

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**ESTUDO ECOEPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO
DE ITAÚNA, MINAS GERAIS, 2015 – 2016**

por

Josiane Valadão Lopes Marques

Belo Horizonte
2019

TESE D/CS- IRR

J.V.L. MARQUES

2019

Josiane Valadão Lopes Marques

**ESTUDO ECOEPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO
DE ITAÚNA, MINAS GERAIS, 2015 – 2016**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde – área de concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientação: Dr. Edelberto Santos Dias
Coorientação: Dra. Érika Michalsky Monteiro

Belo Horizonte
2019

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

M348
2019

Marques, Josiane Valadão Lopes.

Estudo ecoepidemiológico da leishmaniose visceral no município de Itaúna, Minas Gerais, 2015-2016 /Josiane Valadão Lopes Marques. – Belo Horizonte, 2019.

XVIII, 183 f.: il.; 210 x 297 mm.

Bibliografia: f. 137-175

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose Visceral 2. *Lutzomyi*/parasitologia
3. *Leishmania infantum*. Título. II. Dias, Edelberto Santos (Orientação). III. Michalsky, Érika Monteiro (Coorientação).

CDD – 22.Ed. – 616.936

Josiane Valadão Lopes Marques

**ESTUDO ECOEPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO
DE ITAÚNA, MINAS GERAIS, 2015 - 2016**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde – área de concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias

Banca examinadora:

Prof. Dr. Edelberto Santos Dias – IRR/Fiocruz MG (Presidente)

Prof. Dr. Maurício Roberto Viana Sant'Anna – UFMG

Prof. Dr. Eduardo de Castro Ferreira – IRR /Fiocruz MS

Prof. Dr. Edward José de Oliveira – IRR/Fiocruz Minas

Prof. Dra. Carlota Josefovicz Belisário – IRR/Fiocruz Minas

Prof. Dra. Lara Saraiva (Suplente) – IRR/Fiocruz Minas

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 25/04/2019

**“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez”.**
(George Bernard Shaw)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que abençoou cada etapa; que sempre me deu forças nos momentos de fraqueza, e me permitiu desfrutar de muitas alegrias.

Ao meu orientador, Dr. Edelberto Santos Dias, que sempre me apoiou, motivou e proporcionou tantos ensinamentos. Agradeço por todas as oportunidades que tive desde que ingressei no laboratório, em 2009. Pela oportunidade de aprofundar meus conhecimentos, por todos os projetos que pude colaborar, a oportunidade de trabalhar na colônia de flebotomíneos, as viagens para realização do xenodiagnóstico, que mesclaram em momentos árduos e de muita descontração. Obrigada por ser um homem tão justo e exemplo de profissional.

À Dra. Érika Michalsky, que, muito mais que uma co-orientadora, será eternamente uma amiga. Agradeço principalmente pela paciência, constante ajuda e ensinamentos, lições e motivação. Você é uma fonte de conhecimento que gostaria de desfrutar eternamente. Obrigada por ser um importante alicerce em minha vida profissional e pessoal!

A todos os amigos do TFL: Fabiana, Nathália, Rosana, Lívia, Daniely, Ana Carolina, Jucélia, Andreza, Greicielly, Jéssica, Lara, Agnes, Ana Cristina. Aos diversos amigos da pós-graduação e de outros laboratórios. Muito obrigada pelo convívio prazeroso, pelos conselhos sempre oportunos, pelo apoio, amizade e carinho. Sempre conversas agradáveis, de positividade e bom humor, que tornaram os dias mais leves. Também pelas colaborações nos experimentos e trabalhos de campo.

A meus alunos de Iniciação científica, Nathália e Adão, que foram ICs maravilhosos, trabalharam duro neste projeto, sempre colaborando com dedicação. Hoje Nathália uma mestre e Adão um consultor! Que orgulho de ver o crescimento de vocês! Agradeço pela oportunidade de coorientar e de aprender com vocês, foi uma experiência surpreendente!

Aos colaboradores que foram fundamentais na construção deste estudo: Ana Cristina Rocha, Daniel Moreira, Dr. João Carlos França, os quais, de alguma forma, auxiliaram nos trabalhos de campo ou de laboratório. Trabalho sempre laborioso e realizado com seriedade e carinho por todos.

A Dra. Letícia Cavalari e Dra. Consuelo Latorre, que gentilmente cederam seu tempo para colaborar nas análises estatísticas, enriqueceram muito este trabalho, e pela disposição e ensinamentos.

A Plataforma sequenciamento e seus colaboradores, que participaram deste trabalho e contribuíram muito para o amadurecimento deste trabalho.

Ao Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, por fazer parte desta instituição. Ao Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde (IRR/Fiocruz), pela oportunidade concedida no curso de doutorado, apoio financeiro e logístico durante a realização deste projeto e por todo o conhecimento adquirido.

Ao meu marido Júlio, sempre companheiro, melhor amigo e incentivador. Você é minha alegria! Quero compartilhar todas as minhas vitórias com você, afinal você participa de cada momento e merece toda alegria. Te amo!

Agradeço à minha família, em especial à mamãe Geusely e ao meu irmão Gustavo, pelo apoio, torcida incessante e confiança. Aos sobrinhos Henrique e Victória, que me deram 100% de alegria. Sem vocês, eu não teria o mesmo entusiasmo.

Ao meu querido pai Getúlio, por seu amor. Só tenho de agradecer-lhe todo o incentivo, exemplo e força de vontade. Que me ensinou a importância dos estudos. Obrigada por me guiar aí de cima. Te amo!

Aos meus familiares: avós, tios, primos e amigos, que me ajudaram e apoiaram-me para trilhar este caminho tortuoso da pesquisa. Que compreenderam minha ausência nesse período. Amo vocês!

À minha segunda família: Edite e Luiz, Nara e Cristiano, Alessandro e Tânia e família de Carmo do Cajuru. Por carinhosamente acreditar e cuidar de mim, principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos amigos Eduardo, Carlos Henrique, Patrícia, Alexandre, Derly, Cláudio, Vinícios, Luciana, Wenderson, Tamara, Letícia, que pacientemente me apoiaram, cederam os ombros e ouvidos e, com muito carinho, ficaram na torcida.

Aos moradores de Itaúna, por abrirem a porta de suas casas para a realização deste trabalho, mesmo não compreendendo a complexidade da pesquisa, disponibilizaram seu tempo com alegria. Espero que estes resultados possam beneficiá-los.

À Secretaria de Vigilância Epidemiológica de Itaúna, em especial à Virgínia, Jarbas e Marlene, e aos agentes de saúde, obrigada pela parceria e apoio.

Aos cães participantes deste trabalho, minha infinita gratidão!

Agradeço às instituições financiadoras que viabilizaram a execução desse estudo:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)
Instituto René Rachou (IRR)

Apoio logístico

Centro de Controle de Zoonoses do Município de Itaúna- CCZ

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) tem sido foco de preocupação dos órgãos de saúde pública e sua importância é devido a possibilidade de a doença assumir formas graves e letais em humanos. Nos últimos dez anos foram notificados 14 casos de LV em Itaúna, o que caracteriza o município como área recente e esporádica de transmissão. A proposta deste trabalho foi estudar os aspectos ecoepidemiológicos envolvidos na transmissão da LV no município de Itaúna. Capturas entomológicas foram realizadas em onze bairros do município, utilizando armadilhas luminosas do tipo HP, instaladas no peri e intradomicílio, durante o período de maio de 2015 a abril de 2016, para avaliar a influência dos fatores climáticos na distribuição mensal dos flebotomíneos capturados em campo, bem como detectar a infecção e caracterizar a espécie de *Leishmania* nestes flebotomíneos. Foi realizado inquérito canino amostral por meio do diagnóstico sorológico, utilizando os testes DPP e ELISA. Sessenta cães soropositivos foram necropsiados para obtenção de amostras de pele, linfonodo mesentérico, baço e aspirado de medula óssea. Estes tecidos foram analisados por métodos parasitológicos e moleculares, visando à confirmação da infecção e caracterização da espécie de *Leishmania* circulante nestes reservatórios. Durante o período de estudo, foram capturados 1786 flebotomíneos, destes 84% dos exemplares eram *Lutzomyia longipalpis*. Em relação ao comportamento dos espécimens, 20% foram capturados no intradomicílio. A correlação entre o número de flebotomíneos capturados com as variáveis climáticas foi estatisticamente significativa para a variável temperatura. Dos 133 pools analisados, nove apresentaram-se positivos para *Leishmania*, ficando a taxa mínima geral de infecção em 2,91%. Após o sequenciamento foi confirmado que a espécie circulante nos flebotomíneos é *Leishmania (L) infantum*. Em relação aos estudos de infecção nos tecidos caninos, os resultados da PCR demonstraram que das 60 amostras estudadas, 59 (98%) apresentaram-se positivas para o baço, 58 (98%) para medula óssea, 57 (95%) para pele e 56 (93%) para o linfonodo mesentérico. Tanto na mielocultura como no diagnóstico em lâmina a taxa de positividade foi de 75%. O resultado do sequenciamento demonstrou *Le. infantum* a espécie circulante nos cães. A taxa de prevalência canina foi de 5,3%. Os mapas apontaram uma ampla distribuição de LVC por todo o município de Itaúna, revelando quatro bairros apresentando alto risco de transmissão. Com o conhecimento da tríade parasito-vetor-hospedeiro no município, podemos indicar mais precisamente os locais para intensificações das ações de controle de LV empregadas pelo serviço de saúde.

Palavras Chaves: Leishmaniose Visceral, Flebotomíneos, Ecoepidemiologia

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a public health concern in Brazil and in other developing countries, since it is possible to develop serious and lethal forms in humans. In the last 10 years, fourteen cases of LV have been reported in Itaúna (Minas Gerais state), which characterizes the municipality as a recent and sporadic transmission area for the disease. The purpose of this study was to investigate the ecoepidemiological aspects involved in the transmission of VL in Itaúna. Entomological captures were carried out in eleven neighborhoods of the municipality using HP-type light traps installed in the peri and intra-domicile, during the period from May 2015 to April 2016, in order to evaluate the influence of climatic factors on the monthly distribution of the phlebotomine sandflies, as well as to detect *Leishmania* infection in the field-captured insects. Canine sample survey was carried out through serological diagnosis, using DPP® and ELISA tests. Sixty seropositive dogs were necropsied to obtain skin, mesenteric lymph node, and spleen samples, as well as bone marrow aspirates. These tissues were analyzed by parasitological and molecular methods, aiming the confirmation of *Leishmania* infection and the characterization of the circulating *Leishmania* species in these reservoirs. During the study period, 1786 specimens of phlebotomine sandflies were captured, among which 84% were identified as *Lutzomyia longipalpis*. Regarding the anthropophilic behavior of the specimens, 20% were captured in the intradomicile. The correlation between the number of sandflies captured with the climatic variables was statistically significant for the temperature. Nine among 133 pools of phlebotomine sandflies analyzed were positive for *Leishmania*, with the general minimum infection rate being 2.91%. After DNA sequencing, we confirmed that the circulating species in the captured phlebotomine sandflies is *Leishmania infantum*. Regarding the canine tissue infection data, PCR results showed that 59 (98%) of the 60 spleen samples studied were positive for the spleen, 58 (98%) for bone marrow, 57 (95%) for skin and 56 (93%) for the mesenteric lymph node. In myeloculture and exam by imprinting the positivity rate was 75%. The sequencing showed *Le. infantum* to the circulating species in dogs. The canine prevalence rate was 5.3%. The maps showed a wide distribution of VL throughout the Itaúna municipality, revealing four neighborhoods presenting high risk of transmission. With the knowledge of the parasite-vector-host triad in the municipality, we can indicate more precisely the locations for intensification of the LV control actions employed by the health service.

Key words: Visceral Leishmaniasis, sandflies, Ecoepidemiology

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| FIGURA 1: Localização do município de Itaúna, Minas Gerais e sua delimitação urbana | 60 |
| FIGURA 2: Caracterização de residências que foram realizadas as capturas entomológicas no município de Itaúna, MG. | 61 |
| FIGURA 3: Mapa dos pontos de captura entomológica, distribuídos nos onze bairros de estudo, do município de Itaúna, Minas Gerais. | 63 |
| FIGURA 4: Punção de de medula óssea (crista tibial) dos cães selecionados para o estudo, no município de Itaúna, Minas Gerais. | 72 |
| FIGURA 5: Necrópsia e obtenção de de amostras dos cães selecionados para o estudo, provenientes do município de Itaúna, Minas Gerais. | 72 |
| FIGURA 6: Semeadura de medula óssea em meio de cultura NNN/LIT, provenientes dos cães necropsiados do município de Itaúna, Minas Gerais..... | 74 |
| FIGURA 7: <i>Imprint</i> dos tecidos em lâmina e esfregaço de medula óssea para diagnóstico parasitológico direto, provenientes das amostras dos cães participantes do estudo do município de Itaúna, Minas Gerais. | 74 |
| FIGURA 8: Produtos de amplificação de DNA de flebotomíneos obtidos com iniciadores para o gene da cacofonia, visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio..... | 92 |
| FIGURA 9: Produtos de amplificação de DNA de <i>Leishmania</i> spp. em amostras de flebotomíneos, obtidos com iniciadores para o fragmento do gene do SSUrRNA, observados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio..... | 94 |
| FIGURA 10: Produtos de amplificação de DNA de cães, constatando a presença de 227pb do gene IRBP, visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio..... | 97 |
| FIGURA 11: Produtos de amplificação (amostras de medula) obtidos com iniciadores do fragmento do gene SSUrRNA de <i>Leishmania</i> sp., observados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio. | 99 |
| FIGURA 12: Análise das sequencias de <i>Le. infantum</i> encontradas em amostras de tecidos dos cães analisados em Itaúna, 2016..... | 106 |
| FIGURA 13: Mapa de distribuição dos casos caninos e georreferenciamento dos casos humanos, nos bairros do município de Itaúna. | 110 |
| FIGURA 14: Mapa de Kernel mostrando a distribuição de casos humanos de LV em Itaúna, MG, no período de 2007 a 2017..... | 112 |
| FIGURA 15: Mapa de distribuição dos casos caninos e georreferenciamento dos casos humanos, e ponto de captura de flebotomíneos | 114 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|-----|
| GRÁFICO 1: Porcentagem de <i>Lu. longipalpis</i> em relação ao total de espécimens capturados e porcentagem em relação a machos e fêmeas capturadas no município de Itaúna, utilizando armadilha luminosa HP, no período de maio de 2015 a abril de 2016. | 81 |
| GRÁFICO 2: Porcentagem das espécies capturadas no município de Itaúna, utilizando armadilha luminosa HP, no período de maio de 2015 a abril de 2016. | 82 |
| GRÁFICO 3: Distribuição mensal de <i>Lu. longipalpis</i> capturados no município de Itaúna, utilizando armadilha luminosa HP, no período de maio de 2015 a abril de 2016. | 84 |
| GRÁFICO 4: Associação entre o número mensal de flebotomíneos capturados de 05/2015 a 04/2016 e a média de temperatura, umidade e precipitação no período de 04/2015 à 04/2016, no município de Itaúna, MG. | 90 |
| GRÁFICO 5: Número de capturas de flebotomíneos por mês em relação às médias de temperatura e precipitação. | 91 |
| GRÁFICO 6: Distribuição da frequência, por porcentagem, de resultados do teste de PCR para detecção de <i>Leishmania</i> por tecido, dos cães soropositivos de Itaúna 2016. | 98 |
| GRÁFICO 7: Distribuição de resultados do teste parasitológico direto, PCR e mielocultura entre cães sintomáticos e assintomáticos, Itaúna, 2016. | 104 |
| GRÁFICO 8: Frequência cumulativa dos resultados do teste parasitológico direto, PCR e mielocultura entre cães sintomáticos e assintomáticos, Itaúna, 2016. | 105 |
| GRÁFICO 9: Frequência de sinais clínicos sugestivos entre cães sintomáticos e assintomáticos, Itaúna, 2016. | 108 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| TABELA 1: Espécies de flebotomíneos capturados no município de Itaúna, em relação ao sexo, no período de maio de 2015 a abril de 2016, utilizando armadilha luminosa HP..... | 81 |
| TABELA 2: Espécies de flebotomíneos capturados por bairro no município de Itaúna, no período de maio de 2015 a abril de 2016, utilizando armadilha luminosa HP. | 83 |
| TABELA 3: Número mensal de <i>Lu. longipalpis</i> capturados nos bairros do município de Itaúna, utilizando armadilhas luminosas HP, no período de maio de 2015 a abril de 2016. | 85 |
| TABELA 4: Número de exemplares capturados nos bairros do município de Itaúna, em relação ao mês, utilizando armadilha luminosa HP, no período de maio de 2015 a abril de 2016..... | 87 |
| TABELA 5: Número de exemplares capturados nos bairros do município de Itaúna, em relação à endofilia e exofilia, utilizando armadilha luminosa HP, no período de maio de 2015 a abril de 2016. | 88 |
| TABELA 6: Variáveis climáticas mensais no município de Itaúna no período de março de 2015 a abril de 2016..... | 89 |
| TABELA 7: Espécies de fêmeas de flebotomíneos encontrado a presença de DNA de <i>Leishmania</i> e local de captura no período de maio de 2015 a abril de 2016, município de Itaúna. | 93 |
| TABELA 8: Taxa mínima de infecção (TMI) dos <i>pools</i> de fêmeas de flebotomíneos capturados no período de Maio de 2015 a Abril de 2016. | 94 |
| TABELA 9: Sequenciamento de DNA dos <i>pools</i> de flebotomíneos com DNA de <i>Leishmania</i> spp. | 95 |
| TABELA 10: Taxa de soropositividade canina para LVC, do município de Itaúna, no ano de 2016. | 96 |
| TABELA 11: Detecção de positividade através de diagnóstico molecular (técnica PCR), diagnóstico parasitológico (cultura e Lâminas esfregaço/ <i>imprints</i>), de amostras de biópsia de cães soropositivos, provenientes de Itaúna, MG. | 102 |
| TABELA 12: Total de amostras caracterizadas através de sequenciamento de DNA, provenientes das biópsias dos cães analisados pela <i>LnPCR</i> | 106 |
| TABELA 13: Síntese dos resultados obtidos através da distribuição dos casos humanos, cães analisados, taxa de prevalência, taxa de positividade canina, bem como total de flebotomíneos capturados e infectados. | 114 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta de busca de alinhamento local básico)

BOD - Demanda Bioquímica de Oxigênio

Br. – Brumptomyia

CCZ - Centro de Controle de Zoonoses

CEUA - Comitê de Ética no uso de Animais

CIPA - Computer-aided indentification of phlebotomine sandflies of América
(Identificação de flebotomíneos da América auxiliado por computador)

CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária

CP - Controle Positivo

CN - Controle Negativo

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DAT- Teste de Aglutinação Direta

DAT-LPC - Teste de Aglutinação Direta produzido no Laboratório de Pesquisas clínicas

dATP - Trifosfato de Desoxiadenosina

dCTP - Trifosfato de Desoxicidina

dGTP - Trifosfato de Desoxiguanosina

dTTP - Trifosfato de Desoxitimidina

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

DMSO - Dimetil-sulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DPP - *Dual Path Platform* (Plataforma de Duplo Percurso)

EIE - Ensaio Imunoenzimático

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

Ev.- *Evandromyia*

Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz

FWD - Forward

FUNED - Fundação Ezequiel Dias

GPS - Sistemas de Posicionamento Global

H₂O - Água

HP - *Hoover Pugedo*

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia

IRBP - Interphotoreceptor retinoid-binding protein (Proteína interfotorreceptora ligante de retinoide)

IRR - Instituto René Rachou

ITS - Espaçador Interno Transcrito

KCL - Cloreto de Potássio

KDNA - Kinetoplast DNA (DNA do cinetoplasto)

Km - Quilômetros

KOH – Hidróxido de potássio

Le - *Leishmania*

LIT - *Liver Infusion Tryptose* (Infusão de fígado e triptose)

LnPCR – *Leishmania Nested PCR*

LPG - Lipofosfoglicano

LT - Leishmaniose Tegumentar

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

Lu. - *Lutzomyia*

LV - Leishmaniose Visceral

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

LVF - Leishmaniose Visceral Felina

LVH - Leishmaniose Visceral Humana

mm - Milímetro

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MG - Minas Gerais

Mg – Magnésio

Mi. - *Migonemyia*

mM - Milimolar

mL - Mililitro

MS - Ministério da Saúde

NNN - *Novy MacNeal Nicolle*

ng – Nanograma

Ny.- *Nyssomyia*

OMS – Organização Mundial da Saúde

Pb - Pares de Bases

pH - Potencial Hidrogeniônico

PCLV - Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

PCR - *Polimerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

Pi.- *Pintomyia*

pmol - Pico mol

Ps. - *Psathyromyia*

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

(Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição)

RNA - Ácido Ribonucleico

rRNA - Ácido Ribonucleico Ribossomal

REV - Reverse

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

SMF – Sistema Fagocítico Mononuclear

SMS – Secretaria Municipal da Saúde

SINAN – Sistema de Informações de Agravos de Notificação

TFL – Taxonomia de Flebotomíneos/Epidemiologia, Diagnóstico e Controle das Leishmanioses

TMI - Taxa Mínima de Infecção

TRIS-HCL – Hidroximetil Hydrochloride

SSUrRNA - *Small Subunit Ribosomal RNA* (RNA ribossomal da subunidade menor do ribossomo)

SRD – Sem Raça Definida

UV - Ultravioleta

UTM - Universal Transverso de Mercator

WHO - *World Health Organization* (Organização mundial da saúde)

µL - Microlitro

µg - Micrograma

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 | As leishmanioses | 20 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 23 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 26 |
| 3.1 | Leishmaniose Visceral..... | 27 |
| 3.2 | Vetores de LV e infecção por <i>Le. infantum</i> | 31 |
| 3.3 | Morfologia dos flebotomíneos..... | 35 |
| 3.4 | Influência das variáveis climáticas sobre a densidade populacional de flebotomíneos..... | 36 |
| 3.5 | Agente etiológico da LV e ciclo de transmissão da <i>Leishmania infantum</i> ... | 38 |
| 3.6 | Hospedeiros e reservatórios da LV | 40 |
| 3.7 | Sinais clínicos da leishmaniose visceral canina | 42 |
| 3.8 | Diagnóstico | 44 |
| 3.8.1 | <i>Diagnóstico Clínico Canino</i> | <i>44</i> |
| 3.8.2 | <i>Diagnóstico Laboratorial</i> | <i>44</i> |
| 3.9 | Controle da leishmaniose visceral..... | 50 |
| 4 | OBJETIVOS | 56 |
| 5 | METODOLOGIA..... | 58 |
| 5.1 | Área de estudo..... | 59 |
| 5.2 | Escolha dos bairros para o estudo..... | 61 |
| 5.3 | Levantamento entomológico | 62 |
| 5.3.1 | <i>Montagem e identificação dos machos de flebotomíneos capturados</i> | <i>63</i> |
| 5.3.2 | <i>Preparação das fêmeas capturadas para detecção de infecção natural...</i> | <i>64</i> |
| 5.4 | Extração de DNA das fêmeas de flebotomíneos capturadas em campo | 64 |
| 5.4.1 | <i>Reação em cadeia da polimerase (PCR) de gene constitutivo de flebotomíneo (cacofonia).....</i> | <i>65</i> |
| 5.4.2 | <i>Detecção de <i>Leishmania spp.</i> em flebotomíneos capturados no campo..</i> | <i>65</i> |
| 5.4.3 | <i>Análise dos produtos amplificados pela PCR</i> | <i>67</i> |

| | |
|--|-----------|
| 5.4.4 Cálculo da taxa mínima de infecção natural | 67 |
| 5.4.5 Sequenciamento SSUrRNA para determinação da espécie de Leishmania | 67 |
| 5.5 Influência dos fatores climáticos na densidade populacional dos flebotomíneos..... | 68 |
| 5.6 Inquérito canino amostral | 68 |
| 5.6.1 Diagnóstico sorológico..... | 69 |
| 5.6.2 Coleta de amostras de sangue para teste de ELISA | 70 |
| 5.6.3 Recolhimento dos cães sorologicamente positivos | 71 |
| 5.6.4 Eutanásia e necropsia dos cães soropositivos | 71 |
| 5.6.5 Cálculo da taxa de positividade e taxa de prevalência canina da LVC..... | 73 |
| 5.6.6 Isolamento de parasitos | 73 |
| 5.6.7 Pesquisa direta de parasitos..... | 74 |
| 5.6.8 Extração de DNA de medula óssea e tecidos obtidos dos cães soropositivos..... | 75 |
| 5.6.9 PCR de gene constitutivo específico de mamíferos (IRBP) | 75 |
| 5.6.10 Detecção e identificação de Leishmania spp. em amostras de medula óssea e tecidos dos cães soropositivos utilizando a reação em cadeia da polimerase | 76 |
| 5.7 Análises estatísticas | 76 |
| 5.7.1 Testes estatísticos realizados no estudo entomológico | 76 |
| 5.7.2 Testes estatísticos realizados no estudo canino | 76 |
| 5.8 Distribuição espacial dos casos caninos, humanos e pontos de capturas entomológica | 77 |
| 5.8.1 Levantamento e georreferenciamento dos casos caninos..... | 77 |
| 5.8.2 Levantamento e georreferenciamento dos casos humanos | 77 |
| 5.8.3 Levantamento e georreferenciamento dos pontos de capturas entomológicas | 78 |
| 6 RESULTADOS | 79 |
| 6.1 Levantamento da fauna flebotomínica..... | 80 |
| 6.2 Influência das variáveis climáticas na densidade populacional dos flebotomíneos..... | 89 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 6.3 | Detecção do gene cacofonia constitutivo de flebotomíneos..... | 92 |
| 6.4 | Detecção de <i>Leishmania</i> spp. em flebotomíneos..... | 92 |
| 6.5 | Sequenciamento de DNA para identificação da espécie de <i>Leishmania</i> , encontradas nas fêmeas de flebotomíneos capturadas no campo | 95 |
| 6.6 | Inquérito canino amostral | 96 |
| 6.7 | Eletroforese de gene constitutivo específico de mamíferos (IRBP) | 96 |
| 6.8 | Distribuição de frequência de resultados do teste de PCR de cães soropositivos | 97 |
| 6.9 | Frequência de resultados dos exames parasitológico direto, PCR e mielocultura de cães soropositivos | 100 |
| 6.10 | Frequência dos resultados dos testes parasitológico direto, PCR e mielocultura de cães assintomáticos e sintomáticos | 103 |
| 6.11 | Frequência dos resultados cumulativos dos testes parasitológico direto, PCR e mielocultura dos cães assintomáticos e sintomáticos | 104 |
| 6.12 | Caracterização das amostras caninas através de sequenciamento de DNA..... | 105 |
| 6.13 | Características de raça e sinais clínicos sugestivos de infecção por <i>Leishmania infantum</i> entre os cães estudados..... | 107 |
| 6.14 | Georreferenciamento e análise espacial..... | 108 |
| 6.14.1 | <i>Distribuição espacial dos casos caninos de LVC no ano de 2016.....</i> | 108 |
| 6.14.2 | <i>Distribuição espacial dos casos de LVH do município de Itaúna</i> | 110 |
| 6.14.3 | <i>Distribuição de casos de LVC e casos LVH associados aos resultados entomológicos.....</i> | 113 |
| 6.14.4 | <i>Associação dos resultados entomológicos, caninos e humanos</i> | 114 |
| 7 | DISCUSSÃO | 116 |
| 8 | CONCLUSÕES | 134 |
| 9 | REFERÊNCIAS | 137 |
| 10 | ANEXOS..... | 176 |
| 10.1 | Anexo 1 - Casos de LV no Brasil notificados pelo SINAN..... | 177 |
| 10.2 | Anexo 2 - Licença do CEUA..... | 178 |
| 11 | APÊNDICES..... | 179 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 11.1 | Apêndice 1 - Pools de flebotomíneos..... | 180 |
| 11.2 | Apêndice 2- Ficha de necropsia | 181 |
| 11.3 | Apêndice 3 - Análises climáticas | 182 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 As leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias que compreendem um grupo de patologias causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), que possui ciclo biológico heteroxeno, sendo realizado parte em um hospedeiro vertebrado e outra no invertebrado (SHAW, 1997). As leishmanioses apresentam amplo espectro epidemiológico em todo o mundo, ocorrendo em vastas áreas tropicais e subtropicais do globo, na qual estes parasitos infectam uma grande variedade de hospedeiros mamíferos, silvestres e domésticos (DESJEUX, 2001; LAISON & SHAW, 1987; PASSOS, 1993), cuja transmissão ocorre pela picada de fêmeas dos insetos vetores conhecidos como flebotomíneos, pertencentes à ordem Diptera (CORTES *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 1978).

As leishmanioses representam a terceira doença de maior relevância em termos globais, transmitida por vetores aos seres humanos em todo o mundo (SOLANO-GALLEGO, 2009), sendo sobrepujada pela Malária e Filariose (REITHINGER & DAVIES, 2002). Encontram-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo, estando presente nos cinco continentes. Dos 200 países e territórios que reportam a doença, 97 países e territórios são endêmicos e notificaram casos de leishmaniose no ano de 2017 (ALVAR *et al.*, 2012, WHO, 2019). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que aproximadamente 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair estas enfermidades, e estima-se que cerca de 12 milhões de pessoas possam estar infectadas com alguma forma de *Leishmania* no mundo, ficando a incidência anual de aproximadamente 2 milhões de casos, destes 500.000 relacionados à leishmaniose visceral (LV) e 1,5 milhões relacionados às formas cutâneas da doença (WHO, 2015).

A OMS divide as leishmanioses em quatro grupos clínicos: cutânea, mucocutânea, cutâneo-difusa e visceral. A forma cutânea apresenta baixa gravidade, diferente da forma mucocutânea, que pode destruir parcial ou totalmente as mucosas do nariz, boca, garganta e tecidos circundantes. A forma cutâneo-difusa apresenta um aspecto hanseniforme, sendo o tratamento terapêutico extremamente difícil. A LV, também conhecida como calazar, é a forma mais letal e caracterizada

por febre alta, perda de peso substancial, aumento do baço e do fígado e anemia. Se não tratada, a doença pode provocar taxa de mortalidade de até 100% em dois anos (WHO, 2015).

As diferentes formas clínicas relacionadas às leishmanioses dependem da espécie de *Leishmania* e da susceptibilidade do hospedeiro. As leishmânias do complexo *braziliensis* e *mexicana* são os agentes causadores da leishmaniose tegumentar (LT). Já os agentes etiológicos da LV fazem parte do complexo *donovani*, sendo a *Leishmania donovani* o agente etiológico encontrado na África e Ásia; *Leishmania infantum* na Ásia, Europa e África e nas Américas. Apesar da discordância entre pesquisadores, semelhanças estruturais verificadas por meio de estudos moleculares sugerem que a *Le. chagasi* e a *Le. infantum* sejam a mesma espécie (LUKES *et al.*, 2007). Segundo Maurício *et al.*, (2000), as provas isoenzimáticas e genéticas constituem uma forte evidência disso. Neste trabalho, adotar-se-á *Le. infantum* como nome específico do agente etiológico da LV encontrado nas Américas.

No Brasil já foram identificadas 7 espécies de *Leishmania* dermatrópicas que causam a LT em humanos, sendo as principais: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Outras espécies somente foram identificadas nas regiões Nordeste e Norte que são: *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lindenberg* e *Leishmania (Viannia) shawi*. Sobre os vetores que transmitem essas espécies de *Leishmania*, envolvidas na LT, temos *Bichromomyia flaviscutellata*, *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia umbratilis*, *Nyssomyia intermedia*, *Psychodopygus wellcomei* e *Migonemyia migonei* (BRASIL, 2007 b).

A espécie *Le. infantum* é o agente etiológico normalmente associado à LV no Brasil, sendo os vetores relacionados à transmissão a espécie *Lutzomyia longipalpis* (DEANE & DEANE, 1962; GRIMALDI *et al.*, 1989) e *Lutzomyia cruzi* (GALATI *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 1998, FALCÃO DE OLIVEIRA *et al.*, 2017)

As leishmanioses apresentam ampla distribuição geográfica e alta incidência, além da possibilidade de assumir formas graves com taxas elevadas de mortalidade em casos não tratados na forma visceral e alta morbidade na sua forma tegumentar (GONTIJO & MELO, 2004).

A ocorrência da leishmaniose em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor e de um hospedeiro/reservatório susceptível. A

doença se caracteriza por acometimento progressivo do sistema fagocítico mononuclear (SFM), levando à sua hiperplasia, hipertrofia, sendo a patogenia determinada por múltiplos fatores que envolvem os hospedeiros e parasitos, o estado imunológico e nutricional do indivíduo, além de fatores genéticos determinantes da susceptibilidade para a infecção e para a cura (DEANE; DEANE, 1956 e 1962).

A LV inicialmente era descrita como doença de ambiente silvestre ou rural, contudo, as ocorrências de mudanças socioeconômicas e comportamentais referentes à globalização estão intimamente ligadas ao processo de urbanização como o êxodo rural, desemprego, expansão de favelas, guerras, entre outros. Na atualidade a LV é apontada como doença reemergente, com incidência crescente e em franco processo de urbanização, principalmente nas cidades de grande e médio porte (ALVES; BEVILACQUA, 2004; MONTEIRO *et al.*, 2005; BRASIL, 2006; SALOMÓN *et al.*, 2015; PETERSON *et al.*, 2017). Dados epidemiológicos recentes revelam que esse processo de urbanização, pode ser atribuído em partes ao evento da migração da população humana, introduzindo cães de região endêmica em regiões não endêmicas, o que explica o surgimento de novas áreas nos centros urbanos com registro de leishmaniose no Brasil. Outro fator importante se deve à adaptação de *Lutzomyia longipalpi*, que possui importância médica e veterinária, aos ambientes modificados pelo homem, as alterações climáticas e redução dos investimentos em saúde e educação (CARDIM *et al.*, 2013; HARHAY *et al.*, 2011; GONTIJO; MELO, 2004; DANTAS-TORRES, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

A rápida expansão geográfica e a urbanização da LV trouxeram a necessidade de se estabelecer medidas mais efetivas para o seu controle. Até o momento, poucos estudos realizados no Brasil, abrangem toda a cadeia epidemiológica da LV, apesar de existirem alguns que abordam detalhadamente todo o ciclo de transmissão, mas foram publicados nas últimas décadas e podem não mais refletir a situação atual da LV. Além disto, a maioria dos estudos são realizados em áreas endêmicas, não considerando áreas de baixa e média transmissão.

O município de Itaúna, localizado na região centro-oeste de Minas Gerais, é considerado de transmissão esporádica para LV, pois apresenta média inferior a 2,4 casos nos últimos três anos, conforme é preconizado pelo Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2006). A cidade vem registrando casos humanos de LV desde 2007. Apesar de se encontrar em situação de atenção, não existem estudos que esclareçam quais são os condicionantes epidemiológicos da LV em Itaúna. Para o município, não existem informações quanto à fauna flebotomínica, qual espécie de *Leishmania* é circulante nos cães infectados que atuam como reservatórios e nos vetores. Nesse contexto, fica evidente que o município necessita tomar conhecimento sobre as condições que favoreçam a transmissão da doença na região.

O aparecimento constante de notificações de casos de LV humana e indícios do aumento de casos caninos no município de Itaúna nos levou a iniciar o trabalho, objetivando traçar o perfil da transmissão de LV em Itaúna, através de inquérito canino amostral e estudos entomológicos, como também classificar as áreas de transmissão da doença, através do cálculo da taxa de positividade canina urbana e taxa de prevalência canina, utilizando como métodos de diagnóstico os testes DPP® (*Dual Path Platform*) e ELISA® (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Adicionalmente, parte da população canina com sorologia positiva no inquérito foi necropsiada, fornecendo material para ser empregados em técnicas parasitológicas e moleculares, e esses dados foram associados com o estudo entomológico realizado no município. Além disso, a distribuição de casos caninos, casos humanos e de flebotomíneos no município foi analisada espacialmente, a fim de verificar as regiões prioritárias no controle da enfermidade.

Portanto a proposta geral de nosso trabalho foi estudar de uma forma conjunta, os diferentes aspectos relacionados à epidemiologia da LV (infecção

canina associada à densidade vetorial e à notificação de casos humanos), apontando as principais áreas de risco, visando direcionar, de uma forma mais precisa, as ações de controle da LV.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Leishmaniose Visceral

A LV foi descrita na Grécia em 1835, sendo denominada *ponos* ou *hapoplinakon*. Na Índia, em 1869, recebeu o nome *kala-jwar*, que quer dizer “febre negra” ou *kala-azar*, em virtude da pele negra devido ao discreto aumento da pigmentação durante a doença (MARZOCHI *et al.*, 1981). Somente em 1900, o médico escocês William Leishman identificou um protozoário no baço de um soldado indiano que viera a óbito em decorrência de uma febre conhecida como febre “dum-dum”. Até que, em 1903, Charles Donovan encontrou o mesmo parasito em outro paciente, apresentando sintomas pareados. No mesmo ano, Major Ross nomeou esse parasito de *Leishmania donovani*, criando o gênero *Leishmania* (BADARÓ; DUARTE, 1996; PRATA; SILVA, 2005).

Pouco tempo depois, em 1904, Leonard Rogers foi o primeiro a obter sucesso no cultivo do protozoário e demonstrou que estes se apresentavam em formas flageladas. Nicolle e Comte, em 1908, na Tunísia, observaram, pela primeira vez, o parasito em cães, sugerindo seu provável papel como reservatório da doença (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008). Entretanto o mecanismo de infecção da *Leishmania* permaneceu desconhecido até 1931, quando os flebotomíneos foram incriminados como vetores e a transmissão da patologia ficou conhecida por meio de xenodiagnósticos em *hamsters* (ADLER; THEODOR, 1931; KILLICK-KENDRICK; 1990).

Migone registrou um caso de paciente brasileiro no Paraguai, sendo o registro do primeiro caso da doença no Brasil, que ocorreu em 1913, mediante análise do material necropsiado do paciente de Boa Esperança, no Mato Grosso (ALENCAR, 1978). Entre 1936 e 1939, muitos estudos foram realizados por Evandro Chagas e colaboradores, demonstrando a doença em humanos e em cães, com a incriminação do flebotomíneo *Lu. longipalpis* como provável vetor e o parasito identificado como *Le. infantum* (ALVAR *et al.*, 2004; LAINSON *et al.*, 1986; CUNHA; CHAGAS, 1937).

No Brasil, grandes foram as contribuições de pesquisadores como Leônidas Deane e Maria Deane que, estudando o calazar canino em Sobral, no Ceará, esclareceram os aspectos mais importantes da epidemiologia da doença, e delinearam a tríade de controle da leishmaniose visceral, que visa o tratamento dos doentes, combate ao vetor com utilização de inseticidas e eutanásia dos cães

infectados, sendo que a tríade permanece com os mesmos fundamentos básicos até os dias de hoje (DEANE E DEANE, 1955; DEANE, 1956).

De todos os casos de LV no mundo, 90% ocorrem no Brasil, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia, Quênia e Somália (WHO, 2019). Nas Américas a LV é autóctone em 12 países com o registro de 45.490 casos e média anual de 3.499 casos no período de 2001 a 2013, ocorrendo desde o México até a Argentina (OPAS, 2017). Somente no ano de 2013 foi registrado um total de 3.389 casos espalhados por oito países e distribuídos em 798 municípios (OPAS, 2015). Em todo o continente sul-americano, o Brasil apresentou o maior número de casos, 3.253 (96%), seguido por Paraguai 107 casos (3,2%) e Colômbia 13 casos (0,4%). Considerando apenas a população em área de transmissão no Brasil a incidência no referido período foi de 4,35 casos por 100.000 habitantes (OPAS, 2015).

A distribuição geográfica da LV no Brasil revela que a epidemiologia da doença apresenta aspectos ambientais, climáticos e sociais bastante diversificados, nos mostrando uma grande adaptação do vetor transmissor a diferentes ecótopos (GOMES, 1994). Diversos fatores podem estar envolvidos na disseminação da LV e no surgimento de novos focos. O desmatamento é um fator preponderante, uma vez que reduz a disponibilidade de fonte alimentar do inseto transmissor em seu habitat, expondo o cão e o homem, enquanto fontes mais acessíveis, ao lado do intenso processo migratório, que provoca o deslocamento de pessoas que levam seus animais, na maioria domésticos e potencialmente infectados (BRASIL, 2006; SHAW, 2007; CARDIM *et al.*, 2013). Essas mudanças urbanas, associadas à adaptação de *Lu. longipalpis* a ambientes alterados pelo homem, aproximaram hospedeiros definitivos e intermediários, vetores e parasitos, e determinaram mudanças nos níveis endêmicos e epidêmicos da LV (GOMES, 1994; AMBROISE-THOMAS, 2000; PATZ *et al.* 2000; SALOMÓN *et al.*, 2015).

Inicialmente a doença era descrita como doença esporádica, mantinha um perfil silvestre de transmissão peridomiciliar, principalmente ligada a área rural e bolsões de pobreza. Nos últimos anos, após a década de 1970, degradações ambientais, migrações de populações carentes para a periferia dos grandes centros, fixando-se em locais sem infraestrutura de saneamento básico, a urbanização desordenada, migração humana constante e desmatamento acentuado podem ter sido fatores importantes para ampla distribuição geográfica da LV no país (ALVES,

BEVILACQUA, 2004; LAINSON, RANGEL, 2005; BRASIL, 2006; SALOMÓN *et al.*, 2015; PETERSON *et al.*, 2017).

O processo de urbanização da LV no Brasil foi primeiramente alertado por Deane (1956), em seu clássico estudo sobre a doença, e, a partir de então, foi constatada em várias cidades de pequeno e médio porte em vários municípios brasileiros. Em particular, no início da década de 1990, muitos municípios relataram surtos de LV em áreas urbanas, como Belo Horizonte (Minas Gerais), Feira de Santana (Bahia), Várzea Grande (Mato Grosso), Araçatuba (São Paulo), Aquidauana (Mato Grosso do Sul), dentre outros e desde 2000 foram relatadas novas epidemias urbanas nos municípios de Palmas (Tocantins), Três Lagoas e Campo Grande (Mato Grosso do Sul), Caxias, Timon, Codó e Imperatriz (Maranhão), Bauru (São Paulo), Paracatu (Minas Gerais) e Cametá (Paraná) (BRASIL, 2004; SILVA *et al.*, 1997; COSTA, PEREIRA, ARAÚJO, 1990; BEVILACQUA, 2001). Existem também registros de surtos frequentes e em franca expansão, ocorrendo o registro de casos em áreas antes consideradas indenes, como na região Sul (KRAUSPENHAR, *et al.*, 2007; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009).

O maior número de casos autóctones de LV no país concentrava-se especialmente na região Nordeste com 90% dos casos (BRASIL, 2006). Gradativamente, a LV se expandiu para as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste e entre 1998 a 2005 surgiram registros de casos autóctones em diferentes municípios do país (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008). Em 2009, o Nordeste representava apenas 47,5% do total de casos no país (BRASIL, 2011a).

Atualmente o Brasil destaca-se por sua elevada endemicidade, na qual a LV apresenta-se distribuída em 23 das 27 unidades federadas, atingindo as cinco regiões geográficas do país (BRASIL, 2011a). Os estados do Amazonas, Acre, Amapá e Rondônia não possuem casos humanos de LV, entretanto estes dois últimos já confirmaram casos autóctones de LV canina (BRASIL, 2017).

Segundo os dados disponíveis no Sistema de Informações de Agravos e Notificações (SINAN), o número de casos humanos diagnosticados de LV no Brasil, registrados no ano de 2017 (último ano de notificação disponível até o momento) foi de 4.515 casos. Destes, 2.253 ocorreram na região Nordeste (50%), 1094 na região Sudeste (24%) 855 na região Norte (19%), 293 na região Centro-Oeste (6,5%), e 20 na região Sul (0,5%) (Anexo 1). Contudo, quando observamos os dados do SINAN dos últimos 25 anos, notamos um número crescente de casos em todas as regiões,

inclusive em locais onde não havia sido registrado casos, como na região Sul do país.

Na região Sudeste, a doença está distribuída em todos os estados, entretanto, enfatiza-se a relevância do estado de Minas Gerais, devido a sua grande extensão territorial, bem como à alta frequência e ampla distribuição de casos da doença. Em 2017, Minas Gerais foi o estado com o maior número de casos, totalizando 877 notificações em todo país. Belo Horizonte, a capital mineira, representa um dos municípios brasileiros com a maior taxa de letalidade do país (BEVILACQUA *et al.* 2001, LOPES *et al.* 2010), além de registrar o maior número de casos (200) em 2017, seguido de Montes Claros com 199 casos (BRASIL, 2019). Em Minas Gerais no período entre os anos de 1990 a 2002, a média de casos no estado era de 177 casos. Entre 2007 e 2017, a média de casos sobe para 513 casos anuais. Esse foi um aumento considerável, quase três vezes maior em relação à média dos anos anteriores (<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS>). Esse aumento repentino de casos chama atenção, pois nos leva a deduzir que provavelmente as ações de controle preconizadas pelo MS não foram realizadas ou não atenderam seu propósito.

O estado vem sofrendo com a endemicidade da LV, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, destacando os municípios de Montes Claros e Porteirinha, onde se observa taxa de positividade alta para leishmaniose visceral canina (LVC), e alta densidade do vetor *Lu. longipalpis* (FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003; FRANÇA-SILVA *et al.*, 2005, MONTEIRO *et al.*, 2005). Estudos apontam uma crescente urbanização da LV humana e canina também na capital mineira, Belo Horizonte, bem como em outros municípios da região metropolitana, indicando uma elevação da taxa de transmissão da doença nestas áreas (LUZ *et al.*, 2001; SARAIVA *et al.*, 2011; LARA-SILVA *et al.*, 2015).

No município de Itaúna em Minas Gerais, área de estudo deste trabalho, nos últimos 10 anos foram registrados e confirmados 14 casos de LV humana, sendo um caso em 2007; um em 2008; um em 2009; três em 2010; um em 2011; dois em 2012; dois em 2014, dois em 2016 e um em 2017 (Dados Secretaria Municipal de Saúde - SMS de Itaúna). Esses casos humanos notificados caracterizam o município como uma área recente e importante de transmissão da doença. Por ser uma área recente de transmissão, não existem estudos relacionados à doença no município, contudo, o Centro de Controle de Zoonoses

(CCZ) do município declara que o número de casos caninos vem aumentando expressivamente em muitos bairros.

Independente da região, a importância da LV reside não somente na sua alta incidência, mas também na possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes, atingindo principalmente pessoas que vivem em situações socioeconômicas precárias (ALVARENGA *et al.*, 2010; DESJEUX, 2004). É de se esperar que caso não se inicie rapidamente e intensivamente as ações de vigilância e controle de LV, o número de casos humanos aumentem exponencialmente, agravando ainda mais este problema de saúde pública. A vigilância epidemiológica torna-se extremamente necessária em localidades onde ainda existam poucos casos de LV para que o controle seja realizado de maneira rápida e antecipada, evitando o aumento do agravo.

3.2 Vetores de LV e infecção por *Le. infantum*

Existem aproximadamente 900 espécies de flebotomíneos em todo o mundo, a maioria concentrada nas regiões neotropicais, onde ocorrem em média 500 espécies, e destas, mais de 229 já foram registradas no Brasil (GALATI, 2003; READY, 2013, AGUIAR; MEDEIROS, 2003). Os primeiros flebotomíneos americanos foram descritos por Coquillett (1907), sendo que no Brasil os responsáveis pela primeira descrição de flebotomíneos foram Lutz & Neiva (1912).

Os flebotomíneos costumam abrigar-se em troncos de árvores, tocas de animais, folhas caídas no solo, copa de árvores, frestas em rochas que apresentam características peculiares, as quais favorecem a presença desses insetos, como pequenas variações de temperatura e umidade (AGUIAR *et al.*, 1985; AZEVEDO *et al.*, 1993). Porém, com a destruição das matas nativas, e o habitat natural alterado, ocorreu uma restrição de ambientes por eles utilizáveis, e desse modo, as espécies que, de alguma forma, resistem às condições adversas conseguem explorar novos ambientes, aproximando-se cada vez mais dos peridomicílios (FORATTINI *et al.*, 1972; GOMES; GALATI, 1989). Geralmente correspondem ao ambiente onde as fêmeas encontram hospedeiros vertebrados nos quais podem realizar seu repasto sanguíneo (COMER; BROWN, 1993; ELKHOURY, 2005). Contudo, o hábito de voarem em saltos reforça a hipótese de que estes insetos não se afastam muito dos

criadouros e a sua dispersão máxima geralmente não excede um quilômetro (ALEXANDER 1987; YUVAL *et al.*, 1988, DOHA *et al.*, 1991, KAMHAWI *et al.*, 1991, MORRISON *et al.*, 1993).

Tanto os machos quanto as fêmeas alimentam-se de carboidratos, adquiridos através de seiva de plantas, secreções de afídeos e frutas maduras (ALEXANDER; USMA, 1994; CAMERON *et al.*, 1995) que são fontes de energia imprescindíveis para as atividades de vôo, acasalamento, postura e longevidade (BRAZIL & BRAZIL, 2003). As fêmeas necessitam se alimentar de sangue para a maturação de seus ovos, e ao encontrarem um animal vertebrado, fonte de alimento, realizam o processo de telmofagia, na qual o inseto dilacera pequenos vasos presentes na derme do hospedeiro produzindo micro-hemorragias (GORDON & CREWE, 1952; MAGNARELLI; MODI, 1988). Durante a hematofagia o inseto libera saliva que apresenta diferentes substâncias, tais como anticoagulantes, antiagregantes plaquetários, imunossupressores e vasodilatadores, que além de facilitarem a obtenção de sangue, atuam combatendo reações fisiológicas do hospedeiro como os processos inflamatórios e imunológicos no local da picada (RIBEIRO *et al.*, 1995, KAMHAWI, 2000; BATES, 2007).

O vetor se infecta com *Le. infantum* ao alimentar-se de macrófagos parasitados por *Leishmania* spp. na forma amastigota que são direcionados ao intestino médio do inseto juntamente com o conteúdo alimentar. Durante o processo de digestão do sangue, há formação de uma matriz, formada principalmente por quitina, conhecida como matriz peritrófica, cuja função é proteger o epitélio intestinal do inseto contra a abrasividade da digestão e da proliferação bacteriana, além disso, essa matriz peritrófica acaba por proteger as formas promastigotas do parasito da ação de enzimas digestivas do flebotomíneo. A matriz peritrófica garante proteção por tempo suficiente para que cerca de 50% das formas iniciais do parasito, ingeridas pelo inseto, se diferenciem em formas mais resistentes (KAMHAWI *et al.*, 2006; PIMENTA *et al.*, 1997).

Após um período de doze a vinte horas, as amastigotas diferenciam-se em promastigotas (SACKS & PERKINS, 1984; DESCOTEAUX & TURCO, 1999). Estas formas se dividem por divisão binária longitudinal, passando por mudanças morfológicas e fisiológicas. O primeiro estágio no vetor é chamado promastigota procíclica, que possui baixa motilidade e se replica no interior da matriz peritrófica. Após alguns dias, os parasitos se diferenciam em formas alongadas e com alta

motilidade, chamadas nectomonas. Estas se dirigem para o exterior da matriz peritrófica e se aderem ao epitélio intestinal. As nectomonas migram para a região anterior do intestino médio e se diferenciam em leptomonas, formas curtas que continuam a se replicar. Posteriormente, alguns parasitos se diferenciam em formas haptomonas e outros em promastigotas metacíclicas, que são formas longas, apresentam um longo flagelo, alta motilidade e não mais se dividem, sendo estas as formas infectivas para o hospedeiro vertebrado no momento do próximo repasto sanguíneo realizado pelo flebotomíneo (ASHFORD, 2000; CHOI & LERNER, 2001; BATES, 2007; FREITAS *et al.*, 2012; KARKAMO *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2014; ANDREANI *et al.*, 2015).

No Brasil, o *Lu. longipalpis* (LUTZ; NEIVA, 1912) é a espécie de flebotomíneo considerada como mais importante na transmissão da LV, principalmente por ser encontrada nas cinco regiões geográficas do país (LAINSON & RANGEL, 2005; BANETH *et al.*, 2008), não sendo descritos até o momento, apenas nos estados do Amazonas, Rondônia, Acre e Santa Catarina. Estudos recentes sobre a infecção natural de *Lu. cruzi* (MANGABEIRA, 1938) culminaram na detecção da espécie infectada em área endêmica do Mato Grosso do Sul, bem como sua capacidade de transmissão experimental de *Le. infantum* por *Lu. cruzi*, com 10,55% de taxa de infecção, indicando o seu envolvimento no processo de transmissão da doença (SANTOS *et al.*, 1998, SHERLOK, 2003; LAINSON; RANGEL, 2005; PITA-PEREIRA *et al.*, 2008; HARHAY *et al.*, 2011; BRITO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2017, FALCÃO DE OLIVEIRA *et al.* 2017).

Estudos similares foram conduzidos para a confirmação da participação de *Migonemyia migonei* como vetor secundário de *Le. infantum*. Recentemente foi demonstrada a infecção experimental de *Mi. migonei* com *Le. infantum*, entretanto enfatiza-se que no tocante a taxa de infecção, a sobrevivência em dias após o repasto sanguíneo e a quantidade de formas flageladas no tubo digestivo anterior, esta espécie apresenta competência vetorial inferior a *Lu. longipalpis* (GUIMARÃES *et al.*, 2016, GALVIS-OVALLOS *et al.*, 2017).

Outras espécies de flebotomíneos que já foram encontradas com *Le. infantum* são: *Pintomyia evansi*, *Lutzomyia forattinii* e *Nyssomyia antunesi*, mas são necessários mais estudos que comprovem a competência vetorial desses em

transmitir a zoonose (SALOMON *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2010, DANTAS-TORRE, 2009; PITA-PEREIRA *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2013; THIES *et al.*, 2013).

Segundo Killick-Kendrick (1990), para se confirmar uma espécie de flebotomíneo como vetora é preciso obedecer a cinco critérios: 1) a espécie deve ser abundante no foco de leishmaniose, 2) ser altamente antropofílica, 3) suportar o desenvolvimento dos parasitos na ausência de sangue no tubo digestório, 4) demonstrar taxa de infecção natural mais alta em relação a outros flebotomíneos e 5) o parasito isolado do flebotomíneo deve ser indistinguível daqueles isolados de casos humanos. Porém, vale ressaltar que estes critérios, são de difícil demonstração prática e não fazem referência a possíveis espécies cuja participação pode estar restrita a ambientes silvestres. Recentemente Ready (2013) propôs uma atualização na incriminação de vetores acrescentando dois novos critérios que envolvem modelagem matemática. São eles: demonstrar que o flebotomíneo é essencial para manter a transmissão com ou sem a participação de outros vetores e demonstrar que a incidência da doença diminui significativamente com uma redução na densidade de flebotomíneo específico.

Como critério complementar, sugere-se que seja realizado a infecção experimental, utilizando um modelo animal, para avaliar a susceptibilidade do inseto ao protozoário, possibilitando o desenvolvimento do parasito e conseqüentemente a transmissão da doença (KILLICK-KENDRICK, 1990, READY, 2013). Essa suscetibilidade pode ser avaliada considerando cinco pontos principais: a capacidade dos parasitos de resistirem à atividade das enzimas digestivas; de escaparem da matriz peritrófica que reveste o bolo alimentar; de se aderirem ao epitélio intestinal no momento da excreção do resto alimentar; de completarem o ciclo de vida dentro do inseto vetor, culminando no desenvolvimento e diferenciação de formas infectantes e inocularem os parasitos infectantes no hospedeiro vertebrado (PIMENTA *et al.*, 1994, LEHANE, 1997, PIMENTA *et al.*, 1997, PIMENTA *et al.*, 2003).

Em colônias de laboratório, os estudos podem não reproduzir a realidade da infecção por *Leishmania* spp. na natureza. Os estudos ecológicos sugerem barreiras naturais que limitam o ciclo de vida de *Leishmania* spp. à certas espécies de flebotomíneos, enquanto em outras espécies, encontram-se intimamente relacionadas. Existe pouco conhecimento a respeito do grau de especificidade das espécies de *Leishmania* em relação a seus vetores naturais (RANGEL; LAINSON,

2009). Baseado em estudos experimentais os flebotomíneos tem sido classificados como permissivos quando suportam o desenvolvimento de diferentes espécies de *Leishmania* e, quando específicos ou restritivos, quando permitem o desenvolvimento somente da espécie que carregam na natureza. (VOLF; MYSKOVA, 2007, PIMENTA *et al.*, 1994; KAMHAWI *et al.*, 2000). Para Myskova (2008) o lipofosfoglicano (LPG) é necessário em vetores específicos, enquanto que, em vetores permissivos, o parasito se liga através de um mecanismo independente de LPG. Diversos estudos têm investigado o papel do LPG em mediar a adesão dos parasitos ao intestino médio dos flebotomíneos (DOBSON *et al.*, 2010; MYSKOVA *et al.*, 2008; SACKS; KAMHAWI, 2001).

Outro fator de destaque é a preferência pelo tipo de hospedeiro para obtenção de sangue, que varia entre as espécies de flebotomíneos. Algumas espécies têm preferência limitada a poucos hospedeiros animais, enquanto outras demonstram um amplo comportamento "oportunista" podendo se alimentar em diversas espécies de hospedeiros (TESH *et al.*, 1971; QUINNELL *et al.*, 1992; MORRISON *et al.*, 1993; BORGIORNO *et al.*, 2003; NERY *et al.*, 2004; MUNIZ *et al.*, 2006; DIAS-SVERSUTTI *et al.*, 2007; MISSAWA *et al.*, 2008). Claramente, os flebotomíneos "oportunistas" são melhores vetores porque são expostos a uma maior variedade de hospedeiros potencialmente infectados (SACKS *et al.*, 2008).

3.3 Morfologia dos flebotomíneos

A morfologia dos flebotomíneos permite a identificação e diferenciação entre as espécies existentes, e tem por base o estudo das estruturas visíveis do inseto após a preparação em lâmina e observação com auxílio de microscopia (YOUNG & DUNCAN, 1994). A identificação das espécies se faz principalmente por meio de caracteres morfológicos, incluindo seus apêndices. Nas fêmeas isto ocorre principalmente por meio da identificação da espermateca e nos machos através da genitália externa, além de outras características (SHIMABUKURO; TOLEZANI; GALATI, 2011). Para obter uma avaliação morfológica mais profunda, podendo visualizar órgãos internos como o cibário e espermateca, antes da montagem do inseto em lâmina é utilizada a técnica de diafanização do espécime, que o torna translúcido e permite avaliar suas estruturas internas com maior facilidade com o auxílio de microscopio (YOUNG & DUNCAN, 1994).

Segundo as classificações de Martins (1978) e Young & Duncan (1994) o gênero *Lutzomyia*, é o responsável pela transmissão das leishmanioses nas Américas. Entretanto, Galati (1995, 2003) propôs uma classificação com abordagem filogenética, utilizando 88 caracteres morfológicos, valorizando o uso das cerdas ao longo do corpo do inseto, além das outras estruturas e uma nova distribuição entre os grupos. Deste modo, os flebotomíneos vetores de importância médica, foram incluídos em duas subtribos: Lutzomyiina e Psychodopygina, com vários gêneros em cada uma. Em Lutzomyiina destacam-se os gêneros *Lutzomyia*, *Migonemyia* e *Pintomyia* e em Psychodopygina: *Bichromomyia*, *Nyssomyia*, *Psychodopygus*, *Trichophoromyia*, *Psathyromyia* e *Viannamyia*. Além destas, existem também as subtribos Sergentomyiina e Brumptomyiina, incluído nesta última, as espécies do gênero *Brumptomyia* que não possuem importância médica veterinária. Neste trabalho optamos pelo uso da recente classificação de Galati publicada em “Flebotomíneos do Brasil” (RANGEL & LAINSON, 2003).

Outros métodos além dos métodos tradicionais de identificação vêm sendo aprimorados. Um exemplo é o projeto Computer-Aided Identification of Phlebotomine Sandflies of América (CIPA) (DEDET *et al.*, 2003), que foi desenvolvido a partir da digitalização e disponibilização on-line de dados morfológicos para servir de auxílio, reunindo uma grande quantidade de dados atualizados. Outras técnicas que também podem ser utilizadas para a identificação, são os estudos isoenzimáticos (REMY-KRISTENSEN *et al.*, 1996) e a biologia molecular que por meio de pesquisa de sequências de DNA (Ácido desoxirribonucleico) conhecidas, avalia e compara sequências gênicas ajudando na identificação taxonômica (TERAYAMA *et al.*, 2008; MANONMANI *et al.*, 2010).

3.4 Influência das variáveis climáticas sobre a densidade populacional de flebotomíneos

Os locais de abrigo e criadouro de flebotomíneos apresentam características peculiares, as quais favorecem a presença desses insetos, com pequenas variações de temperatura e umidade. Geralmente os locais de abrigo correspondem ao ambiente onde as fêmeas encontram seus hospedeiros

vertebrados e realizam seu repasto sanguíneo (BASIMIKE *et al.*, 1991; MEMMOTT, 1991; COMER; BROWN, 1993).

Em ambientes tropicais, existe maior previsibilidade de chuvas e uma grande estabilidade climática, o que pode favorecer pequenas flutuações nas populações de insetos (WOLDA, 1978; MENDES *et al.*, 2016). Correlações entre variações de fatores ambientais com a flutuação nas populações de alguns insetos já foram estudadas. Os resultados dessas pesquisas demonstraram que as variações populacionais de insetos estariam intimamente ligadas à estabilidade climática e à estabilidade dos *habitats* (WOLDA, 1978; WOLDA *et al.*, 1992; KASSEM *et al.*, 2012).

Vários trabalhos sugerem que alguns fatores abióticos, como a temperatura, pluviosidade e umidade, estejam relacionados, em diferentes graus, com a ocorrência de flebotomíneos, seja por influência sobre os adultos ou pela modificação nos criadouros (SCORZA *et al.*, 1968; CHANIOTIS *et al.*, 1971; MISCEVIC, 1981; ROBERTS, 1994; MICHALSKY *et al.*, 2009).

Chaniotis e colaboradores em 1971 sugerem que a sazonalidade dos flebotomíneos está relacionada com os padrões de distribuição das chuvas que agem modificando as condições dos criadouros no solo. De acordo com esta hipótese, a chuva beneficiaria os flebotomíneos quando esta ocorresse moderadamente ao longo da estação chuvosa, mas prejudicaria estes insetos quando inundasse o chão, destruindo os criadouros e matando as pupas no solo (DIAS *et al.*, 2007, BARATA *et al.*, 2004; MICHALSKY *et al.*, 2009).

Rutledge e Ellenwood (1975) demonstraram que as condições dos criadouros, tais como a quantidade de nutrientes, umidade e temperatura, influenciam fortemente na variação populacional dos adultos nos diversos *habitats*. Em 1987, Feliciangeli demonstrou que as chuvas e os consequentes níveis de umidade parecem ser os mais importantes determinantes na sazonalidade e na densidade de algumas espécies de flebotomíneos.

Os estudos sobre a variação sazonal de *Lu. longipalpis* são importantes para a compreensão da dinâmica de transmissão da doença a partir do conhecimento da interação entre a espécie e seu habitat, visando controlar a população de vetores em uma dada região (MACEDO *et al.*, 2008). Outro fator que também pode estar incriminado na variação da incidência anual de LV, bem como do seu vetor, é o fenômeno El Niño, pois a longa seca desencadeada por esse fator

pode influenciar negativamente a densidade vetorial e a intensidade da transmissão da doença, o que reduziria o impacto da doença nas regiões suscetíveis do Brasil (FRANKE *et al.*, 2002).

O entendimento da influência dos fatores climáticos sobre a população de flebotomíneos é imprescindível, pois a correlação entre os fatores climáticos e o número de flebotomíneos vetores poderá servir de suporte para determinar as épocas do ano mais propícias para a aplicação de inseticidas, objetivando o uso racional dos recursos e a redução de danos ambientais (RESENDE *et al.*, 2006).

Segundo Salomón e colaboradores (2015) cada área geográfica possui um contexto próprio que define a dinâmica de risco de determinada localidade, dessa forma a abundância vetorial irá depender não somente das variações climáticas, como também de fatores bióticos e abióticos e da plasticidade biológica das espécies, não devendo assim ser os dados extrapolados como características da espécie, pois para cada localidade há um cenário particular.

3.5 Agente etiológico da LV e ciclo de transmissão da *Leishmania infantum*

A LV é causada por protozoários pertencentes ao reino Protista e Sub-Reino Protozoa, locomovendo-se por meio de flagelos, pertencendo ao filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*. Como características da ordem Kinetoplastida, apresentam uma região especializada da mitocôndria, que é única nos tripanossomatídeos, denominada cinetoplasto (DEGRAVE *et al.*, 1994; SHAW, 2006; LEVINE *et al.*, 1980).

Atualmente são conhecidas trinta espécies de *Leishmania*, sendo que cerca de vinte são patogênicas aos seres humanos (CUPOLILLO; BOITÉ; PORROZZI, 2014; LAINSON; SHAW, 2005).

Segundo Lainson & Shaw (1987), as leishmânias são classificadas taxonomicamente de acordo com a localização do parasito no aparelho digestivo dos flebotomíneos. Os parasitos que se aderem à porção anterior e média do intestino são agrupados no subgênero *Leishmania* (comportamento suprapilário) e os que apresentam uma fase de divisão que se aderem à parede do intestino posterior (desenvolvimento peripilário), pertencem ao subgênero *Viannia*.

Durante o ciclo de vida do parasito há duas formas distintas da *Leishmania*: as formas promastigotas que são flageladas e extracelulares, presentes no trato digestivo de insetos e nos meios de cultura, e as formas amastigotas não-flageladas e intracelulares obrigatórias, encontradas em neutrófilos dos hospedeiros vertebrados (SECUNDINO *et al.*, 2005; GOSSAGE *et al.*, 2003).

Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, as fêmeas dos flebotomíneos ingerem macrófagos teciduais contendo em seu interior formas amastigotas de *Leishmania*, as quais, após ruptura celular, são liberadas no lúmen do trato digestivo dos insetos, quando o sangue ingerido ainda permanece fresco. Ainda dentro do bolo alimentar (matriz peritrófica) as leishmânias começam a se dividir por fissão binária e se diferenciam em formas promastigotas procíclicas, que mais tarde irão se diferenciar em promastigotas longas, chamadas de nectomonas, as quais escapam do confinamento da matriz peritrófica pela expressão e secreção da enzima quitinase (ROGERS *et al.*, 2008). Essas se ligam ao epitélio intestinal e se movem em direção ao intestino anterior, mais tarde se transformam em promastigotas curtas chamadas de formas leptomonadas (BATES 2007). Por fim, as formas leptomonadas que são responsáveis pela rápida expansão no intestino médio anterior transformam-se na forma promastigota metacíclica, que são infectantes para o hospedeiro vertebrado, que são regurgitadas na pele do hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo feito exclusivamente pelas fêmeas (ROGERS, 2012).

No local onde ocorreu a picada do inseto vetor as formas promastigotas são fagocitadas por células do SFM, macrófagos, células micróglia, células de Kupffer e neutrófilos. As formas promastigotas se transformam em amastigotas, dentro do vacúolo fagocitário, se dividem rapidamente e quando o macrófago está densamente parasitado o vacúolo se rompe liberando as amastigotas, que serão novamente fagocitadas por outros macrófagos (LAINSON; SHAW, 1988; ASHFORD, 2000; BATES, 2007).

Alguns autores levantam a hipótese de que o ciclo de transmissão da LV também possa ocorrer entre a população canina através de ectoparasitos, sugerindo a hipótese da capacidade vetorial de pulgas e carrapatos (COUTINHO *et al.*, 2005; COUTINHO; LINARDI, 2007; PAZ *et al.*, 2013). Em estudo realizado no Brasil, pesquisadores coletaram 39 carrapatos de cães soropositivos, apresentando sinais clínicos sugestivos de LVC e verificaram a presença de DNA de *Leishmania* em seis

desses carrapatos. No mesmo estudo, carrapatos foram macerados e inoculados em hamsters por via oral e intraperitoneal. Seis meses após a inoculação, 14 animais apresentaram sinais de infecção, sendo que 12 haviam sido inoculados por via intraperitoneal e dois por via oral (COUTINHO *et al.*, 2005).

Em cães, outras vias de transmissão já foram determinadas, como a transmissão transplacentária e a transmissão venérea (BOGGIATTO *et al.*, 2011; NAUCKE, 2012). Entretanto, segundo Andrade *et al.*, 2002, a transmissão vertical é extremamente rara e portanto, não contribui significativamente para a disseminação da LVC.

Até o momento, só foi comprovada a transmissão direta no cão, através do coito (ALENCAR, 1959; CABRAL *et al.*, 1992). As vias alternativas de infecção colocam em prova as estratégias de controle e erradicação da LV baseadas na eliminação do vetor, atestando que estas não seriam eficientes, pois a *Le. infantum* manteria seu ciclo, assumindo potencial importância no acasalamento de cães errantes positivos (SILVA *et al.*, 2009).

3.6 Hospedeiros e reservatórios da LV

A definição de reservatório abrange qualquer ser humano, animal, artrópode, planta ou matéria inanimada onde vive e se multiplica um agente infeccioso, do qual depende para sua sobrevivência, reproduzindo-se de maneira a que possa ser transmitido a um hospedeiro susceptível (NEVES, 2006).

A cadeia epidemiológica da LV se desenvolve em determinada área, mediante a presença concomitante do vetor, do reservatório e do hospedeiro susceptível. Compreender a interação entre os reservatórios e flebotomíneos vetores no ambiente em que são encontrados, é um pré-requisito para o direcionamento de estratégias apropriadas de medidas de controle e prevenção das leishmanioses (COSTA *et al.*, 1999).

No novo mundo os hospedeiros de LV incluem uma grande variedade de hospedeiros mamíferos, sendo a ocorrência comum em roedores e canídeos, mas também em edentados, marsupiais, ungulados e primatas (DEANE; DEANE, 1954A; LAINSON *et al.*, 1985, MALTA *et al.*, 2010).

Como hospedeiros silvestres da LV, têm sido descritos o chacal (*Canis aureus*), o lobo (*Canis lupus*) e raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*), encontrados em áreas rurais remotas, mas sem grande importância na maioria das áreas endêmicas (DEANE; DEANE 1955, 1956; LAINSON *et al.*, 1969, 1990; SHERLOCK, 1997).

Deane e Deane (1954b) relataram o primeiro registro de LV em canídeos silvestres no continente americano, sendo a raposa *Lycalopex vetulus* o reservatório infectado. Porém Courtenay (2002) afirmaram que, embora confirmada a alta estimativa da infecção por exames parasitológicos de raposas com LV, a contribuição dessas espécies na transmissão é muito baixa (9%) se comparada aos cães (91%).

Sherlock (1984) encontrou em Jacobina (BA) a espécie *Didelphis albiventris* naturalmente infectado com parasitos causadores da LV. Esse foi o primeiro registro no Novo Mundo de um hospedeiro silvestre marsupial para *Le. infantum*. Posteriormente, foi encontrado na Venezuela o gambá *Didelphis marsupialis* infectado por esse parasito (CORREDOR *et al.*, 1989).

Diversos grupos de animais silvestres além dos canídeos, como felinos e roedores, também já foram incriminados como reservatórios de *Leishmania* spp. (LUPPI *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008). Savani (2004) descreveram o primeiro caso do Brasil e das Américas de leishmaniose visceral felina (LVF) e sugeriram que os gatos domésticos possam atuar como reservatório de LV. Silva (2008) reportaram 25% de soroprevalência em gatos em área endêmica para LV no Rio de Janeiro. Os autores sugeriram que os gatos possam ser considerados como alternativa de hospedeiros domésticos de *Le. infantum* e deveriam ser incluídos nas investigações sorológicas realizadas em áreas endêmicas. Particularmente em gatos, a maioria dos estudos detectam baixas cargas parasitárias, não sendo detectada infecção por métodos parasitológicos (SILVA *et al.*, 2008). Já os roedores constituem um dos grupos de animais sinantrópicos mais procurados pelos flebótomos. Esse achado reforça a necessidade desses animais serem estudados como possíveis reservatórios de *Le. infantum* (CALDAS *et al.*, 2001).

O papel do cão como reservatório de *Leishmania* foi tratado pela primeira vez por Nicolle, em 1908, na Tunísia, quando experimentalmente foi comprovada a infecção desse animal. Maurício (2000) sugere que a *Le. infantum* chegou à América

do Sul, através de cães infectados vindos do continente europeu durante os eventos de colonização no século XVI.

No Brasil, nos anos 50, Deane e Deane, e Alencar, estudando a leishmaniose no Ceará, estabeleceram a importância do cão doméstico como fonte de infecção e manutenção da LV. Ao longo dos anos, fortes evidências foram se somando aos achados de Deane, o que corrobora para a conclusão dele: cães soropositivos, mesmo assintomáticos, podem apresentar intenso parasitismo cutâneo por formas amastigotas (REIS *et al.*, 2006); cães assintomáticos, sem nenhum achado de sinal clínico da doença, podem ser fonte de infecção para flebotomíneos (DA COSTA-VAL *et al.*, 2007; MICHALSKY *et al.*, 2007). Em regiões onde a LV é endêmica a prevalência da infecção canina supera e precede a prevalência da doença humana (ROMERO E BOELAERT, 2010), alguns animais podem permanecer por longos períodos sem apresentar nenhuma sintomatologia da doença, mesmo estando infectados, e na ausência de inquéritos sorológicos e programa de retirada de cães, estes tornam-se importante fonte de infecção para flebotomíneos (MICHALSKY *et al.*, 2007).

O cão adquiriu grande importância como reservatório de *Le. infantum* no ambiente doméstico, devido à sua convivência estreita com o homem. Contudo, a infecção de um animal não é suficiente para que ele possa ser considerado um reservatório. Um animal infectado, à princípio, é um hospedeiro, porém seu papel na manutenção do ciclo de transmissão de uma determinada doença dependerá das peculiaridades da interação parasito-hospedeiro e isto irá determinar a competência da espécie na manutenção ou transmissão do parasito definindo assim seu papel como reservatório (GUERIN *et al.*, 2002; DESJEUX *et al.*, 2004). As aves são refratárias e servem de fonte alimentar aos flebotomíneos atraindo estes para o peridomicílio, sem evidências de que elas sejam reservatórios de *Leishmania* spp. (DIAS, 2003; BRITO *et al.*, 2014).

3.7 Sinais clínicos da leishmaniose visceral canina

Com base na sintomatologia, Mancianti em 1988, classificou a LVC em três grupos: assintomáticos, com ausência de sinais clínicos sugestivos de infecção por *Leishmania* spp., oligossintomáticos, que apresentam no máximo três sinais

clínicos da doença, entre eles opacificação das córneas, perda moderada de peso, alopecia localizada e/ou adenopatia linfoide e cães sintomáticos, apresentando vários sinais clássicos da doença, incluindo lesões cutâneas, perda severa de peso, onicogribose, ceratoconjutivite, apatia, paresia dos membros posteriores. Outras manifestações podem estar incluídas, como diarreia, envolvimento articular, fraqueza, redução das atividades, anorexia, anemia, linfadenopatia local ou generalizada, atrofia muscular e falência renal, sendo estas normalmente, as principais causas de morte de cães infectados (PUMAROLA *et al.*, 1991; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001).

No cão, a exemplo dos humanos, a doença é de evolução lenta e insidiosa e o período de incubação também é bastante variável. Os sintomas aparecem, em média, entre três a sete meses após a inoculação do agente, porém estes sintomas poderão levar anos para se manifestar (DEANE; DEANE, 1955; GENARO, 1993, BRASIL, 2011b). Durante este período, o protozoário (parasitando células fagocitárias) se dissemina, por meio do sistema vascular e linfático para diversos órgãos (ALVES *et al.*, 2010; RIGO *et al.*, 2013)

Quando assintomáticos, os cães infectados podem apresentar aspecto aparentemente normal, mas com alto grau de parasitismo, tanto na pele quanto nas vísceras. Um ponto importante a ser considerado é que tanto animais sintomáticos quanto assintomáticos podem ser fonte de infecção para o inseto vetor, permitindo a transmissão do parasito para o homem e outros vertebrados (MOLINA *et al.*, 1994; MICHALSKY *et al.*, 2007)

Os responsáveis pela grande variedade de sinais clínicos presentes na LVC são os complexos imunes que se depositam em vários órgãos e tecidos dos vertebrados, como pele, vasos sanguíneos, tecidos oculares e em várias articulações, o que conduz ao aparecimento de diversos sintomas, como úlceras cutâneas e das pontas das orelhas, epistaxe, uveíte, conjutivite e episclerite imunomediada e claudicação por poliartrite (KONTOS; KOUTINAS, 1993; CIARAMELLA; CORONA, 2003; TROTZ-WILLIAMS; GRADONI, 2003).

3.8 Diagnóstico

O diagnóstico da LV, tanto em humanos quanto nos animais, é baseado em sinais clínicos, nos dados epidemiológicos (ocorrência ou não da enfermidade na área do indivíduo ou animal) e no diagnóstico laboratorial (BRASIL, 2006).

Até recentemente, o diagnóstico era complexo e invasivo (microscopia direta para avaliar punção do baço ou aspirados de medula óssea), mas os atuais avanços tecnológicos têm levado a significantes melhorias no desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas que são úteis na rápida avaliação da doença, permitindo o estabelecimento de estratégias de controle (BOELAERT *et al.*, 2008).

3.8.1 Diagnóstico Clínico Canino

O diagnóstico clínico canino baseia-se em identificar a LVC por meio da sintomatologia apresentada pelo animal. É um diagnóstico bastante complexo, apresentando os sinais clínicos mais comuns: alterações cutâneas, linfadenomegalia local ou generalizada, perda de peso, aumento do tamanho do baço e do fígado, onicogribose e apatia (MAIA, CAMPINO, 2008). Além disso, muitos cães que vivem em áreas endêmicas podem ter contato com o parasito e não desenvolver sinais clínicos da doença. Estes sinais são bastante variados e inespecíficos, podendo, facilmente, ser confundidos com outras doenças. Dessa maneira, a associação entre os parâmetros clínicos, epidemiológicos, parasitológicos e sorológicos faz-se necessária para o diagnóstico definitivo (FREITAS *et al.*, 2012; DANTAS-TORRES *et al.*, 2006).

3.8.2 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial da LVC ainda representa um desafio, já que um teste eficaz deve detectar a infecção, ter alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, deve ser simples, de fácil execução, ter baixo custo, ser viável em laboratórios e adaptável a condições de campo. Preferencialmente, deve utilizar amostras biológicas obtidas por coletas não invasivas (MAIA; CAMPINO, 2008). Existem três tipos de abordagens no diagnóstico laboratorial que atende aos casos

humanos e caninos: métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (COSTA *et al.*, 1991; SUNDAR; RAI, 2002; BRASIL, 2006).

O exame parasitológico direto ainda permanece como referência no diagnóstico da LV (HERWALDT, 1999; DE VRIES *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2018). O diagnóstico depende da demonstração de formas promastigotas dos parasitos em cultura, ou de formas amastigotas de *Leishmania spp.* em esfregaços de aspirados de linfonodo, medula óssea, baço e fígado corados por Giemsa ou panótico (DISH *et al.*, 2003; LAURENTI, 2009). Esse método é o instrumento mais adequado de diagnóstico devido à sua alta especificidade (100%). O número de *Leishmania* encontrada no exame parasitológico é muito variável, não tendo correlação com a intensidade da sintomatologia (PALTRINIERI *et al.*, 2010). Em algumas situações é muito difícil observar parasitos, principalmente em animais em fase inicial da doença, sendo comum a ocorrência de resultados negativos. Contudo, mesmo apresentando alta especificidade, a dificuldade de execução da técnica, a necessidade de um profissional treinado, a qualidade da amostra, associada a uma baixa carga parasitária, principalmente de animais assintomáticos, podem dificultar a identificação ou mesmo apresentar um resultado falso-negativo (SARIDOMICHELAKIS *et al.*, 2005; MELO, 2004). Deste modo, o diagnóstico parasitológico é considerado inapropriado para estudos epidemiológicos, principalmente para subsidiar as ações de controle. (FAYET, 1999).

O material das punções aspirativas também pode ser inoculado em meios especiais de cultura, aumentando a sensibilidade da pesquisa (acima de 80%), ao se utilizar uma interface líquida, meio LIT (Liver infusion tryptose) ou Schneider, sobre o NNN (Novy-MacNeal-Nicolle), entretanto, pode retardar o resultado em semanas. As culturas devem ser mantidas entre 24 e 26°C e observadas em microscópio invertido semanalmente, por até quatro semanas (DIETZE, 2005).

O diagnóstico sorológico RIFI (reação de imunofluorescência indireta) já foi bastante utilizado no diagnóstico da LV. Em estudos de revisão sistemática com metanálise, a RIFI apresentou sensibilidade de 88% e especificidade de 90% (MAIA *et al.*, 2012). Entretanto requer condições de laboratório sofisticadas que inviabilizam sua utilização em campo (ASSIS *et al.*, 2008). A técnica consiste em aderir antígenos constituídos de promastigotas de *Leishmania* em lâminas de microscopia para fluorescência, onde é processada a reação com o soro a ser

testado. Ao final da reação, a ligação antígeno-anticorpo é observada com o auxílio de um conjugado fluorescente (BRASIL, 2006).

O ELISA é um teste de diagnóstico simples, porém sensível, para a detecção de antígenos do patógeno ou anticorpos específicos produzidos pelo hospedeiro (ENGVALL; PERLMANN, 1971). Esse processo permite analisar grande número de indivíduos com um volume pequeno de amostra. A técnica é altamente sensível, mas a sua especificidade depende do antígeno. Entretanto, a técnica requer infraestrutura laboratorial, como espectrofotômetro, pipetas e estufas (ELMAHALLAWY *et al.*, 2014). As técnicas RIFI e o ELISA eram os testes mais usados no Brasil, devido à melhor sensibilidade e especificidade destes em comparação aos demais (BADARÓ *et al.*, 1983; GUIMARÃES *et al.*, 1990). No entanto, essas técnicas nem sempre foram satisfatórias, já que muitos animais infectados apresentavam testes sorológicos falso negativos (ZAFFARONI *et al.*, 1999; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001).

Outros testes vêm se mostrando promissores para o diagnóstico da LVH, como o ELISA, que utiliza o antígeno recombinante K39 (rK39) de *Le. infantum*. Diversos autores têm avaliado o desempenho da detecção de anticorpos anti-rK39 por ELISA, com sensibilidade variando de 93,3 a 100% e especificidade de 82,5 a 100% (BADARÓ *et al.*, 1996; MACHADO DE ASSIS *et al.*, 2008, 2011; VAISH *et al.*, 2012; ABASS *et al.*, 2013, 2015; KUMAR *et al.*, 2001). Assim como rK39, outras proteínas recombinantes, tais como: rK9, rK26, rK28, rKLO8, entre outras, têm sido avaliadas por ELISA, contudo, a sensibilidade e especificidade destes antígenos são bastante variados (MOHAPATRA *et al.*, 2009; VAISH *et al.*, 2012; ABBAS *et al.*, 2013, 2015).

Outro teste considerado simples e de baixo custo é o teste de aglutinação direta (DAT), que foi desenvolvido por El Harith *et al.* (1986) para utilização em campo, sendo um método semiquantitativo de boa sensibilidade e especificidade, baseado na reação entre anticorpos na presença de antígenos (promastigotas mortas), tripsinizados, fixados com formalina e corados com azul brilhante. Os soros dos pacientes são diluídos em série, incubados juntamente ao antígeno, onde é possível visualizar a aglutinação apenas no dia seguinte (SUNDAR; RAI, 2002). A grande vantagem do DAT é devido a sua realização em laboratório com infraestrutura limitada. Romero e Boelaert (2010) realizaram uma meta-análise com o objetivo de avaliar o desempenho do DAT em pacientes com LV, onde os

resultados apresentaram estimativas de sensibilidade e especificidade de 94,8%. Esta técnica tem sido validada em diversas áreas endêmicas, sendo atualmente utilizada como diagnóstico de primeira linha em centros de referência no Sudão (CHAPPUIS *et al.*, 2003; ABDALLAH *et al.*, 2004). No entanto, no Brasil não existe nenhum kit de DAT registrado na ANVISA e disponível comercialmente. Oliveira e colaboradores (2009) desenvolveram um protótipo de kit para diagnóstico denominado DAT-LPC, este teste apresentou elevada sensibilidade e especificidade de 99% e 98,2%, além demonstrar alta precisão e estabilidade térmica. De acordo com os autores, é possível a produção nacional deste teste que apresentou elevada acurácia, e apresentou ser de simples operacionalidade, com a vantagem de autonomia nacional de produção (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Métodos de diagnósticos moleculares, utilizando o DNA, têm sido explorados visando superar as inúmeras limitações que os métodos diagnósticos de rotina apresentam. Esse método se tornou uma ferramenta útil e muito usada no diagnóstico da LVC. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que vem sendo empregada com frequência no diagnóstico e monitoramento das leishmanioses. É capaz de detectar quantidades mínimas de DNA de *Leishmania* spp. em ampla variedade de amostras clínicas de homem, cães, reservatórios silvestres e vetores. Vários trabalhos têm mostrado que os ensaios moleculares permitem uma detecção mais rápida e sensível de diversas doenças parasitárias, além da possibilidade de caracterização dos microrganismos envolvidos (MELO, 2004; GOMES *et al.*, 2007). A PCR é uma técnica confiável e rápida para diagnosticar a infecção por *Leishmania* spp, com sensibilidade de 70 a 100% e especificidade de 85 a 99% (NO *et al.*, 2001). A alta sensibilidade e especificidade, a habilidade de detectar e identificar o protozoário envolvido (mesmo antes do aparecimento de quaisquer sintomas clínicos), o monitoramento da carga parasitária 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 (GURUMURTHY *et al.*, 2012).

Outra vantagem atribuída à PCR é que ela detecta o material genético do parasito, podendo ser empregada como método confirmatório em caso de animais recém-infectados ou assintomáticos que, na maioria dos casos, não apresentam soroconversão e apresentam baixa carga parasitária (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; ALVES; BEVILACQUA, 2004). A sensibilidade das técnicas de PCR para

detecção de *Leishmania* spp. depende de vários fatores: as condições físico-químicas da reação, a concentração e a natureza do DNA da amostra e os iniciadores e sondas selecionados para a região alvo (BASTIEN *et al.*, 2008). As regiões-alvo mais frequentemente empregadas tendem a ser altamente conservadas e repetitivas, como o gene da subunidade do RNA ribossomal (rRNA) ou o DNA do minicírculo do cinetoplasto (kDNA) (SUNDAR; RAI, 2002; ANTINORI *et al.*, 2007; BASTIEN *et al.*, 2008; MIRÓ *et al.*, 2008). Enquanto o gene rRNA está presente em 40-200 cópias por célula, o minicírculo do kDNA está presente em 10 mil cópias, que se encontram distribuídas entre dez classes de sequências diferentes, conferindo uma elevada sensibilidade às PCR que utilizam essa região como alvo (LACHAUD *et al.*, 2002). Esses iniciadores dirigidos para amplificar a região conservada podem ser utilizados para detectar todas as espécies de *Leishmania* (DEGRAVE *et al.*, 1994).

Atualmente, diversos protocolos de ensaios moleculares foram padronizados para LV, incluindo como alvos diversas sequências gênicas, como: DNA do cinetoplasto - kDNA (SUDARSHAN & SUNDAR, 2014), RNA ribossomal (VAN EYS *et al.*, 1992), mini-éxon derivado do RNA (KUHLIS *et al.*, 2007), betatubulina (AKMAN *et al.*, 2000), glicoproteína 63 (GUERBOUJ *et al.*, 2001), espaçador interno transcrito - ITS (SCHÖNIAN *et al.*, 2003), espaçadores internos do gene ribossômico sub-unidade menor (SSU rRNA) (NOYES *et al.*, 1997; CUPOLILLO *et al.*, 2000).

O desenvolvimento da PCR em tempo real (qPCR) também vem permitindo a quantificação acurada de espécies do gênero *Leishmania* e o monitoramento, em tempo real, do produto amplificado (VERMA *et al.*, 2010). Como uma das características da infecção por *Leishmania* spp. é o animal apresentar parasitos em latência, as abordagens quantitativas são necessárias para elucidar o status de positivo dos cães pela PCR de áreas endêmicas, facilitando a monitorização da carga parasitária e sua resposta ao tratamento (MARY *et al.*, 2004; VITALE *et al.*, 2004; FRANCINO *et al.*, 2006).

Outra técnica empregada é a PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism), que é capaz de diferenciar *Le. amazonensis* de *Le. braziliensis* em pacientes infectados (VOLPINI *et al.*, 2004). Essa mesma técnica também permite diferenciar *Le. amazonensis* e *Le. braziliensis* de *Le. infantum*, que se torna importante em áreas endêmicas de LV e LTA, já que *Le. infantum* e *Le. braziliensis*

são simpátricas. É crucial dispor de testes de diagnóstico não só para confirmar a presença do parasito, mas também identificar e distinguir as espécies de *Leishmania* em flebotomíneos naturalmente infectados.

Atualmente, há um consenso sobre a necessidade de padronização dos ensaios de PCR, pois não há uniformidade entre os protocolos utilizados nos diferentes centros, dificultando a comparação dos resultados (DE RUITER *et al.*, 2014).

Em 2011, o diagnóstico imunológico da LVC passou por grandes modificações, baseadas em um estudo multicêntrico realizado sob a coordenação do MS, na qual foram avaliadas as metodologias de RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta), EIE (Ensaio Imunoenzimático) e o teste rápido imunocromatográfico, DPP® (*Dual Path Platform*) - Biomanguinhos (BRASIL, 2011 c).

Segundo nota técnica do MS, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis de dezembro de 2011, o teste rápido DPP®, patenteado pela Chembio Diagnostics e desenvolvido pelo Instituto Biomanguinhos/Fiocruz, passou a ser o teste de triagem nos inquéritos caninos e o ELISA (Ensaio imunoenzimático), o teste confirmatório no diagnóstico da LVC (BRASIL, 2011d). O teste utiliza a proteína quimérica recombinante denominada K28, com base em fragmentos dos antígenos K9, K26 e K39 do complexo Donovaní (GRIMALDI *et al.*, 2012). Um estudo de Grimaldi *et al.* (2012), utilizando o teste rápido DPP, demonstrou elevada especificidade (96%) e baixa sensibilidade (47%) na identificação de cães assintomáticos infectados, no entanto a sensibilidade do teste é significativamente maior (98%) para detecção de animais sintomáticos.

Outra possibilidade de pesquisa por *Leishmania* de menor custo, porém menos sensível, é a dissecação dos flebotomíneos e posterior análise do seu tubo intestinal sob microscopia óptica (MYSKOVA *et al.*, 2008). Já a técnica de xenodiagnóstico baseia-se na detecção e isolamento do patógeno usando o próprio vetor natural que é colocado para alimentar-se no hospedeiro. Após o repasto sanguíneo, diferentes métodos podem ser empregados para avaliar a presença de *Leishmania* no flebotomíneo, como a PCR que é altamente específica e sensível (MICHALSKY *et al.*, 2007; MYSKOVA *et al.*, 2008). A técnica de xenodiagnóstico é extremamente útil para avaliar a importância epidemiológica de cães parasitados com *Leishmania*, permitindo estabelecer não só as taxas de alimentação de

flebotomíneos, mas também fornecendo dados importantes sobre o potencial destes cães na transmissibilidade da infecção (MOLINA *et al.*, 1994; MICHALSKY *et al.*, 2007). Embora seja uma técnica de grande utilidade, não é recomendada na rotina, sendo seu uso limitado à pesquisa, uma vez que só pode ser executada em laboratórios especializados, onde uma colônia de flebotomíneos esteja bem estabelecida (DA COSTA-VAL *et al.*, 2007; MAIA E CAMPINO, 2008).

3.9 Controle da leishmaniose visceral

O Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) no Brasil, iniciado há mais de 50 anos, tem como objetivo interromper a cadeia de transmissão em diferentes níveis. O MS tem preconizado o diagnóstico precoce e o tratamento dos pacientes humanos, a identificação e eliminação do reservatório doméstico soropositivo em áreas de LV, e redução do contato homem-vetor pelo uso de telas, mosquiteiros, repelentes tópicos, borrifação ambiental e manejo ambiental (BRASIL, 2006; BORASCHI; NUNES, 2007).

O uso de inseticidas, como organofosforados, carbamatos e os piretroides sintéticos é denominado pulverização residual de habitações, ocorrem por aspersão espacial nas paredes e teto das habitações, bem como abrigos de animais. Essa medida é específica para a forma adulta do *Lu. longipalpis* e é considerada eficiente para reduzir a população peridoméstica dos flebotomíneos e, conseqüentemente, a transmissão parasitária. (TESH, 1995; COSTA; VIEIRA, 2001; LACERDA, 1994; MONTEIRO *et al.*, 1994, OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2013). A utilização de inseticidas pode eventualmente ter um efeito transitório, mas geralmente é insustentável a longo prazo, devido a razões técnicas e econômicas. Diante da descontinuidade das ações de controle, os programas, em sua maioria, têm obtido efeito temporário e, como consequência, observa-se a reinfestação dos ambientes e o reaparecimento de casos humanos e caninos de LV (GONTIJO E MELO, 2004, MAROLI *et al.*, 2010).

Ainda, deve-se considerar a ocorrência de resistência do vetor à inseticidas em decorrência destas contínuas intervenções (ROMERO; BOELAERT, 2010). Alexander e colaboradores (2009) apresentaram os primeiros dados de redução significativa da susceptibilidade da população de *Lu. longipalpis* aos inseticidas utilizados pelos programas de controle de vetores, que pode ter sido

induzida pela exposição a inseticidas utilizados em programas de controle da dengue e malária.

Apesar disso, Pessoa e colaboradores (2015) demonstraram em estudo de susceptibilidade de *Lu. longipalpis* à alfa-cipermetrina, em bioensaios de campo, que a população testada era altamente suscetível à alfa-cipermetrina, até seis meses após a borrifação em diferentes superfícies testadas (parede pintada, parede rebocada e madeira). Contudo os autores não descartam o encontro de outras populações de *Lu. longipalpis* susceptíveis à alfa-cipermetrina

Durante o período de maior densidade vetorial, existem medidas alternativas para controle de flebotomíneos usando piretroídes sintéticos, permetrinas e deltametrinas, que já tiveram seu efeito de repelência e eficácia comprovados em estudos anteriores (MANZILLO *et al.*, 2006; KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1997; LUCIENTES, 1999; DAVID *et al.*, 2001; GAVGANI *et al.*, 2002). Estão disponíveis em formulações tópicas ou em coleiras e reduzem o risco de picadas de flebotomíneos e conseqüentemente infecções (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011). O efeito dos piretroídes sintéticos em formulações tópicas (*spot-on*) e *sprays* tem uma duração de três a quatro semanas e em coleiras até oito meses de duração devido ao fato das coleiras apresentam uma liberação lenta do inseticida.

Até 2012, somente as coleiras impregnadas com deltametrina a 4% (Scalibor®) tinham registro no Brasil. Recentemente, outras duas coleiras, com princípios ativos distintos da Scalibor®, foram registradas. São elas a Seresto®, a base de imidacloprida (neonicotinóide) e flumetrina (piretróide); e a Leevre®, composta por deltametrina e propoxur, piretróide e carbamato, respectivamente. Foi comprovado que o uso de coleiras impregnadas com deltametrina 4% (Scalibor®) podem proteger o cão da picada do vetor por até oito meses (DAVID *et al.*, 2001), e mantém o efeito inseticida por um ciclo de vida do flebotomíneo (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1997). Silva e colaboradores (2018) avaliaram aspectos comportamentais de *Lu. longipalpis* comparando áreas submetidas à intervenção com coleira impregnada com deltametrina a 4% como medida de controle da LV, e demonstraram que foi associado uma redução na quantidade de flebotomíneos capturados em 60% na cidade de Montes Claros. Pesquisa realizada por Brazuna (2012) relatou redução da prevalência da LVC em 50% quando avaliou o uso da coleira em 100% da população canina na cidade de Campo Grande, MS. Estes químicos apresentam de baixa a moderada toxicidade, baixa volatibilidade e uma

rápida atividade inseticida (MAROLI *et al.*, 2010; OTRANTO; DANTAS-Torres, 2013).

A eficácia da coleira Seresto® já foi comprovada no controle de pulgas e carrapatos tanto em cães como gatos (DANTAS-TORRES *et al.*, 2013, BRIANTI *et al.*, 2014). Brianti e colaboradores (2016) demonstraram a superioridade da coleira Seresto®, contra a infestação por pulgas e flebotomíneos, quando comparada a Scalibor®. Para avaliação da infestação por pulgas, a Seresto® teve eficácia de 100% nos dois períodos de acompanhamento, enquanto que a eficácia da Scalibor variou de 23,3 a 33,3% nos dias 120 e 210 respectivamente.

Em áreas endêmicas recomenda-se também a colocação de telas e malhas finas impregnados com inseticida nas residências e canis, já que estes constituem uma barreira física contra insetos durante a noite (BRASIL, 2006; FELICIANGELI *et al.*, 1995; PERRUOLO, 1995; KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1997). Os mosquiteiros são bastante utilizados em vários países no Velho Mundo, os quais tem apresentado redução considerável na incidência da doença (GONZÁLEZ *et al.*, 2015), todavia, no Brasil esta ferramenta ainda se encontra pouco explorada possivelmente devido a questões culturais (COURTENAY *et al.*, 2007; AMÓRA, *et al.*, 2009). Outras medidas indicadas são o uso de repelentes tópicos e evitar os ambientes e horários onde os vetores possam frequentar.

O controle das formas imaturas do vetor não é realizado tendo em vista a grande dificuldade na identificação dos criadouros naturais do inseto (BRASIL, 2006; CASANOVA *et al.*, 2013). Em contrapartida, medidas de prevenção e controle relacionados aos criadouros do vetor, estão associados com o manejo ambiental e o desenvolvimento de atividades de educação em saúde com a população (SCANDAR *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2014). O manejo ambiental tem sido indicado como a limpeza de quintais, terrenos e praças públicas, realização de podas, alterando as condições dos meios que propiciem o estabelecimento de criadouros das formas imaturas do vetor. Medidas simples, como limpeza urbana, eliminação dos resíduos, eliminação de fonte de umidade e a não permanência de animais domésticos dentro das casas contribuirão para evitar ou reduzir a proliferação do vetor (BRASIL, 2006).

Estudo realizado por Lara-Silva e colaboradores (2017), avaliaram o uso do controle químico e do manejo ambiental isoladamente na redução da densidade populacional de flebotomíneos. A pulverização química mostrou uma tendência na redução da densidade de *Lu. longipalpis*, contudo, o manejo ambiental foi

significativamente estatístico, demonstrando sua eficácia na redução da densidade de flebotomíneos, tornando essencial no controle vetorial. Ainda, os autores afirmam que o uso concomitante das duas estratégias de controle pode trazer um maior benefício na redução de vetores e consecutivamente na transmissão da doença. Vale destacar que a responsabilidade da intervenção consiste em uma demanda conjunta por parte do poder público e da população na prevenção da doença em locais públicos e privados (SCANDAR *et al.*, 2011).

Quanto às atividades de educação em saúde, é importante que seja distribuído à população de áreas endêmicas, material informativo sobre a LV e que este contenha mensagem clara e pedagógica já que grande parte da população ainda desconhece os principais aspectos a respeito da doença (COSTA *et al.*, 2014; AMORIM *et al.*, 2015). O material educativo deve reduzir significativamente a complexidade da informação sobre a doença, já que é comum ser encontrado em informativos, linguagem imprópria e técnica, gerando erros conceituais sobre o assunto (LUZ *et al.*, 2005).

Com relação aos reservatórios, a medida de controle usada no ciclo urbano ou rural é a realização de inquéritos soropidemiológicos, identificando os animais positivos e realizando a eutanásia destes (LEÃO, 1997). Estima-se que cerca de 850 mil cães sejam avaliados anualmente no país, e entre 20.000 e 25.000 cães sejam eutanasiados após o diagnóstico positivo (RIBAS *et al.*, 2013). Essa estratégia, apesar de sistematicamente empregada, tem apresentado resultados questionáveis, tornando-a, entre todos os métodos propostos para controle da doença, o mais controverso e o menos aceito pela sociedade (OLIVEIRA *et al.*, 2008, COSTA *et al.*, 2013). Existem autores que contestam a eliminação canina, devido ao alto custo, ser extremamente laboriosa e de eficácia duvidosa. Isso provavelmente devido à baixa sensibilidade dos testes sorológicos utilizados para detecção e do atraso na remoção dos cães das áreas endêmicas e da resistência dos proprietários dos cães na retirada dos animais (BORJA-CABRERA *et al.*, 2002).

Entretanto, existem autores que comprovam a redução de casos humanos de LV em locais onde houve eutanásia de cães e as medidas de controle realizadas de forma conjunta e sistemática (MAGALHÃES *et al.*, 1980; ASHFORD, 1996; BARATA *et al.*, 2011). Um bom exemplo de como as medidas de controle integradas podem reduzir a incidência da doença foi mostrado em um estudo realizado em Porteirinha, onde foi identificada a redução da incidência da LV

humana e canina, após a implementação de ações para o combate do vetor e a retirada sistemática de cães soropositivos (FRANÇA-SILVA, 2003). Morais e colaboradores (2015) demonstraram redução na prevalência de LV canina em Belo Horizonte, no período de 2007 a 2011, evidenciando que as atividades propostas pelo Ministério da Saúde são efetivas, porém de execução complexa.

Outro aspecto relevante refere-se à captura de cães errantes, especialmente em áreas urbanas, por ser fonte disseminadora de diversas doenças de importância médico-sanitária, sendo de grande importância para o controle da LV. Somado a isso, outro fator importante e pouco difundido, são as doações de cães na qual é recomendada a realização de exames sorológicos antes da adoção desses animais, principalmente em áreas de transmissão da LV (BORGES *et al.*, 2008).

No Brasil, as ações do PCLV sempre foram descontínuas por razões orçamentárias e escassez de recursos humanos adequadamente treinados. As dificuldades financeiras e orçamentais ultrapassam a capacidade econômica dos municípios, dificultando a criação de carreiras profissionais razoavelmente remuneradas para manter o funcionário contratado. Essas condições levam o agente buscar outro trabalho, que não permanece no campo para adquirir a experiência necessária (TAUIL, 2006). Diante das dificuldades no processo de controle da LV e as medidas não atingirem os efeitos esperados, ocorrem reinfestações dos ambientes e ressurgimento de casos humanos e caninos (GONTIJO, 2004).

A inexistência de tratamento efetivo para a cura da doença canina e a polêmica sobre a eliminação indiscriminada de cães infectados levaram à tentativa de desenvolvimento de novas estratégias de controle, como o desenvolvimento de vacinas caninas. Essa descoberta seria a mais eficiente medida de controle para LV, que poderá ter um impacto na diminuição da prevalência da infecção canina e, conseqüentemente, da humana (MARZOCHI, 1985; HOMMEL *et al.*, 1995, TESH, 1995; DYE, 1996).

Um dos principais desafios para o desenvolvimento de uma vacina eficaz para LV é a necessidade de combinar dois ou mais antígenos para conservar as propriedades antigênicas para várias espécies de *Leishmania*, e para as diferentes fases do parasito (JAIN *et al.*, 2015).

No Brasil, existe atualmente uma vacina sendo comercializada e registrada no Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA): a Leish-

Tec®, registrada em 2007 pela Hertape Calier Saúde Animal (HERMONT, 2008), que contém o antígeno A2, proteína recombinante do estágio amastigota de várias espécies de *Leishmania*, e como adjuvante a saponina. Contudo, confere cerca de 40% de proteção contra a infecção por *Leishmania* (COELHO *et al.*, 2003; ZANIN *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2008; PALATNIK-DE-SOUSA, 2012; GRADONI, 2015; JAIN & JAIN 2015). Apesar de registrada no MAPA e cumprir com os requisitos técnicos exigidos, o MS não autorizou seu uso em saúde pública, devido à falta de dados convincentes sobre sua efetividade (BRASIL, 2009; BRASIL, 2007).

4 OBJETIVOS

GERAL

-Estudar os aspectos ecoepidemiológicos envolvidos na transmissão da leishmaniose visceral no município de Itaúna.

ESPECÍFICOS

a) Estudo de flebotomíneos

- Determinar a fauna de flebotomíneos das áreas selecionadas.
- Estabelecer o número mensal das espécies de flebotomíneos e correlacioná-lo com as variáveis climáticas (temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade)
- Averiguar a flutuação sazonal das espécies de flebotomíneos, e verificar o período do ano mais propício para intensificação das ações de controle (borrifação de inseticidas).
- Verificar a adaptação doméstica das espécies de flebotomíneos
- Detectar nos espécimens capturados a infecção natural por *Leishmania* através de métodos moleculares.

b) Estudo da leishmaniose visceral em cães

- Determinar a taxa de soropositividade da LVC nas áreas selecionadas.
- Detectar a infecção e caracterizar a espécie de *Leishmania* nas diferentes amostras biológicas de cães soropositivos (pele, medula óssea, baço e linfonodo mesentérico)

c) Epidemiologia descritiva

- Georreferenciar os casos humanos, caninos e os pontos entomológicos com presença de flebotomíneos.
- Analisar a distribuição espacial dos dados georreferenciados.

5 METODOLOGIA

5.1 Área de estudo

Itaúna é um município brasileiro situado na região Centro-Oeste do estado de Minas Gerais (FIG.1 A), localizado no quadrilátero ferrífero, no colar metropolitano da Região Metropolitana de Belo Horizonte. Limita-se ao norte pelos municípios de Igaratinga e Pará de Minas; ao Sul por Itatiaiuçu; a leste por Mateus Leme e a Oeste por Carmo do Cajuru (PREFEITURA ITAÚNA, 2017). Encontra-se a 76 Km da capital mineira e esta proximidade permite um grande fluxo de pessoas e animais nesta região.

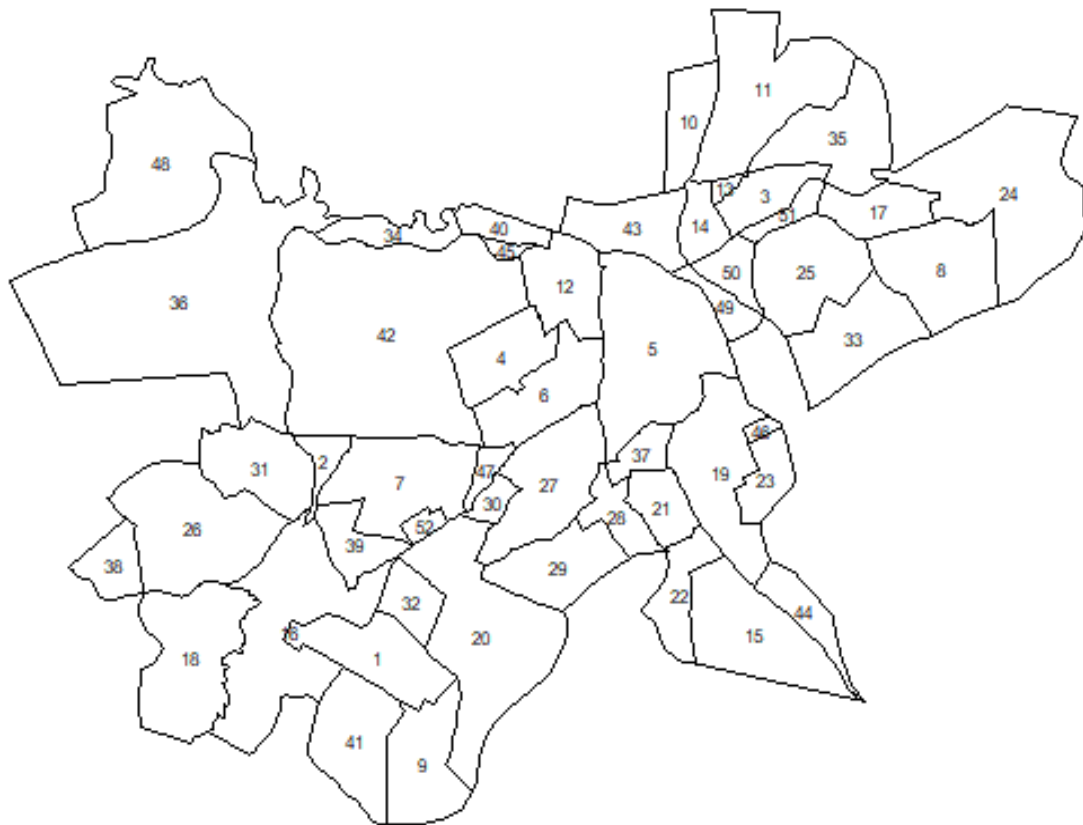
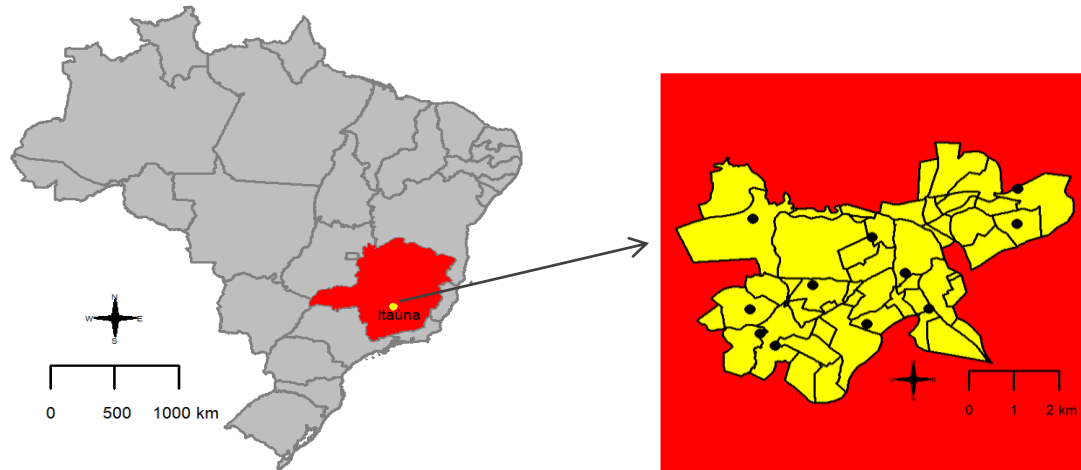
Itaúna encontra-se a 802 metros de altitude e possui área de 495,875 km². Determinada pelo paralelo de 20° 04' 32" de latitude sul, em sua interseção com o meridiano de 44° 34' 35" de longitude oeste. Sua população estimada é de 92.091 habitantes. O município possui atualmente cerca de 52 bairros (FIG. 1B) (IBGE, 2016). O maior bairro de Itaúna é o Centro com 7.259 habitantes e em segundo lugar o bairro Morada Nova com 6.056 habitantes (PREFEITURA ITAÚNA, 2017).

O relevo, modelado em formações do complexo cristalino, apresenta a feição de escarpas, maciços e morros. Os solos são argilosos, de moderada resistência à erosão, de profundidade variável, de baixa a moderada fertilidade natural, com maior aproveitamento na pecuária. Formação aparecendo na maioria das vezes em associação (podzólico e latossolo vermelho-amarelo). As montanhas são rochosas, pré-cambrianas, intensamente dobradas, provocando a formação de colinas côncavas - convexas e cristas esparsas, com altitudes de 860 a 1.200 metros (PREFEITURA ITAÚNA, 2017).

O clima é tropical de altitude com verões quentes, com totais pluviométricos variando em torno de 1.194 mm anuais. A temperatura média anual é de cerca de 22° C. A média das máximas fica em torno de 32° C e a das mínimas de 13° C. A média da umidade relativa do ar é de 64,15%. A vegetação predominante é o cerrado prevalecendo espécies das seguintes famílias: Euphorbiaceae, Caesalpiniaceae, Fabaceae, Mirtaceae, Meliaceae, dentre outras. A fauna de mamíferos é representada principalmente pelas ordens: Didelphimorphia, Chiroptera, Xenartha, Primates, Carnivora e Artiodactyla, dentre outras (PREFEITURA ITAÚNA, 2017).

FIGURA 1: Localização do município de Itaúna, Minas Gerais e sua delimitação urbana

A



B

1- Aeroporto, 2- Alaíta, 3- Antunes, 4- Belveder, 5- Centro, 6- Cerqueria Lima, 7- Chácara Quitão, 8- Cidade Leonane, 9- Cidade Nova, 10- Conj. Hab. Jadir Marinho, 11- Cidade universitária, 12- Das Graças, 13- Eldorado, 14- Fazenda Chácara, 15- Faz. Morro do Engenho, 16- Garcias, 17- Irmãos Auler, 18- Itaunense, 19- Lourdes, 20- Morada Nova, 21- Nogueira Machado, 22- Nogueirinha, 23- Nova Vila Mozart, 24- Olaria, 25- Padre Eustáquio, 26- Parque Jardim, 27- Piedade, 28- Pio XXI, 29- Res. Morro do Sol, 30- Res. Novo Horizonte, 31- Res. Santanense, 32- Res. São Geraldo, 33- Res. Veredas, 34- Res. Victor Gonçalves, 35- Santa Monica, 36- Santanense, 37- Santo Antônio, 38- São Bento, 39- São Geraldo, 40- São Judas Tadeu, 41- Três Marias, 42- Tropical, 43- Universitário, 44- Vargem Verde, 45- Vila Augusto Chaves, 46- Vila Mozart, 47- Vila Nazaré, 48- Vila Santa Maria, 49- Vila Santiago, 50- Vila Tavares, 51- Vila Vilaça, 52- Vila Washington.

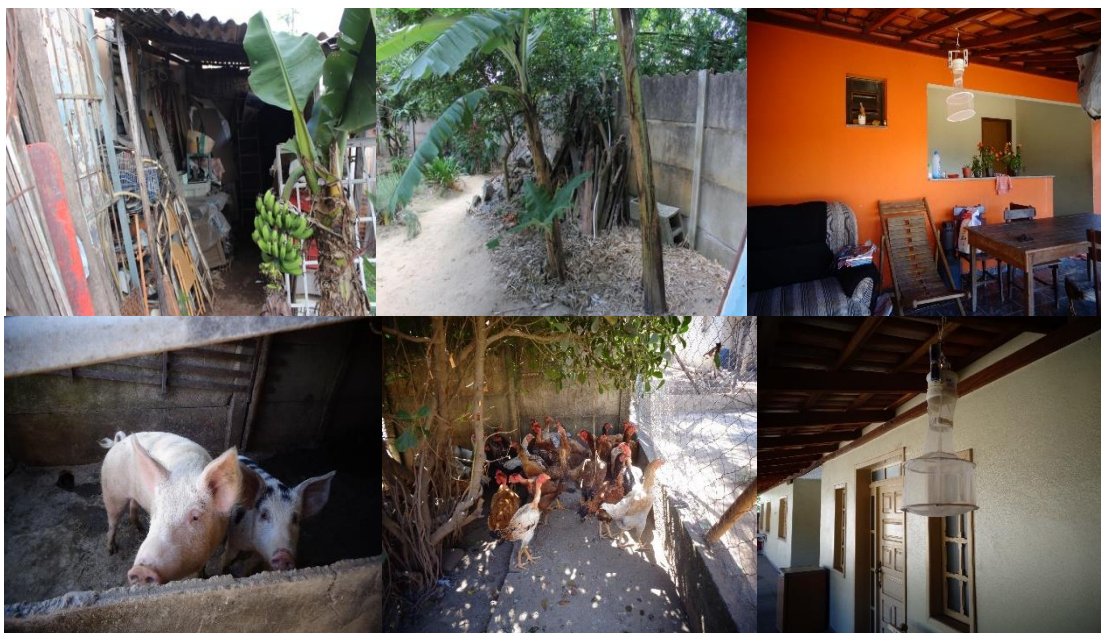
Fonte: Elaborado por Letícia Cavalari Pinheiro

5.2 Escolha dos bairros para o estudo

Para o levantamento entomológico, foram escolhidos onze bairros do município de Itaúna (Chácara do Quitão, Morada Nova, Três Marias, Itaunense, Parque Jardim, Santanense, Graças, Centro, Nogueirinha, Cidade Leonane e Olaria), que possuem características físicas parecidas, sendo todos eles urbanizados. Esses bairros, que representam 21% do total de bairros do município de Itaúna, foram apontados pelo CCZ, pois neles foram notificados casos caninos de LV.

As residências obtiveram escolha direcionada e foram georreferenciadas de acordo com os seguintes critérios: acúmulo de matéria orgânica, presença de árvores frutíferas, vegetação favorecendo áreas sombreadas e presença de animais domésticos (FIG. 2).

FIGURA 2: Caracterização de residências que foram realizadas as capturas entomológicas no município de Itaúna, MG.



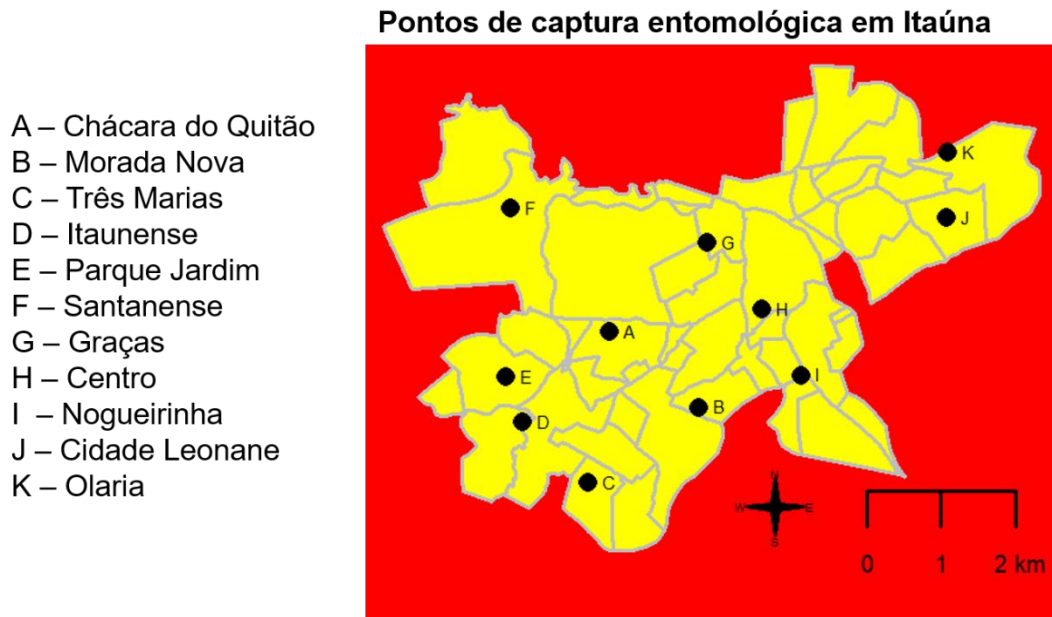
Fonte: Fotografias de Josiane Valadão L. Marques

5.3 Levantamento entomológico

As capturas entomológicas foram realizadas utilizando-se armadilhas luminosas do tipo HP (PUGEDO *et al.*, 2005), sendo uma instalada no intradomicílio e outra no seu respectivo peridomicílio, nos onze bairros selecionados (FIG. 3), de maneira sistemática e de forma pareada, para fornecer subsídios para os estudos de endofilia e exofilia. As armadilhas foram colocadas em locais sombreados, próximos a galinheiros e a outros locais com presença de animais domésticos. Estas foram expostas no período de maio de 2015 a abril de 2016, a partir das 18 horas e recolhidas às 8 horas da manhã seguinte, durante três noites consecutivas de cada mês, realizadas sistematicamente durante 12 meses nas áreas selecionadas, correspondendo a 36 coletas, totalizando 504 horas de esforço amostral por armadilha.

O material entomológico capturado foi distribuído da seguinte forma: todos os machos foram acondicionados em tubos de hemólise contendo álcool 70% visando à identificação taxonômica e conseqüentemente destinados ao levantamento da fauna. As fêmeas capturadas foram congeladas, paralisando sua digestão e acondicionadas em tubos de criopreservação contendo DMSO 6%, que preserva as células evitando seu rompimento. Posteriormente congeladas a -20° C e submetidas à análise molecular (*Ln*PCR) e também foram identificadas taxonomicamente e participaram do levantamento da fauna.

FIGURA 3: Mapa dos pontos de captura entomológica, distribuídos nos onze bairros de estudo, do município de Itaúna, Minas Gerais.



Fonte: elaborado por Leticia Cavalari Pinheiro

5.3.1 Montagem e identificação dos machos de flebotomíneos capturados

Os espécimens capturados foram triados e durante a clarificação, os machos foram colocados em pequenas placas de Petri, numa solução de potassa (KOH a 10%), onde permaneceram entre duas à três horas, para que ocorra o amolecimento da quitina; após esse período foram transferidos para outras placas de Petri com ácido acético, por um período de 15-20 minutos, para neutralizar o hidróxido de potássio; a seguir, lavou-se em água destilada por 15 minutos por três vezes; os insetos permaneceram em lactofenol por 24 horas, para diafanizar; em seguida foram montados entre lâmina e lamínula, em líquido de Berlese, procedimento baseado na metodologia preconizada por Langeron (1949), com modificações.

Para a identificação taxonômica, os insetos foram montados em Berlese, um meio aquoso de baixa refração, que possibilita passagem de luz com maior intensidade, facilitando a observação das estruturas internas, que são necessárias para a identificação de machos e fêmeas. Todo material foi analisado no laboratório do Grupo de Pesquisa em Taxonomia de flebotomíneos/Epidemiologia, diagnóstico e controle das leishmanioses (TFL), do Instituto René Rachou (IRR)/Fiocruz.

A identificação a nível específico foi realizada de acordo com Galati (2003), através da observação por microscopia ótica de caracteres morfológicos internos e externos, por meio do uso de descrições específicas, chaves taxonômicas, e quando necessário utilizou-se comparações com exemplares da coleção referência do IRR. A vantagem da utilização desta classificação é a atualização anual disponibilizada no site: www.fsp.usp.br/~egalati, que permite a inclusão de novas espécies ou novos registros no país, bem como a revisão de caracteres para aprimoramento da identificação.

O material que não foi identificado à nível específico, devido a não integridade de alguns exemplares, foi identificado até o status taxonômico permitido.

5.3.2 Preparação das fêmeas capturadas para detecção de infecção natural

A dissecação das fêmeas capturadas, que se encontravam preservadas do DMSO 6%, consistiu na retirada dos três últimos segmentos abdominais e da cabeça de cada fêmea. Esses segmentos foram montados entre lâmina e lamínula utilizando-se líquido de Berlese, e identificados a nível específico. O restante do corpo da fêmea foi armazenado em tubo tipo *ependorf* para detecção de *Leishmania*. Estes foram acondicionadas individualmente ou agrupadas em *pools* contendo dois até dez exemplares, de acordo com o bairro de captura, mês e espécie, na qual foram devidamente rotulados e armazenados a -20° C para posterior análise molecular (Tabela de *Pools* encontra-se no apêndice 1).

5.4 Extração de DNA das fêmeas de flebotomíneos capturadas em campo

As fêmeas foram dissecadas para a confirmação da espécie e, para detecção de *Leishmania* spp. em flebotomíneos capturados em campo. Estas foram acondicionadas em microtubos de fundo cônico, individualmente ou agrupadas em *pools* de até dez indivíduos. A extração de DNA foi realizada através do kit Puragene Core Kit A da Qiagen e o DNA obtido foi armazenado a -20° C para posterior utilização.

Após as extrações, as amostras de DNA foram quantificadas pelo espectrofotômetro (Espectrophotometer ND-1000 (Nanodrop®), utilizando volume

mínimo de 1 µL de DNA extraído para a obtenção da concentração em ng/µL de cada amostra.

5.4.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) de gene constitutivo de flebotomíneo (cacofonia)

A amplificação de um gene constitutivo do DNA de flebotomíneos (cacofonia) visa confirmar a presença do DNA de flebotomíneos, validando, assim, o processo de extração e os resultados negativos e positivos da *LnPCR*. Para a reação foi utilizado um par de iniciadores que amplificam a região IVS6 do gene constitutivo específico (cacofonia) de flebotomíneos neotropicais. A técnica foi realizada utilizando-se os seguintes iniciadores: 5' GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3' e 5' CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC 3' (LINS *et al.*, 2002). A amplificação do gene constitutivo foi realizada em equipamento termociclador automático (Veriti 96 well Applied Biosystems). A mistura para a reação foi feita utilizando um *kit* para PCR (PureTaq Ready-To-Go PCR Beads/GE Healthcare) que contém aproximadamente 2,5 unidades de PureTaq™ DNA Polymerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 mM dATP, dCTP, dGTP e dTTP e estabilizadores, incluindo BSA. A cada *bead*, foram adicionados 1 µl de cada iniciador (20 pmol) e 21 µl de água para PCR. Preparados os tubos, foram adicionados 2 µl de DNA (cerca de 10 ng/mL). O programa de amplificação utilizado foi: 94° C por 12 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação, 94° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos e uma extensão final de 72° C por 10 minutos e resfriamento a 4° C. Em cada conjunto de reação de PCR, foram incluídos um controle negativo e um positivo. Como controle negativo da reação, foi utilizado um tubo com todos os reagentes, exceto o DNA, e, no controle positivo, adicionado DNA purificado de flebotomíneo.

5.4.2 Detecção de *Leishmania spp.* em flebotomíneos capturados no campo

Após a extração de DNA, foi realizada a técnica de *LnPCR* dirigida ao gene SSUrRNA de *Leishmania*, que amplifica um fragmento desse gene, que é uma região conservada entre todas as espécies de *Leishmania spp.* (VAN EYS *et*

al.,1992; CRUZ *et al.*, 2002, 2006), visando a detecção do parasito em flebotomíneos capturados no campo.

Para a amplificação das amostras, foi realizada uma amplificação inicial de um fragmento de aproximadamente 603 pb, utilizando-se 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, utilizando-se dos iniciadores R3: 5' TCC CAT CGC AAC CTC GGT T 3' e R4: 5' AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3'.

A mistura para a primeira reação foi preparada para um volume final de 25 µl utilizando um *kit* para PCR (PureTaq Ready-To-Go PCR Beads/GE Healthcare) que contém aproximadamente 2,5 unidades de PureTaq™ DNA Polymerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 mM dATP, dCTP, dGTP e dTTP e estabilizadores, incluindo BSA. A cada *bead*, foram adicionados 1 µl de cada iniciador (20 pmol) e 13 µl de água MilliQ. Preparados os tubos, foram adicionados 10 µl de DNA (cerca de 10 ng/mL). Em tubos contendo 1 mL de H₂O, 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 10 µl do produto amplificado diluído, e foi utilizado o mesmo *kit* de PCR Bead.

A amplificação foi processada em aparelho termociclador automático Veriti (Applied Biosystems), utilizando o seguinte ciclo para SSU rRNA: desnaturação inicial a 94° C por cinco minutos, seguido de 35 repetições de desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 60° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos, e extensão final foi a 72° C por cinco minutos e resfriamento a 4° C. Para a segunda reação *LnPCR*, foi realizado o ciclo de 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, e extensão final de 72° C por cinco minutos e resfriamento a 4° C.

Em todas as reações foi utilizado controle positivo com 20 ng de DNA extraído de cultura de *Le. infantum* (MHOM/BR/PP75), e como controle negativo foi utilizada H₂O para PCR como *template*.

5.4.3 Análise dos produtos amplificados pela PCR

Os produtos amplificados pela PCR utilizando iniciadores que amplificam fragmentos do gene constitutivo de flebotomíneos (cacofonia) e do resultado da *Ln*-PCR, destinada a amplificar um fragmento do gene SSUrRNA, foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 2% corados com brometo de etídio e examinados em exposição à luz ultravioleta (UV).

5.4.4 Cálculo da taxa mínima de infecção natural

Considerando-se os agrupamentos de espécimens e dada a possibilidade de se saber a real taxa de infecção natural para cada fêmea, a taxa mínima de infecção natural (TMI) foi estimada atribuindo-se o critério de que pelo menos um dos exemplares estava infectado, quando o *pool* ao qual pertence for positivo para *Leishmania* spp. como descrito por Paiva *et al.* (2006), o que corresponde ao número de grupos positivos x 100/número total de insetos

$$\text{TMI} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de } \textit{pools} \text{ positivos de cada espécie} \times 100}{\text{total de indivíduos da espécie}}$$

5.4.5 Sequenciamento SSUrRNA para determinação da espécie de Leishmania

Para a identificação das espécies de *Leishmania* nos flebotomíneos infectados, foi realizado o sequenciamento do produto amplificado pela segunda reação da *Ln*PCR (fragmento esperado de aproximadamente 353 pb).

Todas as bandas de 353 com intensidade considerável foram cortadas e purificadas utilizando o *kit* comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante. O produto amplificado foi purificado, eluído em 20 µl de H₂O estéril utilizado como “template” para outra reação de PCR, anterior ao processo de sequenciamento.

A reação de PCR para o sequenciamento foi preparada para um volume final de 10 µL, formada por 1 µl do Premix (BigDye® Terminator v3.1 Cycle), 1 µl de

tampão do BigDye, 1 µl dos iniciadores (R3 e R4 para *Leishmania*), na concentração de 3,2 pmol e 2 µL do produto de PCR e 5 µl de H₂O. Esse *mix* foi colocado em um termociclador com o seguinte programa: 94° C por três minutos, seguido de 30 ciclos de 96° C por um segundo, 65° C por cinco segundos (essa temperatura depende da temperatura de anelamento do iniciador utilizado) e 60° C por quatro minutos. O sequenciamento propriamente dito foi posteriormente realizado em sequenciador automatizado ABI 3730 (Life Technologies) e um kit adequado (v3.1 Cycle BigDye® Terminator) em ambas as direções (Forward e Reverse).

Para a análise bioinformática, os softwares usados para edição da sequência e alinhamento foram o BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit.html) e BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Essas análises incluem a edição, alinhamento e a busca de sítios de restrição das sequências estudadas.

5.5 Influência dos fatores climáticos na densidade populacional dos flebotomíneos

Para avaliar a influência das variáveis climáticas (precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar e temperatura) em relação ao número de flebotomíneos capturados, foram utilizados os dados climatológicos obtidos no Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), unidade Divinópolis e a densidade de flebotomíneos capturados, que correspondem ao período de Maio de 2015 a Abril de 2016. Esses dados obtidos foram analisados graficamente e através de estatística não paramétrica, utilizando o método de Spearman para o cálculo da correlação entre variáveis.

5.6 Inquérito canino amostral

A realização do inquérito canino permite identificar a taxa de positividade para LV dos cães infectados, assim como a localidade onde estes se encontram, para realizar o diagnóstico epidemiológico e desenvolver políticas públicas para o enfrentamento dessa situação.

No ano de 2016 foi realizado pelo CCZ do município de Itaúna um inquérito canino amostral (avaliação de cães selecionados em bairros onde foram

registrados casos humanos e/ou caninos de LV). Esse inquérito foi realizado em 15 bairros: Campos, Centro, Chácara do Quitão, Cidade Nova, Garcias, Graças, Cidade Leonane, Morada Nova, Murilo Gonçalves, Nogueirinha, Novo Horizonte, Parque Jardim Santanense, Olaria, Três Marias, Vila Nazaré). No inquérito foram analisados 1701 cães, utilizando os testes sorológicos de DPP e ELISA, preconizados pelo MS.

No mesmo ano foram realizados diagnósticos em 1224 cães por meio de demanda espontânea (quando o proprietário conduz voluntariamente o animal até o CCZ para realização do exame sorológico). Esses cães avaliados sob a forma de demanda espontânea eram provenientes de diferentes bairros do município.

Assim, no ano de 2016 foram avaliados 2925 cães domiciliados em Itaúna visando a determinação da taxa de soropositividade. Os métodos de diagnósticos foram realizados pelos agentes de combate a endemias do CCZ de Itaúna e pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED), como preconizado pelo MS do Brasil.

5.6.1 Diagnóstico sorológico

Para o diagnóstico sorológico, foram utilizadas as técnicas conforme preconizadas pelo MS em 2011. Para realizar a triagem, utilizou-se o teste DPP®, que é o teste imunocromatográfico de uso exclusivo para cães. O DPP® foi realizado na presença do morador e proprietário do cão, já que o teste oferece resultado em 15 minutos. Para o teste pode-se utilizar sangue, soro ou plasma do animal. Optamos pela coleta de sangue, que foi realizada por meio de perfuração da orelha do animal, pela lanceta disponível no *Kit*. Imediatamente após a perfuração utilizou-se alça coletora de sangue, que foi transferida para o suporte do teste, aproximadamente de 5 µL de sangue ao poço 1 intitulado “Amostra + Tampão”, a seguir foram adicionadas 2 gotas do tampão. Após 5 minutos as duas linhas azuis, controle (C) e teste (T), desapareceram. A seguir foram adicionadas 4 gotas do tampão no poço 2 intitulado “Tampão”. A leitura dos resultados foi realizada em 15 minutos após esta etapa, quando avaliado o resultado: negativo, aparecimento de uma linha vermelha ou positivo, duas linhas vermelhas. Por ser um teste de triagem, permite que apenas os casos positivos sejam levados para confirmação, desonerando, desta forma, o laboratório.

Participaram do inquérito canino amostral a população de cães de nove dos onze bairros selecionados para o estudo entomológico do município de Itaúna,

além de outros seis bairros. A partir dos pontos de coleta entomológica, foi traçado um raio de no mínimo 500 metros, para que os cães das residências dentro desse perímetro fossem avaliados para o levantamento da infecção canina. Foram excluídos apenas filhotes com idade inferior a seis meses, cuja sorologia poderia gerar falsos resultados devido a presença de anticorpos maternos adquiridos pelo filhote através da amamentação (BRAGA *et al.*, 1998). Foram aleatoriamente escolhidos 60 cães considerados soropositivos para serem submetidos a necrópsia e a métodos parasitológicos e moleculares.

5.6.2 Coleta de amostras de sangue para teste de ELISA

As reações positivas pelo teste do DPP® foram submetidas ao ensaio imunoenzimático ELISA. Veterinários e agentes do CCZ/Itaúna realizaram exames clínicos para a coleta de sangue por punção na veia radial ou cefálica do cão, seguindo corretamente as normas de assepsia e biossegurança, sendo coletado um volume total de 3 mL com seringas de 5 mL acopladas com agulhas de calibre 25x8mm, estéreis. No momento da coleta, foram utilizadas fichas clínico-epidemiológicas, contendo informações referentes ao estado clínico do animal, como também dados do proprietário, endereço, nome do cão, código da amostra, sexo, raça, idade, tamanho do pêlo, porte, sendo aferido parâmetros fisiológicos relevantes à análise de sinais e sintomas compatíveis com a LV. Outro dado importante na anamnese foi verificar se o cão foi vacinado contra raiva ou leishmaniose visceral.

Após a coleta de sangue total, este foi acondicionado em tubos próprios, devidamente etiquetados, e acondicionados em caixa térmica para posterior centrifugação e obtenção de soro. As amostras de soro foram encaminhadas para o laboratório da FUNED e realizados os testes de ELISA/Biomanguinhos (VOLLER; BIDWELL; BARLETT, 1976).

Foram utilizados Kits EIE-LVC produzido por Biomanguinhos (FIOCRUZ, BR) que emprega antígenos solúveis de *Leishmania major-like* (LIRA *et al.*, 2006) para sensibilização das placas de fundo plano. O resultado foi obtido através da visualização da alteração de cor com o auxílio de equipamentos mensuradores de absorvância. A execução do teste foi realizada por profissionais devidamente qualificados e o ensaio desenvolvido de acordo com as recomendações do

fabricante. Os resultados foram transferidos para a ficha epidemiológica e remetidos para o IRR, onde foram inseridos em um banco de dados.

5.6.3 Recolhimento dos cães sorologicamente positivos

Tanto o inquérito canino quanto a retirada dos cães infectados e eutanásia foi realizada pela Prefeitura Municipal de Itaúna, com a colaboração da equipe do grupo de Leishmaniose e pesquisas TFL do IRR.

Dos cães que participaram do inquérito e que foram diagnosticados como positivos nos testes DPP® e ELISA, foram selecionados aleatoriamente 60 cães para participarem deste estudo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/Fiocruz), sob a licença nº LW-2/15 (protocolo nº p-68/14-3) (Anexo 2). Todos os procedimentos utilizados seguiram as normas técnicas estabelecidas pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002).

5.6.4 Eutanásia e necropsia dos cães soropositivos

Foram aleatoriamente selecionados 60 cães considerados soropositivos para LV, do inquérito canino amostral realizado no município de Itaúna. Estes cães foram eutanasiados e necropsiados de acordo com o protocolo descrito a seguir.

Primeiramente, foi realizada uma inspeção ectoscópica, objetivando preencher um boletim epidemiológico (Apêndice 2) no qual os cães foram caracterizados quanto ao *status* clínico. Optou-se, no presente estudo, por usar somente as formas sintomáticas e assintomáticas da classificação proposta por Mancianti (1988). Para os cães considerados sintomáticos, os sinais clínicos a serem considerados como característicos de LVC foram, onicogribose, lesões cutâneas, perda severa de peso, ceratoconjutivite, dermatite generalizada ou de ponta de orelha, úlceras, hiperqueratose, dentre outros sinais clínicos.

Em seguida, o cão foi anestesiado com Thionembutal (30 mg/mL) por via endovenosa e primeiramente realizada a punção de medula óssea utilizando-se agulha hipodérmica 18 G1 (20x40). Para a punção, foi feita a assepsia do local com álcool 70% e, em seguida, introduzida agulha na região da articulação fêmur-tíbio-

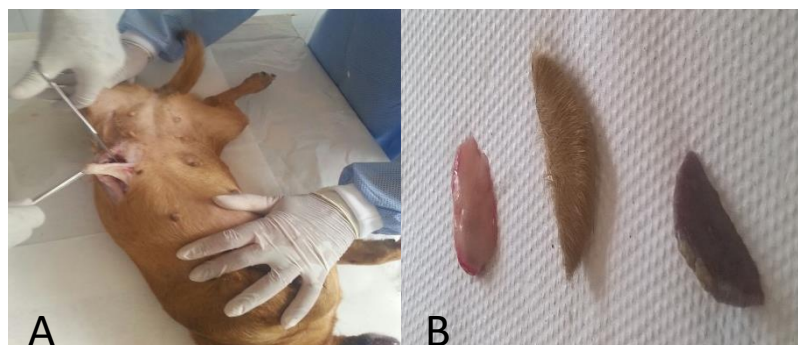
patelar, perfurando a crista da tíbia, possibilitando a coleta de amostra de aspirado da medula óssea (FIG. 4). Posteriormente, o cão foi eutanasiado utilizando-se solução saturada de cloreto de potássio, via endovenosa, na proporção de 0,5 mL/kg de peso do animal. Com o animal em decúbito dorsal, a pele da região abdominal ventral foi rebatida e feita incisão pré-retroumbilical abrindo a cavidade abdominal (FIG. 5 A). Com a região abdominal rebatida, foram recolhidos, com auxílio de tesoura e pinça, fragmentos de baço, linfonodo mesentérico e pele da região distal da orelha (FIG. 5 B), necessários para realização de estudos moleculares.

FIGURA 4: Punção de de medula óssea (crista tibial) dos cães selecionados para o estudo, no município de Itaúna, Minas Gerais.



Fonte: Fotografias de Josiane Valadão L. Marques

FIGURA 5: Necrópsia e obtenção de de amostras dos cães selecionados para o estudo, provenientes do município de Itaúna, Minas Gerais.



A) Incisão pré-retroumbilical. B) Fragmentos de linfonodo mesentérico, pele de ponta de orelha e baço. Fonte: Fotografias de Josiane Valadão L. Marques

5.6.5 Cálculo da taxa de positividade e taxa de prevalência canina da LVC

Para o cálculo da taxa de positividade da LVC no município de Itaúna foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de positividade canina} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de cães reagentes nos dois testes} \times 100}{\text{Total de cães examinados no bairro}}$$

Já para o cálculo da taxa de prevalência canina, utilizamos a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de prevalência canina} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de cães reagentes nos dois testes} \times 1000}{\text{Total de cães estimados por bairro}}$$

5.6.6 Isolamento de parasitos

A manutenção dos parasitos foi feita em meio de cultura NNN (NICOLLE, 1908) enriquecido com meio LIT (Liver infusion tryptose). As culturas foram feitas em duplicata. As amostras de medula óssea coletadas foram semeadas em tubos contendo meio de cultura NNN (NOVY; MC NEL, 1903; NICOLLE, 1908) enriquecidos com LIT e mantidos a $25^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ em estufa biológica (BOD). Neste trabalho, optou-se pela utilização unicamente de amostras de medula óssea, uma vez que a coleta desse material é asséptica, diminui a possibilidade de contaminações e aumenta as chances de isolamento. (FIG. 6). O exame da cultura foi realizado semanalmente e considerado positivo quando foi observada a presença de formas promastigotas de *Leishmania*. Quando não ocorreu o aparecimento de formas flageladas depois de seis semanas, a cultura foi considerada negativa. Após o isolamento dos parasitos, estes foram utilizados em fase exponencial de crescimento para obtenção da massa de promastigotas e estas amostras foram criopreservadas e depositadas no banco de cepas do grupo de pesquisas TFL do IRR.

FIGURA 6: Semeadura de medula óssea em meio de cultura NNN/LIT, provenientes dos cães necropsiados do município de Itaúna, Minas Gerais.



Fonte: Fotografia de Érika Michalsky Monteiro

5.6.7 Pesquisa direta de parasitos

Dos fragmentos de tecidos retirados dos cães soropositivos (baço, linfonodo mesentérico e pele da região distal da orelha), foram realizados exames direto por aposição (*imprint*) e esfregaço de medula óssea, para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania*, sendo as amostras coradas pelo Giemsa (FIG. 7).

FIGURA 7: *Imprint* dos tecidos em lâmina e esfregaço de medula óssea para diagnóstico parasitológico direto, provenientes das amostras dos cães participantes do estudo do município de Itaúna, Minas Gerais.



Fonte: Fotografia de Josiane Valadão L. Marques

5.6.8 Extração de DNA de medula óssea e tecidos obtidos dos cães soropositivos

Os fragmentos de pele, linfonodo mesentérico e baço foram processados para pesquisa de *Leishmania* spp., na qual uma porção de aproximadamente seis milímetros foi cortada e macerada para extração de DNA, que foi realizado utilizando o *kit* de isolamento de DNA de células e tecidos Genomic Prep™ (GE Healthcare). Para extração do DNA de medula óssea, foi separado aproximadamente 200 µl da amostra em microtubo e utilizado o *kit* de cromatografia em coluna - GFX™ Genomic Blood DNA Purification (GE Healthcare). Esses procedimentos foram realizados conforme especificações dos fabricantes. Após as extrações, as amostras de DNA foram quantificadas pelo espectrofotômetro (Espectrophotometer ND-1000 (Nanodrop®)), utilizando volume mínimo de 1 µL de DNA extraído para a obtenção da concentração em ng/µL de cada amostra.

5.6.9 PCR de gene constitutivo específico de mamíferos (IRBP)

Foi realizado o controle endógeno da PCR para os diferentes tecidos coletados dos cães soropositivos deste estudo, utilizando o protocolo padronizado por Ferreira (2010). O objetivo da técnica utilizada foi constatar a presença de fragmento de 227pb do gene que codifica a proteína Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP), comum a todas as espécies de mamíferos. Os iniciadores utilizados foram IRBP fwd: 5'TCC AAC ACC ACC ACT GAG ATC TGG AC 3' e IRBPrev: 5' GTG AGG AAG AAA TCG GAC TGG CC 3'. Foi utilizado o Kit illustra pureTaq Ready-To-Go™ PCR Beads® (GE Healthcare). Aos reagentes foram acrescentados 1,25 µl de cada iniciador a 20 pmol/ µl e 2 µl de DNA para 25 µl de solução final. O programa de amplificação foi iniciado a 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos (94°C por 30 seg, 57°C por 30 seg 72°C por 1 min) e encerrado a 72°C por 5 min. Na eletroforese, utilizamos como marcador molecular com 100 pares de base. Como controle negativo da reação, foi utilizado um tubo que continha todos os reagentes, exceto o DNA e no controle positivo, foi adicionado DNA purificado extraído de pele de cão.

5.6.10 Detecção e identificação de *Leishmania* spp. em amostras de medula óssea e tecidos dos cães soropositivos utilizando a reação em cadeia da polimerase

A pesquisa de DNA do parasito e a determinação da espécie de *Leishmania* circulante nos reservatórios domésticos foi realizada nas amostras de tecidos (baço, linfonodo mesentérico e pele) e medula óssea, utilizando a técnica de *Ln*-PCR destinada a amplificar um fragmento do gene SSUrRNA de *Leishmania* (VAN EYS *et al.*, 1992; CRUZ *et al.*, 2002, 2006). Os procedimentos utilizados para amplificação de DNA e sequenciamento do DNA amplificado das amostras positivas foram os mesmos descritos para flebotomíneos.

5.7 Análises estatísticas

Os dados foram organizados em planilhas e as análises foram feitas no programa Microsoft Excel® (Office 2003) e no programa R (R CORE TEAM, 2017).

5.7.1 Testes estatísticos realizados no estudo entomológico

Para verificar se existe correlação estatística significativa entre o número de flebotomíneos capturados e cada uma das variáveis climáticas (média mensal de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação), utilizamos o teste de correlação de Spearman.

As variáveis foram consideradas com correlação estatisticamente significativa quando o p-valor referente ao teste de hipótese foi menor que 0,05.

Para comparar as proporções de flebotomíneos machos e fêmeas no intra e no peridomicílio, foi utilizado o teste Qui-Quadrado, também com significância de 0,05.

5.7.2 Testes estatísticos realizados no estudo canino

Para verificar se existe diferença significativa da frequência de resultados positivos dos testes diagnósticos entre os quatro diferentes tecidos analisados,

utilizamos o teste Q de Cochran, para a comparação entre 3 grupos (PCR Medula X Parasitológico Medula X Cultura Medula). Nos casos em que o teste tenha apontado diferença significativa entre pelo menos 2 dos grupos, as comparações 2 a 2 foram feitas utilizando o teste de Mc Nemar, com correção de Bonferroni para comparações múltiplas.

No intuito de comparar as proporções de cães positivos entre os sintomáticos e os assintomáticos em cada teste diagnóstico, aplicamos o teste de Qui-Quadrado (quando as condições foram atendidas) ou teste de Fisher (caso contrário). Em todos os testes, o nível de significância utilizado foi de 0,05.

5.8 Distribuição espacial dos casos caninos, humanos e pontos de capturas entomológica

5.8.1 Levantamento e georreferenciamento dos casos caninos

Para o estudo de casos caninos foram utilizados os dados do inquérito sorológico canino e da demanda espontânea, realizado no ano de 2016 abrangendo todos os bairros do município.

Os cães incluídos na análise deveriam ser reagentes nos testes de DPP e ELISA realizados pelos profissionais do CCZ de Itaúna. Os bairros de domiciliação dos cães soropositivos foram considerados para fins de georreferenciamento, confecção de mapas e demais análises espaciais realizadas através do programa R (R CORE TEAM, 2017). Os dados de população canina de cada bairro foram estimados em 13.5% da população humana (BRITO & CHAMONE, 2001). Foram realizadas análises agregadas para identificação das áreas de risco, por meio da confecção de mapa temático com as taxas de prevalência de LV canina.

5.8.2 Levantamento e georreferenciamento dos casos humanos

O levantamento de casos humanos de LV foi realizado a partir da notificação de casos do município de Itaúna, obtidos junto à Secretaria Municipal de Saúde de Itaúna, ocorridos entre os anos de 2007 e 2017. Cada caso humano foi georreferenciado para a análise descritiva considerando o endereço de residência.

Os dados da população humana do município foram obtidos a partir do Censo 2010 do IBGE. As análises descritivas dos dados foram feitas através de tabelas, gráficos e medidas resumo, como médias, medianas, proporções e taxas. Para analisar a distribuição espacial dos casos humanos, foi feito um mapa de densidade de Kernel utilizando o programa R (R CORE TEAM, 2017).

5.8.3 Levantamento e georreferenciamento dos pontos de capturas entomológicas

Para o estudo com flebotomíneos, em cada bairro, foi escolhida uma residência para realização das capturas entomológicas. Esses pontos foram georeferenciados por meio de GPS, utilizando como unidades de análise as coordenadas x e y, obtida pelo GPS marca Etrex, utilizando a projeção “Sistema Universal Transverso de Mercator” (UTM). Os pontos de capturas entomológicas foram considerados para fins de georreferenciamento, confecção de mapas e demais análises espaciais realizadas através do programa R (R CORE TEAM, 2017)

6 RESULTADOS

6.1 Levantamento da fauna flebotomínica

Durante o período de maio de 2015 a abril de 2016 foram capturados 1786 espécimens na área estudada do município de Itaúna, distribuídos em onze espécies pertencentes a 6 gêneros: *Psathyromyia*, *Evandromyia*, *Lutzomyia*, *Pintomyia*, *Nyssomyia* e *Brumptomyia*.

As espécies capturadas foram: *Psathyromyia aragaoi* (COSTA LIMA, 1932), *Psathyromyia lutziana* (COSTA LIMA, 1932), *Evandromyia cortelezii* (BRÈTHES, 1923), *Evandromyia evandroi* (COTA LIMA & ANTUNES, 1936), *Evandromyia lenti* (MANGABEIRA, 1938), *Evandromyia teratodes* (MARTINS, FALCÃO & SILVA, 1964), *Evandromyia termitophila* (MARTINS, FALCÃO & SILVA, 1964), *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ & NEIVA, 1912), *Pintomyia pessoai* (COUTINHO & BARRETTO, 1940), *Nyssomyia whitmani* (ANTUNES E COUTINHO, 1939) e *Brumptomyia brumpti* (LARROUSSE, 1920). As fêmeas de *Ev. cortelezii* e do gênero *Brumptomyia* (FRANÇA E PARROT, 1921) são morfologicamente indistinguíveis, portanto, a identificação foi realizada associada aos machos capturados.

Dos 1786 exemplares capturados, 1436 eram machos (80,5%) e 350 fêmeas (19,5%) (TAB. 1). A espécie mais abundante foi *Lu. longipalpis*, com 1494 exemplares, totalizando 84% dos exemplares capturados. Destes 1280 (85,7%) eram machos, e 214 (14,3%) eram fêmeas (GRAF. 1). A segunda espécie mais capturada foi *Ev. cortelezii* totalizando 6%, seguida de *Ev. lenti* com 3%.

Dentre os exemplares capturados, 63 flebotomíneos não foram identificados à nível específico, devido a não integridade de algumas estruturas morfológicas necessárias para a identificação dos exemplares, contudo, estes foram identificados como pertencentes a subtribo Lutzomyiina.

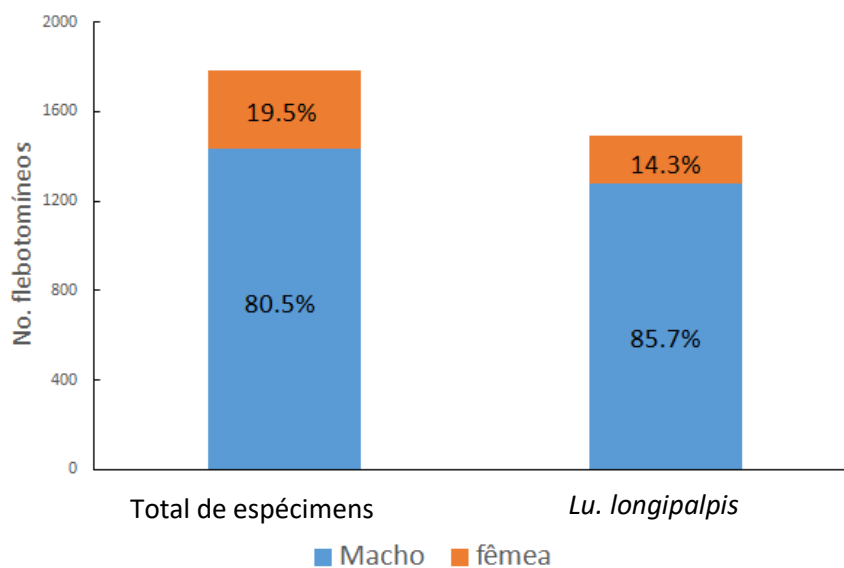
TABELA 1: Espécies de flebotomíneos capturados no município de Itaúna, em relação ao sexo, no período de maio de 2015 a abril de 2016, utilizando armadilha luminosa HP.

| Espécies | Macho | Fêmea | Total | % |
|---------------------------------|-----------------|----------------|----------------|---------------|
| <i>Brumptomyia brumpti</i> | 3 | 8 | 11 | 0,6 |
| <i>Psathyromyia aragaoi</i> | 1 | 1 | 2 | 0,1 |
| <i>Evandromyia cortelezzi</i> | 32 | 68 | 100 | 6,0 |
| <i>Evandromyia evandroi</i> | 17 | 11 | 28 | 1,6 |
| <i>Evandromyia lenti</i> | 35 | 23 | 58 | 3,0 |
| <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 1280 | 214 | 1494 | 84,0 |
| <i>Psathyromyia lutziana</i> | 3 | 1 | 4 | 0,2 |
| <i>Pintomyia pessoai</i> | 14 | 5 | 19 | 1,1 |
| <i>Evandromyia teratodes</i> | 0 | 1 | 1 | 0,1 |
| <i>Evandromyia termitophila</i> | 1 | 2 | 3 | 0,2 |
| <i>Nyssomyia whitmani</i> | 1 | 2 | 3 | 0,2 |
| Lutzomyiina* | 49 | 14 | 63 | 3,0 |
| Total | 1436 (80,5%) | 350 (19,5%) | 1786 (100%) | 100 (100%) |

*Refere-se à subtribo

Fonte: Elaborado pelo autor

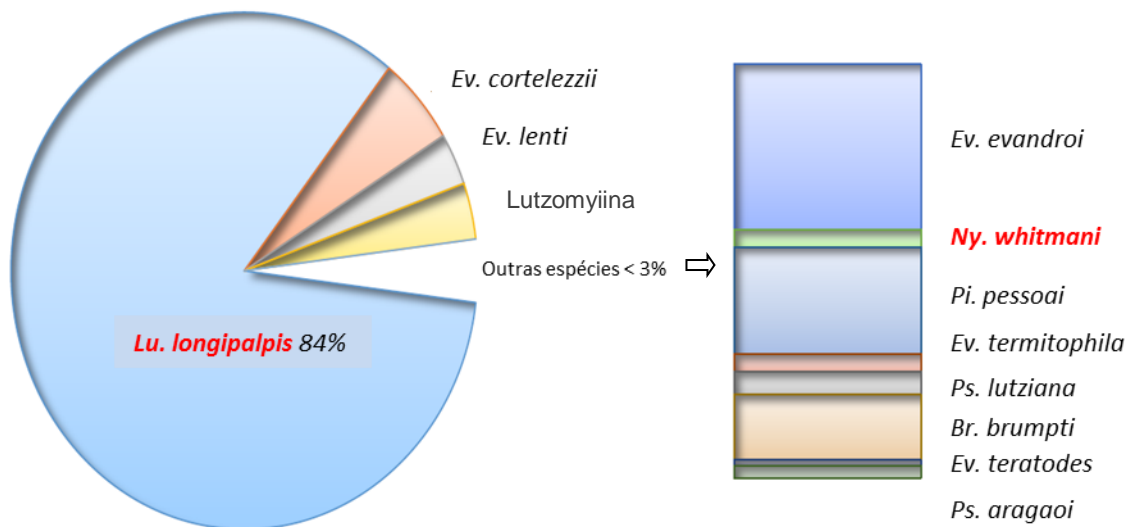
GRÁFICO 1: Porcentagem de *Lu. longipalpis* em relação ao total de espécimens capturados e porcentagem em relação a machos e fêmeas capturadas no município de Itaúna, utilizando armadilha luminosa HP, no período de maio de 2015 a abril de 2016.



Fonte: Elaborado pelo autor

Das espécies de importância médica foram capturadas *Lu. longipalpis* e *Ny. whitmani* (GRÁF. 2). A espécie *Pi. pessoai* não foi considerada importante do ponto de vista médico, porque ainda são necessários mais estudos envolvendo esta espécie para apontá-la como vetora das leishmanioses.

GRÁFICO 2: Porcentagem das espécies capturadas no município de Itaúna, utilizando armadilha luminosa HP, no período de maio de 2015 a abril de 2016.



Fonte: Elaborado por Consuelo Latorre Fortes Dias

Pode-se observar na tabela 2, a distribuição das espécies capturadas por bairro. *Lu. longipalpis* foi encontrada em quase todos os bairros estudados, exceto nos bairros Parque Jardim e Graças. O bairro Chácara do Quitão apresentou o maior índice dessa espécie totalizando 64% do total capturado.

TABELA 2: Espécies de flebotomíneos capturados por bairro no município de Itaúna, no período de maio de 2015 a abril de 2016, utilizando armadilha luminosa HP.

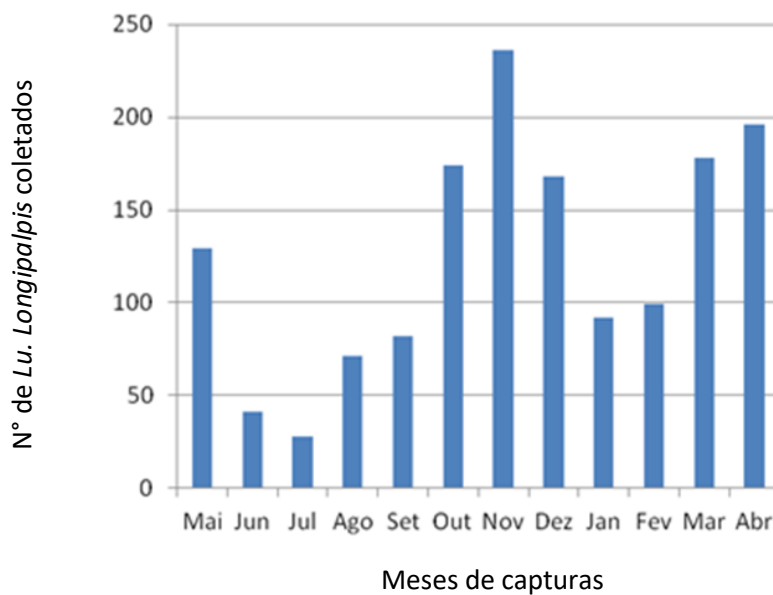
| BAIRRO | Chácara do Quitão | Morada Nova | Três Marias | Itaunense | Parque Jardim | Santanense | Graças | Centro | Nogueirinha | C. Leonane | Olaria | Total |
|-------------------------|-------------------|-------------|-------------|-----------|---------------|------------|----------|-----------|-------------|------------|------------|--------------|
| | Ponto 1 | Ponto 2 | Ponto 3 | Ponto 4 | Ponto 5 | Ponto 6 | Ponto 7 | Ponto 8 | Ponto 9 | Ponto 10 | Ponto 11 | |
| ESPÉCIE | | | | | | | | | | | | |
| <i>Br. brumpti</i> | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 3 | 11 |
| <i>Ps. aragai</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| <i>Ev. cortelezzii</i> | 46 | 11 | 5 | 13 | 1 | 0 | 0 | 0 | 10 | 5 | 9 | 100 |
| <i>Ev. evandroi</i> | 3 | 10 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 0 | 28 |
| <i>Ev. lenti</i> | 15 | 23 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 6 | 9 | 58 |
| <i>Lu. longipalpis</i> | 960 | 77 | 77 | 59 | 0 | 5 | 0 | 15 | 46 | 167 | 88 | 1.494 |
| <i>Ps. lutziana</i> | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 4 |
| <i>Pi. pessoai</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 12 | 5 | 19 |
| <i>Ev. teratodes</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Ev. termitophila</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 |
| <i>Ny. whitmani</i> | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| <i>Lutzomyia*</i> | 39 | 4 | 1 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 | 9 | 3 | 63 |
| TOTAL | 1070 | 126 | 90 | 74 | 1 | 9 | 0 | 15 | 63 | 218 | 120 | 1.786 |

*Refere-se à subtribo

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados do gráfico 3 e tabela 3, irão se concentrar na espécie *Lu. longipalpis*, devido ao fato desta ser a responsável pela transmissão de LV no Brasil. Observamos que *Lu. longipalpis* foi encontrada em todos os doze meses de captura, totalizando 1494 exemplares. O maior número de exemplares de *Lu. Longipalpis* capturados ocorreu no mês de novembro, com 236 (16%) exemplares. Dos onze bairros estudados, 93% de *Lu. Longipalpis* foram capturados em cinco bairros, sendo Chácara do Quitão responsável por 65% dos exemplares capturados, Cidade Leonane 12%, Olaria 6%, Morada Nova 5 % e Três Marias 5% (TAB. 3).

GRÁFICO 3: Distribuição mensal de *Lu. longipalpis* capturados no município de Itaúna, utilizando armadilha luminosa HP, no período de maio de 2015 a abril de 2016.



Fonte: Elaborado pelo autor

TABELA 3: Número mensal de *Lu. longipalpis* capturados nos bairros do município de Itaúna, utilizando armadilhas luminosas HP, no período de maio de 2015 a abril de 2016.

| Ano | Mês | Chácara do Quitão | Morada Nova | Três Marias | Itaunense | Parque Jardim | Santanense | Graças | Centro | Nogueirinha | C. Leonane | Olaria | Total |
|------|--------------|-------------------|-------------|-------------|-----------|---------------|------------|----------|-----------|-------------|------------|-----------|-------------|
| 2015 | <i>Mai</i> | 98 | 9 | 3 | 1 | -- | -- | -- | 1 | -- | 2 | 15 | 129 |
| | <i>Jun</i> | 30 | 2 | 1 | 3 | -- | -- | -- | -- | 1 | 3 | 1 | 41 |
| | <i>Jul</i> | 15 | -- | -- | 4 | -- | -- | -- | 1 | 1 | 7 | -- | 28 |
| | <i>Ago</i> | 14 | 4 | -- | 39 | -- | 1 | -- | -- | -- | 12 | 1 | 71 |
| | <i>Set</i> | 55 | 2 | -- | 5 | -- | -- | -- | -- | 13 | 21 | 9 | 105 |
| | <i>Out</i> | 106 | 3 | 1 | 5 | -- | 1 | -- | 1 | 15 | 9 | 10 | 151 |
| | <i>Nov</i> | 172 | 16 | -- | -- | -- | 1 | -- | -- | 11 | 24 | 12 | 236 |
| | <i>Dez</i> | 152 | 2 | 7 | 1 | -- | 1 | -- | -- | -- | 5 | -- | 168 |
| 2016 | <i>Jan</i> | 10 | 17 | 39 | -- | -- | 1 | -- | 2 | 1 | 18 | 4 | 92 |
| | <i>Fev</i> | 46 | 9 | 2 | 1 | -- | -- | -- | 3 | 3 | 33 | 2 | 99 |
| | <i>Mar</i> | 123 | 5 | 8 | -- | -- | -- | -- | 3 | 1 | 4 | 34 | 178 |
| | <i>Abr</i> | 139 | 8 | 16 | -- | -- | -- | -- | 4 | -- | 29 | -- | 196 |
| | Total | 960 | 77 | 77 | 59 | 0 | 5 | 0 | 15 | 46 | 167 | 88 | 1494 |

Fonte: Elaborado pelo autor

A tabela 4 apresenta os resultados da fauna flebotomínica mensal por sexo. Pode-se observar que exemplares machos e fêmeas foram capturados em 10 das 11 espécies encontradas, exceto *Ev. teratodes* que foi capturada apenas uma fêmea da espécie.

Em relação ao comportamento dos flebotomíneos quanto a endofilia e exofilia, 1430 exemplares (80%) foram capturados no peridomicílio, sendo 84% machos e 16% fêmeas. O total capturado no intradomicílio foi de 356 exemplares (20%), sendo 65% machos e 35% fêmeas (TAB. 5). Utilizando-se o teste Qui-Quadrado, observamos diferença significativa entre as proporções de fêmeas no intradomicílio e no peridomicílio ($p < 0,05$).

TABELA 4: Número de exemplares capturados nos bairros do município de Itaúna, em relação ao mês, utilizando armadilha luminosa HP, no período de maio de 2015 a abril de 2016.

| Mês | <i>Br. brumpti</i> | | <i>Ps. aragaoi</i> | | <i>Ev. cortezzii</i> | | <i>Ev. evandroi</i> | | <i>Ev. lenti</i> | | <i>Lu. longipalpis</i> | | <i>Ps. lutziana</i> | | <i>Pi. pessoai</i> | | <i>Ev. teratodes</i> | | <i>Ev. termitophila</i> | | <i>Ny. whitmani</i> | | <i>Lutzomyia*</i> | | Total | |
|-------|--------------------|---|--------------------|---|----------------------|----|---------------------|----|------------------|----|------------------------|------|---------------------|---|--------------------|----|----------------------|---|-------------------------|---|---------------------|---|-------------------|----|-------|-----|
| | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | | |
| 2015 | Mai | 1 | - | - | - | 3 | 1 | 1 | - | 2 | 2 | 11 | 118 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | 141 |
| | Jun | - | - | - | - | 1 | - | 1 | 1 | 2 | - | 4 | 37 | 1 | - | - | 1 | - | - | - | - | 1 | - | - | - | 49 |
| | Jul | - | - | - | - | 2 | 1 | - | - | - | - | 4 | 24 | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 32 |
| | Ago | - | - | - | - | 8 | 4 | - | 2 | 1 | 5 | 8 | 63 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | 3 | 96 |
| | Set | - | - | - | - | 1 | 1 | - | - | - | - | 13 | 93 | - | - | 1 | 5 | - | - | - | - | - | - | - | 2 | 125 |
| | Out | - | 1 | - | - | 12 | 5 | - | 1 | 2 | 2 | 24 | 126 | - | - | 1 | 2 | - | - | - | - | 1 | - | 4 | 15 | 188 |
| | Nov | 4 | - | - | - | 13 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 43 | 193 | - | - | - | 2 | 1 | - | - | - | - | - | - | 4 | 276 |
| | Dez | - | - | - | - | 5 | 1 | - | - | - | 1 | 28 | 140 | - | - | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | 1 | 8 | 186 |
| 2016 | Jan | 1 | - | - | - | 12 | 6 | 2 | 5 | 5 | 8 | 11 | 81 | - | - | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | 4 | 2 | 141 |
| | Fev | 1 | 1 | - | 1 | 6 | 2 | 2 | 1 | 4 | 8 | 17 | 82 | - | - | - | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | 5 | 131 |
| | Mar | 1 | - | - | - | 2 | 3 | 3 | 1 | 2 | 3 | 22 | 156 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | 7 | 202 | |
| | Abr | - | 1 | 1 | - | 3 | 4 | - | 2 | 1 | 4 | 29 | 167 | - | 2 | - | 2 | - | - | 1 | - | - | - | 1 | 3 | 219 |
| Total | 8 | 3 | 1 | 1 | 68 | 32 | 11 | 17 | 23 | 35 | 214 | 1280 | 1 | 3 | 5 | 14 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 | 14 | 49 | 1786 | |

*Refere-se à subtribo

Fonte: Elaborado pelo autor

TABELA 5: Número de exemplares capturados nos bairros do município de Itaúna, em relação à endofilia e exofilia, utilizando armadilha luminosa HP, no período de maio de 2015 a abril de 2016.

| Espécie | Peri | | Intra | | Total | |
|-------------------------|------|-----|-------|-----|-------|-------|
| | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ |
| <i>Br. brumpti</i> | 2 | 6 | 1 | 2 | 11 | 0,6 |
| <i>Ps. aragaoi</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0,1 |
| <i>Ev. cortelezzii</i> | 16 | 40 | 16 | 28 | 100 | 6,0 |
| <i>Ev. evandroi</i> | 8 | 5 | 9 | 6 | 28 | 1,6 |
| <i>Ev. lenti</i> | 17 | 9 | 18 | 14 | 58 | 3,0 |
| <i>Lu. longipalpis</i> | 1100 | 145 | 180 | 69 | 1494 | 84 |
| <i>Ps. lutziana</i> | 2 | 1 | 1 | 0 | 4 | 0,2 |
| <i>Pi. pessoai</i> | 13 | 4 | 1 | 1 | 19 | 1,0 |
| <i>Ev. teratodes</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0,1 |
| <i>Ev. termitophila</i> | 1 | 2 | 0 | 0 | 3 | 0,2 |
| <i>Ny. whitmani</i> | 1 | 2 | 0 | 0 | 3 | 0,2 |
| Lutzomyiina* | 44 | 9 | 5 | 5 | 63 | 3,0 |
| | 1205 | 225 | 231 | 125 | 1786 | 100,0 |
| | 1430 | | 356 | | | |

*Refere-se à subtribo

Fonte: Elaborado pelo autor

6.2 Influência das variáveis climáticas na densidade populacional dos flebotomíneos

A oscilação das variáveis climáticas: precipitação, temperatura e umidade relativa do ar, distribuídas ao longo de maio de 2015 a abril de 2016, bem como a média deste período estão representadas na tabela 6.

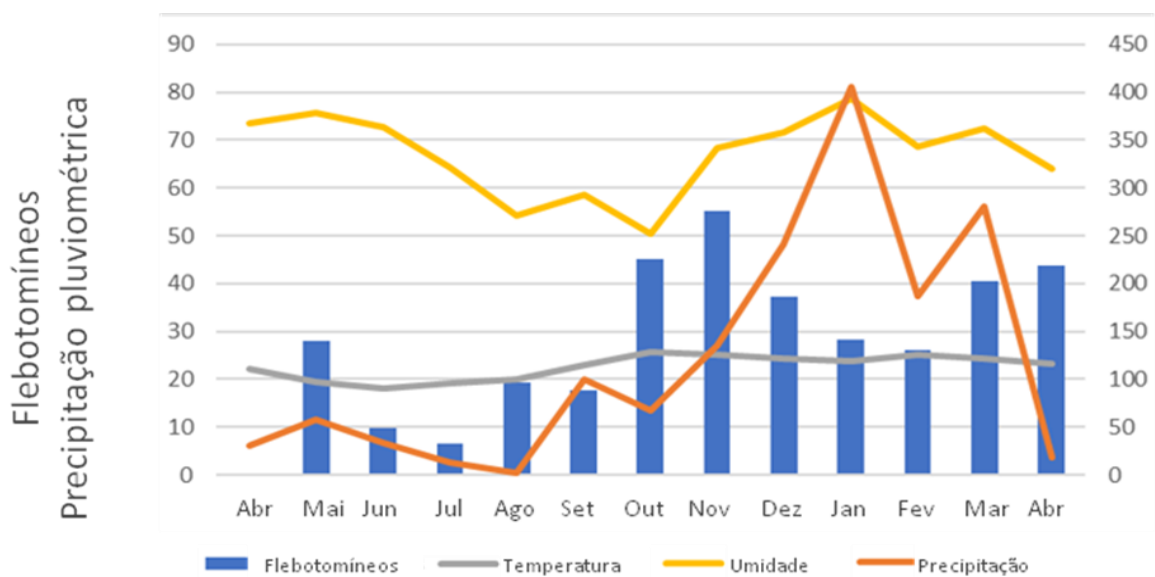
TABELA 6: Variáveis climáticas mensais no município de Itaúna no período de março de 2015 a abril de 2016

| Mês | Precipitação Total (mm) | Temperatura Compensada Média (°C) | Umidade Relativa (%) | |
|-------|-------------------------|-----------------------------------|----------------------|------|
| 2015 | Mar | 334,1 | 23,2 | 77,1 |
| | Abr | 30 | 22,1 | 73,4 |
| | Mai | 57,3 | 19,4 | 75,6 |
| | Jun | 32,8 | 18,1 | 72,8 |
| | Jul | 12,2 | 19,2 | 64,3 |
| | Ago | 1,6 | 20 | 54,1 |
| | Set | 99,9 | 22,9 | 58,6 |
| 2016 | Out | 67,3 | 25,6 | 50,5 |
| | Nov | 134,5 | 25 | 68,3 |
| | Dez | 241,7 | 24,3 | 71,7 |
| | Jan | 405,8 | 23,7 | 78,7 |
| | Fev | 187,4 | 25,2 | 68,6 |
| | Mar | 280,9 | 24,2 | 72,3 |
| | Abr | 18,3 | 23,3 | 63,9 |
| Média | 135,9 | 22,5 | 67,8 | |

Fonte: Elaborado pelo autor

Ao analisarmos o número de flebotomíneos capturados e cada variável climática (temperatura, umidade e precipitação), considerando primeiramente os dados do mesmo mês e em seguida os dados de um mês antes das capturas, observamos que não houve associação estatisticamente significativa entre o número de flebotomíneos e as variáveis climáticas, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica (Apêndice 3). Já em relação à média de temperatura mensal e o número de flebotomíneos capturados, a correlação de Spearman foi estatisticamente significativa ao considerar um mês antes das capturas ($p=0,002$), mostrando que nos meses mais quentes o número de flebotomíneos capturados tende a ser maior (GRÁF. 4).

GRÁFICO 4: Associação entre o número mensal de flebotomíneos capturados de 05/2015 a 04/2016 e a média de temperatura, umidade e precipitação no período de 04/2015 à 04/2016, no município de Itaúna, MG.

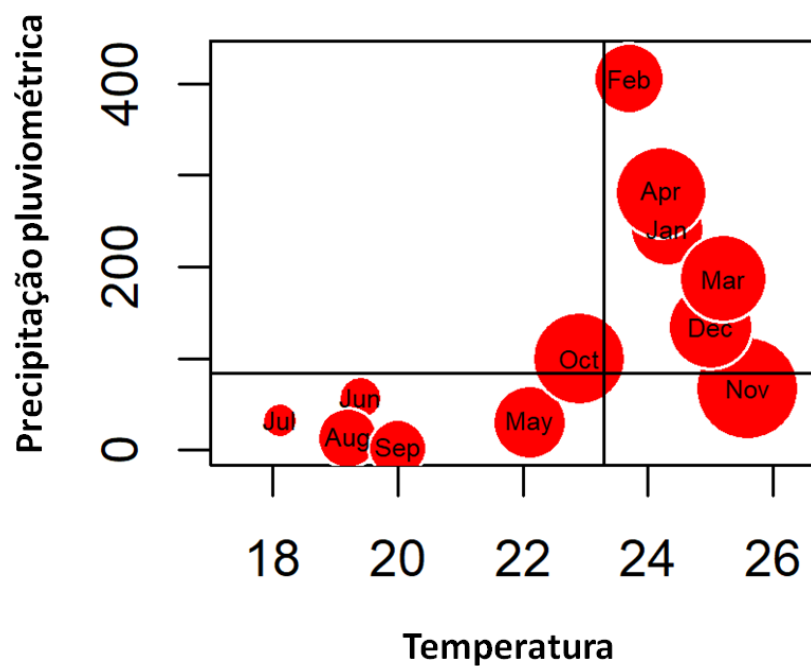


Fonte: Elaborado por Letícia Cavalari Pinheiro

Considerando que a variável temperatura média teve correlação positiva estatisticamente significativa com o número de capturas mensal e que a variável precipitação teve uma correlação positiva, mas que não foi forte o suficiente para ser considerada estatisticamente significativa ($p=0,109$), fizemos um gráfico para

visualizar melhor a relação entre essas duas variáveis climáticas e o número de capturas mensais, representadas no gráfico 5. As linhas traçadas representam as medianas de cada uma das variáveis entre os meses de abril de 2015 e março de 2016 e os raios dos círculos são proporcionais à quantidade de insetos capturados no mês descrito, que é o seguinte ao referente a cada combinação de temperatura média e precipitação. Observamos que os menores números de capturas são referentes aos meses com temperaturas médias mais baixas e menores valores de precipitação.

GRÁFICO 5: Número de capturas de flebotomíneos por mês em relação às médias de temperatura e precipitação

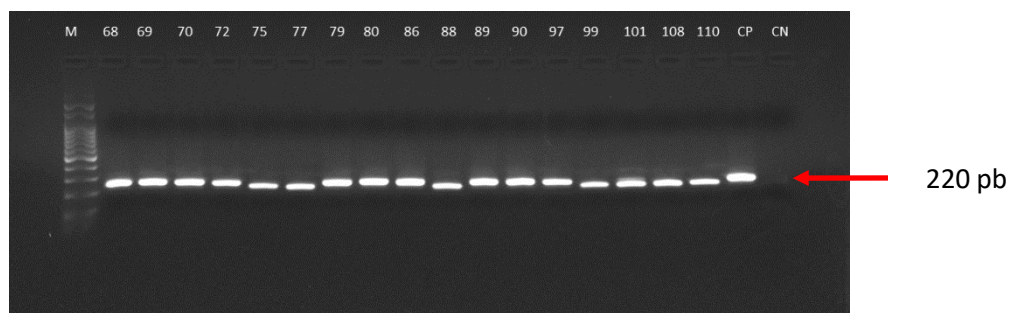


Fonte: Elaborado por Letícia Cavalari Pinheiro

6.3 Detecção do gene cacofonia constitutivo de flebotomíneos

Os resultados dos produtos de amplificação de DNA, de amostras de flebotomíneos para a PCR dirigida ao gene cacofonia estão representados na figura 8. Observa-se o fragmento de 220 pb em todas as amostras, validando tanto o processo de extração como os resultados negativos e positivos. Todas as amostras de flebotomíneos apresentaram-se positivas para nesta PCR. Optamos por exemplificar apenas uma figura de eletroforese em gel de agarose.

FIGURA 8: Produtos de amplificação de DNA de flebotomíneos obtidos com iniciadores para o gene da cacofonia, visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio.



Canaletas: M- Marcador de peso molecular 100 pb; Amostras: 4 a 110 (pools alternados). Controle Positivo da Reação (*Lu. longipalpis*). CN: Controle Negativo da Reação (sem DNA).
Fonte: Elaborado pelo autor

6.4 Detecção de *Leishmania* spp. em flebotomíneos

Foram analisadas 309 fêmeas de flebotomíneos, agrupadas em 133 amostras (72 amostras com apenas um flebotomíneo e 61 *pools* contendo de dois a dez exemplares), para pesquisa de infecção natural por *Leishmania* spp. Estas amostras foram analisadas utilizando a *LnPCR*.

Das 133 amostras, nove delas apresentaram-se positivas para o gênero *Leishmania* (FIG. 9). Em cinco espécies de flebotomíneos (*Ev. cortelezzii*, *Ev. evandroi*, *Lu. longipalpis*, *Ev. lenti* e *Ev. termitophila*) foram encontrados presença de DNA de *Leishmania* spp. (TAB. 7).

Dos onze bairros estudados, em sete foram encontrados flebotomíneos infectados por *Leishmania* spp. (Chácara do Quitão, Cidade Leonane, Nogueirinha, Três Marias, Centro, Morada Nova e Olaria). Entre os nove espécimes de flebotomíneos que apresentaram infecção natural por *Leishmania* spp., quatro de três espécies (2 *Lu. longipalpis*, 1 *Ev. cortelezzii* e 1 *Ev. lenti*) foram capturados no intradomicílio.

A taxa mínima de infecção natural (TMI) encontrada para *Leishmania* spp. entre todas as espécies foi de 2,91 (TMI: $9 \times 100/309 = 2,91$). Quando avaliamos por espécie de flebotomíneos, a TMI foi de 3,22% para *Ev. cortelezzii*, 9,09% para *Ev. evandroi*, 5,88% para *Ev. lenti*, 1,94% para *Lu. longipalpis* e 50% para *Ev. termitophila*, já que de dois *pools*, um apresentou-se positivo (TAB. 8). As amostras dos produtos de amplificação de DNA de flebotomíneos podem ser visualizadas na figura 9. Todas amostras positivas dos flebotomíneos analisados foram enviadas para sequenciamento.

TABELA 7: Espécies de fêmeas de flebotomíneos encontrado a presença de DNA de *Leishmania* e local de captura no período de maio de 2015 a abril de 2016, município de Itaúna.

| <i>Amostras</i> | Nº Exemplares | Espécie | Bairro | Intra/Peri |
|-----------------|---------------|-------------------------|----------------|------------|
| 66 | 6 | <i>Ev. cortelezzii</i> | Chácara Quitão | Peri |
| 75 | 2 | <i>Ev. evandroi</i> | C. Leonane | Peri |
| 79 | 4 | <i>Lu. longipalpis</i> | Nogueirinha | Intra |
| 96 | 1 | <i>Ev. cortelezzii</i> | Três Marias | Intra |
| 116 | 1 | <i>Lu. longipalpis</i> | Três Marias | Peri |
| 118 | 2 | <i>Lu. longipalpis</i> | Centro | Peri |
| 125 | 3 | <i>Ev. lenti</i> | Morada Nova | Intra |
| 139 | 3 | <i>Lu. longipalpis</i> | Morada Nova | Intra |
| 155 | 1 | <i>Ev. termitophila</i> | Olaria | Peri |

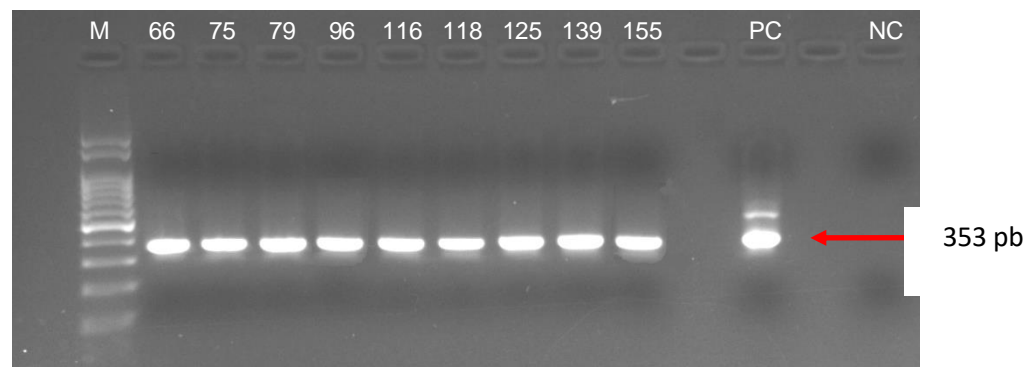
Fonte: Elaborado pelo autor

TABELA 8: Taxa mínima de infecção (TMI) dos *pools* de fêmeas de flebotomíneos capturados no período de Maio de 2015 a Abril de 2016.

| Espécies | Total de Fêmeas | Total de Amostras | Amostras positivos | TMI (%) |
|-------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------|
| <i>Br. brumpti</i> | 4 | 4 | 0 | 0 |
| <i>Ps. aragaoi</i> | 1 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Ev. cortelezzii</i> | 62 | 34 | 2 | 3,22 |
| <i>Ev. evandroi</i> | 11 | 8 | 1 | 9,09 |
| <i>Ev. lenti</i> | 17 | 11 | 1 | 5,88 |
| <i>Lu. longipalpis</i> | 206 | 67 | 4 | 1,94 |
| <i>Ps. lutziana</i> | 1 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Pi. pessoai</i> | 3 | 3 | 0 | 0 |
| <i>Ev. teratodes</i> | 1 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Ev. termitophila</i> | 2 | 2 | 1 | 50 |
| <i>Ny. whitmani</i> | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Total | 309 | 133 | 10 | 2,91 |

Fonte: Elaborado pelo autor

FIGURA 9: Produtos de amplificação de DNA de *Leishmania* spp. em amostras de flebotomíneos, obtidos com iniciadores para o fragmento do gene do SSUrRNA, observados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio.



Canaletas: **M**- marcador de peso molecular 120pb; amostras positivas 66, 75, 79, 96, 116, 118, 125, 139, 155; **CP**-controle positivo da reação (*Le. infantum*) cepa de referência MHOM/BR/PP75; **CN**- controle negativo da reação (sem DNA). Fonte: Elaborado pelo autor

6.5 Sequenciamento de DNA para identificação da espécie de *Leishmania*, encontradas nas fêmeas de flebotomíneos capturadas no campo

As sequencias de DNA obtidas a partir da LnPCR positivas, das nove amostras de fêmeas de flebotomíneos, foram analisadas utilizando o software Bioedit para edição das sequencias e posteriormete alinhadas pelo BLAST. Em todas elas, a espécie de *Leishmania* encontrada foi *Le. infantum* (TAB 9).

TABELA 9: Sequenciamento de DNA dos *pools* de flebotomíneos com DNA de *Leishmania* spp.

| Pool | Espécie | Query cover | E. value | Ident. | Accession |
|------|---------------------|-------------|----------|--------|------------|
| 66 | <i>Le. infantum</i> | 100% | 1e - 127 | 100% | KX007994-1 |
| 75 | <i>Le. chagasi</i> | 100% | 2e - 146 | 100% | KV948484-1 |
| 79 | <i>Le. chagasi</i> | 98% | 9e - 145 | 100% | KV948484-1 |
| 96 | <i>Le. chagasi</i> | 99% | 7e - 146 | 100% | KV948484-1 |
| 116 | <i>Le. chagasi</i> | 100% | 2e - 146 | 100% | KV948484-1 |
| 118 | <i>Le. chagasi</i> | 100% | 9e - 145 | 99% | KV948484-1 |
| 125 | <i>Le. chagasi</i> | 100% | 9e - 145 | 99% | KV948484-1 |
| 139 | <i>Le. chagasi</i> | 100% | 9e - 145 | 99% | KV948484-1 |
| 155 | <i>Le. chagasi</i> | 99% | 7e - 146 | 100% | KV948484-1 |

Fonte: Elaborado pelo autor

* *Le. infantum* = *Le. chagasi*

6.6 Inquérito canino amostral

Dos 2925 cães analisados, 575 apresentaram-se positivos na sorologia (inquérito canino e demanda espontânea), ficando a taxa de positividade canina geral do município em torno de 19,7%. Dos 1701 cães analisados pelo inquérito canino amostral, 204 apresentaram-se positivos na sorologia, ficando a taxa de positividade canina em torno de 12% (TAB. 10).

TABELA 10: Taxa de soropositividade canina para LVC, do município de Itaúna, no ano de 2016.

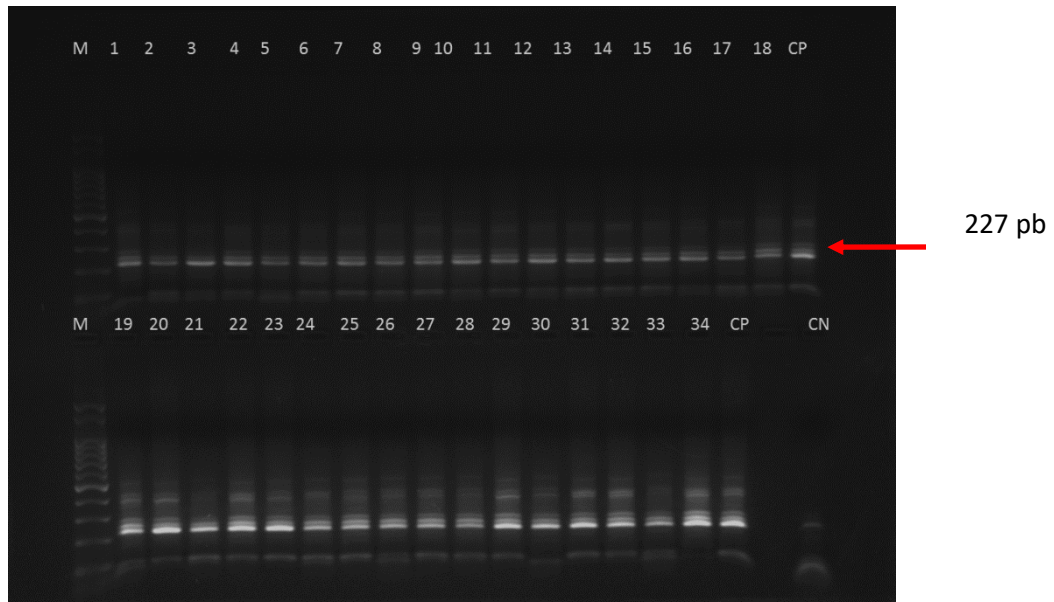
| Taxa de soropositividade canina para LVC | | | | | | |
|--|---------------|-----------------|-----------------|----------------|--------------------------|----------------------|
| | DPP - | DPP+ Elisa + | DPP+ Elisa - | Indeterminados | Total cães analisados | Taxa positividade |
| Inquérito Canino | 1341 | 204 | 127 | 29 | 1701 | 12% |
| Demanda espontânea | 737 | 371 | 92 | 24 | 1224 | 30,30% |
| | 2078 (71%) | 575 (19,7%) | 219 (7,5%) | 53 (1,8%) | 2925 (100%) | 19,70% |

Fonte: Elaborado pelo autor

6.7 Eletroforese de gene constitutivo específico de mamíferos (IRBP)

Todas as amostras de tecido analisadas (pele, baço, linfonodo e medula óssea), apresentaram resultados positivos na PCR dirigida ao IRBP, correspondente a 227 pb (FIG. 10), confirmando o sucesso da extração do DNA destes animais. Optamos por exemplificar apenas uma figura de eletroforese em gel de agarose.

FIGURA 10: Produtos de amplificação de DNA de cães, constatando a presença de 227pb do gene IRBP, visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio.

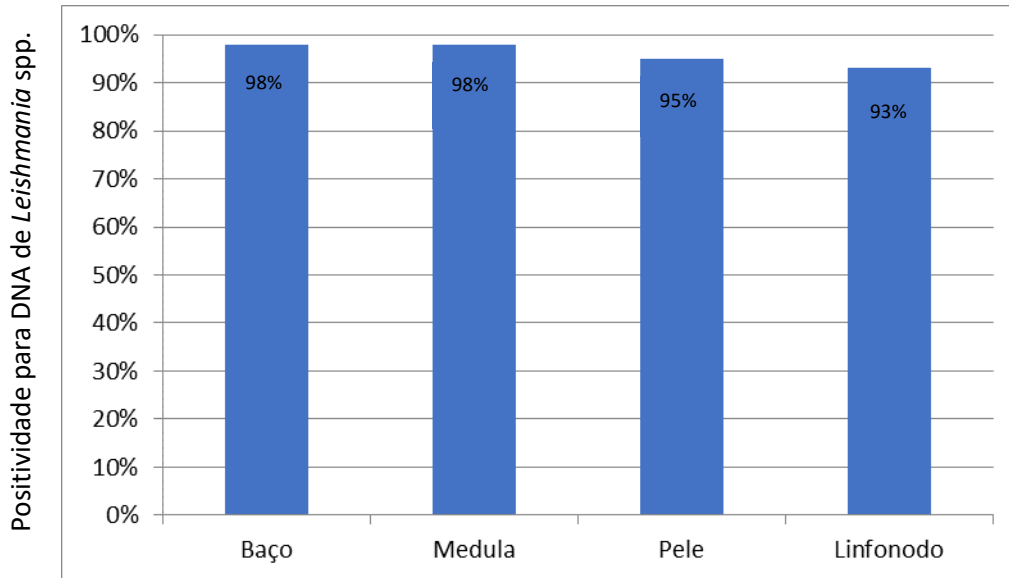


Canaletas: **M**- peso molecular 100 pb. 1 a 34: Amostras linfonodo dos cães do estudo no município de Itaúna, MG. **CP**- Controle positivo (DNA extraído de pele de cão). **CN**- Controle negativo (Sem DNA); Amostras com 227 pb- pares de base. Fonte: Elaborado pelo autor

6.8 Distribuição de frequência de resultados do teste de PCR de cães soropositivos

Das amostras de baço, medula óssea, linfonodo mesentérico e pele dos cães soropositivos analisados pela *LnPCR*, apresentaram-se positivas 59/60 (98%) de baço, 58/59 (98%) amostras de medula, 57/60 (95%) de pele e 56/60 (93%) de linfonodo mesentérico (GRÁF. 6), como pode ser ilustrado na figura 11, onde pode-se observar o resultado da *LnPCR* em amostras de medula dos 60 cães soropositivos.

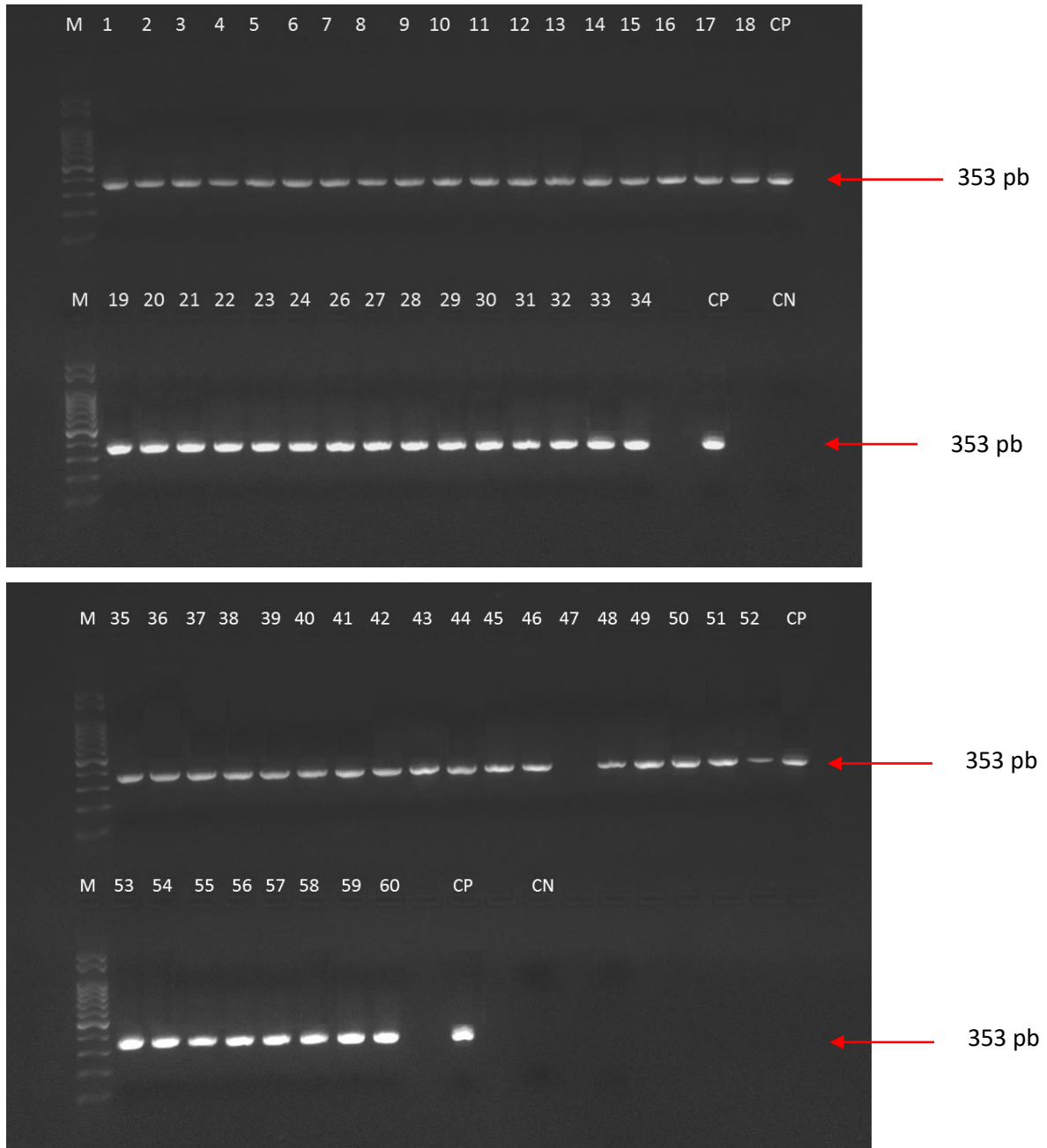
GRÁFICO 6: Distribuição da frequência, por porcentagem, de resultados do teste de PCR para detecção de *Leishmania* por tecido, dos cães soropositivos de Itaúna 2016.



Fonte: Elaborado pelo autor

Dentre os tecidos analisados, optamos por exemplificar visualmente através da amplificação e eletroforese em gel de agarose, as amostras de medula. Das 59 amostras de medula dos cães provenientes do município de Itaúna, apenas a amostra 47 não foi positiva pela técnica da PCR para DNA de *Leishmania*. A figura 11 mostra o fragmento de 353 pb característico, amplificado pelos primers utilizados neste trabalho para o gene SSU rRNA de *Leishmania*. Todos os produtos da LnPCR das amostras positivas dos tecidos analisados foram submetidos ao sequenciamento.

FIGURA 11: Produtos de amplificação (amostras de medula) obtidos com iniciadores do fragmento do gene SSUrRNA de *Leishmania* sp., observados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio.



Canaletas: **M**- marcador de peso molecular 120 pb; **1 a 60**- amostras de medula dos cães soropositivos (apenas a amostra 47 não foi positiva); **CP**- controle positivo da reação (*Le. infantum*) cepa referência MHOM/BR/PP75; **CN**- controle negativo da reação (sem DNA).
 Fonte: Elaborado pelo autor

6.9 Frequência de resultados dos exames parasitológico direto, PCR e mielocultura de cães soropositivos

O resultado da detecção de *Leishmania* spp. em aspirados de medula óssea (cultura 75% e esfregaço 45%) e em *imprint* de biópsias de baço (68,3%) e pele (51,6%) encontram-se detalhados na tabela 11, juntamente com os resultados da *LnPCR* dos 60 cães soropositivos.

LnPCR nos 60 cães examinados foi observado 100% de positividade, considerando pelo menos uma amostra positiva. Os tecidos que apresentaram maior positividade foram o baço 59/60 (98,3%), medula óssea 58/59 (98,3%), pele 57/60 (95%) e linfonodo mesentérico 56/60 (93,3%). Com o objetivo de calcular se houve diferença estatística significativa entre as frequências de resultados positivos nos tecidos analisados pela PCR e para verificar se o resultado de um tecido era melhor que o outro, utilizamos o Teste Q de Cochran, e observamos que a efetividade da PCR foi semelhante para os quatro tecidos ($p=0,36$).

Em relação à técnica de mielocultura, em 75% (45/60) das amostras de medula óssea foram isolados parasitos. A medula óssea foi utilizada por três técnicas diagnósticas diferentes, sendo PCR, mielocultura e lâmina. Verificamos através do teste Q de Cochran, que havia diferença estatística significativa nos resultados entre pelo menos 2 das 3 técnicas utilizadas para o diagnóstico em medula ($p<0,05$).

Ao comparar as técnicas 2 a 2, houve diferença estatisticamente significativa entre todos os exames, sendo que a técnica de PCR obteve melhor desempenho do que a mielocultura ($p=0,000366$) do que o exame por lâmina ($p=0,0000$). Contudo, comparando apenas os resultados do diagnóstico parasitológico direto (quando é observado diretamente o parasito), observamos que a mielocultura apresentou melhores resultados que o diagnóstico por lâminas ($p=0,000831$).

Nos resultados do diagnóstico parasitológico direto em lâmina (*imprint/esfregaço*), 45 cães (75%) apresentaram resultados positivos por esta técnica. Quando analisamos os tecidos individualmente, as amostras de baço representaram 68,3% de positividade e foram as que apresentaram maior número de amostras positivas por esta técnica, corroborando com o resultado da *LnPCR* que

demonstrou o baço com a maior positividade. Em seguida, o linfonodo mesentérico apresentou 63,3% de amostras positivas, pele com 51,6% e por último a medula, totalizando 45% de positividade. Utilizamos o teste Q de Cochran, para verificar se dentre os tecidos analisados, havia alguma diferença estatisticamente significativa na frequência de resultados positivos obtidos por esta técnica. Concluímos que a efetividade do teste de lâminas é diferente entre pelo menos dois dos tecidos ($p=0,0005$). Comparamos os resultados da lâmina nos tecidos dois a dois, através do teste do McNemar com correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Estes resultados demonstraram que houve diferença estatística significativa entre os resultados das lâminas de baço e medula ($p=0.00786$) e linfonodo e medula ($p=0,02050$), indicando que este teste em medula é menos eficiente do que nestes outros dois tecidos (baço e linfonodo). Neste estudo, as amostras de pele e medula óssea foram os tecidos que apresentaram o menor número de resultados positivos pelo diagnóstico parasitológico direto em lâmina.

TABELA 11: Detecção de positividade através de diagnóstico molecular (técnica PCR), diagnóstico parasitológico (cultura e Lâminas esfregaço/*imprints*), de amostras de biópsia de cães soropositivos

| Cão | PCR | | | | Cultura | Lâminas (esfregaço/ <i>imprint</i>) | | | |
|--------------|--------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------------------------------|------------|--------------|--------------|
| | Baço | Medula | Pele | Linfonodo | Medula | Baço | Medula | Pele | Linfonodo |
| 1 | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 2 | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 3 | + | + | + | + | + | - | - | + | + |
| 4 | + | + | + | + | - | + | - | - | + |
| 5 | + | + | + | + | + | - | - | + | - |
| 6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 7 | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| 8 | + | + | + | + | - | + | - | + | + |
| 9 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 10 | + | + | + | + | + | + | - | + | - |
| 11 | + | + | + | + | - | + | + | - | - |
| 12 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 13 | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 14 | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 15 | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 16 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 17 | + | + | + | - | + | - | + | + | + |
| 18 | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| 19 | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 20 | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 21 | + | + | - | + | + | + | + | + | + |
| 22 | + | + | + | + | - | + | - | + | + |
| 23 | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 24 | + | + | - | + | - | - | - | - | - |
| 25 | + | * | + | + | + | + | + | - | + |
| 26 | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| 27 | + | + | + | + | - | + | - | - | - |
| 28 | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| 29 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 30 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 31 | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| 32 | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| 33 | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| 34 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 35 | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| 36 | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| 37 | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| 38 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 39 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 40 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 41 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 42 | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 43 | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| 44 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 45 | + | + | + | + | + | + | - | - | + |
| 46 | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| 47 | + | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 48 | + | + | + | + | - | + | - | - | + |
| 49 | + | + | - | + | - | + | - | + | + |
| 50 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 51 | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 52 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 53 | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| 54 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 55 | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 56 | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 57 | - | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 58 | + | + | + | + | + | + | - | - | + |
| 59 | + | + | + | - | + | + | - | - | + |
| 60 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Total | 98,3% | 98,3% | 95% | 93,3% | 75% | 68,3% | 45% | 51,6% | 63,3% |

* Amostra 25 da medula não foi possível ser coletada para análise pela técnica de PCR

6.10 Frequência dos resultados dos testes parasitológico direto, PCR e mielocultura de cães assintomáticos e sintomáticos

Dos 60 cães analisados, 38 eram sintomáticos (63%) e 22 cães eram assintomáticos (37%). O gráfico 7 apresenta os resultados do diagnóstico parasitológico, PCR e mielocultura dos cães soropositivos para LV.

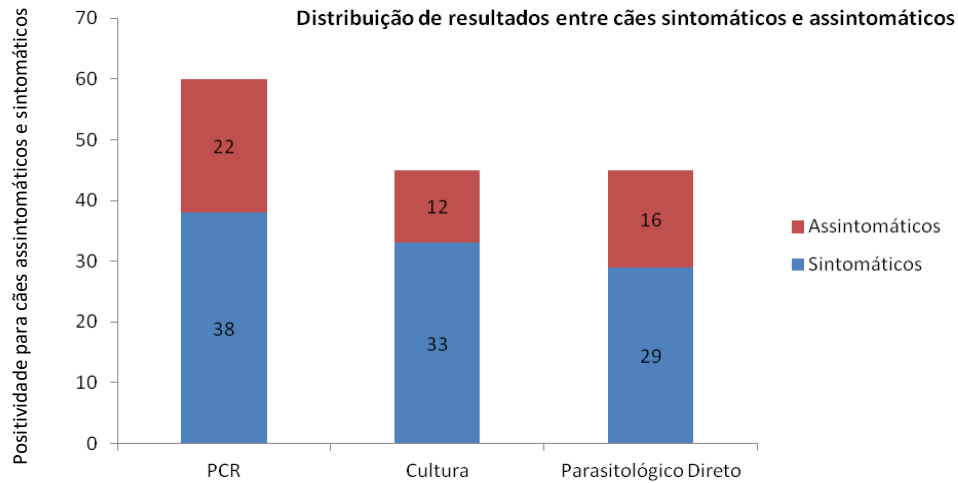
Dos 60 cães soropositivos para LV examinados por meio da PCR, todos os cães (100%) apresentaram resultados positivos, dentre os quatro tipos de tecidos analisados.

Os resultados do exame parasitológico direto, 45 cães (75%) foram positivos, destes, 29 cães (65%) foram classificados como sintomáticos e 16 (35%) como assintomáticos.

Em relação à técnica de mielocultura, dos 60 cães analisados, 45 (75%) cães foram positivos. Dos 38 cães sintomáticos, 33 (87%) apresentaram resultado positivo e 5 (13%) apresentaram resultado negativo, enquanto entre os 22 assintomáticos, 12 (55%) apresentaram resultado positivo e 10 (45%) apresentaram resultado negativo. Ao comparar essas proporções usando o teste Qui-Quadrado, observamos que existe diferença significativa ($p=0,013$) entre a proporção de positivos no grupo dos sintomáticos e no grupo dos assintomáticos. Portanto, a mielocultura demonstrou ser mais eficiente para cães com quadro clínico sintomático.

Para verificar se os cães sintomáticos tendem a apresentar maior proporção de resultados positivos em relação aos assintomáticos, utilizamos os testes Qui-Quadrado ou Teste de Fisher para comparação entre as proporções. Para os testes de PCR e diagnóstico em lâmina, não houve diferença significativa entre os resultados do grupo de cães sintomáticos e assintomáticos para nenhum dos tecidos testados.

GRÁFICO 7: Distribuição de resultados do teste parasitológico direto, PCR e mielocultura entre cães sintomáticos e assintomáticos, Itaúna, 2016.

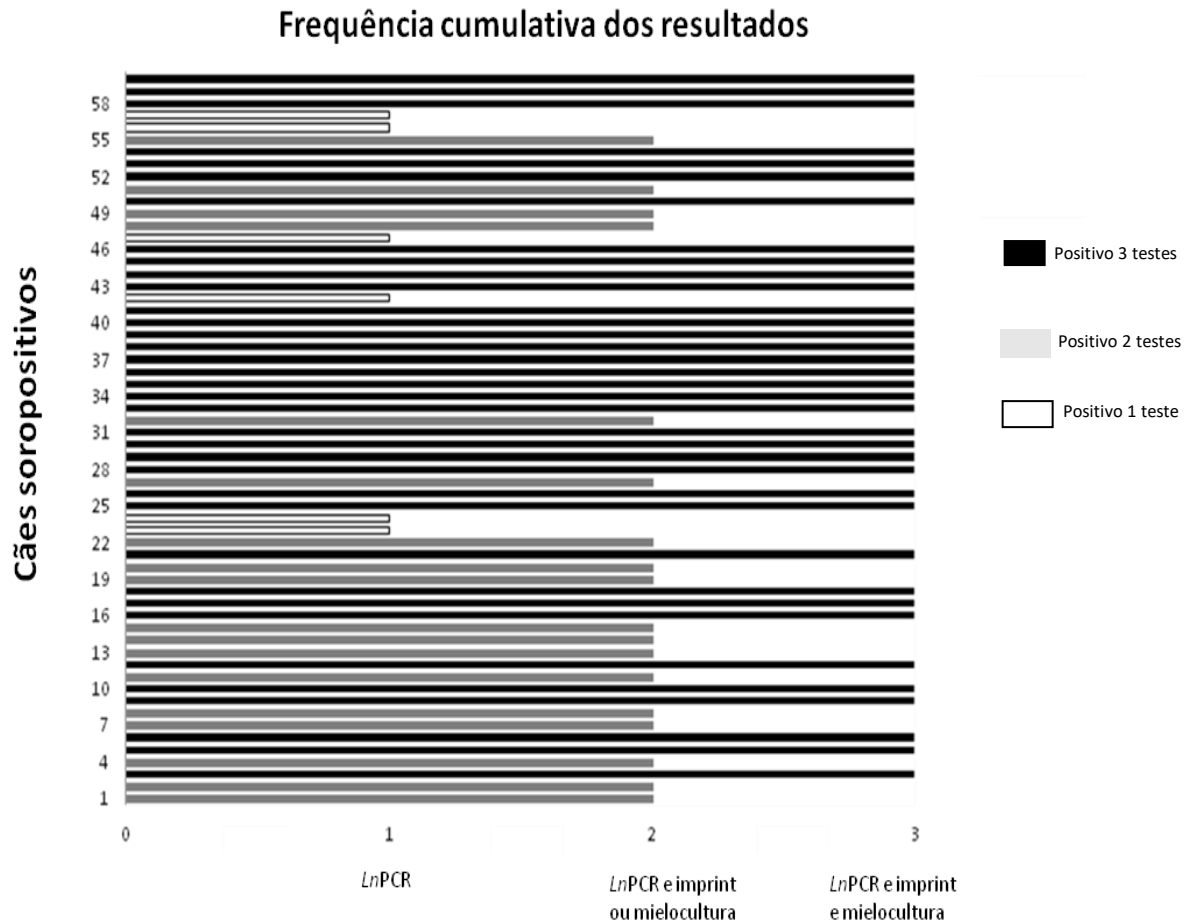


Fonte: Elaborado pelo autor

6.11 Frequência dos resultados cumulativos dos testes parasitológico direto, PCR e mielocultura dos cães assintomáticos e sintomáticos

Dos 60 cães soropositivos analisados (sintomáticos e assintomáticos) por meio do exame parasitológico direto, mielocultura e detecção de DNA pela LnPCR, 60% (36) foram confirmados pelos 3 testes, 30% (18) por 2 testes e 10% (6) foram confirmados somente por 1 teste (GRÁG. 8).

GRÁFICO 8: Frequência cumulativa dos resultados do teste parasitológico direto, PCR e mielocultura entre cães sintomáticos e assintomáticos, Itaúna, 2016.



Fonte: Elaborado pelo autor

6.12 Caracterização das amostras caninas através de sequenciamento de DNA

Das 239 amostras de tecidos obtidas dos cães soropositivos e analisadas pela *LnPCR*, 230 (96%) apresentaram-se positivas, sendo possível visualizar o fragmento de 353pb característico de *Leishmania* spp. Após sequenciamento, edição e alinhamento das sequências de DNA, foi possível identificar em 228 amostras como sendo infectadas por *Le. infantum* (acessos KU948484.1 e KX007994.1), (FIG. 12 e TAB. 12).

FIGURA 12: Análise das sequencias de *Le. infantum* encontradas em amostras de tecidos dos cães analisados em Itaúna, 2016.



Fonte: Elaborado por Consuelo Latorre Fortes Dias

TABELA 12: Total de amostras caracterizadas através de sequenciamento de DNA, provenientes das biópsias dos cães analisados pela *Ln*PCR.

| Tecidos | Sequenciadas | Sequenciadas | Sequenciadas | Não sequenciadas | Total | Total |
|-----------|-------------------|--------------|--------------|-------------------|-------|-------|
| | Forward e Reverse | Forward | Reverse | Forward e Reverse | | |
| Baço | 43 (73%) | 11 (19%) | 4 (7%) | 1 (1%) | 59 | 98% |
| Medula | 34 (59%) | 21 (37%) | 2 (3%) | 1 (1%) | 58 | 98% |
| Pele | 45 (79%) | 10 (18%) | 2 (3%) | 0 (0%) | 57 | 100% |
| Linfonodo | 48 (86%) | 6 (11%) | 2 (3%) | 0 (0%) | 56 | 100% |
| | 170 (74%) | 48 (21%) | 10 (4%) | 2 (1%) | 230 | 99% |

Fonte: Elaborado pelo autor

6.13 Características de raça e sinais clínicos sugestivos de infecção por *Leishmania infantum* entre os cães estudados

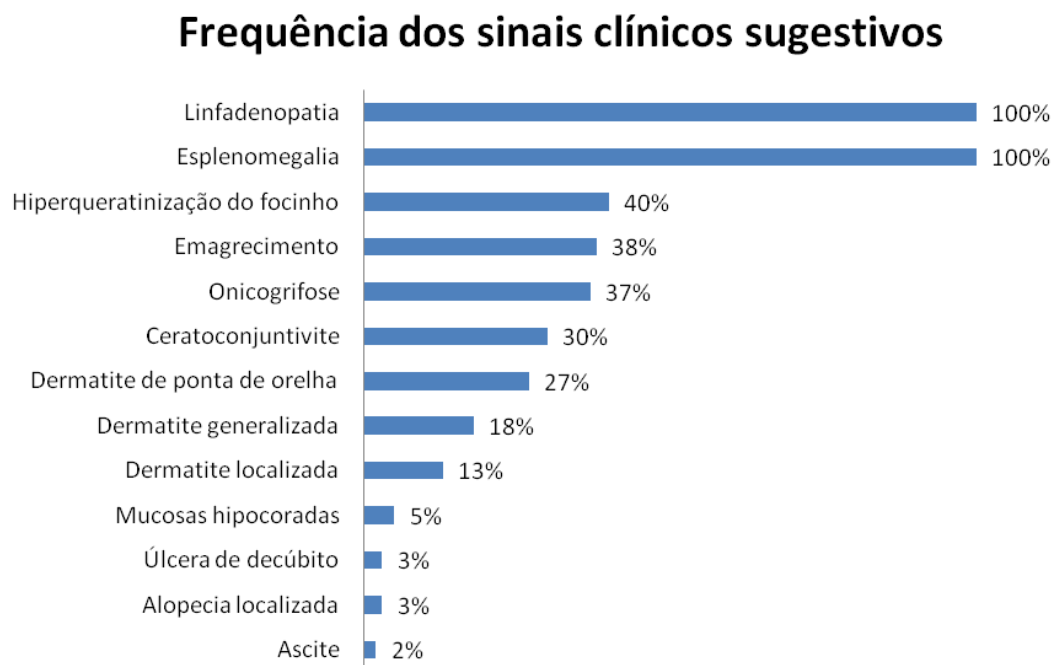
Dos 60 cães estudados, 22 eram assintomáticos, representando 36,6%, e os sintomáticos 38 cães, representando 63,4%, que de acordo com o sexo, estavam distribuídos em 57% de fêmeas e 43% de machos.

A estratificação da população canina examinada, de acordo com a raça, foi representada por 73,4% para cães sem raça definida (SRD). O restante dos animais foi representado em 26,6% distribuídos em 10 raças: Foxhound, Basset Hound, Blue Heeler, Cocker, Pinscher, Poodle, Pit Bull, Fila, Labrador e Pastor Alemão.

A distribuição canina em relação à característica fenotípica da pelagem, observamos que 73,4% tinham pelo curto, enquanto 26,6% apresentavam pelo longo. Já em relação ao porte dos animais, 35% apresentam porte pequeno, 46,6% porte médio e 18,4% porte grande.

Em relação aos sinais clínicos, observamos que dentre os cães sintomáticos, os mais comuns foram hiperqueratinização do focinho (40%), emagrecimento (38%), onicogribose (37%), ceratoconjuntivite (30%), dermatite de ponta de orelha (27%), dermatite generalizada (18%), mucosas hipocoradas (5%), úlcera de decúbito (3%), alopecia localizada (3%) e ascite (2%). Contudo, todos os 60 cães sintomáticos e assintomáticos, apresentaram 100% de esplenomegalia e linfadenopatia (GRÁF. 9).

GRÁFICO 9: Frequência de sinais clínicos sugestivos entre cães sintomáticos e assintomáticos, Itaúna, 2016.



Fonte: Elaborado pelo autor

6.14 Georreferenciamento e análise espacial

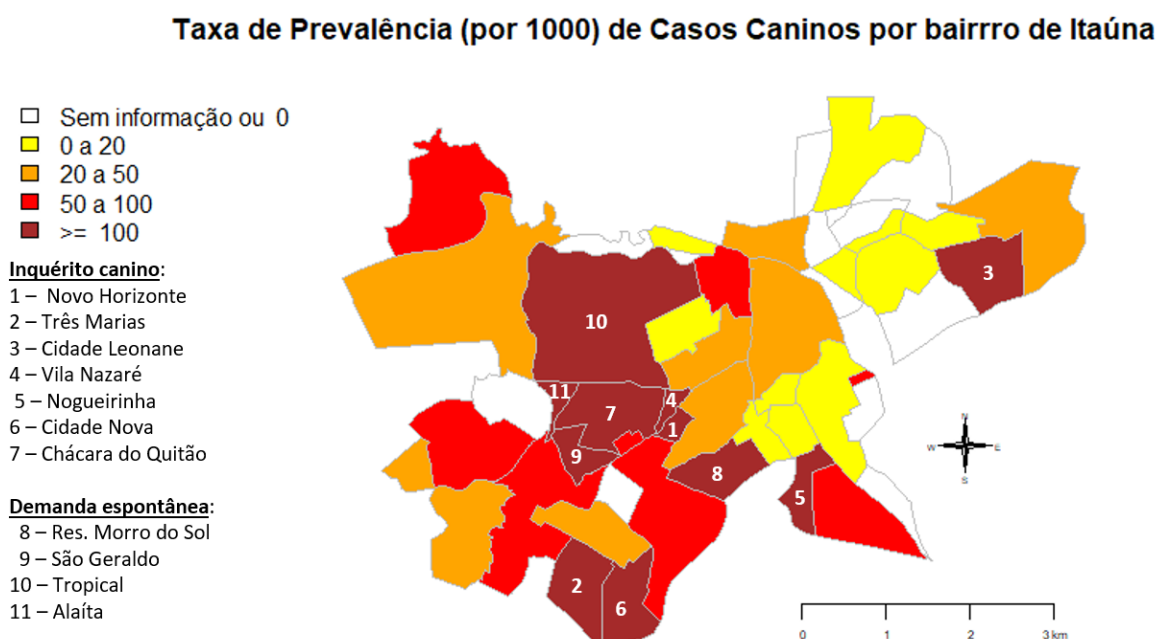
6.14.1 Distribuição espacial dos casos caninos de LVC no ano de 2016

A leishmaniose visceral canina em Itaúna apresentou-se bem distribuída por todo município, com média de prevalência total de 5,3%. A figura 13 apresenta essa distribuição geográfica pelos bairros do município, considerando as taxas de prevalência a cada 1000 cães.

Na figura 13 podemos observar a prevalência canina dividida em 5 categorias, de acordo com os quartis da distribuição encontrada, dividida de forma equilibrada os bairros nas categorias determinadas: ≥ 100 (marrom), 50 a 100 (vermelho), 20 a 50 (laranja), 0 a 20 (amarelo), sem informação ou 0 (branco). Dos 52 bairros do município, 11 (21,15%) pertencem a área marrom; oito (15,4%) a área vermelha; nove (17,3%) a área laranja; onze (21,15%) a área amarela, 13 (25%) dos bairros não houve notificação de casos caninos, ficando inserida na área nula ou branca.

A prevalência canina variou consideravelmente entre os bairros estudados, chamamos atenção para os onze bairros pertencentes à área marrom (FIG.13), que foram os que apresentaram as maiores taxas de prevalência canina. Dentre os 11 bairros com maior prevalência, em 7 deles foi realizado inquérito canino amostral e testes por demanda espontânea e as taxas de prevalência canina foram: Novo Horizonte (11,5%), Três Marias (12,9%), Cidade Leonane (15,4%), Vila Nazaré (17,1%), Nogueirinha (17,8%), Cidade Nova (19,5%), Chácara do Quitão (33,8%) e em 4 destes foram realizados apenas testes por demanda espontânea, ficando as taxas de prevalência em torno de: Res. Morro do Sol (10,6%), São Geraldo (14,7%), Tropical (41,7%), Alaíta (200%). Consideramos o bairro Alaíta e o bairro Tropical como “outliers”, pois estes apresentaram prevalência canina fora do padrão, que pode ser justificado devido ao número reduzido da população humana e consequentemente da população canina de forma que apenas alguns cães infectados implicam em taxas bastante altas (Alaíta - população humana: 6 habitantes e 1 caso canino / Tropical - população humana: 89 habitantes e 12 casos caninos).

FIGURA 13: Mapa de distribuição dos casos caninos e georreferenciamento dos casos humanos, nos bairros do município de Itaúna.



As áreas coloridas são referentes a prevalência canina baseada nos casos diagnosticados em 2016 através do inquérito canino amostral e demanda espontânea. Fonte: Elaborado por Letícia Cavalari Pinheiro

6.14.2 Distribuição espacial dos casos de LVH do município de Itaúna

A distribuição dos casos humanos no município de Itaúna foi analisada a partir dos endereços de residência de cada caso. A análise da densidade de Kernel representada no mapa da figura 14 A, destacou que a infecção está amplamente distribuída pelo município de Itaúna, sendo impossível identificar algum cluster significativo que indique uma região com maior densidade de casos. Os 14 casos humanos de LV registrados apresentaram-se distribuídos em 13 bairros: Aeroporto, Cidade Leonane, Cidade Nova, Das Graças, Itaunense, Nogueira Machado, Olaria, Piedade, Santo Antônio, São Judas, Vila Nazaré, Vila Santa Maria, Vila Vilaça.

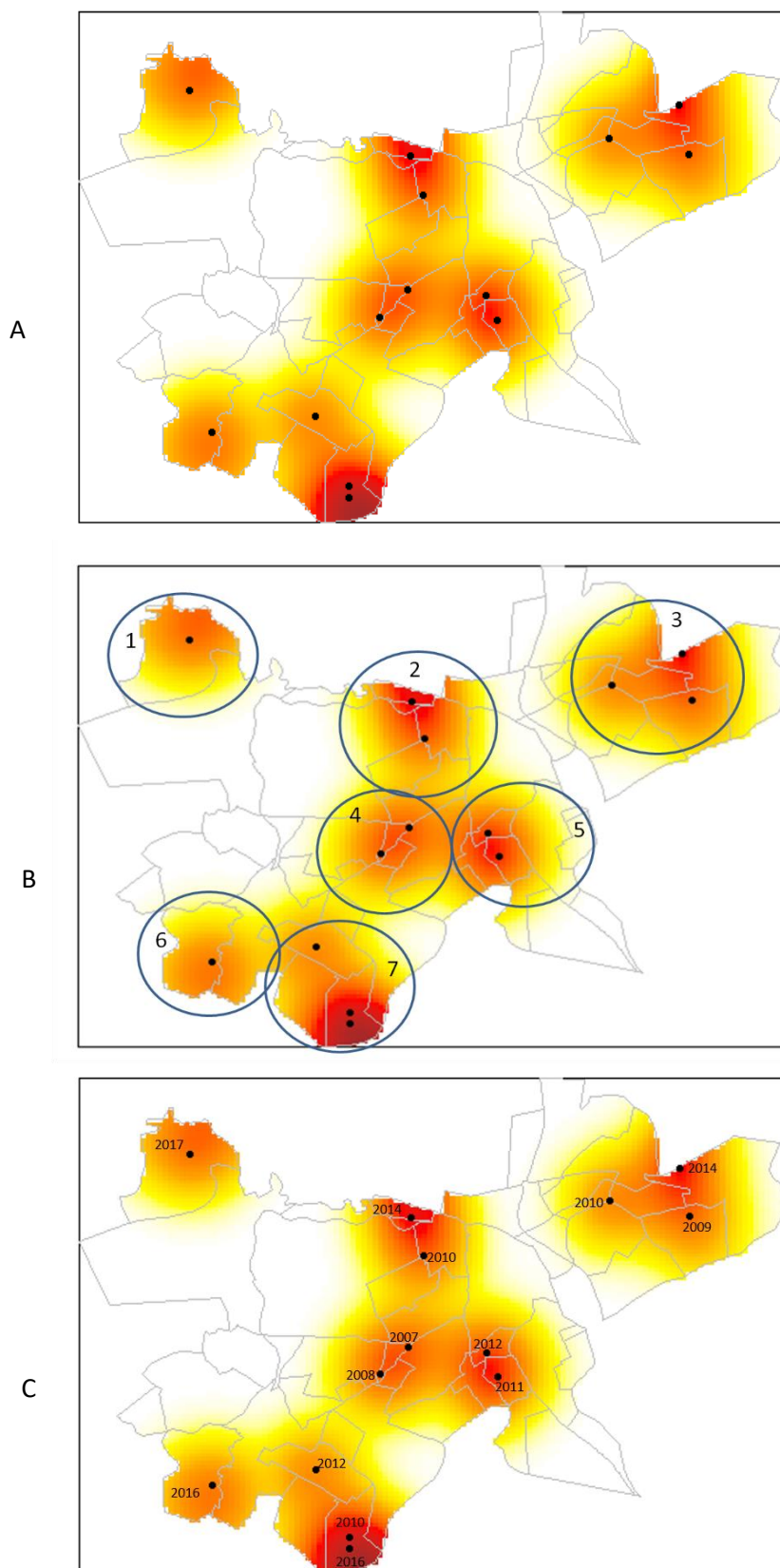
Quando subdividimos o mapa em 7 “Hots” (FIG. 14 B), podemos observar que o número de bairros com intensidade de casos humanos aumenta de 13 para 35 bairros, que são: **Hot 1:** bairros Vila Santa Maria e Santanense. **Hot 2:** São Judas, Vila Augusto Chaves, Res. Victor Gonçalves, Belveder, Cerqueira Lima, Centro, Graças e Universitário. **Hot 3:** Santa Mônica, Antunes, Vila Vilaça, Padre Eustáquio, Irmãos Auller, Res. Veredas, Cidade Leonane e Olaria. **Hot 4:** Chácara

do Quitão, Vila Washington, Morada Nova, Piedade, Novo Horizonte, Vila Nazaré, Cerqueira Lima. **Hot 5:** Centro, Piedade, Morro do Sol, Pio XII, Nogueira Machado, Nogueirinha, Lourdes, Santo Antônio. **Hot 6:** Itaunense e Garcias. **Hot 7:** Aeroporto, Três Marias, Cidade Nova, Morada Nova, Res. São Geraldo.

A área representada pelo “Hot 7” apresentou maior intensidade de casos humanos, devido a ocorrência de dois casos humanos notificados na mesma área (um caso em 2010 e outro em 2016). Durante o período de estudo, os casos humanos registrados em 2016, estão representados no “Hot” 6 e 7 e o último caso notificado em 2017, está representado no “Hot 1”. Os últimos casos humanos de LV notificados ocorreram na região oeste do município (FIG.14 C).

FIGURA 14: Mapa de Kernel mostrando a distribuição de casos humanos de LV em Itaúna, MG, no período de 2007 a 2017.

Densidade de Kernel dos casos de LVH em Itaúna



Fonte: Elaborado por Letícia Cavalari Pinheiro e adaptado por Josiane Valadão L. Marques

6.14.3 Distribuição de casos de LVC e casos LVH associados aos resultados entomológicos

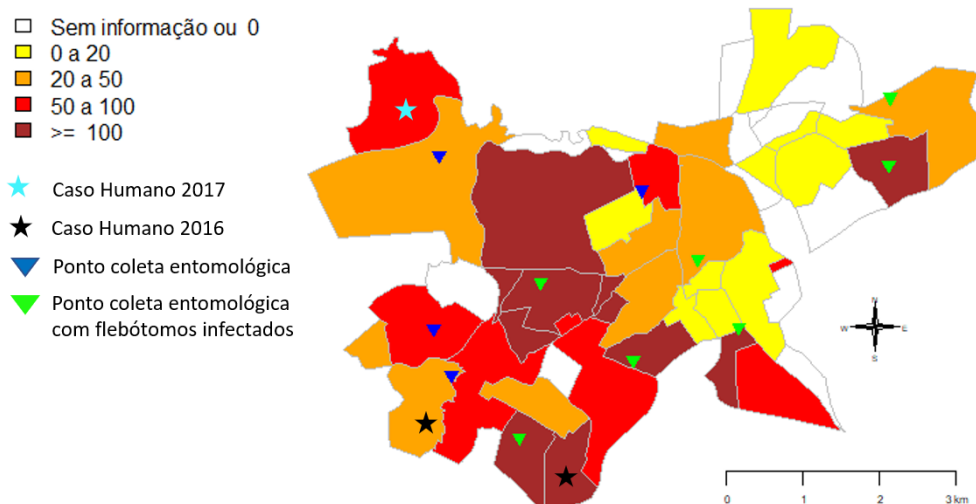
Os casos humanos notificados em 2016 e 2017, as taxas de prevalência canina calculadas por bairro, os pontos de captura entomológica e os pontos entomológicos com presença de flebotomíneos naturalmente infectados foram georreferenciados e plotados em mapa, e posteriormente, foram observadas as possíveis áreas de maior risco de acordo com esses resultados (FIG. 15).

Analisando conjuntamente a taxa de prevalência canina, flebotomíneos positivos bem como os casos humanos notificados de LV, verificamos a existência de focos da doença no município, onde foram identificadas áreas consideradas prioritárias para as ações de controle da doença.

Consideramos como áreas de maior risco de transmissão aquelas que apresentaram altas taxas de prevalência canina, bem como a presença de casos humanos de LV. Baseado nisso, os bairros Itaunense e Cidade Nova foram considerados os bairros de maior risco de transmissão de LV. Entretanto, chamamos atenção para os bairros Chácara do Quitão, Cidade Leonane, Nogueirinha e Três Marias, que apesar de não terem apresentados casos humanos de LV no período de estudo, foram registradas altas taxas de prevalência canina e o encontro de flebotomíneos infectados, tornando-os importantes áreas de transmissão de LV. Também merecem atenção os bairros Morada Nova, Centro e Olaria, visto que foram encontradas taxas de prevalência canina relevantes, porém inferiores as demais áreas, e o encontro de flebotomíneos naturalmente infectados, justificando sua atenção como áreas de risco de transmissão de LV.

FIGURA 15: Mapa de distribuição dos casos caninos e georreferenciamento dos casos humanos, e ponto de captura de flebotomíneos

Taxa de Prevalência (por 1000) de Casos Caninos por Bairro de Itaúna com Pontos de Coleta



Fonte: Elaborado por Letícia Cavalari Pinheiro e adaptado por Josiane Valadão L. Marques

6.14.4 Associação dos resultados entomológicos, caninos e humanos

Os principais resultados entomológicos, caninos e humanos obtidos neste estudo, estão sintetizados na tabela 13, abordando de maneira geral todos os aspectos relacionados à transmissão da LV no município de Itaúna.

TABELA 13: Síntese dos resultados obtidos através da distribuição dos casos humanos, cães analisados, taxa de prevalência, taxa de positividade canina, bem como total de flebotomíneos capturados e infectados.

(continua)

| Bairros | Casos Humanos | População Humana | População Canina | Taxa Prevalência | Flebotomíneos capturados | Flebotomíneos infectados |
|-----------------------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------------|--------------------------|
| Aeroporto | 1 (2012) | 2231 | 301 | 4,3 | | |
| Alaíta | | 6 | 1 | 200 | | |
| Antunes | | 240 | 32 | 0 | | |
| Belveder | | 852 | 115 | 0,9 | | |
| Centro | | 7259 | 980 | 3,8 | 15 | <i>Lu. longipalpis</i> |
| Cerqueira Lima | | 2165 | 292 | 2,1 | | |
| Chácara Quitão | | 593 | 80 | 33,8 | 1070 | <i>Ev. cotelezzi</i> |
| Cidade Leonane | 1 (2009) | 1442 | 195 | 15,4 | 218 | <i>Ev. evandroi</i> |
| Cidade Nova | 1(2010) 1(2016) | 2476 | 334 | 19,5 | | |
| Conj. Hab. Jadir Marinho de Faria | | 3096 | 418 | 1,4 | | |

| | | | | | | |
|------------------------------|-----------|---------------|---------------|-------------|-------------|---|
| Das Graças | 1 (2010) | 2722 | 367 | 9 | 0 | |
| Fazenda Morro do engenho | | 971 | 131 | 5,3 | | |
| Garcias | | 2658 | 359 | 6,7 | | |
| Irmãos Auler | | 2702 | 365 | 1,1 | | |
| Itaunense | 1 (2016) | 3645 | 492 | 3,3 | 74 | |
| Lourdes | | 5337 | 720 | 1 | | |
| Morada Nova | | 6056 | 818 | 5,7 | 126 | <i>Ev. lenti</i> <i>Lu. longipalpis</i> |
| Nogueira Machado | 1 (2011) | 2032 | 274 | 1,8 | | |
| Nogueirinha | | 670 | 90 | 17,8 | 63 | <i>Lu. longipalpis</i> |
| Nova vila Mozart | | 752 | 102 | 0 | | |
| Olaria | 1 (2014) | 2590 | 350 | 4,9 | 120 | <i>Ev. termitophila</i> |
| Padre Eustáquio | | 3402 | 459 | 1,1 | | |
| Parque Jardim Santanense | | 4049 | 547 | 6,9 | 1 | |
| Piedade | 1 (2007) | 3187 | 430 | 3 | | |
| Pio XII | | 1048 | 141 | 1,4 | | |
| Residencial Morro do sol | | 1388 | 187 | 10,7 | | |
| Residencial Novo Horizonte | | 960 | 130 | 11,5 | | |
| Residencial Santanense | | 969 | 131 | 0 | | |
| Residencial São Geraldo | | 794 | 107 | 0 | | |
| Residencial Veredas | | 1354 | 183 | 0 | | |
| Residencial Victor Gonçalves | | 309 | 42 | 0 | | |
| Santa Edwiges | | - | - | - | | |
| Santa Mônica | | 536 | 72 | 0 | | |
| Santo Antônio | 1 (2012) | 1094 | 148 | 1,4 | | |
| Santanense | | 3405 | 460 | 2,6 | 9 | |
| São Bento | | 448 | 60 | 3,3 | | |
| São Geraldo | | 555 | 75 | 14,7 | | |
| São Judas Tadeu | 1 (2014) | 400 | 54 | 1,9 | | |
| Três Marias | | 2127 | 287 | 12,9 | 90 | <i>Ev. cortelezzi</i> <i>Lu. longipalpis</i> |
| Tropical | | 89 | 12 | 41,7 | | |
| Universitário | | 458 | 62 | 4,8 | | |
| Vila Mozart | | 272 | 37 | 5,4 | | |
| Vila Nazaret | 1 (2008) | 863 | 117 | 17,1 | | |
| Vila Santa Maria | 1 (2017) | 113 | 15 | 6,7 | | |
| Vila Tavares | | 600 | 81 | 1,2 | | |
| Vila Vilaça | 1 (2010) | 747 | 101 | 2 | | |
| Vila Washington | | 210 | 28 | 7,1 | | |
| Vargem Verde | | 320 | 43 | 0 | | |
| Vila Augusto Chaves | | 98 | 13 | 0 | | |
| Vila Santiago | | 33 | 4 | 0 | | |
| Fazenda da Chácara | | 46 | 6 | 0 | | |
| Eldorado | | 82 | 11 | 0 | | |
| Total | 14 | 80.451 | 10.859 | 5,3% | 1786 | 9 |

Fonte: Elaborado pelo autor

7 DISCUSSÃO

Este trabalho representa o primeiro estudo no município de Itaúna que objetivou esclarecer os elos da cadeia epidemiológica da LV. A cidade situa-se no centro-oeste de Minas Gerais, e parece ilustrar o processo de expansão e urbanização da doença. O município foi recentemente classificado pelo MS como área de transmissão esporádica de LV, e se encontra em situação de atenção em relação à transmissão da doença.

Diante da problemática, estudos de caráter epidemiológico, visando elucidar a identificação das espécies vetoras, potenciais hospedeiros, conhecimento da biologia e detecção da taxa de infecção natural dos flebotomíneos, são de fundamental importância para o entendimento da cadeia de transmissão da doença, principalmente nas áreas endêmicas para LV.

Neste estudo, os resultados entomológicos possibilitaram identificar a fauna de flebotomíneos em seus aspectos quantitativos e qualitativos. Estes evidenciaram uma diversidade de espécies, confirmando assim a adaptação dos flebotomíneos a ambientes urbanos (BARATA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2007; MICHALSKY *et al.*, 2009, 2011). A fauna flebotomínica se mostrou diversificada com 11 espécies identificadas, das quais *Lu. longipalpis* foi a espécie predominante representando 84% do total dos espécimens capturados, confirmando sua adaptação a ambientes antrópicos (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Lu. longipalpis vetor comprovado de *Leishmania* spp. em diversas regiões do Brasil, possui ampla distribuição geográfica, hábitos alimentares ecléticos e alta capacidade adaptativa. Essa elevada densidade de exemplares capturados em Itaúna, pode ter implicações importantes na transmissão da LV na região (COSTA *et al.*, 1990; BEVILACQUA, 2001; GALIMBERTTI *et al.*, 1999; MICHALSKY *et al.*, 2009), e sua presença no município é uma preocupação, uma vez que já existem relatos da elevação de casos de LVC autóctones no município.

A espécie *Lu. whitmani* foi capturada no município durante o período de estudo, e, apesar de não ter sido encontrada em elevada densidade, apresenta importância epidemiológica, uma vez que é incriminada como espécie vetora de *Le. braziliensis* em algumas regiões do Brasil (QUEIROZ *et al.*, 1994; RANGEL *et al.*, 1996; LUZ *et al.*, 2000).

Em relação ao gênero, foram capturados 1436 machos (80%) e 350 fêmeas (20%). O número de machos capturados pode ter sido maior do que o de

fêmeas por vários motivos: os machos geralmente eclodem antes das fêmeas para atingirem maturidade sexual com a rotação da genitália em 180°, ou também devido a um fenômeno chamado "efeito leque", com aglomeração destes; ou porque os machos são atraídos pelos odores exalados pelos hospedeiros e liberam feromônios sexuais para o acasalamento. Sobretudo, as fêmeas ingurgitadas tendem a permanecer mais próximas do local de alimentação devido ao aumento do peso pós-alimentação e, portanto, tendem a ser menos atraídas para as armadilhas; uma vez que os machos não se alimentam de sangue, eles são mais atraídos pela fonte de luz da armadilha durante o vôo de acasalamento, fatores estes que contribuem e reforçam nosso achado (BRAZIL E BRAZIL, 2003, WARD *et al.*, 1993, KELLY AND DYE, 1997; JONES & QUINNELL 2002; WICKER-THOMAS, 2007; SPIEGEL *et al.*, 2016).

Em relação ao comportamento dos flebotomíneos, a maioria dos espécimens foram capturados no peridomicílio (80%). Podemos observar na tabela 5 que o número de fêmeas capturadas no intradomicílio foi quase metade (124 exemplares) do total de fêmeas capturadas em todo período, representando uma proporção significativamente maior em relação ao número de machos do que a observada no peridomicílio. Este resultado pode ter uma implicação importante na transmissão da LV, visto que apenas as fêmeas são hematófagas e participam diretamente na transmissão das leishmanioses. Resende (2006) observaram a alta capacidade endofílica de *Lu. longipalpis*, e sugere que a probabilidade de transmissão de LV intradomiciliar é alta, conseqüentemente a sua presença no interior das residências pode ter um impacto na transmissão de *Le. infantum*. Nosso estudo corrobora em relação ao comportamento endofílico das fêmeas com outros estudos da literatura, pois demonstra a possibilidade de transmissão da LV ocorrer no intradomicílio (SANTOS *et al.*, 2003, SOUZA *et al.*, 2004, BARATA *et al.*, 2004, 2005, FRANÇA-SILVA *et al.*, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2005; RESENDE *et al.*, 2006, MISSAWA & DIAS 2007).

As mudanças climáticas podem influenciar no comportamento dos vetores, tornando possível a expansão de *Lu. longipalpis* para áreas anteriormente consideradas como não receptivas, acompanhando alterações climáticas (PETERSON *et al.*, 2017). Além disso, estudos sobre análises climáticas vem demonstrando que os fenômenos como o El Niño e La Niña alteram a incidência de

casos de LV durante esses fenômenos, aumentando durante o El Niño e diminuindo durante La Niña (CARDENAS *et al.*, 2006, GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

A interferência de fatores abióticos como precipitação, temperatura e umidade na densidade populacional dos flebotomíneos já foi demonstrada por diversos autores (MICHALSKY *et al.*, 2009, 2011; SOUZA *et al.*, 2004; DIAS *et al.*, 2007). Em 1960, Forattini demonstrou a variação sazonal dos flebotomíneos, indicando o aumento nos meses quentes e úmidos, enquanto nos meses frios e secos havia redução na população. Como as características climáticas são diferentes para cada região, para o conhecimento da epidemiologia da doença e intensificação das ações de controle, torna-se necessário a realização de análises direcionadas para cada região, principalmente em relação ao controle químico, que é uma das principais estratégias de controle de LV empregadas no Brasil (SILVA *et al.*, 2007).

No presente estudo, a correlação entre as variáveis climáticas umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica em relação à densidade dos flebotomíneos capturados não foi estatisticamente significativa, ao contrário da temperatura, cuja correlação foi positiva e estatisticamente significativa. Nossos resultados apresentam um aumento do número de flebotomíneos capturados nos meses mais quentes, contudo não podemos descartar a influência da precipitação pluviométrica na densidade populacional destes insetos. Está claro na literatura que a chuva propicia um aumento da umidade e favorece diretamente na proliferação e sobrevivência dos flebotomíneos (DEANE, 1955; RUTLEDGE E ELLENWOOD, 1975) (GRÁF. 4 e 5).

O uso de técnicas moleculares para a detecção de DNA de *Leishmania* em flebotomíneos vem sendo cada vez mais utilizada, devido principalmente à alta sensibilidade e especificidade destas técnicas (ROCHA *et al.*, 2010; KATO *et al.*, 2007). Neste estudo, a taxa mínima de infecção encontrada foi de 2,91%. Esta taxa é relativamente alta por se tratar de uma área de esporádica transmissão em comparação com TMI de áreas de intensa transmissão relatadas na literatura. Em áreas endêmicas para LV, a taxa mínima de infecção por *Leishmania* são geralmente baixas, podendo variar entre 0,7% e 3,9% (SAVANI *et al.*, 2009; MISSAWA *et al.*, 2010). Ressaltamos que dos nove *pools* encontrados positivos, o

número de fêmeas variou de um a seis exemplares, sendo que apenas uma fêmea positiva foi considerada nos cálculos, o que pode ter subestimado o cálculo da TMI.

Em sete dos onze bairros estudados foram encontrados flebotomíneos infectados por *Leishmania* spp. (Chácara do Quitão, Cidade Leonane, Nogueirinha, Três Marias, Centro, Morada Nova e Olaria). Foram encontradas infectadas no intradomicílio três espécies de flebotomíneos (*Lu. longipalpis*, *Ev. cortelezzii*, *Ev. lenti*). O grande número de *Lu. longipalpis* capturados (84%), e a detecção de infecção por *Le. infantum* em quatro *pools* desta espécie em Itaúna é um fato bastante relevante e exerce um papel fundamental em estudos epidemiológicos. Estes resultados permitem um melhor entendimento da relação entre vetor e agente, podendo indicar condições favoráveis para a disseminação da *Le. infantum* no município.

Em nosso estudo também ressaltamos o encontro de outras espécies de flebotomíneos apresentando DNA de *Le. infantum* no intradomicílio, que foram *Ev. cortelezzii* (6% dos exemplares capturados) e *Ev. lenti* (3% exemplares capturados). Esses achados corroboram com outros trabalhos na literatura, nos quais a espécie *Ev. cortelezzi* já foi encontrada infectada tanto por *Le. infantum* quanto *Le. braziliensis* (LANA *et al.*, 2015; LARA-SILVA *et al.*, 2015; SARAIVA *et al.*, 2010) e a espécie *Ev. lenti* infectada por *Le. infantum* (SHERLOCK, 1996; PAIVA *et al.*, 2010). Mesmo não sendo incriminadas como vetores no ciclo de transmissão de *Leishmania*, reforçamos a necessidade de maiores estudos a respeito da possível participação destas espécies na transmissão destes parasitos, tendo em vista a recorrência do encontro de *Leishmania* spp. infectando estas espécies em diferentes áreas de transmissão de leishmanioses. Em relação à *Ev. lenti* devemos destacar que a mesma já foi encontrada infectada no município de Divinópolis, localizado à 34 Km de Itaúna (MARGONARI *et al.*, 2010), o que pode reforçar ainda mais a importância deste achado em nosso trabalho.

Em nosso estudo, as espécies *Ev. evandroi* e *Ev. termitophila* foram encontradas infectadas por *Le. infantum* no peridomicílio. Outros estudos envolvendo *Ev. evandroi*, detectaram a infecção natural desta espécie e demonstraram uma ampla distribuição geográfica, alta antropofilia, adaptação à ambientes peridomiciliares e sugeriram a sua participação na transmissão de *Le. infantum* para cães (SANGUINETTI *et al.*, 2011; REBÊLO *et al.*, 2010; SHERLOCK,

1996). Já a espécie *Ev. termitophila*, foi encontrada em diversos estudos entomológicos no estado de Minas Gerais, associada a ninho de térmitas (LOIOLA *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 1970). Nossos resultados demonstraram o encontro de *Ev. termitophila* infectada por *Le. infantum* no bairro Olaria, corroborando e validando os estudos de Saraiva e colaboradores em 2010. Contudo, não existem relatos da capacidade vetorial destas espécies na transmissão de LV, pois a competência vetorial não pode ser determinada apenas pela detecção de DNA de *Leishmania*.

É conhecido que a densidade da população de *Lu. longipalpis* que transmite *Le. infantum* está associada a condições de peridomicílio e é frequentemente associada à presença de animais domésticos (FORATINI, 1960; SHERLOCK; GUITTON, 1969). Isso demonstra que sua presença no peridomicílio parece estar envolvida na epidemiologia da doença, pois, sendo uma fonte atrativa para os vetores, permite sua manutenção no ambiente urbano. Estudos relacionados com a determinação de fonte alimentar de *Lu. longipalpis*, demonstraram o caráter eclético de alimentação desta espécie, uma vez que foi encontrada evidência de sangue proveniente de aves, roedores, caninos, equinos, bovinos e humanos (MISSAWA & DIAS 2007; BRANCO, 2011; AFONSO *et al.*, 2012, CUTOLO *et al.*, 2014, PATERNINA *et al.*, 2016).

Essas observações reforçam nossos resultados, uma vez que os locais que encontramos as densidades mais elevadas de flebotomíneos eram locais com presença de animais domésticos e principalmente associados a galinheiros. Nos bairros Chácara do Quitão, Cidade Leonane, Morada Nova, Olaria e Itaunense, foram os locais com as mais elevadas densidades de flebotomíneos, sendo que estes possuíam galinheiros, cachorros, cavalos e porcos. Em locais apenas com a presença de cachorros, foram encontrados números bem inferiores de flebotomíneos, como foi visto nos bairros Centro, Santanense e Nogueirinha. No bairro Parque Jardim, não havia presença de animais domésticos, e apenas um exemplar foi capturado. A exceção é o bairro Graças, onde não foi capturado nenhum flebotomíneo, entretanto, residiam cinco cães confinados no interior da residência sem contato com peridomicílio.

O encontro de *Le. infantum* em flebotomíneos naturalmente infectados no município de Itaúna e a caracterização da espécie de *Leishmania* circulante neste

foco de transmissão de LV, é de extrema importância para compreensão da epidemiologia da doença no município. Consequentemente, o conhecimento da fauna flebotomínica local e seu comportamento em relação à endofilia e exofilia e o estudo da correlação entre as variáveis climáticas e a densidade populacional de flebotomíneos, podem contribuir para o direcionamento das medidas de controle, principalmente em relação à borrifação de inseticidas.

Os resultados entomoepidemiológicos deste estudo possibilitarão que o município realize uma vigilância entomológica de forma contínua, observando o comportamento dos vetores na área estudada no município, dispondo de informações necessárias para direcionar e orientar, de modo eficaz, a aplicação de medidas preventivas, melhorando a saúde da comunidade.

Outro aspecto importante de doenças ligadas a vetores é a existência de uma população de hospedeiros que é efetivamente responsável pela manutenção e dispersão da doença (WOOLHOUSE *et al.*, 1997; WERNECK, 2010), isso torna o conhecimento dos reservatórios de extrema relevância para o efetivo controle da LV. A realização de inquéritos sorológicos na população de cães e a realização de levantamentos entomológicos são indispensáveis, pois revelam dados importantes e contribuem para reduzir o risco de transmissão da doença tanto para o homem quanto para os animais (VIEIRA; COELHO, 1998; ALMEIDA *et al.*, 2009).

Segundo Baneth *et al.*, (2008), “Uma vez que existam as condições favoráveis para a transmissão da doença, caracterizada pela alta densidade vetorial e alta concentração de cães, a infecção irá se espalhar de forma rápida e extensiva entre a população canina”.

O cão é um importante reservatório de *Le. infantum* no ciclo doméstico, atuando na manutenção do parasito neste ambiente. A participação destes no ciclo de transmissão da LV foi reconhecida desde a década de 50 no nordeste brasileiro por Alencar, quando a eutanásia destes animais passou a ser usada como uma medida de controle da LV (DEANE, 1955; ALENCAR, 1959).

Pesquisas envolvendo cães são de grande importância nos estudos relacionados à epidemiologia da doença, já que a LV canina é mais prevalente e antecede à LV humana (MARZOCHI *et al.*, 1985, SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997, OLIVEIRA *et al.*, 2001, BELO *et al.*, 2013). Outro ponto importante e que merece destaque se refere ao elevado número de cães assintomáticos que permanecem

domiciliados em áreas endêmicas, favorecendo assim a manutenção do ciclo de transmissão da doença. (DANTAS-TORRES *et al.*, 2006; ALVAR *et al.*, 2004; MOHEBALI *et al.*, 2005; COURA-VITAL *et al.*, 2011).

Diversos estudos envolvendo a determinação da taxa de positividade canina em municípios brasileiros vêm mostrando variações nas taxas de cães soropositivos para LV em áreas urbanas (LOPES *et al.*, 2010; FRANCA-SILVA *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2005; MESTRE E FONTES, 2007; LANA *et al.*, 2018). Nosso estudo corrobora com esses autores, pois em inquérito canino amostral realizado no município em 2016, pôde-se verificar a média da taxa de positividade canina foi considerada elevada, em torno de 12% (TAB. 10).

O diagnóstico preciso da LVC é complexo e requer, frequentemente, o uso de diferentes técnicas, associando métodos sorológicos, parasitológicos e moleculares para a obtenção de um resultado conclusivo. O fato de os cães infectados apresentarem amplo espectro clínico e anormalidades clínico-patológicas diversas e não específicas reforça a necessidade do uso combinado de métodos laboratoriais para o diagnóstico diferencial da LV (ALVAR *et al.*, 2004; PALTRINIERI *et al.*, 2010).

O exame parasitológico direto ou a cultura de aspirado de medula óssea são as principais técnicas usadas para o diagnóstico da LV tanto em humanos como em cães. Estes exames são considerados referência no diagnóstico da LV (HERWALDT, 1999; DE VRIES *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2018). Contudo, a dificuldade de execução da técnica, a necessidade de um profissional treinado, a qualidade da amostra, associada a uma baixa carga parasitária, principalmente de animais assintomáticos, podem dificultar a identificação ou mesmo apresentar um resultado falso-negativo (SARIDOMICHELAKIS *et al.*, 2005; MELO, 2004). Neste estudo, dentre os 60 cães analisados pelos exames parasitológicos (imprint/esfregaço e mielocultura), um total de 45 cães (75%) apresentaram-se positivos em ambas as técnicas utilizadas (TAB. 11). Dos 45 cães confirmados pelos exames parasitológicos (GRÁF. 7), 20 cães (44,4%) foram classificados como assintomáticos, apresentando taxas de positividade expressivas nos testes de mielocultura (26,7%) e 35,5% no exame imprint/esfregaço. Este número significativo de cães assintomáticos com confirmação parasitológica demonstra a susceptibilidade destes cães a infecção, e denota sua importância na cadeia de

transmissão da LV. Principalmente porque a literatura sugere a presença de 50 a 70% de cães assintomáticos vivendo em áreas endêmicas, atuando como potenciais fontes de infecção para o vetor (MADEIRA *et al.*, 2004).

A pesquisa direta por amastigotas em microscopia é uma técnica com especificidade de 100%, mas sua sensibilidade depende do grau de parasitismo em virtude da distribuição heterogênea do parasito, do tipo de material biológico coletado, de seu processamento e coloração, além da experiência do observador (ALVAR *et al.*, 2004; TAVARES *et al.*, 2003). Através da técnica de imprint/esfregaço, analisando os tecidos individualmente, as amostras de baço apresentaram 68,3% de positividade, seguidas do linfonodo mesentérico (63,3%), pele (51,6%) e medula (45%) (TAB. 11). Nossos resultados corroboram com estudos de Ferrer (1999) e Alvar e colaboradores (2004), demonstrando elevada positividade na microscopia de lâminas de baço e linfonodo, 75% e 50%, respectivamente.

A amplificação de DNA via PCR se constitui numa alternativa prática e vantajosa, por ser um método altamente sensível e específico na detecção, caracterização e identificação de *Leishmania* spp. em amostras clínicas, reservatórios e vetores infectados (MULLER *et al.*, 2003; WEIGLE *et al.*, 2002; MICHALSKY *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2007, MOREIRA *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 2017). Embora a PCR exija infraestrutura mais elaborada e alto treinamento técnico, ela se tornou uma ferramenta de grande valia para o diagnóstico e estudos epidemiológicos da LVC.

Em estudo de coorte realizado por Oliva e colaboradores (2006), foram observados resultados positivos para PCR na maioria dos cães examinados. Em nosso estudo foi encontrado 100% de positividade nos 60 cães examinados utilizando a *Ln*PCR. Pelo menos um dos tecidos testados mostrou-se positivo com uso da técnica, independente do status clínico do cão. Este resultado é importante uma vez que o encontro do parasito em cães assintomáticos, que podem apresentar uma alta carga parasitária na pele, confirma seu potencial de infecciosidade para o inseto vetor (MADEIRA *et al.*, 2004) e denota a importância epidemiológica desse grupo clínico no ciclo de transmissão da LV (MONTEIRO *et al.*, 1994; MICHALSKY *et al.*, 2007).

As técnicas moleculares mesmo representando um avanço no diagnóstico canino, principalmente devido a sua elevada sensibilidade e especificidade podem

apresentar uma ampla variedade de alvos e iniciadores, o que pode dificultar a inserção desse ensaio na rotina dos serviços de saúde, justamente pela falta de um procedimento padrão (IKONOMOPOULOS *et al.*, 2003; XAVIER *et al.*, 2006).

Diversos estudos mostram que a frequência de detecção de DNA do parasito é variável em diferentes tecidos (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001, BARROUIN-MELO *et al.*, 2004; MANNA *et al.*, 2004). Nossos resultados moleculares apresentam essa variabilidade, onde foi possível observar que o baço e a medula óssea apresentaram a maior positividade (98%), seguido pela pele (95%) e linfonodo mesentérico (93%), apesar de não ter apresentado diferença estatisticamente significativa pelo Teste Q de Cochran ($p=0,36$) (GRÁF. 6). Os resultados obtidos no diagnóstico parasitológico utilizando o imprint de baço corroboraram com o resultado obtido na *LnPCR* utilizando a mesma amostra, demonstrando ser o baço o tecido que apresentou a maior taxa de positividade (98%). Outro fator relevante do nosso estudo foi o encontro de elevada positividade nas amostras de pele. Em termos práticos este tecido poderia ser utilizado em pesquisas de campo, como em testes de triagem em massa, devido à facilidade de coleta da amostra e principalmente por não ser um procedimento invasivo.

Neste estudo, a medula óssea foi utilizada em três técnicas diagnósticas diferentes *LnPCR*, mielocultura e exame direto. Ao analisarmos estatisticamente os resultados obtidos no diagnóstico parasitológico direto (esfregaço/mielocultura) observou-se que a mielocultura apresentou melhores resultados que o diagnóstico por esfregaço ($p=0,000831$). Nossos resultados corroboram com os encontrados por Lopes *et al.*, 2017, onde a mielocultura apresentou taxa de positividade de 76%.

Observando o resultado cumulativo dos testes diagnósticos empregados (imprint/esfregaço, mielocultura e *LnPCR*), foi possível visualizar um elevado número de cães (60%) com resultados positivos nas três técnicas (imprint/esfregaço, mielocultura, *LnPCR*), 30% foram confirmados em duas técnicas (*LnPCR* e imprint/esfregaço ou *LnPCR* e mielocultura), e 10% confirmados apenas pela *LnPCR* (GRÁF. 8). O critério de diagnóstico para detecção de infecção por *Leishmania* spp. em cães são os testes sorológicos de DPP (triagem) e ELISA (confirmatório), preconizados pelo PCLV do Brasil. Esse protocolo proposto pelo MS tem sido alvo de diversas críticas, principalmente em relação à especificidade e sensibilidade dos testes (SILVA *et al.*, 2016; GRIMALDI *et al.*, 2012; REITHINGER *et al.*, 2002; DA

COSTA *et al.*, 2003; OTRANTO *et al.*, 2004). Contudo, nossos resultados apresentados acima demonstram que os testes de diagnósticos parasitológicos e/ou moleculares empregados em nossos experimentos confirmaram em sua totalidade (100%) os exames sorológicos de rotina do PCLV, através do inquérito canino amostral realizado no município.

O diagnóstico da LVC representa, em si, um grande desafio, pois não existe um único método que seja simples, de baixo custo, reprodutível, sensível e específico para diagnosticar os vários estágios da doença. No entanto, neste estudo, percebeu-se que a *LnPCR* foi a técnica mais sensível, seguida das técnicas parasitológicas que ficaram empatadas. Esses dados mostram a necessidade do contínuo desenvolvimento de técnicas de detecção da LVC que alcancem elevadas sensibilidade e especificidade para que possam ser empregadas na rotina de vigilância epidemiológica. Contudo, a *LnPCR* mostra ser mais sensível que qualquer método parasitológico convencional no diagnóstico de leishmaniose (MARQUES *et al.*, 2001).

A otimização da detecção e identificação dos agentes causadores das leishmanioses é extremamente útil no contexto clínico, pois a determinação da espécie em questão pode promover maior eficácia no tratamento destas doenças, com o desenvolvimento de possíveis novos fármacos ou mesmo protocolos de tratamento que sejam espécie-específicos. Além disso, a detecção e identificação permitem a geração de dados importantes para estudos epidemiológicos e ecológicos (BRASIL, 2006).

Várias pesquisas utilizam o sequenciamento de fragmentos de DNA obtidos pela amplificação de sequências diferentes genes alvo que, junto à análise do alinhamento das seqüências obtidas, é uma forma de identificar a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (PARVIZI & READY 2008; PARVIZI *et al.*, 2008). O sequenciamento do DNA do cinetoplasto, utilizando produtos de extensão de *primers* por PCR, é realizado para caracterização da espécie da *Leishmania* (MINODIER *et al.*, 1997; MEDEIROS *et al.*, 2002). Essa técnica tem sido amplamente explorada em busca de mais informações sobre a sequência de DNA de *Leishmania*, a fim de aperfeiçoar o diagnóstico e a identificação das espécies (SCHALLING; OSKAM, 2002; LOPES *et al.*, 2017).

Para a identificação da espécie de *Leishmania* das amostras dos cães deste estudo, utilizamos para a análise bioinformática, os softwares para edição da sequência e alinhamento BioEdit e BLAST respectivamente. A caracterização das 228 amostras isoladas dos cães soropositivos da área estudada no município de Itaúna evidenciou que a espécie de *Leishmania* circulante nos reservatórios no município de Itauna é *Le. infantum* (FIG. 12 e TAB. 12), assim como em outros focos de LV, em diversas regiões do Brasil. Este resultado demonstra a importância de estudos epidemiológicos envolvendo a tríade parasito-vetor-reservatório no direcionamento e estabelecimento de medidas eficazes de controle da LV.

A expansão geográfica da LV tem sido registrada em vários estados brasileiros, e vem sendo atribuída a diversos fatores como dificuldades na eliminação dos reservatórios, ineficácia e não integralidade das ações de controle, elevados custos para execução destas ações e principalmente a falta de conhecimento a respeito da ecoepidemiologia das áreas afetadas pela doença, entre outros. (OLIVEIRA *et al.*, 2008, GONTIJO E MELO, 2004; TAUIL, 2006; ZUBEN *et al.*, 2016). Existem muitas controvérsias sobre a eliminação dos cães soropositivos. A aceitabilidade da eutanásia pela população é baixa, principalmente quando se trata de animais assintomáticos, o que dificulta a continuidade da ação. Mediante isso, existe um consenso sobre a necessidade de estudos sobre melhores técnicas diagnósticas, que possam expressar a real magnitude de infecção da população canina (ROMERO E BOELAERT, 2010; COSTA, 2011; COSTA *et al.*, 2013).

Aliado a isso, a soroprevalência canina fazendo-se alta, torna-se iminente para o surgimento de novos casos humanos, e isso normalmente ocorre por falta de estratégias eficazes dos órgãos competentes, tanto no diagnóstico, que deveria ser realizado de maneira sistemática, quanto na retirada e eutanásia dos cães. (REITHINGER; DAVIES, 1999, ASHFORD, 2000; SILVA *et al.*, 2001; CABRERA *et al.*, 2003).

A manifestação clínica da LVC depende de diversos fatores, alguns intrínsecos ao animal, como o tipo de resposta imune desenvolvida e o seu padrão nutricional; e outros extrínsecos, como as condições de higiene das instalações, manejo sanitário do animal e presença de ecto ou endoparasitos (FARIA & ANDRADE 2012). O quadro clínico da LVC observado varia de cães aparentemente saudáveis a aqueles com manifestações severas da doença (SANCHIS; VITU;

GIAUFFRE, 1976; LANOTTE *et al.*, 1979). Molina *et al.* (1994) demonstraram que a infectividade dos cães com LVC não está exclusivamente ligada ao estágio sintomático da doença. Entretanto, epidemiologicamente, é necessário considerar que cães soropositivos são capazes de infectar flebotomíneos indiferentemente da presença de sintomas (MICHALSKY *et al.*, 2007).

Diagnosticar clinicamente a LVC é um problema para as autoridades de saúde, primeiro devido à amplitude de sinais e sintomas que são observados na LV. Em segundo lugar, os animais podem se apresentar aparentemente saudáveis, com poucos sintomas, permanecendo assintomáticos por longos períodos ou por toda a vida, ou até com a sintomatologia grave da doença (SILVA, 2007). Sinais clínicos como apatia, perda de peso, dermatopatias, oftalmopatias, artropatias e nefropatias são alterações bem conhecidas e documentadas como manifestações clínicas da LV. (CIARAMELLA *et al.*, 1997, EGUCHI *et al.*, 2017). Em nosso trabalho os sinais clínicos mais comuns foram hiperqueratinização do focinho (40%), emagrecimento (38%), onicogribose (37%), ceratoconjuntivite (30%) dentre outros sinais clínicos (GRÁF. 9). Contudo, o que chamou atenção foi o aumento de baço e linfonodo em 100% dos cães estudados, esses achados corroboram com estudos realizados por outros pesquisadores (LOPES *et al.*, 2017; FREITAS *et al.*, 2012). O encontro de linfadenopatia e esplenomegalia em cães pode levar a suspeita da LVC, entretanto, é necessária a realização de exames mais específicos para o diagnóstico preciso e confirmação da infecção por *Le. infantum* (MATTOS *et al.*, 2004).

Outros estudos exploram fatores de risco associados à LVC como raça, sexo, idade, dentre outras características dos cães, contudo seus resultados muitas vezes são conflitantes. Dos 60 cães analisados em nosso estudo, 34 (56,6%) eram fêmeas e 26 (43,4%) machos. Pesquisas relacionadas à LV, ligadas ao sexo dos cães, normalmente não demonstram diferenças estatísticas (MORENO & ALVAR 2002; FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003, BARBOZA *et al.*, 2006). Entretanto no Brasil uma maior prevalência de LV em cães machos foi encontrado na Bahia com 61% (BARROUIM-MELO *et al.*, 2006) e em Pernambuco com 51,6% (DANTAS-TORRES *et al.*, 2006).

A maioria dos cães estudados em Itaúna (73,4%) apresentavam característica de pelagem curta. Em estudo realizado em Montes Claros, por França-Silva *et al.*, 2003, foi observado que a infecção por *Leishmania* spp. foi mais

prevalente em animais com essa característica (11,9%). Cães que apresentam pêlo curto são considerados alvos fáceis para a infecção, fato que pode estar relacionado a uma maior facilidade do vetor transmissor realizar o repasto sanguíneo (LEAL *et al.*, 2018). Resultados mais consistentes em relação a estes fatores exigem estudos com atributos mais definidos, necessitando serem mais elaborados como estudo de coorte, estudo de caso controle ou ainda estudos transversais (DAVIES *et al.*, 2000).

Outro fator importante associado é a execução de inquéritos sorológicos para avaliar os níveis de soroprevalência, conforme é preconizado pelo PCLV, de forma a acompanhar o estado de surtos e epidemias, e avaliar a eficácia das medidas de controle aplicadas (BRASIL, 2006). Conforme preconizado, recomenda-se o inquérito amostral canino anual nas áreas de transmissão moderada e intensa para LV, para avaliar as taxas de prevalência em cada setor, a fim de identificar setores prioritários a serem trabalhados, auxiliando na escolha das medidas de controle a serem priorizadas. (BRASIL 2006). Salienta-se que o município de Itaúna, nossa área de estudo, é classificado como área de transmissão esporádica, conforme preconização do MS. Fato que chama atenção visto que de acordo com as orientações adotadas pelo MS, o município de Itaúna não seria área de abrangência para realização de inquérito amostral para LVC.

O conhecimento da prevalência canina é de elevada importância, pois tem o propósito de conhecer a soroprevalência e realizar o controle dos reservatórios nas áreas urbanas. Essa informação, agregada à estratificação da incidência de LVH, orienta a priorização do controle nas áreas de transmissão. No Brasil, já foram demonstradas elevadas variações de prevalência canina de 1,9 a 35% em áreas endêmicas, havendo descrições de até 53,4% em determinadas regiões. Especialmente em Minas Gerais, diversos pesquisadores vêm demonstrando elevadas taxas de prevalência de LVC (FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003; FRANÇA-SILVA *et al.*, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2005; COURA-VITAL *et al.*, 2011; MICHALSKY *et al.*, 2011; BARATA *et al.*, 2011, 2013; TANURE *et al.*, 2015; LARA-SILVA *et al.*, 2015).

Nossos resultados apresentam uma distribuição da LV canina por todo o município de Itaúna. A taxa de prevalência em todo o município foi de 5,3%. Contudo, as taxas de prevalência canina variaram consideravelmente nas áreas de estudo, corroborando com os resultados dos autores acima. Obtivemos taxas de

0,9% à 33,8%. Contudo, outros bairros apresentaram taxas de 41,7% (Tropical) e 200% (Alaíta), e esse fato ocorreu devido ao número pequeno de moradores e cães residindo nestes bairros, e os cães encontrados infectados, elevou a taxa de prevalência, tornando-se um valor aberrante atípico, sendo considerado inconsistente.

A utilização de ferramentas de geoprocessamento e análise espacial vem sendo cada vez mais aprimorado e explorados inclusive em estudos ligados à saúde, em pesquisas de doenças transmissíveis, permitindo uma melhor compreensão da distribuição destas doenças, entre elas as leishmanioses (OLIVEIRA *et al.*, 2001; WERNECK *et al.*, 2002; CARVALHO, SOUZA-SANTOS, 2005; RINALDI *et al.*, 2006; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006; MESTRE & FONTES, 2007; ARAUJO, *et al.*, 2013; BARBOSA, *et al.*, 2014). A análise espacial permite visualizar as regiões de maior prevalência da doença, permitindo identificar as áreas prioritárias para o controle, tornando possível aplicar as medidas de vigilância mais direcionadas, reduzindo os custos aplicados no PCLV, haja vista que a falta de recursos financeiros é um dos principais entraves para o desenvolvimento de políticas eficazes relacionadas ao PCLV no Brasil (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008, OTRANTO & DANTAS-TORRES, 2013).

Estudos de análise espacial como o de Margonari (2006) observaram a distribuição de casos caninos e humanos em Belo Horizonte, verificaram correlação entre o número de casos de LV canina e humana. Com auxílio da análise de Kernel, Prado (2011) observaram áreas de intensa concentração de cães com LV associadas com casos humanos da doença na cidade de Montes-Claros (MG), o que contribuiu para as ações da vigilância epidemiológica nessa região.

Em nosso estudo foram elaborados mapas de análise espacial, com a prevalência canina do município de Itaúna. Observamos que dos 52 bairros de Itaúna a prevalência de LV canina apresentou expressiva em onze bairros (marron) (FIG. 13). Chamamos atenção para os onze bairros que apresentaram as maiores taxas, nas quais sete participaram do inquérito amostral e demanda espontânea: Cidade Nova, Cidade Leonane, Novo Horizonte, Nogueirinha, Três Marias, Chácara do Quitão, Vila Nazaré e quatro bairros que participaram apenas da demanda espontânea: Tropical, São Geraldo, Res. Morro do Sol e Alaíta. Essa elevada prevalência é um indicador útil para monitorar a força de transmissão do parasito

para os seres humanos, ressaltando a importância de priorizar as intervenções nessas áreas (BELO *et al.*, 2013).

Foi elaborado um mapa de Kernel apresentando a distribuição dos 14 casos humanos registrados entre os anos de 2007 à 2017 no município de Itaúna. Os casos humanos apresentaram-se bem distribuídos por todo o município, ocorrendo registro de dois casos durante o período do nosso estudo, sendo no bairro Itaúnense e Cidade Nova e posteriormente no ano de 2017 foi notificado um caso no bairro Vila Santa Maria.

Os casos humanos começaram a surgir no ano de 2007 na região central de Itaúna, e a doença foi se espalhando a partir de 2009 na região leste do município, sendo que os últimos casos registrados nos anos de 2016 e 2017 foram notificados na região oeste, demonstrando a migração e difusão da doença no município. A análise pelo mapa de Kernel demonstrou presença de 7 “hotspots” distribuídos pelo município. Dois casos humanos estavam concentrados no bairro Cidade Nova e os outros 12 casos distribuídos em 12 bairros distintos. Observamos que dos 13 bairros que apresentaram casos humanos, quando analisados pelo mapa de Kernel, percebemos que as áreas de mais alta intensidade de casos humanos estão espalhadas por todo o mapa e que abrangeram 35 bairros, mostrando que durante o período de estudo a doença parece já ter atingido a maior parte do território de Itaúna.

Em nosso estudo, verificamos a existência de focos da LV apontados visualmente pelos mapas, bem como uma associação entre a prevalência da doença canina e o encontro de flebotomíneos infectados. Bairros que já apresentaram casos humanos de LV tendem a ser bairros de maior risco, pois provavelmente apresentam os elos completos da cadeia de transmissão (vetor-reservatório-hospedeiro susceptível), outrossim, não podemos deixar de destacar a importância dos bairros com altas taxas de prevalência canina também apresentarem alto risco de transmissão da doença.

De acordo com as análises dos mapas, apontamos o bairro Cidade Nova como área de risco, visto que a prevalência canina foi intensa e devido ao registro de um caso humano no ano de 2016, apesar de não saber a situação entomológica neste local. Também chamamos atenção para o bairro Itaunense que apresentou

caso humano em 2016 e presença de *Lu. longipalpis* apesar da prevalência canina apresentar-se média.

Contudo, outras áreas merecem atenção, que são os bairros Chácara do Quitão, Três Marias, Nogueirinha e Cidade Leonane, que embora não tenham sido registrados casos humanos recentes nessas localidades, ambos apresentam elevadas taxas de prevalência canina, elevada densidade de *Lu. longipalpis*, e também encontro de flebotomíneos naturalmente infectados nestes quatro bairros. Também merecem atenção os bairros Morada Nova, Centro e Olaria, na qual foram encontradas taxas de prevalência canina inferiores mas relevantes, principalmente porque também nessas áreas foram encontrados flebotomíneos naturalmente infectados, justificando sua atenção como áreas de risco de transmissão de LV.

Estes resultados são de extrema importância para direcionamento do controle canino, contudo a falta de dados consistentes sobre este reservatório, disponibilizado pelo CCZ, como a falta de regularidade do inquérito canino, bem como o desconhecimento do tamanho da população canina não permitiu avaliações mais profundas sobre a soroprevalência da LV.

No geral, as áreas estudadas apresentam grande relevância em relação à transmissão da LV, pois apresentam casos caninos dispersos por todos os bairros que a compõe, flebotomíneos vetores de LV (*Lu. longipalpis* em abundância: (84%), que foram capturados em nove bairros estudados, tanto no peridomicílio quanto no intradomicílio, além de encontrados vetores infectados naturalmente e casos humanos diagnosticados nos anos de estudo.

Isso sugere que as condições para manutenção do ciclo de transmissão do parasito causador da LV encontram-se adequadas e que as ações de controle empregadas no município podem ser consideradas pouco eficientes. A ocorrência de casos de LVC nos alerta sobre a importância dessa doença, a qual vem emergindo no Brasil, principalmente quando se encontram vetores infectados por *Leishmania*.

Portanto as ações de controle devem ser direcionadas de forma mais efetiva (controle do vetor, eliminação de cães soropositivos e tratamento dos casos humanos), conforme preconizado pelo Ministério da Saúde, principalmente para os bairros onde foram diagnosticados casos humanos; e também devem ser realizadas ações de vigilância epidemiológica e manejo ambiental regularmente em toda a área

estudada, devido à presença de cães soropositivos e vetores (*Lu. longipalpis*) infectados naturalmente ou não.

Os resultados obtidos com esse estudo são inéditos no município e enfatizam a importância de se rever as medidas de controle atualmente preconizadas para as áreas de transmissão esporádicas e moderadas de LV, reduzindo assim as possibilidades de desenvolvimento e manutenção do ciclo urbano da doença.

Podemos recomendar com nossos estudos, que para obtenção de um programa efetivo de controle da LV, é necessário a implementação e a integralidade das ações de controle e vigilância epidemiológica, como também um melhor planejamento pelo serviço de saúde, não só no município de Itaúna como em outras áreas endêmicas afetadas por este agravo.

8 CONCLUSÕES

A fauna flebotomínica apresentou exemplares de seis gêneros distribuídos em onze espécies, sendo *Lu. longipalpis* a espécie predominante, com 84%, dos exemplares capturados. Devido à elevada densidade de *Lu. longipalpis*, sua implicação na literatura como vetor natural da doença, e apresentar taxa de infecção natural de 1,94%, acredita-se ser esta espécie a responsável pela transmissão no município.

O grande número de flebotomíneos capturados no intradomicílio (20%), e proporcionalmente um maior número de fêmeas sugere a adaptação destes ao ambiente doméstico, contribuindo para que a transmissão possa ocorrer no interior das residências.

A correlação dos flebotomíneos capturados com os fatores climáticos demonstrou estatisticamente significativo para a temperatura, o que influenciou na maior densidade de flebotomíneos capturados nos meses mais quentes.

Foi detectado a presença de DNA de *Le. infantum* circulante em cinco espécies de flebotomíneos (*Ev. cortelezzii*, *Ev. evandroi*, *Lu. longipalpis*, *Ev. lenti* e *Ev. termitophila*); demonstrando a permissividade destes flebotomíneos a infecção por *Le. infantum*, indicando a importância de novos estudos para esclarecimento do real papel de suas competências vetoriais na transmissão da doença.

A taxa de positividade canina de 12%, bem como a prevalência canina de 5,3% foram substancialmente elevadas para um município onde a transmissão de LV é considerada esporádica, confirmando o cão doméstico como um importante elo no ciclo de transmissão da doença no município.

A técnica de PCR foi mais sensível que as demais técnicas utilizadas, apresentando taxas de positividade entre 93% a 98%, considerando os quatro tecidos analisados.

Entre as técnicas de diagnóstico parasitológico, observamos que a mielocultura apresentou melhores resultados que o diagnóstico por lâminas.

Os testes parasitológicos e/ou moleculares empregados no diagnóstico da LVC confirmaram em sua totalidade, todos os exames sorológicos realizados anteriormente no serviço de rotina (DPP e ELISA), conforme preconizados pelo PCLV.

Podemos apontar como área de risco os bairros Chácara do Quitão, Três Marias, Nogueirinha e Cidade Leonane, já que apresentaram elevadas taxas de

prevalência canina, elevada densidade de *Lu. longipalpis*, e presença de flebotomíneos naturalmente infectados.

A análise espacial demonstrou que a LVC e LVH e flebotomíneos encontram-se dispersos por todo o município de Itaúna. Esses elementos favorecem a transmissão de LV no município, necessitando que as medidas de controle sejam intensificadas, evitando o agravamento da doença em Itaúna.

9 REFERÊNCIAS

ABASS, E. *et al.* rKLO8, a novel *Leishmania donovani*-derived recombinant immunodominant protein for sensitive detection of visceral leishmaniasis in Sudan. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 7, p. e2322, 2013.

ABASS, E. *et al.* Heterogeneity of *Leishmania donovani* parasites complicates diagnosis of visceral leishmaniasis: comparison of different serological tests in three endemic regions. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0116408, 2015.

ABDALLAH, K. A. *et al.* Evaluation of the direct agglutination test based on freeze-dried *Leishmania donovani* promastigotes for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Sudanese patients. **Trop Med Int Health**, v. 9, n. 10, p. 1127-1131, 2004.

ADLER, S.; THEODOR, O. Investigations on Mediterranean kala-azar. II- *Leishmania infantum*. **Proc R Soc Lond**, v. 108, p. 453-502, 1931.

ADLER, S.; THEODOR, O. Transmission of disease agents by phlebotomine sandflies. **Annual Review of Entomology**, v. 2, p. 203-226, 1957.

AFONSO, M. M. D. S. *et al.* Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. **J Trop Med**, v. 2012, 858657, 2012.

AGUIAR, G. M. *et al.* Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. IV. Frequência mensal em armadilhas luminosas (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 80, p. 465-482, 1985.

AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição e habitats: distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: Rangel EF, Lainson R. (org.). **Flebotomíneos do Brasil**, ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, cap. 3. p. 207-55, 2003.

AKMAN, L. *et al.* Multi-Site DNA Polymorphism Analyses of *Leishmania* Isolates Define their Genotypes Predicting Clinical Epidemiology of Leishmaniasis in a Specific Region. **J Eukaryotic Microbiol**, v. 47, n. 6, p. 545-554, 2000.

ALENCAR, J. E. Leishmaniose visceral no Brasil. **Revista Med Un Fed Ceará**, n.17-18, p.129-148, 1978.

ALENCAR, J. E. **Calazar canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil**. 1959. Tese. Imprensa Oficial, p. 342, 1959.

ALEXANDER, B.; USMA, M.C. Potential source of sugar for the phlebotomine sand fly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 88, p. 543-49, 1994.

ALEXANDER, B. *et al.* Susceptibility to chemical insecticides of two Brazilian populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Trop Med Int Health**, v. 14, n. 10, p. 1272-1277, 2009.

ALEXANDER, J. B. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. **J Med Entomol**, v. 24, p. 552–558, 1987.

AL-JURAYYAN, N. A. *et al.* The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. **J Trop Pediatr**, v. 41, n. 3, p. 143-48, 1995.

ALMEIDA, P. S. *et al.* Geographic distribution of Phlebotomine sandfly species (Diptera: Psychodidae) in central west Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 551-559, 2015.

ALMEIDA, A. B. P. F. *et al.* Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Rev Soc Bras Med Trop**, p. 156-159, 2009.

ALVAR, J. *et al.* WHO. Leishmaniasis control team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS**, v. 1, n. 7, e35671, 2012.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol**, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.

ALVAR, J. *et al.* The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clin Microbiol**, v. 21, n. 2, p. 334-59, 2008.

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniose canina. **Adv Parasitol**, 57 p. 1 – 88, 2004.

ALVARENGA, D. G. *et al.* Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Rev Soc Bras Med Trop**, Brasília, v. 43, p. 194-197, 2010.

ALVES, G. B. B. *et al.* Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 3, p. 310-315, 2010.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos; o caso da epidemia em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil 1993-1997. **Cad Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

AMBROISE-THOMAS, P. Emerging parasites zoonosis: the role of host-parasite relationships. **Int J Parasitol**, v. 30, p. 1361-67, 2000.

AMÓRA, S. S. A. *et al.* Control of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) leishmaniasis vectors. **Neotrop Entomol**, Londrina, v. 38, n. 3, p. 303-310, 2009.

AMORIM, C. F. *et al.* Levantamento de flebotomíneos às margens do Rio Mossoró no nordeste do Brasil. **Rev Baiana de Saúde Pública**, v. 39, n. 3, p. 584-597, 2015.

ANDRADE, H. M. *et al.* *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* is not vertically transmitted in dogs. **Vet Parasitol**, v. 103, n. 1-2, p. 71-81, 2002.

ANDREANI, G. *et al.* *Leishmania infantum* amastigotes trigger a subpopulation of human B cells with an immunoregulatory phenotype. **PLoS Negl Trop Dis**, São Francisco, v. 9, n. 2, e0003543, 2015.

ANTINORI, S. *et al.* Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV - infected and HIV - uninfected patients: a single-center, 8 - year experience in Italy and review of the literature. **Clin infec dis**, v. 44, n. 12, p. 1602-10, 2007.

ARAUJO, V. E. M. *et al.* Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: A spatial analysis in urban área. **Plos Negl Trop Dis**, v. 7, n. 11, e2540, 2013.

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin Dermatol**, v. 14, p. 523-532, 1996.

ASHFORD, R. W. What it takes to be a reservoir host. **Bel J Zoo**, v. 127, p. 85– 90, 1997.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**, v. 30, p. 1269- 81, 2000.

ASSIS, T. S. M. *et al.* Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 17, n. 2, p. 107-116, 2008.

ASSIS, T. S. M. *et al.* Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, n. 2, p. 81-85, 2011.

AZEVEDO, A. C. R. *et al.* Studies on the sandfly fauna of Samuel Ecological Station, Porto Velho Municipality, Rondônia State, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 509-512, 1993.

BADARÓ, R.; DUARTE, M.I.S. **Leishmaniose visceral (calazar)**. In: Veronese R, Focacci R. Tratado de Infectologia. (v. 2). São Paulo: Atheneu, p. 1234-59, 1996.

BADARÓ, R. *et al.* Estudo longitudinal soro epidemiológico de leishmaniose visceral americana (LVA) em área endêmica de Jacobina-BA. In: **Reunião Anual sobre Doenças de Chagas**, 10, Caxambu, 1983.

BADARÓ, R. *et al.* New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 154, p. 1003-1011, 1986.

BANETH, G. *et al.* Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol**, v. 24, n. 7, p. 324-30, 2008.

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. **Leishmaniasis**. In: Green CE, ed. Infectious Diseases of the Dog and the Cat. Fourth. St. Louis, Missouri, USA: Elsevier. p. 734-749, 2012.

BANETH, G. **Leishmaniasis**. In: Greene, CE. Infectious diseases of the dog and cat. 3. Ed. Canada: Saunders Elsevier, Cap. 73, p. 685-689, 2006.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 10, p.1097–1106, 2007.

BARATA, R. A. *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. **Biomed Res Int**, v. 2013, id. 405083, 2013.

BARATA, R. A. *et al.* Controle da leishmaniose visceral no município de Porteirinha, Estado de Minas Gerais, no período de 1998 a 2003. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. (3), p. 386-88, 2011.

BARATA, R. A. *et al.* Phlebotomines sand flies in Porteirinha, an endemic área of American visceral leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 481-87, 2004.

BARATA, R. A. *et al.* Aspects of the ecology and behaviour of phlebotomines in endemic area for visceral leishmaniasis in state of Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, p 421-425, 2005.

BARBOZA, D. C. P. M. *et al.* Estudo de coorte em áreas de risco para Leishmaniose visceral canina, em municípios da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. **Rev Bras Saúde Prod An**, v. 7, n. 2, p. 152- 163, 2006.

BARBOSA, D. S *et al.* Spatial analysis for identification of priority areas for surveillance and control in a visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. **Acta trop**, v. 131, p. 56-62, 2014.

BARROUIN-MELO, S. M. *et al.* Comparação entre aspiração esplênica e linfonodal como métodos de amostragem para a detecção parasitológica da infecção por *Leishmania chagasi* em cães. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 195 – 197, 2004.

BARROUIN-MELO, S. M. *et al.* Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysintomatic animals. **The Vet Jour**, v. 171, p. 331-339, 2006.

BASIMIKE, M.; MUTINGA, M. J.; KUMAR, R. Distribution of sandflies (Diptera: Psychodidae) in three vegetation habitats in the Marigat area, Baringo district, Kenya. **J Med Entomol**, v. 28, p. 330-333, 1991.

BASTIEN, P.; PROCOP, G. W.; REISCHL, U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 6, p. 1897-1900, 2008.

BEATI, L. *et al.* Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. **Int J Parasitol**, New York, v. 34, n. 2, p. 225-234, 2004.

BELO, V. S. *et al.* Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 4, e2182, 2013.

BEVILACQUA, P. D. *et al.* Urbanization of visceral leishmaniose in Belo Horizonte, Brazil. **Arq Bras Med Vet Zoo**; v. 53, n. 1, p. 1-8, 2001.

BOELAERT, M. *et al.* Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 102, p. 32-40, 2008.

BOGGIATTO, P. M. *et al.* Transplacental transmission of leishmania infantum as a means for continued disease incidence in north america. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. (4), e1019, 2011.

BONGIORNO, G. *et al.* Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. **Acta Trop**, v. 88, p.109-16, 2003.

BORASCHI, C. S. S.; NUNES, C. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Clín Vet**, v. 71, p. 44-8, 2007.

BORJA-CABRERA, G. P. *et al.* Long-lasting protection against canine kala-azar using the FML-Quil A saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**, v. 20, p. 3277-84, 2002.

BORGE, B. K. A. *et al.* Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Cad Saúde Pública**, v. 24, n. 4, 2008.

BRAGA, M. D. M. *et al.* Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imunoenzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 315, n. 5, p. 419-424, 1998.

BRANCO, S. I. M. **Estudo dos flebótomos (Diptera, Phlebotominae), vectores de Leishmania sp. no Concelho de Torres Novas, Portugal**. 2011 [Dissertação de Mestrado] Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>. Acesso em 22 de novembro de 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvmg.def>. Acesso em 05 de janeiro de 2019.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde; 5^o reimpressão, 2014.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Manual de Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV**. 1^aEd. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de controle da leishmaniose visceral: série A: normas e manuais técnicos**. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Subcoordenação de Zoonoses Vetoriais e Raiva. Nota técnica n. 48/2011-UVR/CGDT/DEVEP/SVS/MS. **Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde** Brasília: Ministério da Saúde; 2011. [acesso em 25 jan. 2013]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_48_2011_diagnostico_lvc_19_9_2011.pdf.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Coordenação de fiscalização de produtos veterinários**. Nota Técnica nº11/2016/CPV/DFIP/DAS/GM/MAPA, Ministério da Saúde. 2016. [acesso em 07/02/2017] Disponível em: <http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>

BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV**. Brasília, DF, 2011a.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução de letalidade**. Departamento de Vigilância Epidemiológica./ Secretaria de Vigilância em Saúd. Ministério da Saúde. Brasília-DF; 80p, 2011 b.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota técnica conjunta nº 01/2011. CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS-MS, Brasília, 3 p., 2011 c.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Regulamento técnico para pesquisa, desenvolvimento, produção, avaliação, registro e renovação de licenças, comercialização e uso de vacina contra a leishmaniose visceral canina**. Brasília: MAPA; 2007.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. atualizada. Brasília: Ed.MS, 180 p, 2007 b.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota de esclarecimento sobre as vacinas antileishmaniose visceral canina registradas no MAPA**. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota técnica vacina antileishmaniose visceral canina Leishmune®**. Brasília; Ministério da Saúde; 2005.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. **Biologia de Flebotomíneos neotropicais**. In: Rangel EF, Lainson R, editors. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 257-274, 2003.

BRAZUNA, J. C. M. **Estudos sobre leishmaniose visceral humana e canina no município de Campo Grande, MS, Brasil**. 2012. 118 f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012.

BRIANTI, E. *et al.* Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%)/flumethrin (4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniosis. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 1–10, 2014.

BRIANTI, E. *et al.* Field Evaluation of Two Different Treatment Approaches and Their Ability to Control Fleas and Prevent Canine Leishmaniosis in a Highly Endemic Area. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, p. 1–13, 2016.

BRITO, V. N. *et al.* Phlebotomine fauna, natural infection rate and feeding habits of *Lutzomyia cruzi* in Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil. **Mem Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 899-904, 2014.

BRITO, M. G.; CHAMONE, T. L. Manual de condutas básicas na campanha de vacinação anti-rábica animal. Belo Horizonte: **Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais**, p.16, 2001.

BROWN, M.; WITTEWER, C. Flow cytometry: principles and clinical applications in Hematology. **Clin Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1221-29, 2000.

BURNS-JR, J. M. *et al.* Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc Natl Acad Sci**, v. 90, p. 775–779, 1993.

CABRAL, M.; O' GRADI, J. E.; ALEXANDER, J. In: Demonstration of *Leishmania* Specific Cell Mediated and Humoral Immunity in Assymptomatic Dogs. **Parasite Immunol**, v. 14, p. 531-539, 1992.

CABRERA, M. A. A. **Ciclo enzoótico da transmissão da *Leishmania (Leishmania) chagasi* CUNHA & CHAGAS, 1937 no ecótopo peridoméstico em Barra de guaratiba, Rio de Janeiro, RJ: Estudo de possíveis variáveis preditoras**. Tese (Magister Scientiae), Escola de saúde publica, Fundação Oswaldo cruz, Rio de Janeiro, p.90,1999.

CABRERA, M. A. A. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Rev Inst Med Trop**, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.

- CALDAS, A. J. M. *et al.* Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in North-East Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 96, n. 1, p. 21-28, 2002.
- CAMERON, M. M. *et al.* Sugar meal sources for the phlebotomine sandflies *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil. **Med Vet Entomology**, v. 9, p. 263-72, 1995.
- CARDENAS, R. *et al.* Impact of climate variability in the occurrence of leishmaniasis in Northeastern Colombia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 75, p. 273–277, 2006.
- CARDIM, M. F. M. *et al.* Introduction and expansion of human American visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil, 1999-2011. **Rev Saude Publica**, v. 47, n. 4, p. 691-700, 2013.
- CARVALHO, M. R. *et al.* Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Trop**, v. 116, p. 108-110, 2010.
- CARVALHO, M. S. M.; SOUZA-SANTOS, R. Análises de dados especiais em saúde pública: métodos, problemas, perspectivas. **Card Saúde Púb**, v. 21, p. 361-78, 2005.
- CASANOVA, C. *et al.* Larval breeding sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in visceral leishmaniasis endemic urban areas in southeastern Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 9, e2443, 2013.
- CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **VetLearn**, v. 25, p. 358-368, 2003.
- CIARAMELLA, P. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet Rec**, v.141, p.539- 543, 1997.
- CHANLOTIS, B. N. *et al.* Natural populations dynamics of phlebotomine sandflies in Panamá. **J Med Ent**, v. 8, p. 339-52, 1971.
- CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 11, p. 873-82, 2007.
- CHAPPUIS, F. *et al.* Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and an rK39-antigen-based dipstick test for the diagnosis of suspected kala-azar in Nepal. **Trop Med Int Health**, v. 8, n. 3, p. 277-285, 2003.
- CHOI, C.M. & LERNER, E.A. Leishmaniasis as an Emerging Infection. **J Investig Dermatol Symp Proc**, v. 6, p. 175-182, 2001.
- CLEMENTS, A. **The biology of mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction.** v. 1, p. 532, 1992.

COELHO, E. A. *et al.* Immune response induced by the Leishmania (Leishmania) donovani A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental Leishmania (Leishmania) amazonensis infection. **Infect Imm**, v. 71, p. 3988- 3994, 2003.

COMER, J. A.; BROWN, J. Use of hollow trees as diurnal resting shelter by *Lutzomyia shannoni* (Diptera, Psychodidae) on Ossabaw island, Georgia. **Env Entomol**; v. 20, p. 613-17, 1993.

CORTES, S. *et al.* Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. **Vet Parasitol**, v. 189, n. 2, p. 189-196, 2012.

CORREDOR, A. *et al.* *Didelphis marsupialis*: an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 83, p. 195, 1989.

COSTA, P. L. *et al.* Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. **Acta Trop**, v. 126, p. 99 -102, 2013.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001.

COSTA, D. N. C. C. *et al.* Culling Dogs in Scenarios of Imperfect Control: Realistic Impact on the Prevalence of Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v.7, e2355, 2013.

COSTA, C. H. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics, and ethics behind this public health policy. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, p. 232-242, 2011.

COSTA, K. F. L. *et al.* Awareness of visceral leishmaniasis and its relationship to canine infection in riverside endemic areas in northeastern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 5, 2014.

COSTA, C. H. N. *et al.* Kala-azar is a slow-motion systemic inflammatory response syndrome: lessons from death. In: **International Congress of Immunology**, 13, Aug. 21-25, Rio de Janeiro, Brazil, 2007.

COSTA, A. C. *et al.* Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 24, p. 21-25, 1991.

COSTA, C. H.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Rev Saúde Pública**, v. 24, p. 361-72, 1990.

COSTA, C. H. N. *et al.* Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil? **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 93, p. 464, 1999.

COUTINHO, M. T. *et al.* Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol**, v. 128, p. 149-155, 2005.

COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Vet Parasitol**, Berlin-DE, v. 147, p. 320–325, 2007.

COURTENAY, O. *et al.* Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. **Parasitol**, v.125, p. 407- 414, 2002.

COQUILLET, D. W. Discovery of blood sucking Psychodidae in America. **Entomol News**, v. 18, p. 101-2, 1907.

COTTON, J. A. The expanding world of human leishmaniasis. **Trends Parasitol**, v. 33, n. 5, p. 341-344, 2017.

COURA-VITAL, W. *et al.* Prevalence and Factors Associated with *Leishmania infantum* Infection of Dogs from an Urban Area of Brazil as Identified by Molecular Methods. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 8, e1291, 2011.

COURTENAY, O. *et al.* Deltamethrin-impregnated bednets reduce human landing rates of sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* in amazon households. **Med Vet Entomol**, Oxford; v. 21, n. 2, p. 168-176, 2007.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem (nota prévia). **Hospital**, v.11, p. 5-9, 1937.

CUTOLO, A. A. *et al.* Sandflies (Diptera: Psychodidae) associated with opossum nests at urban sites in southeastern Brazil: A risk factor for urban and periurban zoonotic *Leishmania* transmission? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.109, p. 391–393, 2014.

CRUZ, I. *et al.* *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. **Indian J Med Res**, v. 123, n. 3, p. 357-88, 2006.

CRUZ, I. *et al.* A nested polymerase chain reaction (Ln- PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in coinfecting patients with human immunodeficiency virus. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 96, p. 185-89, 2002.

CUPOLILLO, E.; BOITÉ, M. C.; PORROZZI, R. Considerações Sobre a Taxonomia do Gênero *Leishmania*. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C.R. (org.). **Leishmanioses do Continente Americano**. 22. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, v. 2. p. 39-51, 2014.

CUPOLILLO, E. *et al.* A Revised Classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasit Today**, v. 16, p. 142-144, 2000.

DA COSTA-VAL, A. P. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Vet J**, v. 174, n. 3, p. 636-643, 2007.

DA COSTA, R. T. *et al.* Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans R Soc. Trop Med Hyg**, v. 97, n. 6, p. 678-82, 2003.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151-156, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Leishmune® vaccine : The newest tool for prevention and control of canine leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. **Vet Parasitol**, v. 141, p. 1-8, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Expansão Geográfica da Leishmaniose Visceral no Estado de Pernambuco. **Ver Soc Bras Med Trop**, v. 39, p. 352-356, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Canine Leishmaniasis in South América. **Parasit Vectors**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2009.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Efficacy of an imidacloprid / flumethrin collar against fleas, ticks and tick-borne pathogens in dogs. **Parasit Vectors**, v. 6, p. 245, 2013.

DAVID, J. R. *et al.* Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 839-47, 2001.

DAVIES, C. R. *et al.* The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. **Cad Saúde Pública**, v. 16, n. 4, p. 925-950, 2000.

DE RUITER, C. *et al.* Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 9, p. 3147-3155, 2014.

DE VRIES, H. J.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. **Am J Clin Dermatol**, v. 16, n. 2, p. 99-109, 2015.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, v. 4, p. 198-212, 1962.

DEANE, L.M. **Leishmaniose visceral no Brasil. Estudo sobre reservatórios e transmissores no Estado do Ceará.** [Tese], 1956. Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1956.

DEANE. L. M.; DEANE, M. P. Encontro de cães naturalmente infectados pela leishmânia donovani, no Ceará. **Hospital**, v. 45, p. 703-07, 1954a.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmânias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **Hospital**, v. 45, p. 419-21, 1954b.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P.; ALENCAR, J. E. Tipo de região e prevalência de leishmaniose visceral em uma região endêmica do Ceará. **Rev Paul Med**, v. 46, p. 130-31, 1955.

DEDET, J. P.; VIGNES, R.; RANGEL, E. F. **Morfologia e taxonomia**: grupo CIPA. In: Rangel EF, Lainson R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, v. 2, p. 177-184, 2003.

DEGRAVE, W. *et al.* Use of molecular probes and PCR for detection typing of Leishmania: a mini review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 463-69, 1994.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, J. S. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1455, p. 341-52, 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-18, 2004.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, v. 95, p. 239–243, 2001.

DIAS, E. S. *et al.* Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. (1), p.49–52, 2007.

DIAS, F. O. P.; LOROSA, E.S.; REBÊLO, J.M.M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *L. longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cad Saúde Pública**, v.19, n. 5, p. 1373-1380, 2003.

DIAS-SVERSUTTI, A. C. *et al.* Preliminary study on feeding preference of *Nyssomyia neivai* (Pinto) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) in a rural area of the State of Paraná, South Brazil. **Neotrop Entomol**, v. 36, n. 6, p. 953-9, 2007.

DIETZE, R. Diagnóstico sorológico e parasitológico da leishmaniose visceral: consulta de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas. Rio de Janeiro: **Organización Panamericana de la Salud**, p. 63-65, 2005.

DINESH, D. S. *et al.* Emergence periodicity of *Phlebotomus argentipes* Annandale and brunette (Diptera: Psychodidae): A laboratory study. **J Parasit Dis**, v.33, n.1, p.23-27, 2009.

DISH, J. *et al.* Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnostics of human infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 97, p. 1-5, 2003.

DOBSON, D. E. *et al.* Leishmania major survival in selective Phlebotomus papatasi sand fly vector requires a specific scg-encoded lipophosphoglycan galactosylation pattern. **PLoS Pathog**, San Francisco, v. 6, n. 11, 2010.

DOHA S. *et al.* Dispersal of Phlebotomus-papatasi (Scopoli) and Phlebotomus-Langerona Nitzulescu in El-Hammam, Matrouh governorate Egypt. **Ann Parasitol Hum Comp**, v. 66, p. 69–76, 1991.

DRUZIAN, A.F. *et al.* factors for death from visceral leishmaniasis in an urban area of Brazil. **PLOS Negl Trop Dis**, San Francisco, v. 9, p. 1-11, 2015.

DYE, C.; WILLIAMS, B. Malnutrition, age and the risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited. **Proced R So Lon B**, v. 254, p. 33-39, 1993.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **Am J Trop Med Hyg**, v. 55, n.2, p.125-30, 1996.

EGUCHI, G.U. *et al.* Ceratoconjuntivite nodular em um caso de leishmaniose visceral canina: relato de caso. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.69, n.6, p.1480-1484, 2017.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa): quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v.8, p. 871-74, 1971.

EL HARITH, A. *et al.* A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, London; v. 80, p.583-587, 1986.

ELMAHALLAWY, E. *et al.* Diagnostico de leishmaniose. **J Infect Dev Ctries**, v.8, p. 961-972, 2014.

ELKHOORY, A. N. S. M. Vigilancia e Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. In: Consulta de expertos OPS/OMS sobre leishmaniose visceral em las Américas, **Organización Panamericana de la Salud**, Rio de Janeiro; p.24-26, 2005.

FALCÃO DE OLIVEIRA, E. *et al.* Experimental infection and transmission of Leishmania by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 2, e5401, 2017.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. DE. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Rev Pan-Amazônica Saúde**, v. 3, p. 47–57, 2012.

FAYET, G. Canine leishmaniasis in Europe; Part 2: Pathogenesis – Clinical signs – Diagnosis, **Mer Biol Technical Bulletin**, 1999.

FELICIANGELI, M. D. *et al.* Sandfly control trial with deltamethrin impregnated curtains in El Ingenio, Miranda State, Venezuela. **B Dir Marlariol San Amb**, v. 35, n. 1, p. 127-32, 1995.

FELICIANGELI, M. D. Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in the northern Venezuela. IV - Sandfly monthly fluctuation and leishmaniasis incidence relationship. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 177-79, 1987.

FEITOSA, M. M. *et al.* Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Rev Clínica Vet**, v. 5, n. 28, p. 36-43, 2000.

FERNANDES, A. P. *et al.* Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, p. 5888-5895, 2008.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Canine Leishmaniasis: Na update. **Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum**, Barcelona, p. 6-10, 1999.

FERREIRA, E.C. *et al.* Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in areas endemic for leishmaniasis. **Mem Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 895-898, 2010.

FORATTINI, O. P. Nota sobre criadouros naturais de flebotomos em dependências peridomiciliares no Estado de São Paulo. **Arq Fac Hig S Públ Univ**, São Paulo, v. 7, p. 158-67, 1953.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, p. 658, 1973.

FORATTINI, O. P. *et al.* Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado de São Paulo. **Brasil Rev Saúde Públ**, v. 6, n. 3, p. 255-61, 1972.

FORATTINI, O. P. Novas observações sobre a biologia de flebotomos em condições naturais (Diptera, Psychodidae). **Arq Hig Saúde Públ**, v. 25, p. 209-15, 1960

FRANÇA-SILVA, J. C. **Estudo retrospectivo da prevalência e da incidência da Leishmaniose Visceral Canina na cidade de Porteirinha, Minas Gerais, Brasil**. 2003, [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

FRANÇA-SILVA, J. C. *et al.* Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic área of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 111, p. 161-173, 2003.

FRANÇA-SILVA JC, *et al.* Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 131, p. 213-220, 2005.

FRANCINO, O. *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, v. 137, n. 3-4, p. 214-221, 2006.

FRANKE, C. R. *et al.* Impact of the El Niño/Southern Oscillation on Visceral Leishmaniasis, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 8, p. 914-917, 2002.

FREITAS, V. C. *et al.* Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in its natural sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, n. 4, p. 606-612, 2012.

FREITAS, J. C. *et al.* Alterações clínicas e laboratoriais em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 1, p. 24-29, 2012.

GALATI, E. A. B. **Morfologia e taxonomia**: classificação de *Phlebotominae*. In: Rangel EF, Lainson R. (Org.). Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; cap. 2, p. 23-52, 2003.

GALATI, E. A. B. *et al.* Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev de Saúde Públ**, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.

GALATI, E. A. B. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) with emphasis on American groups. **Boletín de la Dirección de Malariología y Ambiental**, v. 35, n. 1, p. 133-142. 1995.

GALIMBERTTI, M. Z. *et al.* Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 32, n. 1, p. 217-218, 1999.

GALVIS-OVALLOS, F. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite**, v. 24, n. 2, p. 10, 2017.

GAVGANI, A. S. M. *et al.* Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomized trial. **The Lancet**, v. 360, p. 374-79, 2002.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral americana**. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM. Parasitologia humana. São Paulo: Atheneu; p. 56-72, 2000.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. 1993. [Tese]. Belo Horizonte: Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG; 1993.

GOMES, A. C. Sand fly vectorial ecology in the State of São Paulo. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 457-460, 1994.

GOMES, A.C.; GALATI, E. A. B. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana: capacidade vetorial flebotomínea em ambiente florestal primário do Sistema da Serra do Mar, região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Rev Saúde Públ**, v. 23, p. 136-142, 1989.

GOMES, A. H. *et al.* PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. **Vet Parasitol**, v.144, n 3-4, p. 234-241, 2007.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, N. M. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GONZÁLEZ, U. *et al.* Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. **Cochrane Database Syst Rev**, Oxford; v. 5, n. 8, 2015.

GONZÁLEZ, C. *et al.* Climate change and risk of leishmaniasis in North America: Predictions from ecological niche models of vector and reservoir species. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 1, e585, 2010.

GORDON, R. & CREWE, W. The mechanisms by which mosquitoes and tsetse-flies obtain their blood-meal, the histology of the lesions produced, and the subsequent reactions of the mammalian host; together with some observations on the feeding of *Chrysops* and *Cimex*. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 42, p. 335-356, 1952.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **Int J Parasitol**, v. 33, n. 10, p.1027-1034, 2003.

GRADONI, L. Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. **Vet Parasitol**, v. 208, p. 94–100, 2015.

GRIMALDI, J. G.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of geographical distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am J Trop Med Hyg**, v. 41, p. 687-725, 1989.

GRIMALDI, J. R. *et al.* Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP(R) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 106, n. 1, p. 54-59, 2012.

GUIMARÃES, V. C. F. V. *et al.* *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. **Parasites and Vectors**, v. 9, p. 159, 2016.

GUIMARÃES, M. C.; CELESTE, B. J.; FRANCO, E. L. Diagnostic performance indices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis sera from northern and northeastern Brazil. **Bull World Health Organ**; v. 68, p. 39-43, 1990.

GUERIN, P.J. *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002.

GUERBOUJ, S. *et al.* Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure? **Parasitol**, v. 122, n. 1, p. 25-35, 2001.

GURUMURTHY, S. *et al.* Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. **Parasitol Res**, v. 110, p. 1065- 1078, 2012.

HARHAY, M. O. *et al.* Urban Parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol**, v. 27, n. 9, p. 403-9, 2011.

HERMONT, V. J. **Leish-tec: vacina recombinante contra leishmaniose visceral canina**: manual técnico. 1. ed. Juatuba: Hertap Calier Saúde Animal; 2008. Acesso em 12 dez. 2013. Disponível em: <http://www.hertapecalier.com.br/images/arqConteudo/4900aabb8f1dc.pdf>.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, p. 1191-1199, 1999.

HOMMEL, M. *et al.* Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 89, p. 55-73, 1995.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas). **Itaúna**. Minas Gerais, Brasil; 2016. [capturado 20 dez. 2016]. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=313380>.

IKONOMOPOULOS, J. *et al.* Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Vet Parasitol**, v. 113, n. 2, p. 99-113, 2003.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **J Immunol Methods**, v. 422, p. 1–12, 2015.

JONES, T. M.; QUINNELL, R. J. Testing predictions for the evolution of lekking in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **Anim Behav**, v. 63, p. 605–612, 2002.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 604-615, 2011.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends Parasitol**, v. 22, n. 9, 2006.

KAMHAWI, S. *et al.* The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. **Parasitol**, v. 121, n. 1, p. 25-33, 2000.

KAMHAWI, S.; ABDEL-HAFEZ, S. K.; MOLYNEUX, D. H. The behaviour and dispersal of sandflies 129 in Ras el Naqb, south Jordan with particular emphasis on *Phlebotomus kazeruni*. **Parasitol**,; v. 33, p. 307–314, 1991.

KARKAMO, V. *et al.* The first report of autochthonous non-vector-borne transmission of canine leishmaniosis in the Nordic countries. **Acta Vet Scan**, v. 56, n. 84, 2014.

KATO, H. *et al.* Establishment of a mass screening method of sand fly vectors for *Leishmania* infection by molecular biological methods. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. 2, p. 324-9, 2007.

- KASSEM, H. A. *et al.* Environmental factors underlying spatial patterns of sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with leishmaniasis in southern Sinai, Egypt. **Acta Trop**, Basel, v. 67, n. 2, p. 1-8, 2012.
- KELLY, D. W.; DYE, C. Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Anim Behav**, v. 53, n. 4, p. 721-31, 1997.
- KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of *Leishmaniasis*: a review. **Med Vet Entomol**, v. 4, p. 1-24, 1990.
- KILLICK-KENDRICK, R. *et al.* Protection of dogs from bites of phlebotomus sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Med Vet Entomol**, v. 11, p. 15-21, 1997.
- KILLICK-KENDRICK, R.; RIOUX, J. A. Intravectorial cycle of *Leishmania* in the sandflies. **Ann Parasitol Hum Comp**, v. 66, n. 1, p. 71-74, 1991.
- KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin Dermatol**, v. 17, n. 3, p. 279-89, 1999.
- KONTOS, V. J.; KOUTINAS, A.F. Old world canine leishmaniasis, **Compendium**, v. 15, p. 949- 959, 1993.
- KRAUSPENHAR, C. *et al.* Visceral leishmaniasis in a dog in Cruz Alta, Rio Grande do Sul, south Brazil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 907-910, 2007.
- KUHLS, K. *et al.* Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. **Microbes Infect**, v. 9, n. 3, p. 334-343, 2007.
- KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Front Immunol**, v. 3, p. 251, 2012.
- KUMAR, R. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 8, p. 1220-24, 2001.
- LACERDA, M. M. The Brazilian leishmaniasis control program. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.89, p. 489-495, 1994.
- LACHAUD, L. *et al.* Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. **Parasitology**, v. 125, n. 3, p. 197-207, 2002.
- LAINSON, R. & RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–27, 2005.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. **New World leishmaniasis**. In: Cox, F. E. G. *et al.* Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Parasitology. 10. ed. London: Hodder Arnold ASM Press; p. 313-49, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographic distribution. W Peters, R Killick-Kendrick editors, *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. **Academic Press**, London; p. 1-120, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **Leishmaniose do Novo Mundo**. As espécies neotropicais de *Leishmania*. In: Collier, L.; Balows, A.; Sussman, M. (eds), *Microbiologia de Topley & Wilson e Infecções Microbianas*, vol. 5, Parasitologia. Arnold, Londres, p. 241-266, 1998.

LAINSON, R. *et al.* A *Leishmania* e as leishmanioses. In: Lainson R, organizador. Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. v. I. Serviços de saúde pública. Belém: **Inst Evandro Chagas**, p. 83-124, 1986.

LAINSON, R. *et al.* Amazonian visceral leishmaniasis: distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 235-37, 1990.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden WHR; Evans DA. *Biology of the Kinetoplastida*. London and New York: **Academic Press**, v.2, p.1–116, 1979.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; LINS, Z. C. Leishmaniasis in Brazil. IV. The fox, *Cerdocyon thous* as a reservoir of *Leishmania donovani* in Pará State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 63, p. 741-45, 1969.

LAINSON, R. *et al.* Leishmaniasis in Brazil. XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 79, p. 223-26, 1985.

LANA, R. S. *et al.* Phlebotomine Sand Fly Fauna and *Leishmania* Infection in the Vicinity of the Serra do Cipó National Park, a Natural Brazilian Heritage Site. **Biomed Res Int**, p. 1–9, 2015.

LANA, R. S. *et al.* Ecoepidemiological aspects of visceral leishmaniasis in an endemic area in the Steel Valley in Brazil: An ecological approach with spatial analysis. **PLoS One**, v. 30, n. 13(10), e0206452, 2018.

LANGERON, M. **Précis de microscopie**. Masson et Cie, Libraires de L'Académie de Medicine, Saint-Germain, Paris, v. 1, 1949.

LANOTTE, G. *et al.* Écologie des leishmanioses dans le Sur de la France: les formes évolutives de la leishmaniose visceral canine. Élaboration d'une typologie bio-clinic à finalité épidémiologique. **Ann Parasit**, v. 54, p. 277-95, 1979.

LARA-SILVA, F. O. *et al.* Evaluation of chemical spraying and environmental management efficacy in areas with minor previous application of integrated control actions for visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Trop**, v. 176, p. 109-113, 2017.

LARA-SILVA, F. O. *et al.* Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Trop**, v. 148, p. 128-136, 2015.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Bepa**, v. 6, p. 13-23, 2009.

LEAL, G. G. A. *et al.* Risk profile for *Leishmania* infection in dogs coming from an area of visceral leishmaniasis reemergence. **Prev Vet Med**, v. 1, n. 150, p 1-7, 2018.

LEÃO, R. N. Q. Doenças infecciosas e parasitárias, enfoque amazônico. Belém: **Cepuj**; p. 885, 1997.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annu Rev Entomol**, v. 42, p. 525–550, 1997.

LEVINE, N. D. *et al.* A newly revised classification of the Protozoa. **J Protozool**, v. 27, p. 37–58, 1980.

LIMA-COSTA, C. R. *et al.* Genetic structuring and fixed polymorphisms in the gene period among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil. **Parasit Vectors**, v. 8, n. 193, 2015.

LINS, R. M. *et al.* Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. **Insect Mol Biol**, v. 11, n. 2, p. 117-22, 2002.

LIRA, R. A. *et al.* Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Vet Parasitol**, v. 137, n. 1-2, p. 11–16, 2006.

LOIOLA, C. F.; SILVA, D. A.; GALATI, E. A. B. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) and species abundance in an area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 581-585, 2007.

LOPES, E. G. P. *et al.* Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte-MG, 1993 a 2007. **Arq Bras Med Vet e Zootec**, v. 62, p. 1062–1071, 2010.

LOPES, J. V. *et al.* Seroprevalence and molecular characterization of *Leishmania* in dogs from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis in Brazil. **Int J Vet Sci Med**, v. 22, n. 5, p. 70-74, 2017.

LUCIENTES, J. Laboratory observations on the protection of dogs from the bites of *Phlebotomus perniciosus* with Scalibor® ProtectorBands: preliminary results. In: R. Killick-Kendrick (ed.). Canine Leishmaniasis: an update: proceedings of the International Canine leishmaniasis Forum Barcelona, Spain. Wiesbaden: **Hoechst Roussel Vet**, p. 92-94, 1999.

- LUKES, J. *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc Natl Acad Sci**, v. 104, p. 9375-80, 2007.
- LUPPI, M. M. *et al.* Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Vet Parasitol**, v. 55, n. 1-2, p. 146-51, 2008.
- LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 4, p. 84-95, 1912.
- LUZ, Z. M. P.; SCHALL, V.; RABÊLLO, A. Evaluation of a pamphlet of visceral leishmaniasis as a tool for providing disease information to healthcare professionals and laypersons. **Cad Saúde Pùb**, v. 21, n. 2, p. 606-21, 2005.
- LUZ, E. *et al.* *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania* (V.) *braziliensis* in Paraná state, Southern Brazil. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 94, p. 623-31, 2000.
- LUZ, Z. P. M. *et al.* Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 34, p. 249-254, 2001.
- MACEDO, I. T. F. *et al.* Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. **Ciência Animal**, v. 18, p. 2, 2008.
- MACHADO DE ASSIS, T. S. *et al.* Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 17, n. 2, p.105-116. 2008.
- MACHADO DE ASSIS, T. S.; RABELLO, A.; WERNECK, G. L. Latent class analysis of diagnostic test for visceral leishmaniasis in Brazil. **Trop Med Int Health**, v. 17, n. 10, p. 1202-7, 2012.
- MACIEL, B. L. *et al.* Association of nutritional status with the response to infection with *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Méd Hyg**, v. 79, n. 4, p. 591-98, 2008.
- MADEIRA, M. F. *et al.* Identification of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* Isolated from Healthy Skin of Symptomatic and Asymptomatic Dogs Seropositive for Leishmaniasis in the Municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 8, p. 440-444, 2004.
- MAGALHÃES, P. A. *et al.* Calazar na Zona do Rio Doce - Minas Gerais: resultados de medidas profiláticas. **Rev Inst Med Trop**, v. 22, p. 197-202, 1980.
- MAGNARELLI, L. A.; MODI, G. B. Caloric determination of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). **J Med Entomol**, v. 20, p. 568-69, 1988.
- MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet Parasitol**, v. 158, n. 4, p. 274-87, 2008.

MAIA, C. *et al.* Experimental Parasitology In vitro drug susceptibility of *Leishmania infantum* isolated from humans and dogs. **Exp Parasitol**, v. 135, n. 1, p. 36-41, 2013.

MAIA, Z. *et al.* Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 1, p. e1484, 2012.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S, *et al.* Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad Saúde Pùb**, v. 24, n. 12, p. 2941- 47, 2008.

MALTA, M. C., *et al.* Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in brazil. **Vet Parasitol**, v. 169, n. 1-2, p. 193-7, 2010.

MANCIANTI, F. *et al.* Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 82, n. 4, p. 566–7, 1988.

MANNA L, *et al.* *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, v. 142, n. 3-4, p. 271-280, 2006.

MANNA, L. *et al.* Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. **Vet J**, v. 182, n. 3, p. 441-445, 2009.

MANNA, L. *et al.* Comparação de diferentes amostras de tecido para diagnóstico baseado em PCR e acompanhamento da leishmaniose visceral canina. **Vet Parasitol**, v. 125, p. 251 – 262, 2004.

MANGABEIRA, F. O. Sobre duas novas especies de *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 33, n. 3, p. 349-56, 1938.

MANONMANI, M. *et al.* Species-Diagnostic Polymerase Chain Reaction Assays for *Phlebotomus argentipes* and *Phlebotomus papatasi*, Vectors of *Leishmania*. **J Med Entomol**, v. 47, n. 5, p. 743-747, 2010.

MANZILO, V. *et al.* Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. **Vet Parasitol**, v. 142, p. 142-45, 2006.

MARGONARI, C. *et al.* Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* Infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil.2010, **J Med Entomol**, v. 47, n. 6, p. 1212-1219, 2010.

MARGONARI, C. *et al.* Epidemyology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 31-38, 2006.

MAROLI, M. *et al.* Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. **J Am Vet Med Associat**, v. 236, p.11, 2010.

MARQUES, M. J. *et al.* Simple form of clinical sample preservation and Leishmania DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, n. 6, p. 902-906, 2001.

MARTINS, A. V.; SILVA, J. E.; FALCÃO, A. L. Estudo sobre os flebótomos do Estado de Minas Gerais: VIII: Descrição e duas novas espécies, *Lutzomyia hermanlenti* sp.n. e *Lutzomyia oliveirai* sp. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Rev Bras Biol**, v. 30, n. 4, p. 547-553, 1970.

MARTINS, A. V.; WILLIAMS, P.; FALCÃO, A. L. American Sandflies (Diptera): Psychodidae, Phlebotominae. Rio de Janeiro, **Acad Bras Ciências**, 195p, 1978.

MARZOCHI, M. C. A. *et al.* Leishmaniose visceral (calazar). **J Bras Med**, v. 41, n. 5, p. 61-84, 1981.

MARZOCHI, M. C. A. *et al.* Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro - Brasil. **Cad de Saúde Púb**, v. 1, n. 4, p. 432-446, 1985.

MARY, C. *et al.* Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR assay with high sensitivity. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 11, p. 5249–5255, 2004.

MATTOS JR, D. G. *et al.* Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 56, n. 1, p.119-122, 2004.

MAURICIO, I. L.; STOHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**, v. 16, p. 188-89, 2000.

MEDEIROS, A. C. R.; RODRIGUES, S. S.; ROSELINO, A. M. F. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of leishmania for the diagnosis of american cutaneous leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 4, p. 421-424, 2002.

MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Rev Bras Parasitol Vet**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 41-45, 2004.

MEMMOTT, J. Sandfly distribution and abundance in a tropical rain forest. **Med Vet Entomol**, v. 5, p. 403-11, 1991.

MENDES, C. S. *et al.* The impact of climate change on leishmaniasis in Brazil. **Cien Saude Colet**, v. 21, n. 1, p. 263–272, 2016.

MESTRE, G. L.; FONTES, C. J. The spread of the visceral leishmaniasis epidemic in the state of Mato Grosso, 1998-2005. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40 p. 42-48, 2007.

MICHALSKY, É. M. *et al.* Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Vet Parasitol**, v. 147, p. 67-76, 2007.

MICHALSKY, É. M. *et al.* Phlebotomine distribution in Janaúba, na area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104, n. 1, p. 56-61, 2009.

MICHALSKY, É. M. *et al.* Association of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) population density with climate variables in Montes Claros, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1191-93, 2009.

MICHALSKY, É. M. *et al.* Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 56-61, 2009.

MICHALSKY, É. M. *et al.* Natural infection with *Leishmania infantum chagasi* in *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sandflies captured in the municipality of Janaúba, State of Minas Gerais, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, p. 58-62, 2011.

MICHALSKY, É. M. *et al.* Assessment of PCR in the Detection of *Leishmania* spp. in Experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Rev Inst Med Trop**, v. 44, n. 5, p. 255-59, 2002.

MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. **Leishmaniose visceral americana**. In: Neves DP (ed.). *Parasitologia humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu; p. 67-83, 2005.

MILLERON, R. S. *et al.* Effects of Varying Moisture on Egg Production and Longevity of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera : Psychodidae). **J Med Entomol**, v. 45, p. 160–165, 2008.

MINODIER, P. *et al.* First-line liposomal amphotericin B for pediatric visceral leishmaniasis in southern France. **Arch Pediatr**, v. 12, n. 7, p. 1102-1108, 2005.

MINODIER, P. *et al.* Rapid identification of causative species in patients with old world leishmaniasis. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 10, p. 2551-2555, 1997.

MIRÓ, G. *et al.* Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. **Vet Dermatol**, v. 20, p. 397-404, 2009.

MISCEVIC, Z. Dependence of the flight of sandflies (Diptera, Phlebotomidae) in artificial light on the temperature and relative humidity. **Acta Vet**, v. 31, p. 32-39, 1981.

MISHRA, M. *et al.* Amphotericin versus sodium stibogluconate in first-line treatment of Indian kala-azar. **Lancet**, v. 344, n. 8937, p. 1599-1600, 1994.

MISSAWA, N. A. et al. *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* (L.) *chagasi* in Várzea Grande, Mato Grosso State, Brazil, an area of intense transmission of visceral leishmaniasis. **Cad Saúde Pública**, v. 26, n. 12, p. 2414-2419, 2010.

MISSAWA, N. A.; DIAS, E. S. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Várzea Grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 8, p. 913-918, 2007.

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Feeding preference of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in transmission area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 4, p. 365-368, 2008.

MISSAWA, N.A.; DIAS, E. S. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Várzea Grande: An area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 913–918, 2007.

MIRANDA, S. et al. Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol. **Vet Parasitol**, v. 144, n. 3-4, p. 251–260, 2007.

MIRÓ, G. et al. Canineleishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends Parasitol**, v. 24, n. 8, p. 371-377, 2008.

MOHAPATRA, T. M. et al. Compararative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries**, v. 4, n. 2, p. 114-117, 2009.

MOHEBALI, M. et al. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. **Vet Parasitol**, v. 129, p. 243–251, 2005.

MOLINA, R. et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 88, n. 4, p. 491-493, 1994.

MONCAZ, A.; FAIMAN, R.; WARBURG, A. Breeding sites of *Phlebotomus sergenti*, the sand fly vector of Cutaneous Leishmaniasis in the Judean Desert. **Plos Negl Trop Dis**, v. 6, n. 7, e1725, 2012.

MONTEIRO, E. M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Rev Soc Brasil Med Trop**, v. 38, p. 147-52, 2005.

MONTEIRO, S. P.; LACERDA, M. M.; ARIAS, J. R. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 1, n. 27, p. 67-72, 1994.

MONTOYA, A. et al. *Leishmania infantum* infection in bennett's wallabies (*macropus rufogriseus*) in a Spanish wildlife park. **J Zoo Wildl Med**, v. 47, n. 2, p. 586-593, 2016.

MORAIS, M. H. F. *et al.* Avaliação das atividades de controle da leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006-2011. **Epidemiol Serviços Saúde**, v. 24, p. 485–496, 2015.

MOREIRA, M. A. B. *et al.* Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Vet Parasitol**, v. 145, p. 245-52, 2007.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **T Parasitol**, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

MORRISON, A. C.; FERRO, C.; TESH, R. B. Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American Visceral leishmaniasis in Colombia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 49, n. 1, p. 68-75, 1993.

MORRISON, A. C. *et al.* Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **J Med Entomol**, v. 30, p. 427–435, 1993.

MULLER, N. *et al.* PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. **Vet Parasitol**, v. 114, p. 223-29, 2003.

MUNIZ, L. H. G. *et al.* Host feeding preferences of sandflies in rural area, Southern Brazil. **Rev Saude Publica**, v. 40, n. 6, p. 1087-1093, 2006.

MYSKOVA, J.; VOTYPKA, J.; VOLF, P. *Leishmania* in sand flies: comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. **J Med Entomol**, v. 45, n. 1, p. 13 -138, 2008.

NAUCKE, T. J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Par Vectors**, v. 5, p. 67, 2012.

NERY, L. C. R.; LOROSA, E. S.; FRANCO, A. M. R. Feeding Preference of the Sand Flies *Lutzomyia umbratilis* and *L. spathotrichia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in an Urban Forest Patch in the City of Manaus, Amazonas, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 571-4, 2004.

NEVES, D. P. **Parasitologia Dinâmica**. Editora Atheneu, São Paulo. Capítulo 61, p. 465-468, 2006.

NICOLLE, C. Nouvelles acquisitions sur le kala-zar: cultures inoculations au chien, étiologi. **C R Hebd Séances et l'Acad Sci Paris**; v. 146, p. 498-99, 1908.

NO, E. T. *et al.* *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based Analyses and DNA Sequencing. **Exp Parasitol**, V. 97, P. 35-44, 2001.

NOYES, H. A. *et al.* The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania*: their classification and evidence for a neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade. **J Eukaryot Microbiol**, v. 44, n. 5, p. 511-517, 1997.

NOVY, F. G.; MCNEAL, W. J. The cultivation of *Trypanosoma brucei*: a preliminary note. **J Amer Med Ass**, v. 41, p. 1266-68, 1903.

OLIVA, G. *et al.* Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. **J Am Vet Med Associat**, v. 236, n. 11, p.1192-1198, 2010.

OLIVA, G. *et al.* Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **J Clin Microbiol**, v. 44, p. 1318–1322, 2006.

OLIVEIRA, E. *et al.* Improvement of direct agglutination test (DAT) for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, v. 103, n. 12, p. 1279-1281, 2009.

OLIVEIRA, E. *et al.* Validation of a direct agglutination test prototype kit for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, v. 107, n. 4, p. 243-247, 2013.

OLIVEIRA, A. L. L. *et al.* Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 5, p. 446-50, 2006.

OLIVEIRA, C. D.; MORAIS, M. H.; MACHADO-COELHO, G. L. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. **Cad Saúde Públ**, v. 24, n. 12, p. 2953-58, 2008.

OLIVEIRA, A. G. *et al.* Study of sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil, from 1999 to 2000 1999-2000. **Cad Saude Publica**, v.19, p. 933-944, 2003.

OLIVEIRA, C. D. *et al.* Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994- 1997. **Cad Saúde Pública**, v. 17, p. 1231–1239, 2001.

OLIVEIRA, E. F. *et al.* Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. **PLoS Neg Trop Dis**, v. 11, n. 2, e0005401, 2017.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends Parasitol**, v. 29, n. 7, p.339-345, 2013.

OTRANTO, D. *et al.* Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 6, p. 2769-2770, 2004.

OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection**. Addis Ababa, Naribi; p. 20-22, 2007.

OMS (Organização Mundial da Saúde) WHO (World Health Organization). **Visceral Leishmaniasis Epidemiology** - Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> . Acesso em 05 janeiro de 2019.

OMS (Organização Mundial da Saúde) WHO (World Health Organization) **Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/en/> . Acesso em 25 de maio de 2015.

OMS (Organização Mundial da Saúde) WHO (World Health Organization). **Control of leishmaniasis**. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/en/index.html>. Acesso em 5 jan. 2014.

OMS (Organização Mundial da Saúde) WHO (World Health Organization). **Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection**. Addis Abeba: WHO; 2007.

OMS (Organização Mundial da Saúde) WHO (World Health Organization). **Manual on visceral leishmaniasis control**. Geneva: WHO/Leish/96.40; 1996.

OPAS, ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS), ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Leishmaniasis Informe Epidemiológico de las Américas**. 133 Inf. Leishmaniasis v. 4, p. 3–7, 2016.

OPAS, ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Informe Epidemiológico das Américas – Leishmaniose**, p.3–7, 2015

OPAS, ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Informe Epidemiológico nas Américas** - Leishmanioses: Washington, Organização Pan-Americana da Saúde. 2017. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34113/informe_leishmanioses_5_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 08 mar. 2018.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for canine leishmaniasis. **Front Immunol**, V. 3, p. 1–15, 2012.

PAIVA, B. R. *et al.* Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Trop**, v. 99, p. 252- 259, 2006.

PAIVA, B. R. *et al.* Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Acta Trop**, v. 115, p.126–130, 2010.

PALTRINIERI, S. *et al.* Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v. 236, p. 1184-1191, 2010.

PASSOS, V. M. A. *et al.* Epidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 1, p. 103-10, 1993.

PARANHOS-SILVA, M. *et al.* Cohort study on canine emigration and Leishmania infection in an endemic area for american visceral leishmaniasis. Implications of the disease control. **Acta Trop**, v. 69, p. 75-83, 1998.

PARVIZI, P.; READY, P. D. Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA fragments detect three Leishmania species of gerbils in sandflies from Iranian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. **Trop Med Int Health**, v. 13, n. 9, p. 1159–1171, 2008.

PARVIZI, P. *et al.* PCR detection and sequencing of parasite ITS-rDNA gene from reservoirs host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. **Parasitol Res**, v. 103, p. 1273–1278, 2008.

PATERNINA, L. E. *et al.* Evidence for anthropophily in five species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from northern Colombia, revealed by molecular identification of bloodmeals. **Acta Trop**, v. 156, p. 86-92, 2016.

PATZ, J. A. *et al.* Effects of environmental changes on emerging parasitic disease. **Int J Parasitol**, v. 30, p. 1395-405, 2000.

PAZ, G. F. *et al.* Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. **Parasitol Research**, v. 106, n. 2, p. 523–528, 2010.

PAZ, G. F. *et al.* Ectoparasites and anti-Leishmania antibodies: Association in an observational case–control study of dogs from a Brazilian endemic area. **Prev Med Vet**, v. 112, n. 1-2, p. 156-9, 2013.

PESSOA, G. C. *et al.* Baseline susceptibility of to alpha-cypermethrin in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) from Lapinha Cave (Brasil). **Vet Parasit**, v. 8, p. 469, 2015.

PETERSON, A. T. *et al.* Influences of climate change on the potential distribution of *Lutzomyia longipalpis* sensu lato (Psychodidae: Phlebotominae). **Int J Parasitol**, v. 47, p. 667–674, 2017.

PERRUOLO, G. Factibilidad de utilización de cortinas impregnadas con deltametrina para el control de flebotomos. **Bol Dir Malarial San Amb**, v. 35, n. 1, p. 295-304, 1995.

PIMENTA, P. F. *et al.* Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of Leishmania is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. **Proc Natl Acad Sci**, v. 91, n. 19, p. 9155-9159, 1994.

PIMENTA, P.F. P. *et al.* A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. **Parasitology**, v. 115, p. 359–369, 1997.

PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; BLANCOM, E. E. N. **Interação *Leishmania hospedeiro invertebrado***. In: *Flebotomíneos do Brasil*, editora Fiocruz, p. 367, 2003.

PINTADO, V.; LOPES-VELEZ, R. Visceral leishmaniasis associated with human immunodeficiency virus infection. **Enferm Infecc Microbiol Clín**, v. 19, p. 353–357, 2001.

PITA-PEREIRA, D. *et al.* Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tróp**, v. 107, p. 66-9, 2008.

PRADO, P. F. *et al.* Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, state of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. **Rev Soc Bras Med Trop**, Brasília, v. 44, n. 5, p. 561-566, 2011.

PRATA, A.; SILVA, L. A. Calazar. In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**, v. 1, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 713-32, 2005.

PREFEITURA DE ITAÚNA. **Dados do município**. Disponível em: <http://www.itauna.mg.gov.br/site/municipio/relevo>. Acesso em 26 de junho 2017.

PUGEDO, H. *et al.* HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, n. 1, p. 70-72, 2005.

PUMAROLA, M. *et al.* Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. **J Compe Pathol**, v. 105, p. 279-86, 1991.

QUEIROZ, R. G. *et al.* Cutaneous Leishmaniasis in Ceará State in Northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturite municipality. **Am J Trop Med Hyg**, v. 50, p. 693-98, 1994.

QUINNEL, R. J.; DYE, C.; SHAW, J. J. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. **Med Vet Entomol**; v. 6, n. 3, p. 195-200, 1992.

RABELLO, A.; ORSINI, M.; DISCH, J. *Leishmania/HIV* co-infection in Brazil: an appraisal. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 97, n. 1, p. 17-28, 2003.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. p. 367, 2003.

RANGEL, E. F. *et al.* Variation between geographical populations of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) sensu lato (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 43-50, 1996.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven e putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v. 104, n. 7, p. 937-954, 2009.

READY, P. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Ann Rev Entomol**, v. 58, p. 227-250, 2013.

REBÊLO, J. M. M. **Flebótomos vetores das leishmanioses**: manual para técnicos e profissionais de saúde. São Luis: Universidade Federal do Maranhão, Ministério da Saúde; 1999.

REBÊLO, J. M. M. *et al.* Occurrence of sand flies (Diptera, Psychodidae) in leishmaniasis foci in an ecotourism area around the Lençóis Maranhenses National Park, Brazil. **Cad Saúde Pública**, v. 26, p. 195-98, 2010.

REMY-KRISTENSEN, A. *et al.* *Phlebotomus sergenti* (parrot 1917): morphological and isoenzymatic comparisons of two natural populations from Tenerife (Canary Islands, Spain) and Crete (Greece). **Parasitol Res**, v. 82, n. 1, p. 48-51, 1996.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

REICHE, E. M. *et al.* Doença de chagas congênita: epidemiologia, diagnóstico laboratorial, prognóstico e tratamento. **Jornal de Pediatria**, v. 72, p. 125-32, 2006.

REIS, A. B. *et al.* Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res Vet Sci**, v. 81, n. 1, p.68-75, 2006.

RESENDE, M. C. DE, *et al.* Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 1, p. 51–55, 2006.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Canine leishmaniasis: nove strategies for control. **Treds Parasitol**, v. 18, n. 7, p. 289-90, 2002.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. **Am J Trop Med Hyg**, v. 61, p. 530-41, 1999.

REITHINGER, R. *et al.* Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, 2002.

RIBAS, M. L. *et al.* Estimating the optimal control of zoonotic visceral leishmaniasis by the use of a mathematical model. **Scientific World Journal**, v. 2013, n. 6, p. 1-6, 2013.

RIBEIRO, J. M. C. **Insect saliva: function, biochemistry, and physiology**. In: Regulatory mechanisms in insect feeding. Springer US; pp. 74-97, 1995.

RIGO, R. S. *et al.* Renal Histopathological Findings in dogs with visceral leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 55, n. 2, p.113-116, 2013.

RINALDI, L. *et al.* New insights into the application of geographical information systems and remote sensing in veterinary parasitology. **Geospat Health**, v.1, n. 1, p. 33-47, 2006.

ROATT, B.M. *et al.* Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: promising treatments for this neglected disease. **Front Immunol**, p. 1-12, 2014.

ROBERTS, D. M. Arabian sand flies (Díptera: Psychididae) prefer the hottest nights? **Med Vet Entomol**, v. 8, p. 194-98, 1994.

ROCHA, L. S. *et al.* Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 104, p. 461-466, 2010.

ROGERS, M. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. **Front Microbiol**, v. 28, p. 223, 2012

ROGERS, M. *et al.* *Leishmania* chitinases facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. **Cell Microbiol**, v. 10, p. 1363–1372, 2008.

ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - a systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 4, e584, 2010.

ROSS. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **Br Med J**, v. 2, n. 2237, p. 1261-62, 1903.

RUTLEDGE, L. C.; ELLENWOOD, D. A. Production of phlebotomine sandflies on the open forest floor in Panama: the species complement. **Environ Entomol**, v. 4, p. 71-77, 1975.

SACKS, D. L.; LAWYER, P.; KAMHAWI, S. The Biology of *Leishmania*- sand fly interactions. In: Myler P, Fasel N, editores. *Leishmania: After the Genome*. UK: **Caister Academic Press Norfolk**, p. 205-38, 2008.

SACKS, D. L. & PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**; v. 223, p. 1417-1419, 1984.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Ann Rev Microbiol**, Palo Alto; v. 55, p. 453-483, 2001.

SANCHIS, R.; VITU, C.; GIAUFFRE, A. Les examens de laboratoire dans la leishmaniose canine. II. Evolution des tests biologiques dans la maladie experimentale. **Revue Me Vet**, v.127, p. 1191-202, 1976.

SANGUINETTE, C. C. **Leishmanioses no município de Várzea da Palma, Minas Gerais, Brasil: Estudo dos flebotomíneos e da leishmaniose canina**. 2011. [Dissertação], Belo Horizonte, (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias). Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, [s.n.]; 160 p. 2011.

SANTA ROSA, I. C. A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clín Vet**, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.

SANTOS, R. C. D. *et al.* Isolation of naturally infecting *Leishmania infantum* from canine samples in Novy-MacNeal-Nicolle medium prepared with defibrinated blood from different animal species. **Vet Parasitol**, v. 15, n. 257, p.10-14, 2018.

SANTOS, V. C. *et al.* Host modulation by a parasite: How *Leishmania infantum* modifies the intestinal environment of *Lutzomyia longipalpis* to favor its development. **PLoS ONE**, São Francisco; v. 9, n. 11, e111241, 2014.

SANTOS, S. O. *et al.* The presence of *Lutzomyia* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul State. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, p. 633-634, 2003.

SANTOS, S. O. *et al.* A incriminação de *Lutzomyia (L.) cruzi* como vetor da leishmaniose visceral americana. **Med Vet Entomol**, v. 12, p. 101-103. 1998.

SALOMÓN, O. D. *et al.* *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. **Acta Trop**, v. 113, p. 84-87, 2010.

SALOMÓN, O. D. *et al.* *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 831-846, 2015.

SARAIVA, L. *et al.* Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in área urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: characterization of favored locations as determined by spatial analysis. **Acta trop**, v. 117, p.137-145, 2011.

SARAIVA, L. *et al.* 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**, v. 105, n. 8, p.1033-9, 2010.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. *et al.* Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **Am J Trop Med Hyg**, v. 73, n. 1, p. 82-6, 2005.

SAVANI, E. S. M. M. *et al.* The first record in the Americas of an autochthonous case of Leishmania (*Leishmania*) infantum chagasi in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 120, p. 229-33, 2004.

SAVANI, E. S. *et al.* The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 9, n.160 v. 1-2, p. 18-24, 2009.

SCHALLING, H. D.; OSKAM, L. Molecular biological applications in the diagnostic and control of Leishmaniasis and parasite identification. **Trop Med Int Health**, v. 7, n. 8, p. 641-51, 2002.

SCHIMMING, B. C.; PINTO, E.; SILVA, J. R. C. Leishmaniose visceral canina – Revisão de literatura. **Rev Cien Elet Med Vet**, Garça, v. x, n. 19, 2012.

SCHÖNIAN G, *et al.* PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagn Microbiol infect dis**, v. 47, n. 1, p. 349-358, 2003.

SCANDAR, S. A. S. *et al.* Ocorrência de leishmaniose visceral americana na região de São José do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil. **Bol Epid Paulista**, São Paulo; v. 8, n. 88, p. 13-22, 2011.

SCORZA, J. V.; ORTIZ, I.; GOMES, I. Observaciones biológicas sobre algunos flebotomos de Rancho Grande (Venezuela). Sobre los factores microclimáticos que determinan la endemicidad de la flebotomo fauna de “Rancho Grande”. **Acta Biol. Venezuélica**, v.6, p. 76-83, 1968.

SHAW, J. J. Ecological and evolutionary pressures on leishmanial parasites. **A review Bra J Gent.**, v. 20, n1, 1997.

SHAW, J. J. The leishmaniasis - Survival and expansion in a changing world. A minireview. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 541–546, 2007.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of name *Leishmania (leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agente of visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p.577-579, 2006.

SECUNDINO, N. F. C. *et al.* *Lutzomyia longipalpis* Peritrophic Matrix: Formation, Structure, and Chemical Composition. **J Med Entomol**, v. 42, n. 6, p. 928-938, 2005.

SILVA, R. A. *et al.* Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.113, n. 5, e170377, 2018.

SILVA, R. B. S. *et al.* Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesq Vet Bras**, v. 36, n. 7, p. 625-629, 2016.

SILVA, A. R. *et al.* Leishmaniose visceral (calazar) na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil: evolução e perspectivas. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 30, p. 359-68, 1997.

SILVA, A. V. M. *et al.* The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Trop**, v. 105, p. 92-94, 2008.

Silva FL, RG Oliveira , Silva TM , Xavier MN , Nascimento EF , Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol**, v. 160, n. 1-2, p. 55-59, 2009.

SILVA, J. G. D. *et al.* Natural infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* sp. in Teresina, Piauí State, Brazil. **Cad Saúde Pública**, v. 23, p. 1715-1720, 2007.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Rev Trop Ciên Agr Biol**, v. 1, n. 1, p. 20, 2007.

SILVA, E. S. *et al.* Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-91, 2001.

SHERLOCK, I. A. **Importância Médico-Veterinária: a importância dos flebotomíneos**. In: Rangel EF, Lainson R. (org.). *Flebotomíneos do Brasil*. 20. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz; cap. 1. p. 15-21, 2003.

SHERLOCK, I. A. **Interações ecológicas da leishmaniose visceral no Estado da Bahia, Brasil**. [Tese]. Salvador: Fundação Oswaldo Cruz; 1997

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 671-683, 1996.

SHERLOCK, I. A. *et al.* Natural infection in the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 515, 1984.

SHERLOCK, I. A.; GUITTON, N. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. IV. Variação horária e estacional de *Phlebotomus longipalpis*. **Rev Bras Malariol Doenças Trop**, v. 21, p. 715-27, 1969.

SHIMABUKURO, P. H. F.; TOLEZANO, J. E.; GALATI, E. A. B. Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo. **Pap Avulsos Zoo (São Paulo)**, v. 51, n. 27, p. 399-441, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **J Vet Parasitol**, n. 165, p. 1-18, 26, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Par Vectors**, v. 4, n. 86, p.1-16, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J Clin Microbiol**, v. 39, p. 560-63, 2001.

SOUZA, C. M. *et al.* Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 795-803, 2004.

SOUSA-GOMES, M. L. *et al.* Coinfecção *Leishmania*-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **Epid Serv Saúde**, v. 20, p. 519-526, 2011.

SPIEGEL, C. N. *et al.* The *Lutzomyia longipalpis* complex: a brief natural history of aggregation-sex pheromone communication. **Parasit Vectors**, v. 9, p. 58, 2016.

SUDARSHAN, M.; SUNDAR, S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. **Diag Microbiol Infectious Dis**, v. 80, n. 1, p. 40-42, 2014.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clin Diag Lab Immun**, v. 9, p. 951-958, 2002.

TANURE, A. *et al.* Identification of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) blood meals in an endemic leishmaniasis area in Brazil. **Rev Inst Med Trop**, v. 57, n. 4, p. 321-4, 2015.

TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 275-77, 2006.

TAVARES, C. A. P.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N. Molecular diagnosis of Leishmaniasis. **Expert Rev Mol Diagn**, v. 3, n. 5, p. 657-67, 2003.

TERAYAMA, Y. *et al.* Molecular typing of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from areas endemic for Leishmaniasis in Ecuador by PCR-RFLP of 18S ribosomal RNA gene. **J Vet Med Sci**, v. 70, n. 9, p. 907-13, 2008.

TESH, R. B. The genus Phlebovirus and its vectors. **Ann Rev Entomol**, v. 33, p. 169-181, 1988.

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am J Trop Med Hyg**, v. 52, p. 287-92, 1995.

TESH, R. H. *et al.* Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. **Am J Trop Med Hyg**, v. 20, p.150-6, 1971.

THIES, S. F. *et al.* Phlebotomine sandfly fauna and natural infection rates in a rural area of Cerrado (tropical savannah) in Nova Mutum, State of Mato Grosso in Brazil. **Rev Soc Med Trop**, v. 46, n. 3, p. 293-8, 2013.

THOMAZ-SOCCOL, V. *et al.* Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. *Revista. Bras Parasitol Vet*, v. 18, n. 3, p. 46-51, 2009.

TROTZ-WILLIAMS, L.; GRADONI, L. Disease risks for the travelling pet: Leishmaniasis. *Practice*, v. 25, n. 4, p. 190-197, 2003.

VAN HANDEL, E. Metabolism of nutrients in the adult mosquito. *Mosquitoes News*, v. 44, p. 573-79, 1984.

VAISH, M. *et al.* Evaluation of rK28 antigen for serodiagnosis of visceral Leishmaniasis in India. *Clin Microbiol Infect*, v. 18, n. 1, p. 81-5, 2012.

VAN EYS, G. J. *et al.* Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol*, v. 51, p. 133-42, 1992.

VERMA, S. *et al.* Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. *PLoS One*, v. 5, e10107, 2010.

VITALE, F. R. S. *et al.* TaqMan-Based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1026, n. 1, p. 139-143, 2004.

VIEIRA, J. B. F.; COELHO, G. E. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 31, n. 2, p. 85-92, 1998.

VIRBAC. **Resumo de Características do medicamento Milteforan®**. 2012. Disponível em: [http://www.virbac.pt/pvirbacptpubpt/display.aspx?srv=pvirbacpt&typ=pub&lang=pt&cmd=view&style=styles/specie.xsl&select=PRODUCT%5B@ID\\$eq\\$PRODUCT_36%5D&affp=&](http://www.virbac.pt/pvirbacptpubpt/display.aspx?srv=pvirbacpt&typ=pub&lang=pt&cmd=view&style=styles/specie.xsl&select=PRODUCT%5B@IDeqPRODUCT_36%5D&affp=&). Acesso em 27 Novembro, 2017.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARLETT, A. The enzyme linked immunosorbente assay (Elisa): a guide with abstracts of microplate applications. *Bull world Health Organ*, v. 54, n. 2, p. 129–139, 1976.

VOLF, P.; MYSKOVA, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol*, Oxford, v. 23, p. 91-92, 2007.

VOLPINI, A.C. *et al.* PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L.* (*Leishmania*) *amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*, v. 90, n. 1, p. 31-37, 2004.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Am Entomol Inst*, v. 54, n. 1, p. 881, 1994.

YUVAL, B.; WARBURG, A.; SCHLEIN, Y. Leishmaniasis in the Jordan Valley. V. Dispersal characteristics of the sandfly *Phlebotomus papatasi*. **Med Vet Entomol**, v. 2, p. 391–395, 1988.

WARD, R. D. *et al.* Pheromone disseminating structures in tergides of male phlebotomines (Diptera; Psychodidae). **Bull Entomol Res**, v. 83, p. 437-45, 1993.

WEIGLE, K. A. *et al.* PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. **J Clin Microbiol**, v. 40, p. 601-06, 2002.

WERNECK, G. L. *et al.* The urban spread of visceral leishmaniasis: clues from spatial analysis. **Epidemiology**, v. 13, n. 3, p. 364-367, 2002.

WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cad de Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p. 644–645, 2010.

WICKER-THOMAS, C. Pheromonal communication involved in courtship behavior in Diptera. **J Insect Physiol**, v. 53, p. 1089-1100, 2007.

WOLDA, H. Fluctuations in abundance of tropical insects. **Am Naturalist**, v. 112, p. 1017-1045, 1978.

WOLDA, H.; SPITZER, K.; LEPS, J. Stability of environment and of insect populations. **Res Pop Ecol**, v. 34, p. 213-225, 1992.

WOOLHOUSE, M. E. *et al.* Heterogeneity in the transmission of infectious agents: implications for the design of control programs. **Proc Natl Acad Sci**, v. 94, p. 338-342, 1997.

XAVIER, S. C. *et al.* Comparison of paraffin – embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dog using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Vet Research**, v. 2, n. 17, p. 1-7, 2006.

ZANIN, F. H. C. *et al.* Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and Nucleoside Hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. **Microbes Infect**, v. 9, p. 1070-1077, 2007.

ZAFFARONI, E. *et al.* Epidemiological patterns of canine leishmaniasis in Western Liguria (Italy). **Vet Parasitol**, v. 81, p. 11-19, 1999.

ZUBEN, A. P. B. V. & DONALÍSIO, M. R. Difficulties in implementing the guidelines of the Brazilian Visceral Leishmaniasis Control Program in large cities. **Cad Saúde Púb**, v. 32, n. 6, e00087415, 2016.

10 ANEXOS

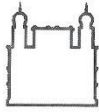
10.1 Anexo 1 - Casos de LV no Brasil notificados pelo SINAN

Distribuição de casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, grandes regiões e unidades federadas, 2007 a 2017 - Notificados pelo SINAN

| Região/UF de notificação | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 | Total |
|----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| TOTAL | 3.565 | 3.991 | 3.894 | 3.704 | 4.107 | 3.269 | 3.472 | 3.733 | 3.558 | 3.455 | 4.515 | 41.263 |
| Região Norte | 802 | 861 | 775 | 702 | 902 | 634 | 572 | 434 | 506 | 622 | 855 | 7.665 |
| .. Rondônia | 3 | - | - | - | 1 | 2 | 2 | - | - | - | - | 8 |
| .. Amazonas | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 2 | - | 2 | - | 1 | - | 15 |
| .. Roraima | 3 | 2 | 7 | 17 | 16 | 11 | 21 | 18 | 21 | 43 | 37 | 196 |
| .. Pará | 370 | 366 | 301 | 312 | 365 | 248 | 252 | 230 | 269 | 342 | 529 | 3.584 |
| .. Amapá | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | 3 |
| .. Tocantins | 424 | 488 | 464 | 372 | 519 | 371 | 297 | 184 | 216 | 235 | 289 | 3.859 |
| Região Nordeste | 1.726 | 1.893 | 1.939 | 1.845 | 2.046 | 1.537 | 1.984 | 2.422 | 2.148 | 1.828 | 2.253 | 21.621 |
| .. Maranhão | 301 | 404 | 370 | 354 | 381 | 230 | 519 | 432 | 519 | 650 | 746 | 4.906 |
| .. Piauí | 363 | 452 | 267 | 248 | 313 | 296 | 398 | 417 | 317 | 262 | 344 | 3.677 |
| .. Ceará | 550 | 556 | 677 | 541 | 611 | 410 | 481 | 621 | 510 | 363 | 392 | 5.712 |
| .. Rio Grande do Norte | 71 | 93 | 96 | 84 | 121 | 96 | 80 | 99 | 82 | 87 | 105 | 1.014 |
| .. Paraíba | 25 | 41 | 21 | 33 | 42 | 40 | 37 | 59 | 46 | 33 | 46 | 423 |
| .. Pernambuco | 76 | 85 | 83 | 67 | 85 | 70 | 72 | 171 | 181 | 116 | 183 | 1.189 |
| .. Alagoas | 32 | 25 | 31 | 34 | 37 | 37 | 25 | 43 | 44 | 26 | 47 | 381 |
| .. Sergipe | 75 | 40 | 45 | 90 | 78 | 57 | 50 | 67 | 69 | 55 | 78 | 704 |
| .. Bahia | 233 | 197 | 349 | 394 | 378 | 301 | 322 | 513 | 380 | 236 | 312 | 3.615 |
| Região Sudeste | 690 | 836 | 824 | 810 | 756 | 664 | 555 | 591 | 664 | 756 | 1.094 | 8.240 |
| .. Minas Gerais | 423 | 526 | 579 | 580 | 506 | 402 | 339 | 389 | 473 | 554 | 877 | 5.648 |
| .. Espírito Santo | - | 3 | 8 | 2 | 11 | 2 | 4 | 4 | 8 | 18 | 26 | 86 |
| .. Rio de Janeiro | 3 | - | 6 | 2 | 5 | 5 | 9 | 6 | 7 | 8 | 10 | 61 |
| .. São Paulo | 264 | 307 | 231 | 226 | 234 | 255 | 203 | 192 | 176 | 176 | 181 | 2.445 |
| Região Sul | 4 | 5 | 10 | 7 | 6 | 7 | 4 | 6 | 6 | 17 | 20 | 92 |
| .. Paraná | 3 | 4 | 1 | 5 | 2 | 5 | - | 2 | 5 | 13 | 7 | 47 |
| .. Santa Catarina | 1 | 1 | - | - | 2 | 2 | 1 | - | - | 2 | 4 | 13 |
| .. Rio Grande do Sul | - | - | 9 | 2 | 2 | - | 3 | 4 | 1 | 2 | 9 | 32 |
| Região Centro-Oeste | 343 | 396 | 346 | 340 | 397 | 427 | 357 | 280 | 234 | 232 | 293 | 3.645 |
| .. Mato Grosso do Sul | 236 | 252 | 196 | 215 | 273 | 310 | 245 | 178 | 133 | 127 | 159 | 2.324 |
| .. Mato Grosso | 31 | 55 | 68 | 55 | 55 | 54 | 35 | 18 | 25 | 15 | 20 | 431 |
| .. Goiás | 19 | 28 | 23 | 33 | 29 | 26 | 32 | 40 | 38 | 39 | 51 | 358 |
| .. Distrito Federal | 57 | 61 | 59 | 37 | 40 | 37 | 45 | 44 | 38 | 51 | 63 | 532 |

Fonte: Ministério da Saúde, Brasil / SINAN

10.2 Anexo 2 - Licença do CEUA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-2/15

Certificamos que o protocolo (P-68/14-3), intitulado "ISOLAMENTO E ESTUDO DA(S) CEPA(S) DE LEISHMANIA(S) CIRCULANTE(S) EM CÃES SOROPOSITIVOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL DO MUNICÍPIO DE ITAÚNA, MINAS GERAIS.", sob a responsabilidade de EDELBERTO SANTOS DIAS, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 15/12/2017 e inclui o uso total de :

Canis familiaris

- 50 Machos.
- 50 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 15 de dezembro de

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Eteida M. Mollinaro
Eteida M. Mollinaro
Vice - Coordenadora
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 0463096

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04626550
15/12/2014

11 APÊNDICES

11.1 Apêndice 1 - Pools de flebotomíneos

As amostras descritas a seguir continham apenas um flebotomíneo:

1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 34, 36, 37, 41, 57, 63, 71, 73, 84, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 98, 100, 102, 103, 104, 105, 107, 109, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 122, 128, 130, 131, 133, 134, 137, 138, 142, 143, 144, 148, 151, 154, 155, 157.

As amostras descritas a seguir foram armazenadas em *pools* com mais de um flebotomíneo:

| Amostra | Nº Flebotomíneos | Amostra | Nº Flebotomíneos |
|---------|------------------|---------|------------------|
| 4 | 5 | 99 | 2 |
| 12 | 2 | 101 | 2 |
| 14 | 2 | 108 | 4 |
| 23 | 2 | 110 | 4 |
| 29 | 3 | 111 | 3 |
| 33 | 5 | 118 | 2 |
| 35 | 2 | 119 | 3 |
| 39 | 6 | 120 | 2 |
| 40 | 2 | 121 | 2 |
| 42 | 2 | 123 | 2 |
| 43 | 2 | 124 | 2 |
| 47 | 7 | 125 | 3 |
| 48 | 10 | 126 | 4 |
| 54 | 6 | 127 | 2 |
| 56 | 4 | 129 | 2 |
| 62 | 2 | 132 | 2 |
| 64 | 4 | 135 | 8 |
| 66 | 6 | 136 | 7 |
| 68 | 10 | 139 | 3 |
| 69 | 10 | 140 | 2 |
| 70 | 10 | 141 | 3 |
| 72 | 2 | 145 | 2 |
| 75 | 2 | 146 | 8 |
| 77 | 2 | 147 | 6 |
| 79 | 4 | 149 | 2 |
| 80 | 2 | 150 | 2 |
| 86 | 5 | 152 | 3 |
| 88 | 2 | 153 | 2 |
| 89 | 10 | 156 | 3 |
| 90 | 10 | 158 | 2 |
| 97 | 2 | | |

11.2 Apêndice 2- Ficha de necropsia



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



Roteiro para necropsia de cães com leishmaniose visceral

Número do animal: **54 - Maradona**
Endereço:

1) Dados do animal

- Raça: **SRD**
- Sexo: **Macho**
- Idade: **-**
- Cor: **Marron**
- Porte: **Grande** Pêlo: **curto** **15,6 kg**

2) Sintomatologia clínica

- Ceratoconjuntivite
- Opacificação de córnea ()
- Hiperqueratinização do focinho
- Hiperqueratinização de coxins ()
- Dermatite de ponta de orelha
- Dermatite () localizada generalizada (**Fur furácia**)
- Alopecia () localizada generalizada
- Mucosas hipocoradas ()
- Emagrecimento () leve moderado () acentuado
- Úlceras de decúbito ()
- Ascite ()
- Paresia de membros posteriores ()
- Onicogribose
- Emaciação ()
- Infecções secundárias ()
- Linfadenopatia ()

Ectoparasitos pulgas () carrapatos

Classificação geral

Assintomático() Oligossintomático() Sintomático

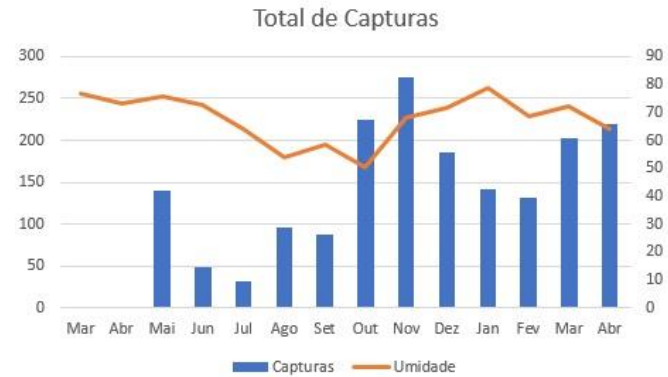
Achados de necropsia

Fígado: normal() alterado()

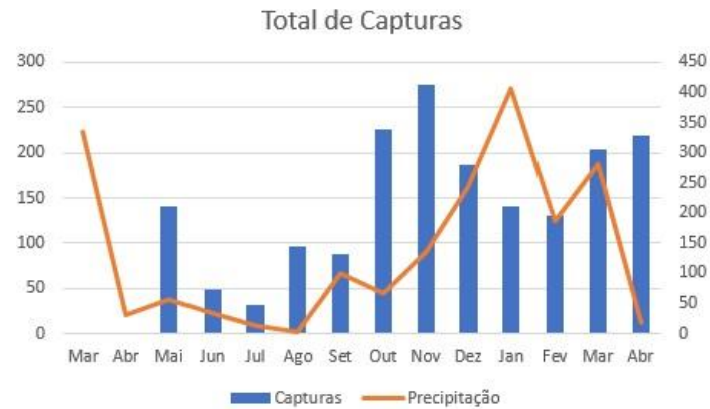
Baço: normal() alterado

Linfonodo mesentérico: normal() alterado

11.3 Apêndice 3 - Análises climáticas



Associação entre o número de flebotomíneos capturados e a variável climática umidade, no período de 05/2015 à 04/2016, município de Itaúna, MG.



Associação entre o número de flebotomíneos capturados e a variável climática precipitação, no período de 05/2015 à 04/2016, município de Itaúna, MG.

| | Variáveis Climáticas de Maio/2015 a Abril/2016 | | Variáveis Climáticas de Abril/2015 a Março/2016 | |
|--|--|---------|---|---------|
| | Correlação de Spearman | p-Valor | Correlação de Spearman | p-Valor |
| Temperatura X Número de Flebotomíneos | 0,74 | 0,08 | 0,82 | 0,002 |
| Precipitação X Número de Flebotomíneos | 0,41 | 0,193 | 0,49 | 0,109 |
| Umidade X Número de Flebotomíneos | -0,08 | 0,8 | -0,46 | 0,134 |

| | Correlação de Spearman p-Valor | | | | | |
|--|--------------------------------|-------|-------------------|-------|-------------------|-------|
| | 05/2015 a 04/2016 | | 04/2015 a 03/2016 | | 03/2015 a 02/2016 | |
| Temperatura x Número de Flebotomíneos | 0,74 | 0,08 | 0,82 | 0,002 | 0,47 | 0,127 |
| Precipitação x Número de Flebotomíneos | 0,41 | 0,193 | 0,49 | 0,109 | 0,27 | 0,391 |
| Umidade x Número de Flebotomíneos | -0,08 | 0,8 | -0,46 | 0,134 | -0,45 | 0,14 |