348.

Silva ES, Van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CMF, Schallig HDFH, Brazil RP. Diagnosis of canine Leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, by parasite, antibody and DNA detection assays. Vet Res Commun 2006; 30: 637-643.

Silva SM. Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937), submetidos a um protocolo terapêutico em clínica veterinária de Belo Horizonte [Dissertação de mestrado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.

Soares MRA, Mendonça IL, Bonfim JM, Rodrigues JA, Werneck GL, Costa CHN. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Trop* 2011; 117:6-9.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology, Spain. *J Clin Microbiol* 2001; 39 (2): 560-563.

Soto SIU, Lehmann T, Rowton ED, Velez ID, Porter CH. Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. *Mol Phylogenet Evol* 2001; 18: 84-93.

Souza CM, Pessanha JE, Barata RA, Monteiro EM, Costa DC, Dias ES. Study on Phlebotomine Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Fauna in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99 (8): 795-803.

Souza NA, Vigoder FM, Araki AS, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA. Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil. *J Med Entomol* 2004; 41: 906-913.

Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gomen L, Baneth G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis* 2004; 189: 1779-1833.

Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 951-958.

Travi BL, Ferro C, Cadena H, Montoya-Lerma J, Adler GH. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. *Res Vet Sci* 2002; 72: 83-86.

UCDB em foco. Leishmaniose mata 18 em MS. Jornal Laboratório do Curso de Jornalismo. Ano V. edição n. 57, p.4, 2006.

Uchôa CMA, Serra CMB, Duarte R, Magalhães CM, Silva RM, Theophilo F, Figliuolo LP, Horta FT, Madeira MF. Aspectos sorológicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 2001; 34(6): 563-568.

Van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. Mol Biochem Parasitol 1992; 51: 133-142.

Ward RD, Phillipis A, Marcondes CB. The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. In: MW Service, editores. Biosystematics of haematophagous insects. Oxford University Press: Oxford; 1988. P. 257-269.

Watts PC, Hamilton JG, Ward RD, Noyes HA, Souza NA, Kemp SJ, Feliciangeli MD, Brazil R, Maingon RD. Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. Am J Trop Med Hyg 2005; 73: 734-743.

World Health Organization. Leishmaniasis. Geneva: WHO, 1995. Disponível em: <http://www.who.int/>. Acesso em: 17 janeiro 2011.

World Health Organization. Leishmaniasis. Geneva: WHO, 2006. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis>. Acesso em: 09 fevereiro 2009.

Ximenes MFFM, Souza MF, Castellón EG. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94: 427-432.

Ximenes MFFM, Castellón EG, Souza MF, Freitas RA, Pearson RD, Wilson ME, Jerônimo SMB. Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. J Med Ent 2000; 37: 162-169.

Ximenes MFFM, Bermudez EGC, Freitas RA. Morphological genitalic anomaly in *Lutzomyia longipalpis* sensu lato (Lutz & Neiva, 1912) collected in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. Entomotróp 2002; 17(2): 183-184.

Yang S, Rothman R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. The Lancet London 2004; 4: 337-348.

Young DG, Lawyer RG. New World vectors of the leishmaniasis. Curr Top Vector Res 1987; 4: 29-71.

Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Am Entomol Inst 1994; 54: 881.

Zeledón R, Murillo J, Gutierrez H. Observaciones sobre la ecología de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) y posibilidades de existencia de leishmaniasis visceral en Costa Rica. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79:455-459.