

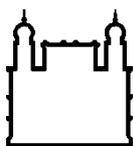
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Vigilância e Controle de Vetores

**AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
NO PLANALTO DEPOÇOS DE CALDAS MG - SP**

ROSIMERE PEREIRA GARCIA

Rio de Janeiro
Outubro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores

ROSIMERE PEREIRA GARCIA

AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO
PLANALTO DE POÇOS DE CALDAS MG-SP.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Vigilância e Controle de Vetores.

Orientador (es): Prof. Dr.Otacílio da Cruz Moreira
Prof. Dr.Reginaldo Peçanha Brazil

RIO DE JANEIRO

Outubro 2019

Pereira Garcia, Rosimere .

AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO PLANALTO DE POÇOS DE CALDAS MG-SP. / Rosimere Pereira Garcia. - Rio de Janeiro, 2019.
85 f.

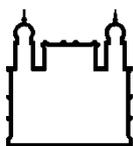
Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores, 2019.

Orientador: Dr.Otacilio da Cruz Moreira.
Co-orientador: Dr.Reginaldo Peçanha Brazil.

Bibliografia: f. 76-85

1. Flebotomíneos . 2. Diagnóstico Molecular. 3. PCR em tempo real. 4. Leishmaniose. 5. Planalto de Poços de Caldas . I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manquinhos/ICICT com os dados



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores

AUTOR: ROSIMERE PEREIRA GARCIA

AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO PLANALTO DE POÇOS DE CALDAS MG-SP

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Otacílio da Cruz Moreira
Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil**

Aprovada em: 30/10/2019

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Rafaela Vieira Bruno – Presidente (IOC-FIOCRUZ)

Prof. Dra. Cristina Maria Giordano Dias (SES-RJ)

Prof. Dr. Cristian Ferreira de Souza (externo-Universidade Lancaster-Inglaterra)

Prof. Dra. Fernanda Nazaré Morgado (IOC)

Prof. Dra. Denise Borges dos Santos Dias (UERJ)

Rio de Janeiro, 30 de outubro de 2019



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado profissional em Vigilância e Controle de Vetores de **Rosimere Pereira Garcia**, sob orientação do Dr. Otacilio da Cruz Moreira e coorientada pelo Dr. Reginaldo Peçanha Brazil. Ao trigésimo dia do mês de outubro de dois mil e dezanove, realizou-se às nove horas, no Auditório Maria Deane - Pavilhão Leonidas Deane, o exame da dissertação de mestrado profissional intitulada: "**Avaliação Epidemiológica de Leishmaniose Visceral Canina no Planalto de Poços de Caldas MG-SP**", no programa de Pós-graduação em Vigilância e Controle de Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Epidemiologia e controle de vetores, na linha de pesquisa: Vigilância. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Rafaela Vieira Bruno - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Cristian Ferreira de Souza - Universidade de Lancaster, Dr^a. Cristina Maria Giordano Dias - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr^a. Fernanda Nazaré Morgado – IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Denise Borges dos Santos Dias – UERJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado profissional. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Fernando Ariel Genta, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 30 de outubro de 2019.

Dr^a. Rafaela Vieira Bruno (Presidente da Banca): *Rafaela Vieira Bruno*

Dr. Cristian Ferreira de Souza (Membro da Banca): *Cristian Ferreira de Souza*

Dr^a. Cristina Maria Giordano Dias (Membro da Banca): *Cristina Maria Giordano Dias*

Dr. Fernando Ariel Genta (Coordenador do Programa): *Fernando Ariel Genta*

AGRADECIMENTOS

A minha família, por compartilhar de todo o processo no decorrer desse mestrado, sempre apoiando, torcendo e dando suporte.

Ao meu irmão Célio que aprendeu muito sobre flebotomíneos, além de colocação e retirada de armadilhas

Aos meus filhos Estevam e Isaac pela parceria de todas as horas e a tolerância por minhas ausências, por ouvir os desabafos e conversas sobre flebotomíneos.

Ao meu Orientador Dr. Otacílio pela paciência e carinho de sempre e pelo grande aprendizado nesse período e que levo para a vida toda.

Ao Dr. Reginaldo Brazil, por compartilhar todo o seu conhecimento, com leveza e olhar paterno.

A Dra. Andressa Alencastre Fuzari pela sua amizade e carinho em todos os momentos, além do grande aprendizado na ciência e na vida.

Aos colegas do LABIMDOE, pela grande disposição em ajudar para que tudo desse certo. Em especial a Heloisa por me acompanhar nos experimentos sendo tão jovem e com tanto a ensinar.

A Dra. Daniela Pita e Dra. Thais na grande ajuda com a infecção natural dos flebotomíneos e de tudo mais que foi solicitado sempre com carinho e grande disposição.

A Dra. Constança Brito e Dr. Carlos que me receberam prontamente, e pela gentileza de sempre.

Ao Sr. Romildo Teixeira de Paula e Sra. Nair Sproverie Teixeira de Paula, proprietários do Café Aroma da Serra, onde foram colocadas as armadilhas em Andradas-MG

Ao Sr. Paulo Henrique Marques e Maria Alves Pereira Marques Proprietários do restaurante Sabortolan.

Ao Sr. Renato Alvarez Dias e Leila Fabiana Campos do Restaurante Fazenda do Ozório.

A ONG Sitio do Lobato.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias pelo apoio incondicional

Aos colegas do Mestrado com os quais rimos, choramos, reclamamos, festejamos e que vou levar para a vida toda. Em especial os que partilharam as noites

no alojamento, Mara, Aline, Fabiane (Juntas desde o início e para Sempre), Thaina e meu grande amigo Igo que dividimos dificuldades nas coletas de flebotomíneos e por quem mantenho um carinho eterno.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Mestrado Vigilância e Controle de vetores pela oportunidade de cursar um mestrado de tão alto nível, mesmo mantendo nossas ocupações.

Aos Professores da Pós-PGVCV que nos adotaram como filho primogênito, ensinando com delicadeza e rigor ao mesmo tempo.

A Universidade Federal de Alfenas, onde tudo começou com os Professores Marcos, Loiola, Hermínia, Rita e Juliana.

Ao Dr. Carlos Frederico Loiola pela colaboração oferecida durante o projeto e empréstimo das armadilhas.

A Secretária da Pós-graduação Helenice pela agilidade e carinho nas nossas solicitações, conhecendo cada aluno pelo nome.

A Prefeitura Municipal de Poços de Caldas, que acreditou na minha capacidade e apostou no retorno em conhecimento para o Município

A Secretaria Municipal de Saúde, Dr. Carlos Mosconi e Flávio Togni por permitir minha ausência no trabalho e ainda fornecer subsídios para a realização do projeto, em troca de conhecimento para o setor e melhor prestação de serviço à comunidade.

A coordenação de Vigilância Ambiental, Jorge Miguel Ferreira do Lago que forneceu toda a infraestrutura para a realização do Projeto.

Aos Veterinários Marcos Vinicius e Elis Perlato pelo grande trabalho que exercem no Centro de Controle de Zoonoses e Abrigo Municipal de Cães, não medindo esforços para colaborar na realização do projeto.

Ao José Roberto e Alexandre agentes de endemias que participaram na colocação e retirada das armadilhas.

A coordenação de Vigilância Epidemiológica, Juliana Loro amiga e parceira de sempre, não mediu esforços para que esse sonho se concretizasse.

Aos parceiros do Serviço Aretha, Roberta, Luciane, Cristiano, Alexandre e Vânia que acompanharam todos os altos e baixos no decorrer desse período.

A Minha Amiga Leandra Rossi, que participou de todo o projeto, seja incentivando, botando a mão na massa e fazendo tudo que foi necessário.

Ao Grupo de leitura que me encorajou quando as forças faltaram.

Enfim a todos que participaram direta ou indiretamente, deixo o meu muito obrigado.

**Aos Meus Filhos Estevam e Isaac
pela parceria de uma vida e apoio
incondicional.**

**“Por Conhecimento,
entendo a certeza que
nasce da comparação
de ideias”**

Hume
*(Tratado da natureza
Humana)*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

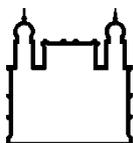
Avaliação Epidemiológica de Leishmaniose Visceral Canina no Planalto de Poços de Caldas MG-SP

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM VIGILÂNCIA E CONTROLE DE VETORES **ROSIMERE PEREIRA GARCIA**

As leishmanioses são amplamente distribuídas no mundo, constituindo importante problema de saúde pública e correspondendo a graves síndromes clínicas encontradas nos seres humanos. Buscando compreender o avanço da leishmaniose no sul do estado de Minas Gerais, realizamos o diagnóstico de cães dos CCZs de Poços de Caldas/MG e Espírito Santo do Pinhal/SP, por PCR em tempo real e sorologia (DPP®), estudo da fauna flebotômica, com investigação de infecção natural por *Leishmania sp.*, em insetos coletados no transecto que compreende os municípios de Espírito Santo do Pinhal- SP, Andradas e Poços de Caldas-MG. A captura dos flebotômicos foi realizada por 12 meses, utilizando armadilhas luminosas tipo CDC instaladas no crepúsculo vespertino, permanecendo por 12 horas. Os insetos foram enviados ao laboratório, triados e separados por sexo. Os machos e partes da fêmea foram montados para a identificação taxonômica. A pesquisa da infecção natural por *Leishmania* foi realizada na parte restante do corpo de 17 fêmeas. No total, foi possível coletar 16 flebotômicos em Poços de Caldas, onde as espécies *Psychodopygus lloydi* e *Pintomyia fischeri* foram as mais abundantes. Em Andradas, 49 flebotômicos foram coletados, sendo *Migonemyia migonei* a espécie mais abundante. Para o diagnóstico dos cães foram coletadas 142 amostras que foram agrupadas em pools de 5 amostras, analisadas através detecção de *Leishmania* por PCR em Tempo Real, utilizando um sistema TaqMan multiplex, obtendo 5 pools positivos, que foram abertos e processados individualmente, obtendo 3 amostras positivas. Para a técnica DPP® foram encontrados 3 cães reagentes. Na análise da infecção natural das fêmeas de flebotômicos por PCR e hibridização espécie específica, obtivemos 01 fêmea de *Psychodopygus lloydi* infectada com *Leishmania infantum*. Este estudo confirma a presença de flebotômicos nos municípios de Poços de Caldas e Andradas, presença de cães reagentes através das técnicas utilizadas, bem como a presença de *Leishmania infantum* em flebotômico fêmea coletado no município de Poços de Caldas.

Palavras-chave: Diagnóstico molecular; Leishmaniose; PCR em tempo real, flebotômicos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Epidemiological Evaluation of Canine Visceral Leishmaniasis in the Poços de Caldas Plateau (MG-SP)

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN VECTORS SURVEILLANCE AND CONTROL

Rosimere Pereira Garcia

Leishmaniasis are widely distributed worldwide, constituting an important public health problem and corresponding to severe clinical syndromes found in humans. In order to understand the progress of leishmaniasis in the south of Minas Gerais state, we performed the diagnosis of dogs of CCZ from Poços de Caldas / MG and Espírito Santo do Pinhal / SP, by real time PCR and serology (DPP®), fauna study. phlebotomine, with investigation of natural infection by *Leishmania sp.*, in insects collected in the transect comprising the municipalities of Espírito Santo do Pinhal-SP, Andradas and Poços de Caldas-MG. The sand flies were captured for 12 months using CDC light traps installed in the evening twilight, remaining for 12 hours. The insects were sent to the laboratory, screened and separated by sex. Males and female parts were assembled for taxonomic identification. The survey for natural *Leishmania* infection was performed on the remaining body of 17 females. In total, it was possible to collect 16 sandflies in Poços de Caldas, where the species *Psychodopygus lloydi* and *Pintomyia fischeri* were the most abundant. In Andradas, 49 sandflies were collected, being *Migonemyia migonei* the most abundant species. For the diagnosis of dogs, 142 samples were collected and pooled in 5 samples, analyzed by *Leishmania* detection by Real Time PCR, using a TaqMan multiplex system, obtaining 5 positive pools, which were opened and processed individually, obtaining 3 positive samples. For the DPP® technique, 2 reactive dogs were found. In the analysis of the natural infection of phlebotomine females by PCR and species-specific hybridization, we obtained 01 *Psychodopygus lloydi* females infected with *Leishmania infantum*. This study confirms the presence of sand flies in the municipalities of Poços de Caldas and Andradas, the presence of reactive dogs through the techniques used, as well as the presence of *Leishmania infantum* in female sand flies collected in the municipality of Poços de Caldas.

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
Índice de Figuras	xiv
Lista de Tabelas	xviii
Lista de Siglas e Abreviaturas	xix
Lista de Símbolos	xx
1 INTRODUÇÃO	22
Epidemiologia	23
Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	23
Os Flebotomíneos	27
Leishmaniose Canina	29
Forma de transmissão das leishmanioses	30
2 JUSTIFICATIVA	37
3 OBJETIVOS	38
Objetivo Geral.....	38
Objetivos Específicos	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
Áreas de Estudo	39
Características de Relevo e Vegetação	40
Poços de Caldas (MG)	41
Características do clima e vegetação.....	42
Andradas (MG)	43
Espírito Santo do Pinhal (SP)	44
Técnica de capturas e procedimentos para a identificação das espécies.....	45
Estudo de Infecção natural por <i>Leishmania</i> em flebotomíneos ...	49
Obtenção do extrato total de flebotomíneos	50
Extração de DNA.....	50
Ensaio de Dot- Blot.....	53

	Diagnóstico molecular <i>de Leishmania</i> em cães	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
	Poços de Caldas	57
	Andradas- MG	61
	Diagnóstico molecular de Leishmaniose Canina	64
	Diagnóstico de infecção natural	69
6	CONCLUSÃO	71
7	PERSPECTIVAS	72
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

Índice de Figuras

Figura 1- Espectros clínicos da leishmaniose em pacientes. A - Leishmaniose Cutânea. B – Leishmaniose Difusa. C – Leishmaniose cutânea mucosa. D – Leishmaniose Visceral ou Calazar. E – Leishmaniose Dérmica Pós Calazar. (Adaptado Brasil, 2007.)	23
Figura 2- Mapa de distribuição de leishmaniose visceral no Mundo. Adaptado de WHO 2015. Disponível em: http://gmapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis2013VL.png .	26
Figura 3: Ciclo biológico holometábolo do flebotomíneo, apresentando desenvolvimento em 4 fases distintas (A) ovo; (B) larva; (C) pupa; (D) adulto;Fonte: Ovallos 2011.....	27
Figura 4- Animais com manifestação sistêmica de leishmaniose visceral canina: (A) linfonodo poplíteo aumentado (linfadenomegalia-circulo). (B) emagrecimento com evidenciação das costelas sob a pele e musculatura atrofiada. (C) Palidez de mucosas orais (D) atrofia de musculatura temporal. .	30
Figura 5: Ciclo biológico da <i>Leishmania spp</i> . O ciclo da Leishmania ocorre em duas fazes , uma no hospedeiro vertebrado(setas azuis), e outra no hospedeiro invertebrado (setas vermelhas). Fonte: adaptado de CDC 2015.....	31
Figura 6: Formas amastigotas de <i>Leishmania sp</i> .Observadas no exame parasitológico direto em amostra de linfonodo de cão sintomático para LVC, atendido no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Goiás, procedente do município de Caldas Novas. Fonte: Carlos Eduardo Fonseca-Alves.....	32
Figura 7 Reservatórios de <i>Leishmanias</i> . Na sequência <i>Cão, raposa e marsupial</i> Fonte: https://leishmaniosevisceralcanina.wordpress.com/2016/09/19/leishmaniose-visceral-uma-zoonose/	32
Figura 8 Situação Epidemiológica de transmissão de leishmaniose visceral humana e canina ,segundo Boletim Epidemiológico do estado de São Paulo. Adaptado por Garcia RP,2019.....	34
Figura 9- Classificação epidemiológica de leishmaniose visceral no Estado de São Paulo- dezembro 2017	35

Figura 10 Distribuição dos Municípios do Estado de São Paulo com presença de <i>Lutzomyia longipalpis</i>-	35
Figura 11 Mapa de Distribuição de Leishmaniose Visceral no Estado de Minas Gerais- Fonte Secretaria Estadual de Saúde(SES-MG).	36
Figura 12 Transecto entre os municípios de Poços de Caldas-MG e Espírito Santo do Pinhal- SP. Região escolhido para o estudo. Fonte: https://www.google.com/maps/dir	39
Figura 13: Termas Antônio Carlos- utilizado para banhos termais e tratamentos à base de hidroterapia. Localizado no município de Poços de Caldas-MG. Fonte: Foto g1.com. br.	40
Figura 14: Arte em vidro. Atividade econômica e tradicional do município de Poços de Caldas-MG. Fonte: https://cristaiscadoro.com.br/blog/fabricacao-100-artesanal-cristais-ca-doro.	41
Figura 15: Mapa de municípios do entorno de Poços de Caldas-MG. Mostrando as localidades mais próximas da Cidade de Poços de Caldas. Fonte: http://www.pocosdecaldas.mg.gov.br	42
Figura 16: Mapa da divisão política do Estado de Minas Gerais, indicando a localização do município de Poços de Caldas, e sua proximidade com municípios vizinhos do Estado de São Paulo. Fonte https://pt.wikipedia.org/wiki/Pocos_de_Caldas.	43
Figura 17: Mapa da Divisão Política do Estado de Minas Gerais, indicando a localização do Município de Andradas -MG, e sua proximidade com municípios vizinhos do Estado de São Paulo.	44
Figura 18: Mapa de Divisão Política do Estado de São Paulo indicando a localização do município de Espírito Santo do Pinhal em região de fronteira com o município de Andradas -MG Fonte:https://pt.wikipedia.org/wiki/Espirito_Santo_do_Pinhal	45
Figura 19 Pontos de Coleta: (A) Sítio do Lobato , (B) Fazenda do Ozório ono período de março de 2018 a fevereiro de 2019, no município de Poços de Caldas-MG. Fonte Arquivo Pessoal.	46
Figura 20: Foto de satélite da distribuição de armadilhas nos pontos de coleta : (01) Sabortolan; (02) Fazenda do Ozório; (03) CCZPC; (04) Sitio do Lobato; (05)	

Abrigo de animais, no período de março de 2018 a fevereiro de 2019, no município de Poços de Caldas-MG. Fonte: Google Earth.	46
Figura 21: Foto de satélite da distribuição de armadilhas no ponto de coleta: Café Aroma da Serra -- Estrada Poços de Caldas-Andradas Km 04, no período de março de 2018 a fevereiro de 2019, no município de Andradas-MG. Fonte: Google Earth.....	48
Figura 22 A-) Colocação de armadilha no galinheiro localizado no Café Aroma da Serra, local de coleta de flebotomíneos no município de Andradas-MG. B-) Armadilha colocada dentro do galinheiro. Fonte: Arquivo Pessoal.....	49
Figura 23: Esquema da estrutura de um minicírculo do kDNA de Leishmania sp. (~800 pb), demonstrando o local de anelamento dos primers A e B e o sentido da amplificação pela PCR.....	52
Figura 24: Porcentagem de flebotomíneos capturados no município de Poços de Caldas (ABR-abrigo municipal, CCZ-centro de controle de zoonoses, SB- sitio do lobato) no período de março de 2018 a fevereiro de 2019.	56
Figura 25 (A) Visita do Colégio Cepoc ao Abrigo Municipal de Cães em Poços de Caldas. Fonte: www.pocosdecaldas.mg.gov.br; (B) Instituto Sitio do Lobato recebendo visitantes para atividades de preservação e conservação do meio ambiente. Fonte: https://www.institutositiodolobato.org.	59
Figura 26: Número de espécimes capturados por ponto de coleta (SLB – Sitio do Lobato), (ABR- Abrigo de cães), (CCZ- Centro de controle de zoonoses) no município de Poços de Caldas-MG, no período de março de 2018 a fevereiro de 2019.	60
Figura 27 Médias de temperatura e umidade por número de espécimes no Município de Poços de Caldas-MG, no período de março/2018 a fevereiro /2019.	60
Figura 28 (A) Espécies de Flebotomíneos coletados no município de Andradas-MG no período de março 2018 a fevereiro de 2019; (B) Quantitativo de flebotomíneos coletados, separados por gênero no município de Andradas – MG no período de março de 2018 a fevereiro de 2019.....	62

Figura 29 Médias de temperatura e umidade por quantidade de insetos coletados por mês de coleta, no município de Andradas-MG no período de março de 2018 a fevereiro de 2019.	62
Figura 30 (A) Realização de teste rápido DPP® com leitor;(B) leitura de teste rápido DPP® negativo;(C) leitura de teste rápido DPP® positiva;(D) teste rápido DPP® positivo (reação fraca).	63
Figura 31- Resultado de amostras coletadas de cães do CCZ e Abrigo Municipal de Poços de Caldas.	64
Figura 32 (A) curva de amplificação para controles positivos de <i>Leishmania brasiliensis</i> (a 100 e 10fg µl) e três amostras positivas(0694,0879,1134)cuja fluorescência ultrapassa o <i>threshold</i> . (B) curva de amplificação do controle exógeno de amplificação do controle interno exógeno (IAC) para todas as amostras de cão do estudo dos municípios de Poços de Caldas-MG e Espírito Santo do Pinhal - SP	65
Figura 33 Eletroforese em gel de agarose à 2% corado com Nancy para avaliação de infecção natural em fêmeas de flebotomíneos por <i>Leishmania</i> sp. M: Marcador de peso; Em A - (1-2); B – (3,4); C- (5,6) Controles negativos - DNA extraído de flebotomíneos machos; Em A(1-6); B(7-12);C(12-17) - Fêmeas de flebotomíneos coletados nos municípios Poços de Caldas e Andradas –MG submetidas ao diagnóstico molecular que se apresentaram negativas para <i>Leishmania</i> spp. Em D-Hibridização dos produtos amplificados com sonda específica para <i>Leishmania infantum</i> (Dot-Blot) – 1: <i>Psychodopygus lloydi</i> – peridomicílio- Sitio do Lobato (Poços de Caldas-MG); 2 e 3: controles positivos (sinal mais intenso) - 10 µL DNA de <i>L. (L.) infantum</i> (658 ng/ µL) (MHOM/MA/67/ITMAP263) extraído de cultura celular.	69

Lista de Tabelas

Tabela 1 Pontos de coleta de flebotomíneos em Poços de Caldas-MG, com indicações de Latitude, Longitude e Altitude.	47
Tabela 2 Temperatura mínima e máxima x precipitação em Poços de Caldas durante o ano de coleta . Fonte: Samsung.weather.com	57
Tabela 3 Resultado de amostras analisadas individualmente por PCR em TEMPO REAL X DPP®, provenientes de pools positivos analisados.	66
Tabela 4 Relação de espécimes fêmeas de flebotomíneo enviadas para diagnóstico de infecção natural, de acordo com local de coleta e espécie. Em vermelho, é apresentada a amostra que foi positiva para a detecção de <i>Leishmania infantum</i> , de acordo com a técnica de hibridização com sonda espécie-específica.....	68

Lista de Siglas e Abreviaturas

ABR- Abrigo de Cães
BEPA- Boletim Epidemiológico Paulista
CCZ- Centro de Controle de Zoonoses
CDC- Center for disease control (Centro de Controle de doenças)
CEUA - Comissão Ética do uso de animais
DNA - deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
DPP- Dual Patch Platatfom
DRS - Departamento Regional de Saúde
EDTA- Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
ESP – Espírito Santo do Pinhal
FIOCRUZ – Fundação Osvaldo Cruz
FOZ- Fazenda do Ozório
GVE – Grupo de vigilância epidemiológica
HIV- Human Immunodeficiency Vírus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Rec. Naturais Renováveis
IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDHM- Índice de Desenvolvimento Humano
IOC – Instituto Osvaldo Cruz
kDNA – DNA do cinetoplasto
L- *Leishmania*
LABIMDOE – Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas
LDP – Laboratório de doenças parasitárias
LTA-Leishmaniose tegumentar americana
LV- Leishmaniose visceral
LVA- Leishmaniose visceral americana
LVC- Leishmaniose visceral canina
ONG- Organização não governamental
PCR- polimerase chain reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PVCLV- Programa de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral
SB- Sabortolan
SES- Secretaria de Estado de Saúde
SLB- Sítio do Lobato
SR - Serviço regional
SUCEN- Superintendência de Controle de Endemias
TR – Teste Rápido
UV- Ultravioleta

Lista de Símbolos

% - Porcentagem
°C – Graus celsius
C- Controle
MgCl- Cloreto de magnésio
Ct- Treshold
dNTP- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
HCl – Ácido Clorídrico
H₂O - Molécula de água
KCl – Cloreto de Potássio
km – Quilometros
m – Metro
Mg – Migonemyia
ml – Mililitros
mm – milímetros
NaOH – Hidroxido de Sódio
NaCl- Cloreto de Sódio
nm – Nanomolar
Pb- Pares de Base
PBS – Tampão fosfato

Pi – Pintomyia

Ps - Psychodopygus

pmol/UL- Picomoles por microlitro

SDS- Dodecil Sulfato de Sódio

T- Teste

TBE – Tris-borato-EDTA

TE – Tampão Tris-EDTA

Tris – Trisma Base

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses representam um grupo de doenças com ampla distribuição geográfica no Novo e Velho Mundo, sendo um importante problema de saúde pública mundial. As leishmanioses cutânea, mucocutânea e visceral correspondem às principais síndromes clínicas encontradas nos seres humanos (1). As leishmanioses também são consideradas um conjunto de doenças tropicais, pertencendo ao grupo das doenças negligenciadas no mundo. Elas vitimam mais de 12 milhões de pessoas, ocorrendo dois milhões de casos novos a cada ano e 350 milhões de pessoas em risco de contrair a infecção, principalmente em áreas com alto índice de pobreza. Existe em todo o mundo um total de 98 países com transmissão endêmica relatada (2,3). A pobreza é um dos fatores importantes no contexto das leishmanioses, porém não o principal (2). A leishmaniose pode se apresentar em diferentes formas clínicas, de acordo com a espécie de *Leishmania* e da relação do parasito com seu hospedeiro, sendo classificadas em quatro formas clínicas: leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea mucosa e leishmaniose cutânea difusa, sendo as duas principais a leishmaniose cutânea ou tegumentar e a visceral(4).(Figura 1).



Figura 1- Espectros clínicos da leishmaniose em pacientes. A - Leishmaniose Cutânea. B – Leishmaniose Difusa. C – Leishmaniose cutânea mucosa. D – Leishmaniose Visceral ou Calazar. E – Leishmaniose Dérmica Pós Calazar. (Adaptado Brasil, 2007.)

Epidemiologia

Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Moreira em 1895(5) foi quem identificou pela primeira vez no Brasil a presença do chamado “botão endêmico dos países quentes”, chamando também “Botão da Bahia” ou “Botão de Biskra”. Lindenberg em 1909 identificou as formas do parasita em úlceras cutâneas (6) de material coletado de trabalhadores de áreas desmatadas para construção de rodovia. Em1911, Splendore, (7), relatou a forma mucosa. A Leishmaniose tegumentar americana que era conhecida como zoonose que acometia animais silvestres e oportunamente humanos em região de floresta passa a ser uma grande preocupação para a vigilância epidemiológica por apresentar mudanças frequentes de padrões (8).

A LTA é encontrada na maioria dos países americanos, exceto do Uruguai e Chile (9,10). No Brasil, este agravo está e presente em todas as regiões do país (11,12). A LTA se expandiu na década de 80 e em 2003 já fazia vítimas em quase todos os estados, e daí para frente estava presente em todas as regiões do país. A subnotificação se apresenta como um grande problema no controle da LTA, além de diagnósticos equivocados, pacientes assintomáticos e o grande número de agentes etiológicos envolvidos (13). Atualmente são reconhecidas 11(onze) espécies de *Leishmania* que participam na transmissão no Novo Mundo, e oito espécies descritas, até o momento, somente em animais (quadro 1).

Quadro 1: Principais espécies de *Leishmanias* responsáveis pelas leishmanioses nas Américas, sua distribuição geográfica, vetores e formas clínicas.

ESPÉCIE DE <i>LEISHMANIA</i>	DISTRIBUIÇÃO GEOGRAFICA	VETOR	FORMA CLÍNICA
<i>L. (Leishmania) infantum</i>	América do Sul e América Central	<i>Lu.longipalpis, Lu.cruzi, Lu.evansi</i>	Visceral
<i>L(Viannia) braziliensis</i>	América do Sul e América Central	<i>Ny. intermedia, Ny. neivai, Ny. whitmani, Mi. migonei, Ps. wellcomei, Ps. complexus</i>	Cutânea e mucocutânea
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	Norte do Brasil, Guiana Francesa e Suriname	<i>Ny.umbratilis</i>	Cutânea
<i>L. (Viannia) panamensis</i>	Norte da América do Sul e América Central	<i>Ny. trapidoi, Ny. ylephiletor, Lu. gomezi, Ps. panamense</i>	Cutânea
<i>L. (Viannia) peruviana</i>	Peru	<i>Lu. peruensis, Lu. verrucarum</i>	Cutânea
<i>L. (Viannia) lainsoni</i>	Norte do Brasil, Bolívia e Peru	<i>Tr. ubiquitalis, Lu. nuneztovari, Tr. velascoi</i>	Cutânea
<i>L. (Viannia) naiffi</i>	Norte do Brasil e Guiana Francesa	<i>Ps. ayrozai</i>	Cutânea
<i>L.(Viannia) shawi</i>	Norte do Brasil	<i>Ny. whitmani</i>	Cutânea
<i>L (Viannia) colombiensis</i>	Colômbia e Panamá	<i>Lu. hartmanni, Lu. gomezi, Ps. panamensi</i>	Cutânea

<i>L. (Viannia) lindenbergi</i>	Norte do Brasil	<i>Ny. antunesi</i>	Cutânea
<i>L. (Leishmania) amazonenses</i>	América do Sul e América Central	<i>Bi. flaviscutellata, Pi. nuneztovari</i>	Cutânea – Difusa
<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	Sul dos Estados Unidos. México e América Central	<i>Bi. olmeca</i>	Cutânea –Difusa
<i>L. (Leishmania) venezuelensis</i>	Venezuela	<i>Bi. olmeca bicolor</i>	Cutânea

Fonte: Adaptado de Brazil et al. 2015

Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) é um agravo de notificação compulsória segundo a Portaria de consolidação nº4 de 28 de setembro de 2017 ,constando no Guia de Vigilância em Saúde(14), considerada como uma doença negligenciada com grande letalidade, principalmente em indivíduos sem tratamento e crianças em estado de desnutrição e indivíduos imunodeprimidos como portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Ocorre na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, recebe o nome de leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar neotropical. (15).

Encontrada na América Latina, em aproximadamente em 12países, e no Brasil 90% dos casos ocorrem na Região Nordeste (15).(Figura 2)

Distribuição espacial da leishmaniose visceral no mundo

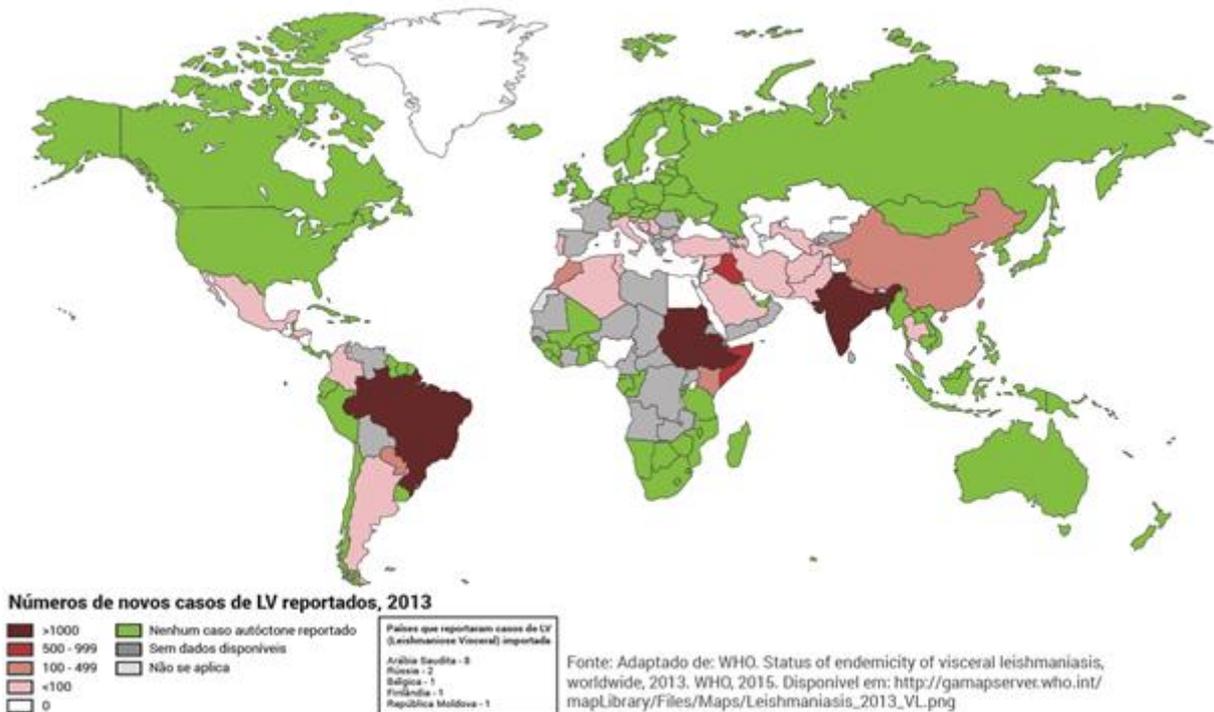


Figura 2- Mapa de distribuição de leishmaniose visceral no Mundo. Adaptado de WHO 2015. Disponível em: <http://gamapservet.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis2013VL.png>.

A doença no Brasil foi descrita pela primeira vez em 1913, por Migone (16). A partir daí *Lutzomyia longipalpis* aparece como principal espécie vetora e apareceram os primeiros relatos da infecção canina. Depois disso a LV foi encontrada em vários municípios, de todas as regiões do Brasil. Uma doença que era predominante de zona rural, hoje acomete pessoas em grandes centros urbanos (8). As estratégias de controle da doença se limitavam ao reservatório canino, através de eutanásia, e do controle vetorial, porém isso não foi suficiente para a redução dos casos. Por isso, houve necessidade e de se repensar as estratégias utilizadas pelo Programa de vigilância e controle de leishmaniose visceral – PVCLV.

O hospedeiro silvestre pode ser considerado como reservatório natural das *Leishmanias*. Em hospedeiros acidentais, incluindo o homem e animais domésticos, a infecção é sintomática (9). O calazar canino é mais prevalente que no humano e precede a endemia (17). Evoluiu lentamente, levando a acentuado emagrecimento, perda de pelos e apatia, onicogribose, porém frequentemente assintomático, embora com alto grau de parasitismo nas vísceras e pele mesmo com aparência saudável.

Os Flebotomíneos

Os flebotomíneos são pequenos insetos medindo de 2 a 3 mm, são holometábolos, (Figura 3) e apresentam intensa pilosidade ao longo de todo o corpo (18), com coloração amarelada ou palha, repousam com as asas eretas e abertas. Constituem um grupo de insetos de origem antiga, com registros fósseis datando de cerca de 120 milhões de anos (19). Estão distribuídos por todos os continentes, presentes no mundo com aproximadamente 800 espécies, das quais, 470 ocorrem nas Américas e metade delas no Brasil (20). A distribuição dos flebotomíneos nas Américas se estende desde o sul do Canadá até o Sudeste da Argentina (21,22). Algumas espécies são amplamente distribuídas, outras são mais restritas a uma determinada região, com distribuição local e até mesmo focal (23).

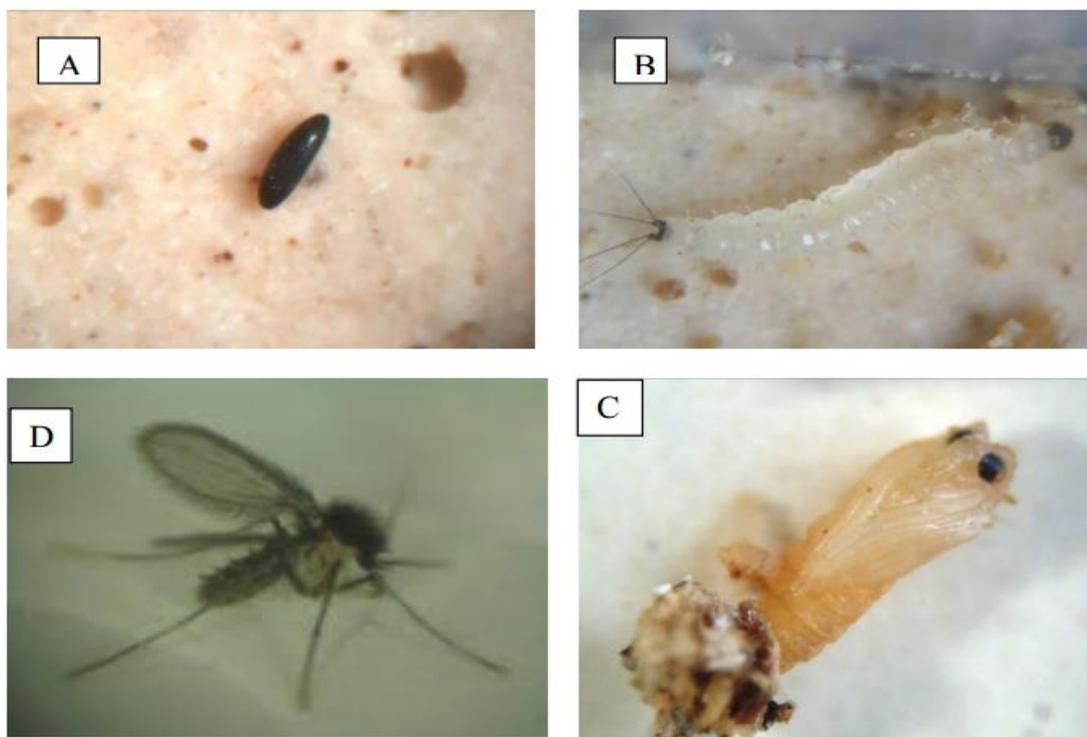


Figura 3: Ciclo biológico holometábolo do flebotomíneo, apresentando desenvolvimento em 4 fases distintas (A) ovo; (B) larva; (C) pupa; (D) adulto; Fonte: Ovallos 2011

No Brasil, os flebotomíneos estão em todos os estados(24,25). São conhecidos popularmente como “asa branca”, “birigui”, “cangalhinha”, flebótomo (ou fleboti), mosquito-palha e tatuquira (26).

Essa variação de nomes populares mostra como a população pode distingui-los de outros insetos hematófagos. As suas formas imaturas desenvolvem-se em solo

úmido, ao abrigo da luz, rico em matéria orgânica, entre raízes expostas, embaixo de folhas caídas e de pedras, em gretas de rochas, tocas de animais e no ambiente antrópico, em chiqueiro, galinheiro ou outros ecótopos em que as condições adequadas se fizerem presentes (26). Ambos os sexos necessitam de açúcares em sua dieta. Embora existam relatos de encontros de machos com sangue em seu tubo digestivo (27), apenas as fêmeas são consideradas hematófagas, se alimentando em um largo espectro de animais representados por mamíferos, aves e também animais de sangue frio (28–32).

A atividade hematofágica de maneira predominante é noturna, mas também podem ocorrer durante o dia (33).

As formas aladas abrigam-se nos mesmos locais de criadouros, em tronco de árvores e folhas de arbustos caídas no chão.

Ambos os sexos não se afastam muito dos seus criadouros ou locais de abrigos, embora possam ser capturados até cerca de 1 km do ponto de soltura, com a maioria não indo além dos 250m (30).

Entre os flebotomíneos americanos, cerca de 60 espécies (13%) são antropofílicas e podem estar associadas às condições ambientais que o homem vem modificando na sua busca pela sobrevivência e produtividade (25). Dentre elas são encontradas as espécies vetoras de *Leishmania*, causadoras de LTA e LVA.

Os flebotomíneos têm grande importância médica, não só pelo fato de atuarem como vetores de arboviroses, bartonelose e das leishmanioses, mas também são incluídas como insetos importunos, devido à sua picada dolorida, com frequentes reações alérgicas. Também foram isolados do tubo digestivo de flebotomíneos tripanosomatídeos de importância para o homem, ainda por esclarecer, pertencentes aos subgêneros *Herpetosoma* e *Megatrypanum* (34,35).

Entre os parâmetros estudados para a incriminação de uma espécie como vetor de determinada parasitose, além da distribuição geográfica coincidente com a da doença e da competência vetorial, são fatores relevantes, o seu grau de relacionamento com os reservatórios e/ou homem, densidade e taxa de infecção natural pelo parasito.

Conhecer a diversidade de espécies de flebotomíneos e sua abundância relativa fazem parte dos itens necessários para compreender a história natural dos parasitos transmitidos por estes insetos (36). Além disso, são importantes também

para determinar os níveis de antropofilia e zoofilia das espécies e sua distribuição ecológica, principalmente nas áreas endêmicas para leishmanioses (37).

Memmott(38), em sua pesquisa sobre a distribuição e abundância de flebotomíneos em uma floresta úmida na Costa Rica, também afirma que são importantes quatro aspectos nos estudos sobre fauna flebotomínica: determinação da fauna existente, o efeito da vegetação na distribuição das espécies, a distribuição vertical de cada uma das espécies em um determinado ambiente e a distribuição das espécies em seus abrigos diurnos.

Pouco se conhece sobre a distribuição ecológica das espécies de flebotomíneos, uma vez que os mesmos se distribuem de acordo com seu local de abrigo, de maneira bem focal (26). Estudos como o de Casanova (39) tentam compreender melhor esta distribuição das espécies, principalmente daquelas de importância na transmissão de *Leishmania* para o homem. Segundo o estudo de Killick-Kendrick em 1990(40), entre os sete critérios que incriminam os potenciais vetores de *Leishmania*, é fundamental que os insetos capturados sejam portadores de promastigotas no trato digestivo. Também sua densidade populacional tem papel importante para essa definição, principalmente associado a este primeiro fato.

Das espécies de flebotomíneos conhecidos, apenas 81 espécies (10% do total) têm sido incriminadas como vetoras de leishmanioses (41). Para 19 destas, houve comprovação de capacidade vetorial, 11 no Velho Mundo, pertencentes ao gênero *Phlebotomus* e oito ao gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo (40).

Um fato importante refere que um grande número de autores relatam a possibilidade de mudanças no quadro epidemiológico das leishmanioses nas regiões Sudeste e Sul do Brasil e de alguma forma, indicam possíveis interferências ambientais alterando o comportamento de algumas espécies de vetores, ou vetores em potencial, devido principalmente às alterações antrópicas que o meio ambiente tem sofrido nestas áreas (42–46).

Leishmaniose Canina

A leishmaniose canina é considerada um problema de saúde pública em vários países, incluindo o Brasil, onde os cães são considerados o principal hospedeiro doméstico para a infecção humana de LV(47). Esses animais são altamente

suscetíveis à infecção e representam importante fonte de infecção por causa do intenso parasitismo da pele na infecção por Leishmaniose visceral canina(48,49).A LVC é considerada emergente e reemergente, devido ao aumento no número de cães soropositivos e pela expansão geográfica da doença (50), ela é mais prevalente que no humano e precede a endemia(17). É de evolução lenta, levando a acentuado emagrecimento, perda de pelos e apatia, onicogribose, porém frequentemente assintomáticos, embora com alto grau de parasitismo nas vísceras e pele mesmo com aparência saudável. (Figura 4)



Figura 4- Animais com manifestação sistêmica de leishmaniose visceral canina: (A) linfonodo poplíteo aumentado (infoadenomegalia-circulo). (B) emagrecimento com evidencição das costelas sob a pele e musculatura atrofiada. (C) Palidez de mucosas orais (D) atrofia de musculatura temporal.
Fonte: Msc. Mauricio Franco Zanette/ Dr. Claudio Nazaretian Rossi

Forma de transmissão das leishmanioses

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*(51) que são microrganismos que se encontram no interior das células do sistema fagocitário de vertebrados. As formas promastigotas, flageladas, estão presentes no

trato digestivo do inseto(52). As *Leishmanias* são transmitidas pela picada das fêmeas de flebotomíneos infectadas.

O ciclo do parasita ocorre em dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado, neste caso o flebotomíneo (53)(Figura 5).

A transmissão da *Leishmania* ocorre quando a fêmea do flebotomíneos infectada pica o hospedeiro enquanto faz o repasto sanguíneo, nesse processo ela inocula formas promastigotas que são fagocitadas por macrófagos se transformam em formas amastigotas. O parasita se desenvolve nesse meio e se multiplica, infectando outras células do sistema mononuclear fagocitário(54).

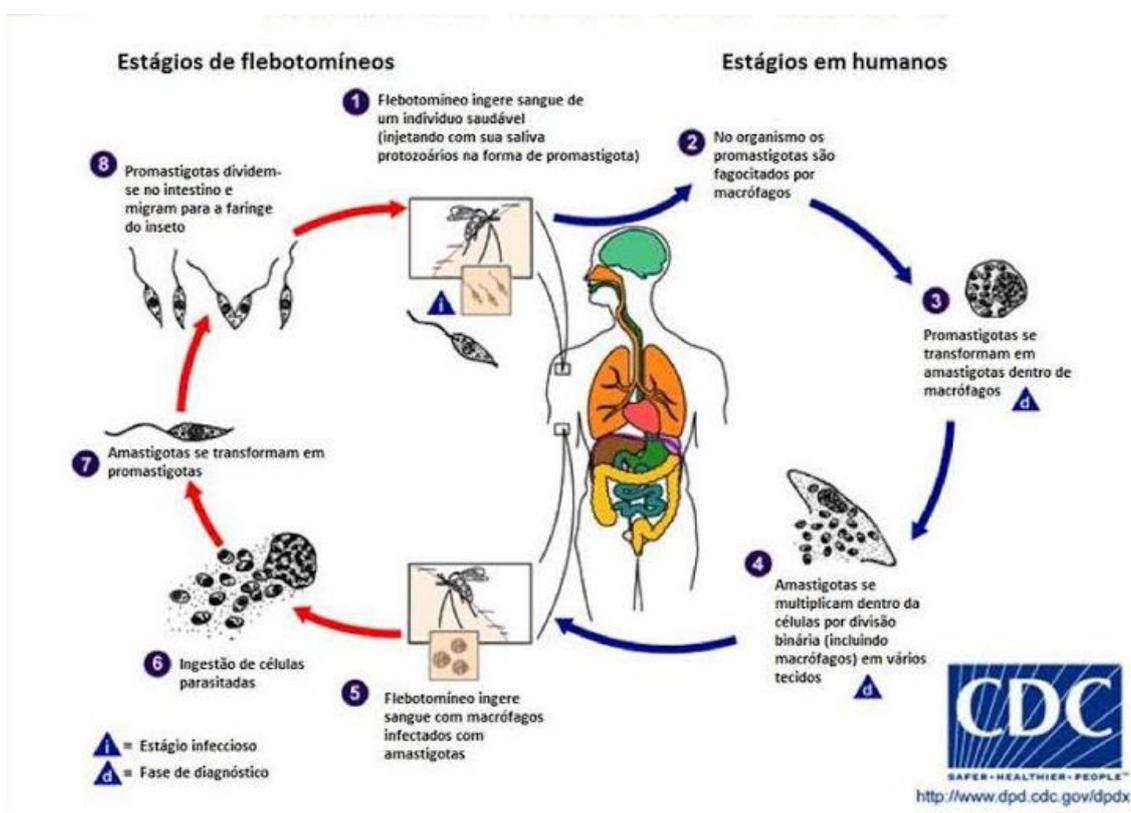


Figura 5: Ciclo biológico da *Leishmania* spp. O ciclo da *Leishmania* ocorre em duas fases, uma no hospedeiro vertebrado (setas azuis), e outra no hospedeiro invertebrado (setas vermelhas). Fonte: adaptado de CDC 2015.

Nas fêmeas de flebotomíneos, o parasita permanece na luz do trato digestivo e as formas amastigotas, (Figura 6) que foram ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em formas promastigotas, que são as flageladas, e estão prontas para serem inoculadas no próximo repasto(55).

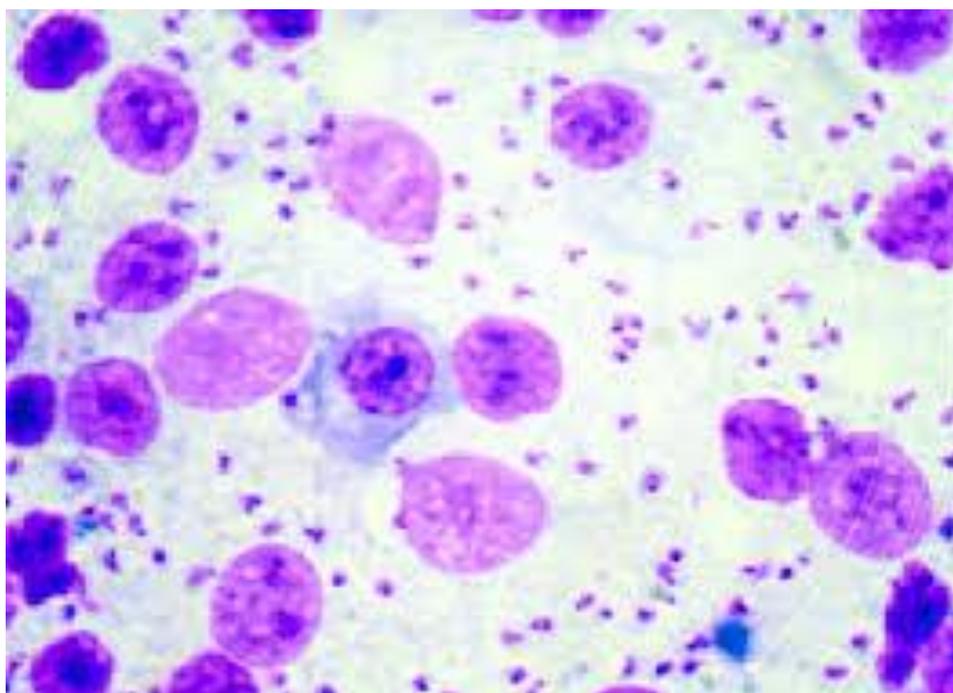


Figura 6: Formas amastigotas de *Leishmania* sp. observadas no exame parasitológico direto em amostra de linfonodo de cão sintomático para LVC, atendido no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Goiás, procedente do município de Caldas Novas. Fonte: Carlos Eduardo Fonseca-Alves

Podemos citar como exemplo de reservatórios das *Leishmanias* os animais silvestres, como roedores, gambás e canídeos silvestres como as raposas (50,56,57), além dos animais domésticos tais como: suínos(58), felinos (59). (Figura 7).



Figura 7 Reservatórios de *Leishmanias*. Na sequência Cão, raposa e marsupial
Fonte:<https://leishmaniosevisceralcanina.wordpress.com/2016/09/19/leishmaniose-visceral-uma-zoonose/>

A Superintendência Regional de Saúde de Pouso Alegre (SRS/Pouso Alegre), com 55 municípios sob sua coordenação, inclui os do Planalto de Poços de Caldas, onde este estudo foi desenvolvido. Localizada ao sul/sudoeste do estado de Minas Gerais, compreende uma região com áreas consideradas indenes para LV.

O município de Poços de Caldas se apresenta como uma dessas áreas, ao contrário da região norte e leste do estado, com municípios conhecidamente endêmicos para essa parasitose (60). Ressaltamos, entretanto, o potencial risco de introdução da LV como endemia nessa região, tendo em vista relato de casos importados de LV canina, além da notificação de casos autóctones de LV canina no município paulista de Espírito Santo do Pinhal, na região limítrofe com o estado de Minas Gerais (Figuras 8 e 9), localizado a 72 km do município de Poços de Caldas; ainda, nessa região limítrofe com Minas Gerais, detectou-se a presença do vetor *L. longipalpis* no município paulista de Águas da Prata (61,62). (Figura 10).

O estado de São Paulo atualizou os números de transmissão canina e humana, os municípios endêmicos foram classificados de acordo com a intensidade de transmissão da doença através do cálculo da média de casos autóctones em três anos consecutivos, (Figura 8) para isso, considerou-se o período de 2014 a 2017(63).

Quadro 1. Classificação epidemiológica dos municípios com transmissão de LV segundo o Programa de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral, por Serviço Regional (SR) da Superintendência de Controle de Endemias, Departamento Regional de Saúde (DRS) e Grupo de Vigilância Epidemiológica (GVE), estado de São Paulo, 2017

MUNICÍPIO	SR	DRS	GVE	CLASSIFICAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA
Caieiras	1	1	9	Transmissão canina
Cotia	1	1	10	Transmissão canina
Embu	1	1	10	Transmissão canina
Guarujá	2	4	25	Transmissão humana
Cerquillo	4	16	31	Transmissão canina
Salto	4	16	31	Transmissão canina
Sorocaba	4	16	31	Transmissão canina
Votorantim	4	16	31	Transmissão canina e humana
Campinas	5	7	17	Transmissão canina
Espirito Santo do Pinhal	5	14	26	Transmissão canina
Indaiatuba	5	7	17	Transmissão canina
Itupeva	5	7	17	Transmissão canina

Quadro 2. Classificação epidemiológica dos municípios do Estado do Estado de São Paulo com presença de vetor (*Lutzomyia longipalpis*) segundo o Programa de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral, por Serviço Regional (SR) da Superintendência de Controle de Endemias, Departamento Regional de Saúde (DRS) e Grupo de Vigilância Epidemiológica (GVE). 2017

SR	DRS	GVE	MUNICÍPIO	CLASSIFICAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA
5	14	26	Águas da Prata	Silencioso receptivo vulnerável
5	7	17	Águas de Lindoia	Silencioso receptivo vulnerável
8	15	29	Álvares Florence	Silencioso receptivo vulnerável
6	3	12	São Carlos	Silencioso receptivo vulnerável
8	15	30	São Francisco	Silencioso receptivo vulnerável
5	14	26	São João da Boa Vista	Silencioso receptivo vulnerável
5	7	17	Socorro	Silencioso receptivo vulnerável
8	15	30	Três Fronteiras	Silencioso receptivo vulnerável

Figura 8 Situação Epidemiológica de transmissão de leishmaniose visceral humana e canina, segundo Boletim Epidemiológico do estado de São Paulo. Adaptado por Garcia RP, 2019.

A partir do resultado, os municípios foram estratificados como: a) transmissão esporádica, o município que apresenta média maior que zero e menor que 2,4 casos; b) transmissão moderada, município com média maior ou igual a 2,4 e menor que 4,4; c) transmissão intensa, município com média a partir de 4,4 casos. (Figura 9) Foram considerados “prioritários” para as ações do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) os municípios classificados como de transmissão moderada e intensa.(63)

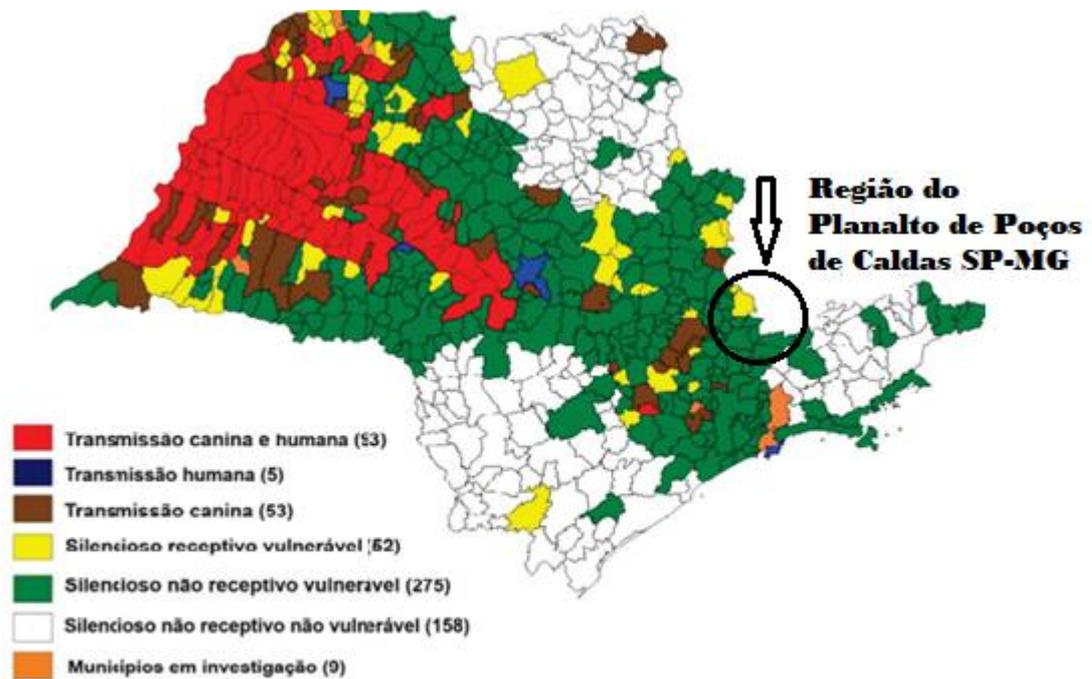


Figura 9- Classificação epidemiológica de leishmaniose visceral no Estado de São Paulo- dezembro 2017. Região limítrofe com o município de Poços de Caldas (seta), indicando a proximidade com municípios vulneráveis e receptivos segundo classificação da Secretaria de Estado de São Paulo (SES). Fonte: Secretaria de Estado de São Paulo (SES).

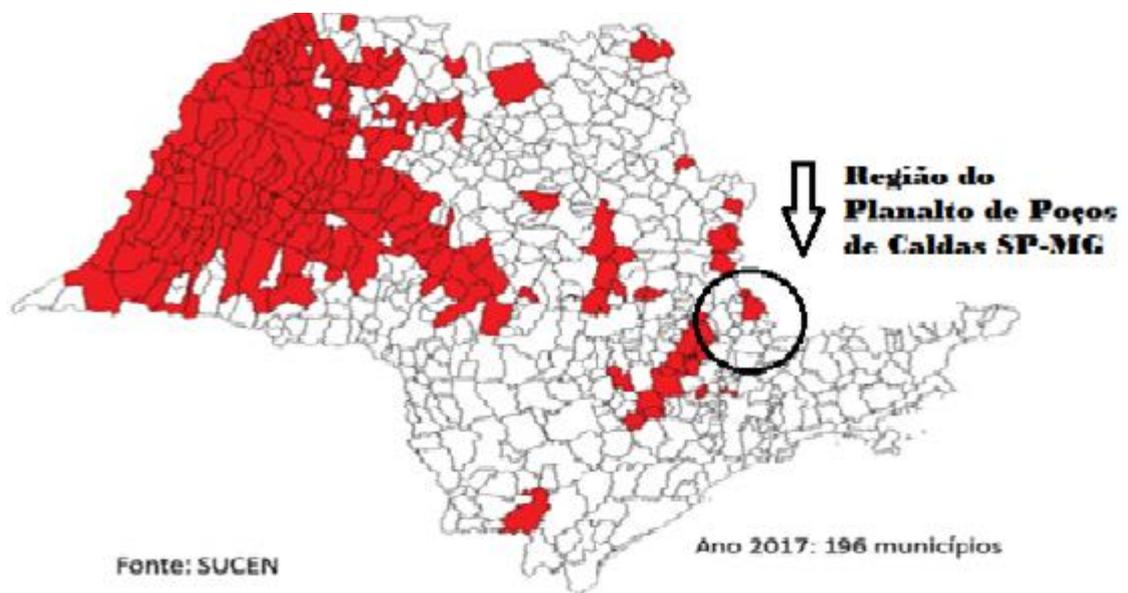


Figura 10 Distribuição dos Municípios do Estado de São Paulo com presença de *Lutzomyia longipalpis*-Dezembro 2017. Região limítrofe com o município de Poços de Caldas (seta) indicando a proximidade com Municípios vizinhos com presença de *Lu. longipalpis*. Fonte: Secretaria de Estado de São Paulo (SES).

Em Minas Gerais, a LV ocorre desde 1940, quando foram detectados os primeiros casos humanos na região Norte do estado. Nessa época, a doença era tipicamente rural, diferente do que se observa atualmente, em que 84% dos casos confirmados são residentes em zonas urbanas. A urbanização da LV ocorreu, possivelmente, devido a uma mudança de comportamento do vetor, em consequência às modificações socioambientais, como o processo migratório, deslocando para a periferia das cidades, populações humana e canina originárias de áreas rurais onde a doença era endêmica. (64). Face à expansão das leishmanioses em Minas Gerais (Figura 11) e mais recentemente para a região sul do Estado, aliada a pouca informação existente sobre os possíveis vetores na área sob investigação, são necessários estudos ecológicos sobre estes dípteros que possam contribuir para a elucidação da autoctonia dos casos, assim como contribuir com a implementação de medidas de vigilância vetorial.

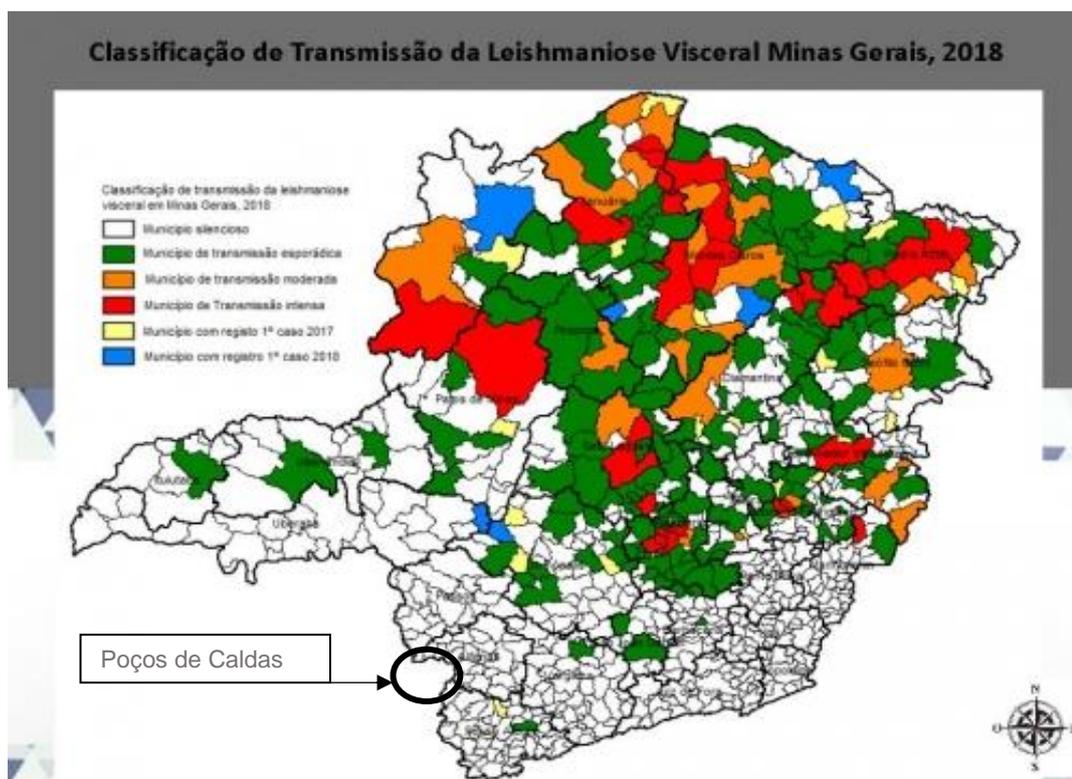


Figura 11 Mapa de Distribuição de Leishmaniose Visceral no Estado de Minas Gerais- Fonte Secretaria Estadual de Saúde(SES-MG)

2 JUSTIFICATIVA

O conhecimento da diversidade de espécies de flebotomíneos e sua abundância relativa fazem parte dos itens necessários para a compreensão da história natural dos parasitos transmitidos por estes insetos (36). Os cães são considerados os principais reservatórios de *Leishmania infantum* podendo desenvolver leishmaniose visceral caninos sendo os reservatórios mais importantes na transmissão no peridomicílio, em áreas urbanas e periurbanas, uma vez que os animais assintomáticos, que não apresentam sinais clínicos da doença, podem ser uma fonte de infecção para vetores (65). Diante disso, torna-se importante realizar um estudo da fauna flebotomínica analisando o transecto entre os municípios limítrofes dos estados de Minas Gerais e São Paulo, que compreendem os municípios de Poços de Caldas, Andradas, e Espírito Santo do Pinhal, avaliando a infecção natural dos flebotomíneos e realizando o diagnóstico molecular dos cães lotados nos Centros de controle de zoonoses (CCZ) destas cidades.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Realizar análise epidemiológica de leishmaniose visceral na região do Planalto de Poços de Caldas, através do diagnóstico molecular de cães albergados nos CCZs de Poços de Caldas (MG) e Espírito Santo do Pinhal (SP) e análise da fauna flebotomínica nos municípios de Poços de Caldas e Andradas para a detecção de *Leishmania sp.* nos insetos coletados.

Objetivos Específicos

- Capturar e identificar as espécies de flebotomíneos presentes na região compreendida entre os municípios de Poços de Caldas (MG) e Andradas (MG).
- Fazer a detecção molecular de *Leishmania* nos flebotomíneos fêmeas coletadas através do método de PCR em Tempo Real.
- Realizar diagnóstico molecular de leishmaniose canina através do método de PCR em tempo real, a partir de amostras de sangue dos cães existentes nos CCZ de Espírito Santo do Pinhal (SP) e Poços de Caldas (MG).
- Realizar análise integrada dos dados para avaliação epidemiológica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Áreas de Estudo

O Estado de Minas Gerais se divide em 853 municípios, com população estimada de 20.997.560 habitantes(66). A Secretaria de Estado da Saúde, por meio das Vigilâncias Ambiental e Epidemiológica, é a Instituição responsável pela notificação, tratamento, controle e avaliação das principais endemias, inclusive das leishmanioses. Sendo assim, para melhor gerenciar este trabalho ela se divide, administrativamente, em 25 Regionais de Saúde.

No presente estudo, as áreas investigadas localizam-se no Planalto de Poços de Caldas, (Figura 12) situado ao sudoeste do Estado, constituindo os municípios de Poços de Caldas-MG, Andradas-MG e Espírito Santo do Pinhal - SP. A Escolha dessa área se justifica devido à presença confirmada de *Lutzomyia longipalpis* no município paulista de Espírito Santo do Pinhal(62), que faz fronteira com Poços de Caldas juntamente com outros municípios do Estado de São Paulo e também pela extensa malha viária que liga os municípios.

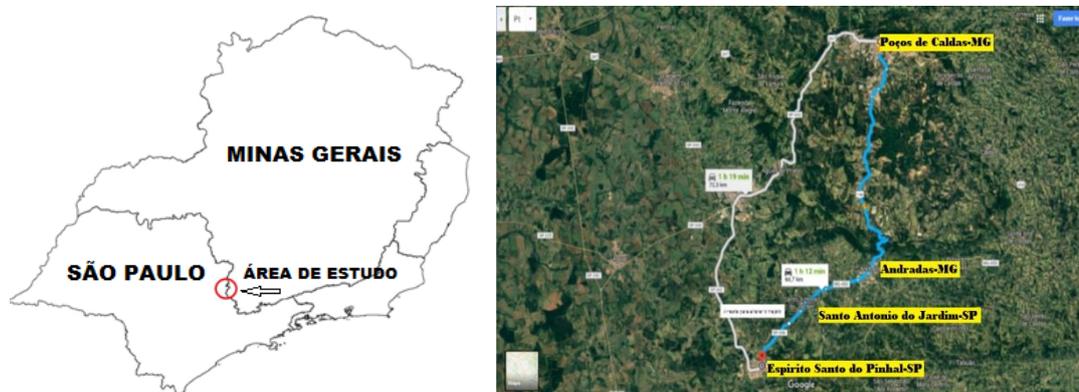


Figura 12 Transecto entre os municípios de Poços de Caldas-MG e Espírito Santo do Pinhal- SP. Região escolhido para o estudo. Fonte: <https://www.google.com/maps/dir>

Segundo estima o IBGE, 2019(67) a população em Poços de Caldas é de aproximadamente 167.397 habitantes, sendo 96,5% deles vivendo na área urbana. Na década de 90, a população do município aumentou 2,66% ao ano. Este fato provavelmente se deve em grande parte a chegada de muitos migrantes buscando melhorar de vida. Na década de 80 o crescimento da população foi de 1,34%, (68). Poços de Caldas tem aproximadamente 168 bairros urbanos, se expandindo na

direção oeste e tem ao norte sua expansão limitada pela serra de São Domingos, tombada e com proposta para se converter em área de preservação permanente.

Poços de Caldas tem no turismo sua principal atividade comercial e, também é muito conhecida por suas fontes de águas minerais que são usadas no tratamento de diversas enfermidades. (Figura 13).



Figura 13: Termas Antônio Carlos- utilizado para banhos termais e tratamentos à base de hidroterapia. Localizado no município de Poços de Caldas-MG. Fonte: Foto g1.com. br.

Devido à proximidade com grandes centros como São Paulo, Campinas, Belo Horizonte e Rio de Janeiro, costuma receber muitos turistas, que vem em busca de sossego e acabam por movimentar a economia adquirindo artesanatos, doces caseiros e os tão famosos cristais produzidos no próprio município (Figura 14). Também existem muitas pessoas que chegam à cidade para tratamentos com águas sulfurosas. Poços de Caldas também é famosa pela sua produção de sabonetes artesanais. (69).



Figura 14: Arte em vidro. Atividade econômica e tradicional do município de Poços de Caldas-MG. Fonte: <https://cristaiscadoro.com.br/blog/fabricacao-100-artesanal-cristais-ca-doro>

Características de Relevo e Vegetação

Poços de Caldas (MG)

O município de Poços de Caldas se localiza no Sudoeste do estado de Minas Gerais, fazendo fronteira com o estado de São Paulo, é o município mais desenvolvido da região. Sua área física é de 750 km² somando toda sua extensão que compreende montanhas, campos e vales, a cidade propriamente dita ocupa 544 km². Possui altitude média de 1.200m, sendo que pode chegar a 1.686m no Cristo Redentor, que fica no alto da Serra de São Domingos. Da área total de 544 km², aproximadamente 85 km² são áreas rurais, e a área urbana ocupa 459km², a zona rural se limita com oito municípios: Botelhos, Bandeira do Sul, Caldas, Andradas e os municípios de Águas da Prata, São Sebastião da Gramma, Caconde e Divinolândia, que pertencem ao estado de São Paulo(69).(Figura 15)

Os solos de Poços de Caldas têm características geológicas diversificadas com rochas de interesse para mineração, como exemplo as jazidas de bauxita, argila refratária, minérios de ferro (69).



Figura 15: Mapa de municípios do entorno de Poços de Caldas-MG. Mostrando as localidades mais próximas da Cidade de Poços de Caldas. Fonte: <http://www.pocosdecaldas.mg.gov.br>

Características do clima e vegetação

O clima de Poços de Caldas se caracteriza por possuir invernos secos e verões brandos. No inverno de abril a setembro tem temperatura média de 15° C, o verão de outubro a março com temperatura média de 21°C, o índice pluviométrico anual é de 1745 mm. Apresenta temperaturas mínimas de -6° C, podendo ocorrer geadas, e máximas de 31,7°C(69). A umidade média é de 79% e pode chover até 190 dias durante o ano. A velocidade do vento varia entre 5 a 10 km/h. Predominam no município dois tipos básicos de vegetação natural: campo e floresta tropical. Os campos são constituídos por arbustos baixos e gramíneas rústicas, com regiões de mata pouco densa que circunda todo o município(69).



Figura 16: Mapa da divisão política do Estado de Minas Gerais, indicando a localização do município de Poços de Caldas, e sua proximidade com municípios vizinhos do Estado de São Paulo. Fonte https://pt.wikipedia.org/wiki/Pocos_de_Caldas

Andradas (MG)

O município de Andradas fica a 30 km de Poços de Caldas, foi criado em 1888 e ocupa uma área de 467,00 km² possui dois distritos: Gramínea e Campestrinho. Segundo o IBGE em 2017, sua população era de 40.299 habitantes, sendo que 81% viviam em área urbana(70). A distância até Belo Horizonte é de 498 km, servida por duas rodovias que fazem ligação regional: A rodovia BR146 que liga o município a Poços de Caldas e a rodovia MG 455, que faz ligação com a rodovia Ademar de Barros (SP 340), que por sua vez faz ligação com o estado de São Paulo através da região de Campinas.

O clima de Andradas é quente e temperado com maior índice pluviométrico no verão com média anual de 1579 mm, a temperatura média é de 20°C podendo variar entre 22,7°C e 16°C dependendo da estação do ano(71).A vegetação consiste em pastagens e as matas ciliares. Já nas regiões mais altas a vegetação natural é predominantemente de plantas rasteiras. Encontramos em Andradas três diferentes tipos de relevo: os altos planaltos, variando entre 1.350 e 1.500 metros, colinas arredondadas e alinhadas e região serrana, onde está localizada a Serra do Caracol. A altitude pode variar entre 1400m e 1657m no Pico do Gavião, muito conhecido por

praticantes de voo livre(70). Andradas não possui CCZ, os cães são abrigados por protetores e ONGs.



Figura 17: Mapa da Divisão Política do Estado de Minas Gerais, indicando a localização do Município de Andradas -MG, e sua proximidade com municípios vizinhos do Estado de São Paulo.

Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Andradas>

Espírito Santo do Pinhal (SP)

Espírito Santo do Pinhal, (Figura18) localizado no estado de São Paulo, fazendo divisa com Poços de Caldas, com extensa malha viária ligando os dois estados. Com extensão territorial de 389,4 km². Segundo o IBGE, em 2019 o município tinha cerca de 44.330 habitantes no último censo. Faz divisa com municípios mineiros e paulistas como: Albertina, Andradas, Estiva Gerbi e São João da Boa Vista. Possui altitude de 861 metros(72). Tem clima temperado e quente, com menos pluviosidade no inverno que no verão. A temperatura média em Espírito Santo do Pinhal é de 19.4 °C. A pluviosidade média anual é 1531 mm. O mês mais seco é julho, cuja precipitação é de 24 mm(72).



Figura 18: Mapa de Divisão Política do Estado de São Paulo indicando a localização do município de Espírito Santo do Pinhal em região de fronteira com o município de Andradas -MG. Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Espírito_Santo_do_Pinhal

Técnica de capturas e procedimentos para a identificação das espécies.

As capturas de flebotomíneos foram realizadas em ambientes silvestres e peridomiciliares no período de 12 meses consecutivos (março de 2018 a fevereiro de 2019), das 17h às 8h, obedecendo-se os horários de crepúsculos vespertinos e matutinos, com periodicidade mensal. Os ambientes peridomiciliares eram compostos por moradores e animais domésticos, lago, pomar e mata preservada. Foram utilizadas armadilhas HP tipo CDC (73) para a captura dos insetos. As armadilhas foram adaptadas para utilização com potes de plástico (capacidade 200 ml) ao invés das gaiolas de pano. Os potes plásticos contendo álcool a 80% foram presos à armadilha por um pedaço (20 cm) de meio fina de seda fixada na base da armadilha. Atraindo os insetos pela luz, onde são sugados pela ventilação e caem direto no álcool. Esta modificação visou a preservação dos insetos para a montagem e posterior identificação (74). (Figura 19).



Figura 19 Pontos de Coleta: (A)Sítio do Lobato , (B)Fazenda do Ozório no período de março de 2018 a fevereiro de 2019,no município de Poços de Caldas-MG. Fonte Arquivo Pessoal.

Todos os pontos são próximos a Serra de São Domingos, que contorna o município e é considerada “Unidade de Conservação” com 1686 metros de altitude. Foram distribuídas 02 armadilhas no CCZ municipal (CCZ1 E CCZ2), 02 armadilhas no abrigo de cães municipal (ABR1 E ABR2), 02 armadilhas no Restaurante Sabortolan (SB1 E SB2), 01 no Restaurante Fazenda do Ozório (FOZ) e 02 no Sitio do Lobato (ONG) (SLB1 E SLB2) (Figura 21).

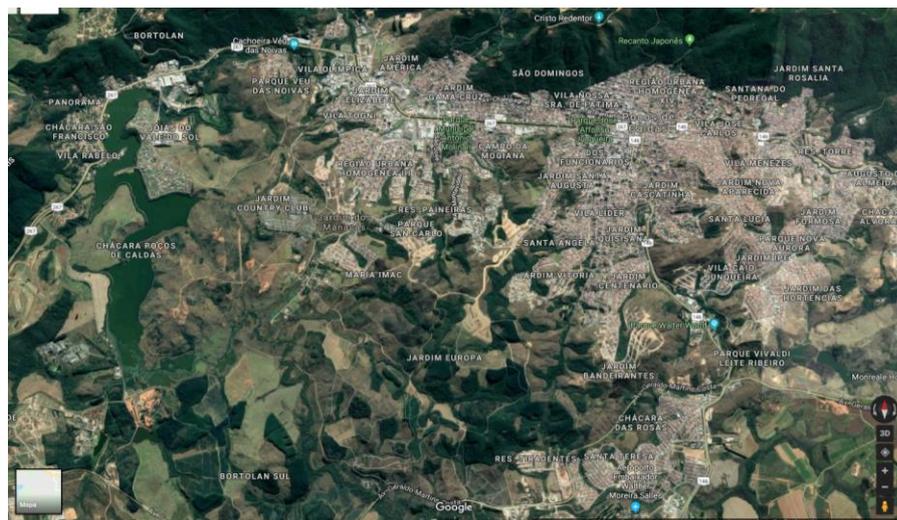


Figura 20: Foto de satélite da distribuição de armadilhas nos pontos de coleta: (01) Sabortolan; (02) Fazenda do Ozório; (03) CCZPC; (04) Sítio do Lobato; (05) Abrigo de animais, no período de março de 2018 a fevereiro de 2019,no município de Poços de Caldas-MG. Fonte: Google Earth.

As localidades pesquisadas, embora se localizem em vários bairros do município de Poços de Caldas, apresentam vegetação semelhante, com pequenas porções de matas remanescentes juntamente com áreas de plantio próximo às residências. Todos os pontos foram georreferenciados conforme a Tabela 1.

Tabela 1 Pontos de coleta de flebotomíneos em Poços de Caldas-MG, com indicações de Latitude, Longitude e Altitude.

Ponto	Latitude	Longitude	Altitude
SB1 (Mata)	-21.7877212	-46.6463318	1333 m
SB2(quintal)	-21.7877212	-46.6463318	1333 m
FOZ (jabuticabeira)	-21.5276669	-55.6083129	1191 m
CCZ1(Baia)	-21.805885	-46.612827	1271 m
CCZ2(fora)	-21.805781	-46.612617	1271 m
SLB1(árvore)	-21.783372	-46.536340	1281 m
SLB2 (Oco árvore)	-21.783372	-46.536340	1281 m
ABR 1(Baia)	-21.811180	-46.574131	1274 m
ABR2(casa)	-21.811293	-46.573582	1274 m

No município de Andradas as armadilhas foram distribuídas em peridomicílio, numa região de mata nativa, onde existe uma plantação de bananas e abrigos de animais domésticos (cães, galinhas entre outros), latitude: -22.0353054, longitude: -46.5610987 foram distribuídas 03 armadilhas dentro da propriedade ficando 01 entre as bananeiras, 01 próximos ao açude e 01 no galinheiro (Figura 22).



Figura 21: Foto de satélite da distribuição de armadilhas no ponto de coleta: Café Aroma da Serra -- Estrada Poços de Caldas-Andradas Km 04, no período de março de 2018 a fevereiro de 2019, no município de Andradas-MG. Fonte: Google Earth.

Em Poços de Caldas e Andradas a captura dos flebotomíneos foi realizada em parceria com as equipes municipais de Vigilância, por um período de 12 meses. Foram utilizadas armadilhas luminosa HP (tipo CDC) alimentadas com baterias de 6 Volts (73). As armadilhas luminosas foram instaladas sempre no crepúsculo vespertino e retiradas no crepúsculo matutino, permanecendo no ambiente por, no mínimo, 12 horas (Figura 22).



Figura 22A-) Colocação de armadilha no galinheiro localizado no Café Aroma da Serra, local de coleta de flebotomíneos no município de Andradadas-MG.(B-) Armadilha colocada dentro do galinheiro. Fonte: Arquivo Pessoal.

Os insetos coletados foram enviados ao laboratório da vigilância ambiental do município de Poços de Caldas, onde passaram por uma triagem. Cada armadilha foi minuciosamente examinada, retirando todo e qualquer material capturado. Deste, foram selecionados somente os flebotomíneos, espécie de interesse do estudo. Os flebotomíneos foram montados entre lâmina e lamínula, seguindo técnicas de montagem de rotina do Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP), de acordo com Fuzari, 2011(75). Os espécimes serão depositados no Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos do Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz, Belo Horizonte, MG. A identificação dos flebotomíneos foi realizada segundo classificação de Galati, 2003(20).

Estudo de Infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos

Os flebotomíneos coletados nas armadilhas foram separados entre machos e fêmeas. As fêmeas, individualmente, foram colocadas sobre uma lâmina com uma gota de salina e utilizando dois estiletos estéreis foram dissecados os dois últimos segmentos abdominais, expondo dessa forma a espermateca (parte do aparelho reprodutor feminino) permitindo sua visualização. Sobre o segmento abdominal

extraído, foi adicionada uma lamínula para a identificação da espécie. Em seguida, todo o restante do corpo dessa fêmea foi também acondicionado em microtubos contendo 200 µL de tampão de armazenamento, congeladas e encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do IOC/Fiocruz (LABIMDOE), onde foram realizados ensaios de PCR convencional para avaliação de infecção natural para *Leishmania*. Para isso, foram separadas somente fêmeas sem resíduo de alimentação. Os insetos machos estão sendo apenas montados em lâminas para identificação.

Obtenção do extrato total de flebotomíneos

O DNA utilizado na PCR foi extraído a partir do extrato individual de flebotomíneos machos (provenientes de insetário, para controles negativo) e fêmeas, em 100 µL de tampão de lise: TE - 10 mM Tris-HCl pH 9,2 contendo 10 mM de ácido etileno diamina tetra acético (EDTA) e 100 µg/mL de proteinase K (US Biolog). Os lisados foram mantidos em tubos *ependorf* e incubados (2 a 3 h, 56 °C) com agitações periódicas. No final da incubação, o material foi centrifugado (9800×g, 15min.) e o sobrenadante coletado e aquecido (15 min., 95 °C). Posteriormente, as amostras foram mais uma vez centrifugadas (9800×g, 40 s, 4 °C)(76). Os volumes das preparações foram ajustados para 200 µL pela adição de TE1:10 e estocadas (- 20 °C) até o momento da extração do DNA total.

Extração de DNA

A extração de DNA a partir dos lisados individuais de flebotomíneos foi realizada utilizando o kit comercial Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega), segundo as especificações do fabricante. O DNA eluído em 50 µL de TE 1:10 foi posteriormente estocado a - 20 °C até o momento de uso. Todas as etapas para a extração de DNA foram monitoradas, com a inclusão de amostras controle negativo. A inclusão de machos determina um controle para possíveis contaminações, pois essas amostras não podem conter DNA de *Leishmania* spp. Os fluxos laminares próprios para extração de DNA, assim como todo o material utilizado nesta etapa, foram devidamente descontaminados com a utilização de cloro diluído (1:100) e exposição a raios UV.

Reação em Cadeia da Polimerase – Triagem de amostras positivas para *Leishmania* spp.

Para a PCR foram utilizados dois pares de iniciadores que amplificam simultaneamente na mesma reação, um produto de 120 pb referente ao DNA de *Leishmania* (no caso de amostras de fêmeas positivas) e outro de 220 pb correspondente ao DNA de flebotomíneos (no caso de todas as amostras de machos e fêmeas). O primeiro par amplifica a região conservada dos minicírculos do kDNA; primer A [5' GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC 3'] e primer B [5' GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA 3'] (Figura 23) (77). O segundo par amplifica um gene constitutivo específico de flebotomíneos (*cacophony*): 5Llcac [5'GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3'] e 3Llcac [5'CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC 3'] (Lins et al., 2002). A inclusão deste segundo par de iniciadores (gene *cacophony*) confere a confiabilidade do DNA extraído (qualidade, pureza), evitando possíveis resultados falso negativos, pois todas as amostras (machos e fêmeas) constituídas por flebotomíneos devem amplificar o produto referente a esse alvo.

As reações ocorreram em um volume final de 100 µL, consistindo de solução tampão da PCR 1X (10mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM de KCl, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 4,5 mM MgCl₂, 200µM de cada dNTP (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), 0,2 µM de cada primer, 1,25 U Taq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 10 µL de DNA e H₂O (ultrapura e estéril, grau Biologia Molecular) para completar o volume. A ciclagem térmica consistiu de 36 ciclos e foi realizado no aparelho modelo *Gene Amp® PCR System 9700*, com a seguinte programação, por ciclo: desnaturação (30 s, 94 °C), anelamento (30 s, 55 °C) e extensão (30 s, 72 °C). Este programa foi precedido de uma etapa (12 min, 94 °C) para ativação da enzima (Hot Start) e após os 36 ciclos foi incluído um passo de extensão final (10 min, 72 °C).

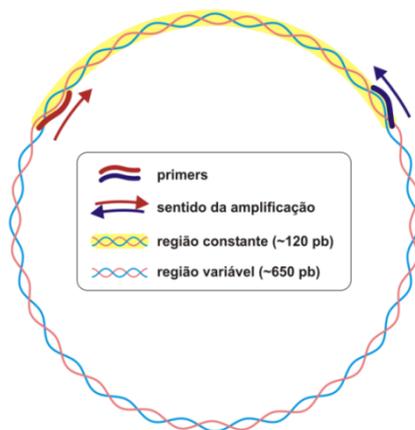


Figura 23: Esquema da estrutura de um minicírculo do kDNA de *Leishmania* sp. (~800 pb), demonstrando o local de anelamento dos primers A e B e o sentido da amplificação pela PCR.

Eletroforese em gel de agarose

Os ensaios de eletroforese foram realizados em cuba horizontal, em géis de agarose (Seakem e Nu Sieve, FMC Bioproducts, Rockland, USA) a 2,0%, com dimensões de 12,5 por 20 cm, preparados em TBE (0,89 M Tris-HCl; 0,89 M ácido bórico; 0,024M EDTA, pH 8,3 - TBE 10X). Após a imersão do gel solidificado em tampão TBE, alíquotas contendo 10 µL do produto da PCR foram misturadas a 1 µL do tampão de aplicação de amostra (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol) e aplicadas no gel. A eletroforese foi conduzida por 2 h à 70 V. O peso molecular dos *amplicons* foi determinado pela inclusão do marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder – Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). O gel foi corado com *Nancy-520 DNA Gel Stain (Sigma®)* e após a corrida, os resultados foram registrados através de um sistema fotográfico de documentação em gel – UVP *Bioimaging Systems* (Upland, CA, USA).

Ensaio de Dot- Blot

O produto amplificado na PCR para o alvo de *Leishmania* (kDNA), das amostras coletadas nos municípios de Poços de Caldas e Andradas /MG, foi adicionalmente analisado por hibridização em fase sólida.

Inicialmente, os produtos da amplificação de cada amostra foram submetidos a um processo de desnaturação, que consistiu em aquecimento (100 °C, 3 min de 10 µL dos *amplicons* diluídos em 90 µL de água destilada, seguido de rápido resfriamento em gelo (4 °C) e a adição de 13 µL de solução desnaturante (4 N NaOH contendo 25mM EDTA pH 8.0). O material desnaturado foi adsorvido por vácuo moderado à membrana de nylon (Boehringer Mannheim, Germany), previamente umedecida em água destilada e acondicionada em aparelho Bio-Dot™ (BioRad, Hercules, CA, EUA). Após a adsorção dos *amplicons*, as áreas de aplicação da membrana foram tratadas com 100 µL de água destilada/poço, seguida de 100 µL de solução desnaturante/poço. A membrana foi removida do Bio-Dot™, lavada 5 vezes por 5 min cada, em solução salina contendo citrato de sódio - SSC 2X e posteriormente foi seca à temperatura ambiente. Finalmente, o DNA foi covalentemente fixado à membrana por irradiação com luz UV em aparelho Stratalinker™, durante dois minutos.

Para a reação de hibridização, as membranas contendo os DNAs foram pré-tratadas (3 h, 60 °C) em solução BLOTTO - *Bovine lacto transfer technique optimizer* (SSC 1,5X, 1% SDS, 0,5% de leite desnatado Mollico®), em forno de hibridização (Techne Inc, Princeton N.J./USA). Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução BLOTTO (16 h, 56 °C) contendo 25 pmol/µL da sonda específica para o subgênero *Viannia*: 5` TAA TTG TGC ACG GGG AGG CCA 3` (Fernandes et al., 1996), ou com sonda específica para *Leishmania infantum*: 5` AAA AAT GGG TGC AGA AAT 3` (Francino et al., 2006)(78), ambas marcadas com biotina na extremidade 5`. Após o período de hibridização, as membranas foram lavadas (5 vezes/5 min cada) com tampão de lavagem (tampão salina ou *Phosphate buffered saline* PBS contendo 0,05% de Tween-20) à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas (1 h, 25 °C) com o conjugado Streptavidina-Peroxidase (Sigma) diluído (1/1000) em tampão de lavagem. Após um novo ciclo de lavagem das membranas, a reação de hibridização foi revelada com kit de quimiluminescência (Santa Cruz, USA) seguindo as especificações do fabricante.

Diagnóstico molecular de *Leishmania* em cães

Foram analisadas amostras de 154 cães alojados no CCZ de Poços de Caldas e 18 amostras de cães alojados no CCZ de Espírito Santo do Pinhal, coletadas nos meses de julho e agosto de 2018. Após a imobilização dos animais, foram coletadas amostras de sangue por punção venosa, braquial ou jugular. Foram coletados 04 ml de sangue de cada animal em tubos vacuteiner EDTA-K2, e imediatamente adicionado 04 ml de uma solução de guanidina 6M+EDTA 0,2 N. Em seguida, as amostras foram fervidas por 15 minutos. As amostras foram mantidas a uma temperatura de 4°C encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do IOC/Fiocruz (LABIMDOE). O diagnóstico molecular foi realizado por PCR em tempo real, através de ensaios de presença e ausência, conforme descrito acima. Como este ensaio é composto por um sistema TaqMan com um alvo no parasito e um alvo em um controle interno exógeno de amplificação, ele pode ser utilizado para DNA extraído de diferentes tipos de amostras biológicas, como flebotomíneos e sangue de cães. O DNA foi extraído utilizando o “*High Pure PCR Template Preparation Kit*” (Roche), seguindo os protocolos sugeridos pelo fabricante. Conforme necessidade, ajustes foram realizados, tendo em vista o aumento e melhora da reprodutibilidade e rendimento da Extração de DNA por coluna de sílica. Para a realização de um controle de qualidade da extração de DNA e monitoramento da ausência de inibidores na PCR, utilizamos como controle de qualidade da extração de DNA, e monitoramento da ausência de inibição da PCR, o controle interno exógeno(IAC) (Figura 32-A), trata-se de um plasmídeo contendo um fragmento de um gene de uma aquaporina de *A. thaliana*, que não possui homologia com genes de mamíferos e parasitos que é adicionado 5µl a cada amostra antes da extração de DNA, utilizamos o sistema TaqMan multiplex. Para isso, foram utilizados iniciadores para o Kdna Mary (Lz93 (fw) 5’ – TACTCCCCGACATGCCTCTG – 3’, Lz93 (rw) 5’ – GAACGGGGTTTCTGTATGC – 3’; e sondas para o Kdna Mary (Tq FAM/NFQ-MGB-TCTGCGAAATCCGAAAAAT–NFQ-MGB.A mistura de reação para o ensaio TaqMan era composta por: Taq Master mix (Roche) 2x- 10 µl ; Primer KDNA Mary F [Final]=300nM; Primer KDNA Mary F [Final]=300nM); Sonda TaqMan KDNA Mary Tq

FAM/NFQ-MGB [Final]=100nM; Primer IAC FW [Final]=300nM; Primer IAC Rw [Final]=300nM; sonda TaqMan IAC Tq-MGB VIC/NFQ[Final]=100nM; H₂O qsp 20µl. A ciclagem da PCR utilizada foi: 95°C – 10 minutos (95°C – 15 segundos/60°C – 1 minuto (coleta de fluorescência)) em 45 ciclos. Para a realização do controle de qualidade das amostras de DNA, a amplificação do alvo IAC foi monitorada para cada amostra, em paralelo, através do sistema TaqMan (VIC/TAMRA) (79).

Ensaio utilizando Teste rápido (TR) DPP® BioManguinhos

O Teste rápido DPP® BioManguinhos foi utilizado para triagem dos animais conforme preconiza o PCLV. O TR DPP® leishmaniose visceral Canina-BioManguinhos (conforme informações do fabricante) emprega uma combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal e anticorpos específicos da amostra para *Leishmania*. Em sequência reagem com antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi* ligados a uma membrana (fase sólida). A amostra é aplicada ao poço#1(AMOSTRA+TAMPÃO), seguida pela adição do tampão de corrida. O tampão propicia o fluxo lateral promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos. Após a migração da amostra e do tampão ao longo do suporte de teste, deve-se adicionar tampão de corrida ao poço#2(TAMPÃO). O conjugado se liga aos anticorpos específicos para *Leishmania* produzindo uma linha (roxa/rosa) na área TESTE (T). Na ausência de anticorpos para *Leishmania* a linha (roxa/rosa) não aparece na área do TESTE (T). Em ambos os casos, a amostra continua a migrar ao longo da membrana produzindo uma linha (roxa/rosa) na área de CONTROLE (C), O que demonstra o funcionamento adequado dos reagentes.

Aspectos Éticos e legais

O Laboratório de Doenças Parasitárias já possui autorização e licença do IBAMA para captura de flebotomíneos, sob o número de 32669-4 na qual serão incluídas apenas as novas localidades de estudo. Para a parte relacionada ao diagnóstico em cães, este projeto possui aprovação do CEUA IOC/FIOCRUZ, sob o número de licença 034/2018

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Poços de Caldas

Esse estudo teve como objetivo inicial fazer um levantamento sobre a presença de flebotomíneos na região, onde esse fato era desconhecido. Para isso escolhemos pontos de acordo com o que a literatura descreve como sendo preferências do referido inseto, todos os pontos circundam a Serra de São Domingos, localizada no município de Poços de Caldas, por se tratar de região de mata com abundância de matéria orgânica e temperatura e umidade favorável. Em Andradas-MG, os mesmos cuidados foram observados selecionando um ponto onde encontramos plantações de bananeira e animais domésticos.

Foram realizadas 12 coletas na cidade de Poços de Caldas de março de 2018 a fevereiro de 2019. Neste período foram coletados 16 flebotomíneos (Figura 20) pertencentes às seguintes espécies: *Pintomyia fischeri* (PINTO, 1926), *Evandromyia tupynambai* (MANGABEIRA, 1942), *Psychodopygus lloydi* (ANTUNES, 1937).

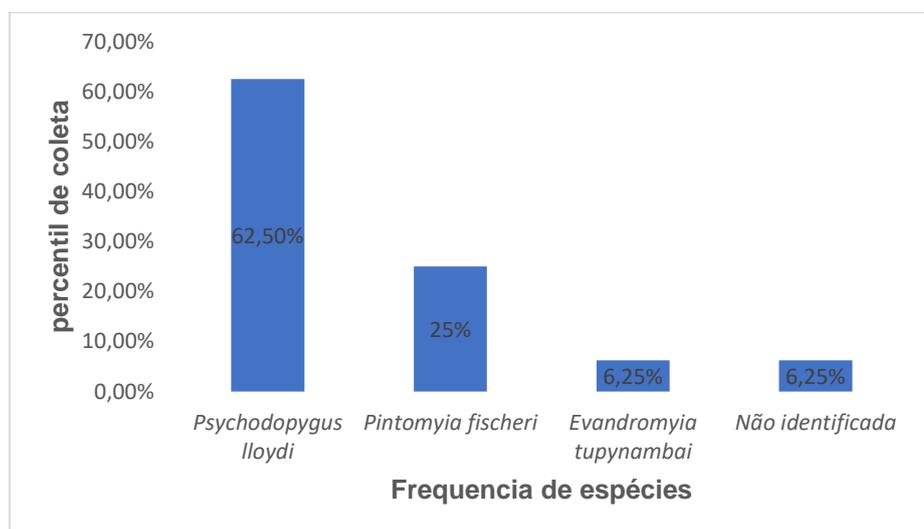


Figura 24: Porcentagem de flebotomíneos capturados no município de Poços de caldas (ABR-abrigo municipal, CCZ-centro de controle de zoonoses, SB- sitio do lobato) no período de março de 2018 a fevereiro de 2019.

A espécie *Pintomyia fischeri* (Pinto, 1926), tem ampla distribuição geográfica, foi descrita em 1926 através de análise de exemplares coletados na cidade de São Paulo. Foi encontrada em todos os meses do ano, com maior densidade nos meses quentes e úmidos, mas foi encontrada também nos meses frios e secos, com atividade hematofágica no crepúsculo vespertino (80). É dotada de alto grau de antropofilia (81).

Está entre os flebotomíneos que são incriminados como transmissores de *Leishmania spp.* agentes etiológicos da LTA. Esta espécie de flebotomíneo por ser frequentador do ambiente domiciliar e matas remanescentes, foi incriminada como suspeita de transmissão do agente causador da leishmaniose visceral no interior de São Paulo, após verificação de sua capacidade de se infectar com *Leishmania infantum* através de experimentos em laboratório(82), e por *Leishmania braziliensis* em espécies do município de Porto Alegre –RS(83). Está presente em 121 municípios do Estado de São Paulo(84).

A espécie *Pi.fischeri* representa 25% do total de flebotomíneos coletados em Poços de Caldas (Figura 26). Entre os dois períodos onde foram coletadas (C2 e C8) observamos também um volume de precipitação bem significativo variando entre 152 e 181mm e temperatura média entre 16 e 26°C (Tabela 2). Foram coletados no abrigo de Cães Municipal e no Sítio do Lobato, ambos os locais são cercados por mata nativa.

Tabela 2 Temperatura mínima e máxima x precipitação em Poços de Caldas durante o período de coleta entre os meses de março de 2018 a fevereiro de 2019. Fonte: Samsung.weather.com

MÊS	MINIMA (°C)	MÁXIMA (°C)	PRECIPITAÇÃO (mm)
Janeiro	16°	26°	271
Fevereiro	17°	26°	222
Março	16°	26°	181
Abril	13°	25°	91
Mai	10°	23°	74
Junho	8°	22°	30
Julho	8°	22°	23
Agosto	10°	24°	37
Setembro	12°	25°	77
Outubro	14°	25°	152
Novembro	15°	26°	153
Dezembro	16°	25°	345

Evandromyia tupynambai, (MANGABEIRA1942) é uma espécie associada a roedores, encontrada em restos de matas e peridomicílio, e ainda segundo o autor acredita-se que essa espécie seja considerada comum e bem adaptada em ambientes silvestres, eclética com relação às fontes de alimento (85).

Foi encontrada naturalmente infectada no Parque Estadual Serra da Tiririca no Rio de Janeiro (85).

Tem seu holótipo com espécimes capturados no município de Campos, Rio de Janeiro e sua distribuição geográfica restringe-se a poucos estados da região Nordeste e em toda região Sudeste, com exceção apenas de SP (20).

No estado do Rio de Janeiro, já foi encontrada no Parque Nacional de Itatiaia, em Petrópolis, Ilha Grande(86–88) e foi registrada pela primeira vez nos municípios de Niterói e Maricá, em 2010 (35), desde então, essa espécie vem se mostrando presente tanto nas armadilhas localizadas em ambientes de mata (ambientes silvestres) como em áreas de peridomicílio.

Em Poços de Caldas essa espécie de flebotomíneo foi encontrada no CCZ, situado na região oeste do município, em região periurbana, albergando em média 120 cães. Foi coletado um percentual de 6,25% do total de flebotomíneos capturados, acreditamos que baixo número está relacionado à reforma pela qual o estabelecimento estava passando, ocorrendo muita movimentação de pessoas e a retirada dos cães que foram albergados no abrigo municipal durante esse período.

Psychodopygus lloydi, (ANTUNES 1937) foi descrita a partir de machos coletados em Mogi das Cruzes, SP. (89). Com ampla distribuição geográfica, estados do Rio de Janeiro, no município de Petrópolis, Estado de São Paulo, nos municípios de Osasco, Piedade e São Paulo e no Estado de Minas Gerais registramos esta espécie nos municípios de Belo Horizonte, Belo Vale, Caeté, Conceição do Mato Dentro, Entre Rios de Minas, Itabira, Nova Lima, Oliveira, Ouro Preto, Pirapora, Pitangui Sabará e Santa Bárbara.

Apresenta comportamento antropofílico e capacidade de se alimentar em várias espécies hospedeiras, Tonelli (2017)(90) encontrou *Ps.lloydi* em Minas Gerais alimentada com sangue de porco o que sugere sua atração por animais domésticos.

Foi encontrada com infecção natural em Minas Gerais no Parque Estadual de Ibitipoca com *Leishmania (Viannia) braziliensis* (50).

Ps. lloydi foi a espécie mais abundante no município de Poços de Caldas, somando 62,5% dos flebotomíneos coletados (Figura 26). Foram encontradas na ONG Sitio do Lobato localizado na região Leste da cidade em zona urbana, composto por mata nativa, animais silvestres e domésticos, galinheiro e lago. O local é aberto à visitação pública, recebe escolares para pesquisas em ambientes naturais (Figura 26-B). Também foram encontradas em menor número no abrigo de cães municipal, situado

na região Sudoeste do município, alberga aproximadamente 140 cães, recebe visita de escolares para palestra de posse responsável e feiras de adoção (Figura 26-A). Na ocasião da coleta o abrigo estava passando por reformas para ampliação de suas estruturas, para melhor acolher animais resgatados.



Figura 25(A) Visita do Colégio Cepoc ao Abrigo Municipal de Cães em Poços de Caldas. Fonte: www.pocosdecaldas.mg.gov.br; (B) Instituto Sítio do Lobato recebendo visitantes para atividades de preservação e conservação do meio ambiente. Fonte: <https://www.institutositiodolobato.org>.

No município de Poços de Caldas a temperatura varia de 17 a 25°C, podendo chegar a temperaturas muito baixas no inverno e no verão e nos meses mais quentes a precipitação aumenta, (Tabela 2) a média varia em frio intenso ou muita chuva o que pode suportar uma hipótese do baixo número de insetos coletados durante o ano(Figura 27), uma vez que esses insetos se abrigam para se proteger de mudanças bruscas ocorridas no meio ambiente (91)(Tabela 2).

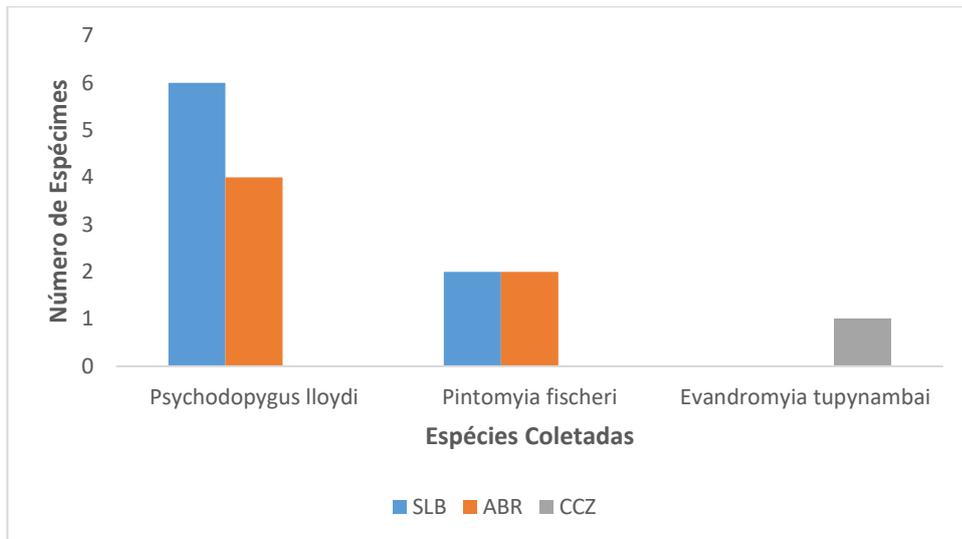


Figura 26: Número de espécimes capturados por ponto de coleta (SLB – Sitio do Lobato), (ABR- Abrigo de cães), (CCZ- Centro de controle de zoonoses) no município de Poços de Caldas-MG, no período de março de 2018 a fevereiro de 2019.

Os meses de maior abundância de flebotomíneos em Poços de Caldas foram os meses de março e abril onde a média de temperatura foi de 21,7 e umidade relativa do ar em 51%. (Figura 30).

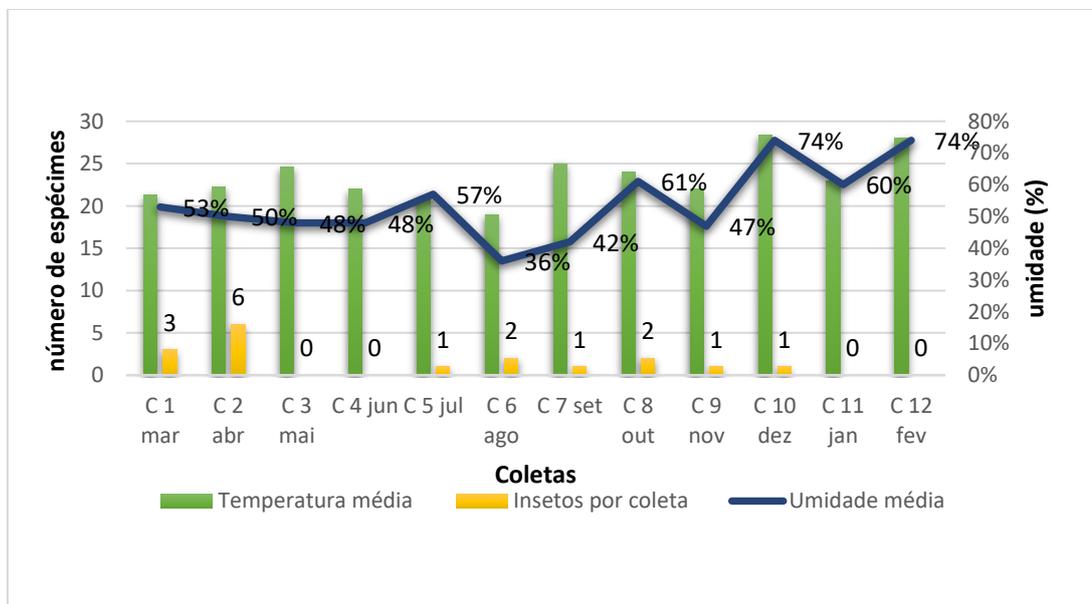


Figura 27 Médias de temperatura e umidade por número de espécimes no Município de Poços de Caldas-MG, no período de março/2018 a fevereiro /2019.

Andradas- MG

No município de Andradas foram realizadas 12 coletas com periodicidade semanal, somando um total de 49 flebotomíneos das seguintes espécies: *Pintomyia fischeri* (Pinto, 1926), *Migonemyia migonei* (França 1920), *Brumptomyia nitzulescui* (Costa Lima 1932). (Figura 29-A e B).

Mg. Migonei já foi encontrada naturalmente infectada em São Paulo(92,93) em Baturité no estado do Ceará por *L. (V.) braziliensis* (94), e em Pernambuco, por *L. infantum* (95). Também foram registrados casos autóctones de LV na Argentina(96), e em São Vicente Ferrer, no Brasil, onde foi constatada a presença de *Mg.migonei* e a ausência de *Lu. longipalpis*. Em São Vicente Ferrer, foi encontrada naturalmente infectada por *Leishmania infantum chagasi* (95). Em Fortaleza, *Mg. migonei*, possivelmente, compartilha com *Lu. longipalpis* o papel de vetor da LV(97). No Rio de Janeiro, Rangel et al. (1986 e 1990)(94,98) observaram que *Mg. migonei* foi a segunda espécie mais abundante, em experimentos realizados em Vargem Grande e Mesquita, respectivamente, sendo que em Vargem Grande foi a espécie que mais sugou o cão, o que levou os autores a sugerirem o possível papel desta espécie na participação da transmissão da leishmaniose tegumentar canina naquela área.

As espécies de *Brumptomyia* não são importantes na epidemiologia da LTA e, segundo Aguiar & Medeiros (2003)(99), em sua totalidade, sugam o sangue de dasipodídeos (tatus), sendo encontradas sempre em folhas caídas no solo florestal e nas tocas destes animais.

O local onde foi realizada a coleta fica na Serra que liga o Município de Andradas a Poços de Caldas popularmente chamada de “Curva do Saci”, com grande abundancia de mata nativa, plantações de banana e animais domésticos. Os flebotomíneos foram coletados na armadilha colocada dentro do galinheiro.

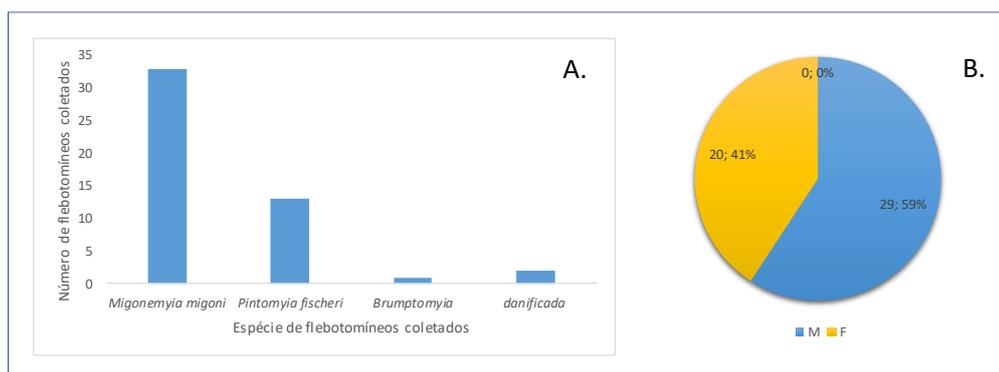


Figura 28 (A) Espécies de flebotomíneos coletados no município de Andradas-MG no período de março 2018 a fevereiro de 2019; (B) Quantitativo de flebotomíneos coletados, separados por gênero no município de Andradas – MG no período de março de 2018 a fevereiro de 2019.

A temperatura no local foi mais alta comparando com Poços de Caldas variando entre 18 e 28°C, a umidade relativa do ar variou entre 39 e 81,5% (Figura 30). A coleta com maior número de exemplares foi no mês de maio com um total de 39 flebotomíneos, uma época em que as noites costumam ser muito frias.

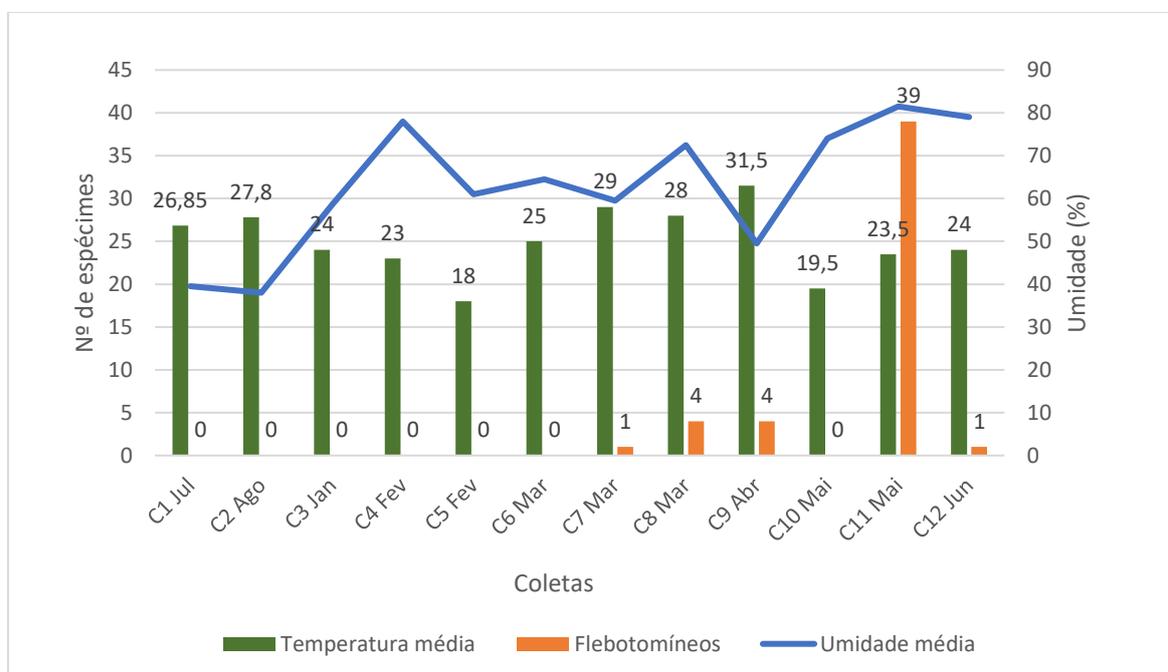


Figura 29 Médias de temperatura e umidade por quantidade de insetos coletados por mês de coleta, no município de Andradas-MG no período de março de 2018 a fevereiro de 2019.

Ensaio utilizando Teste rápido (TR) DPP® Biomanguinhos.

Para essa fase do estudo foram coletadas 62 amostras de sangue de cães alojados CCZ e Abrigo de Cães de Poços de Caldas. As amostras foram obtidas através de punção braquial ou jugular, coletando 4 ml de sangue em tubo seco sem EDTA. Após retração do coágulo o sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos, separado o soro do coágulo para assim evitar hemólise e armazenado a -20°C. até o transporte para o Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, respeitando-se as normas de biossegurança, onde foram realizados os testes. Para a leitura dos testes além da visualização, utilizamos um leitor de testes que realiza leituras da quantidade de anticorpos anti-*Leishmania* presente na amostra, leitura do controle negativo além de leitura qualitativa (POSITIVO / NEGATIVO). (Figura 30). O leitor possui alta sensibilidade para a reação, se mostrando eficiente na leitura de resultados onde as faixas não são visíveis ao olho do técnico que realiza o procedimento, detectando mesmo as reações fracas.



Figura 30 (A) Realização de teste rápido DPP® com leitor;(B) leitura de teste rápido DPP® negativo;(C) leitura de teste rápido DPP® positiva;(D) teste rápido DPP® positivo(reação fraca).

Das 62 amostras pesquisadas obtivemos 02 amostras que foram reagentes. Porém não foram reagentes na análise por PCR em TEMPO REAL. Essas amostras positivas foram coletadas no Abrigo de Cães e CCZ de Poços de Caldas com os códigos 393564 e 0688.

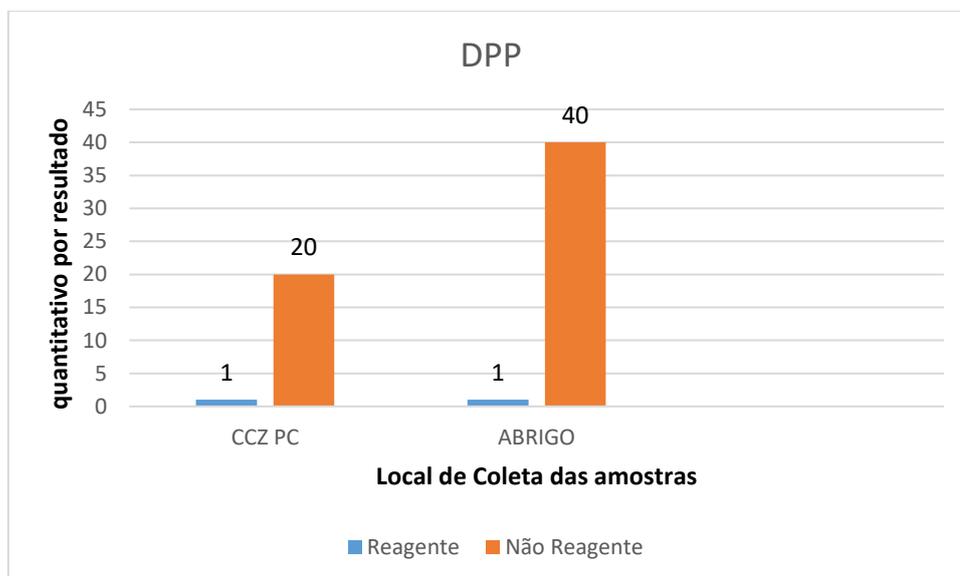


Figura 31- Resultado de amostras coletadas de cães do CCZ e Abrigo Municipal de Poços de Caldas.

Diagnóstico molecular de Leishmaniose Canina

Foram analisadas 154 amostras de cães coletadas no CCZ de Poços de Caldas, CCZ de Espírito Santo do Pinhal e Abrigo Municipal de cães de Poços de Caldas. As amostras foram divididas em 33 pools de 3 a 5 amostras e processadas conforme protocolo descrito em material e métodos. Como controle de qualidade da extração de DNA, e monitoramento da ausência de inibição da PCR, o controle interno exógeno foi utilizado (Figura 32-A), trata-se de um plasmídeo contendo um fragmento de um gene de uma aquaporina de *A. thaliana*, que não possui homologia com genes de mamíferos e parasitos. Este controle exógeno é adicionado a amostra, antes da extração de DNA.

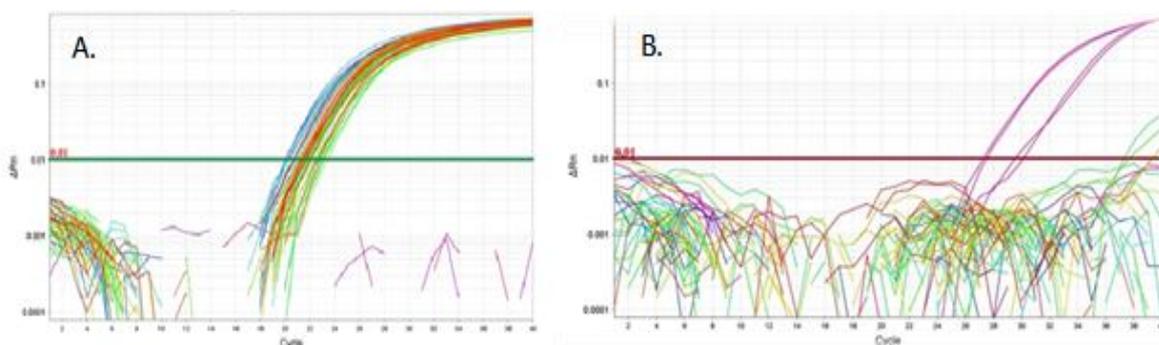


Figura 32(A) curva de amplificação para controles positivos de *Leishmania brasiliensis* (a 100 e 10fg| μ l) e três amostras positivas(0694,0879,1134)cuja fluorescência ultrapassam *threshold*. (B) curva de amplificação do controle exógeno de amplificação do controle interno exógeno (IAC) para todas as amostras de cão do estudo dos municípios de Poços de Caldas-MG e Espírito Santo do Pinhal - SP

Todos os ensaios são realizados em duplicata e cada reação possui um controle negativo e um positivo de *Leishmania*. Todos esses cuidados são para garantir a qualidade da extração e da PCR em tempo real. Além dos cuidados com a reação, também são observados os ambientes onde todo o processo é realizado como descontaminação de locais e todos os objetos que serão utilizados no procedimento com hipoclorito de sódio, DNAzap (Applied Biosystems) e luz ultravioleta na desinfecção das capelas e da sala de extração.

Para todas as amostras de cães, observamos uma amplificação do controle interno com valores de Ct entre 20 e 23 (para um *threshold* posicionado em 0,01), validando os resultados (Figura 31- A).Para o alvo em *Leishmania sp.*, os pools de amostra identificados como CCZ4, CCZ5, ESP1 e AB12 apresentaram reação positiva, com valores médios de Ct de 27, 30, 37 e 39,como pode ser observado na figura representativa das curvas de amplificação (Figura 31-B).Esses pools positivos foram abertos e testados individualmente, onde obtivemos 3 amostras positivas (Tabela 3). As amostras coletadas em Espírito Santo do Pinhal resultaram em um pool positivo, porém na individualização das amostras contidas nele algumas apresentaram coágulo após o armazenamento, restando apenas uma amostra viável e esta teve resultado negativo.

Tabela 3: Resultado de amostras analisadas individualmente por PCR em TEMPO REAL X DPP®, provenientes de pools positivos analisados.

Município	Pool	Amostras	PCR	DPP®
Poços de Caldas	CCZ4	0690	Negativo	-
		0694	Positivo	-
		0710	Negativo	Negativo
		0879	Positivo	-
Poços de Caldas	CCZ5	0972	Negativo	Negativo
		1057	Negativo	-
		1134	Positivo	-
Espírito Santo do Pinhal	ESP7	ESP7	Negativo	-
Poços de Caldas	AB12	11393400	Negativo	-
		Flor	Negativo	-
		11324257	Negativo	Negativo

As amostras de Poços de Caldas 0694,0879(CCZ4),1134(CCZ5) foram positivas para leishmaniose visceral. Esse é o primeiro levantamento realizado no município de Poços de Caldas, não se pode determinar a autoctonia desses casos por se tratar de cães de procedência indeterminada, é necessário a continuidade desse levantamento de flebotomíneos e testagem de cães, dada a necessidade de se evitar que a doença se instale no município. Os profissionais do município já realizam parte dessa ação, pois todos os cães quando dão entrada no CCZ passam por uma consulta minuciosa com o veterinário que observa o estado geral do animal, pelagem, unhas e presença de lesões aparentes, logo após são chipados e registrados, ficam separados em observação por um período, e após confirmar que o cão é saudável ele é enviado ao abrigo municipal de cães onde fica disponível para adoção. Não são

realizados testes de triagem e levantamento de procedência. Apenas seria necessária adequação de protocolos.

Diagnóstico de infecção natural

Foram enviados 17 flebotomíneos fêmeas para avaliação de infecção natural segundo tabela 4. Para as reações de PCR obtivemos resultados negativos (Figuras 32-A,32-B,32-C), porém para a hibridização do produto da PCR, com sonda espécie-específica, identificamos uma fêmea de *P. lloyd* infectada com *L. infantum*(Figura 32-D). Essa fêmea de flebotomíneo infectada naturalmente foi coletada no município de Poços de Caldas no Instituto Sítio do Lobato (Tabela 5)

Tabela 4 Relação de espécimes fêmeas de flebotomíneo enviadas para diagnóstico de infecção natural, de acordo com local de coleta e espécie. Em vermelho, é apresentada a amostra que foi positiva para a detecção de *Leishmania infantum*, de acordo com a técnica de hibridização com sonda espécie-específica.(ABR =Abrigo de cães; AND = Andradas; SLB = Sitio do Lobato).

NUMERO	LOCAL	MUNICÍPIO	SEXO	ESPÉCIE
1	ABR 1(BAIA)	PC	F	<i>Pintomyia fischeri</i>
2	ABR 2	PC	F	<i>Pintomyia fischeri</i>
3	AND C8-2	AND	F	<i>Migonemyia migonei</i>
4	SLB ARVORE	PC	F	<i>Psychodopygus lloydi</i>
5	AND C11-8	AND	F	<i>Migonemyia migonei</i>
6	AND C8-1	AND	F	<i>Migonemyia migonei</i>
7	AND C11-9	AND	F	<i>Migonemyia migonei</i>
8	AND C11-11	AND	F	<i>Migonemyia migonei</i>
9	AND C11-12	AND	F	<i>Migonemyia migonei</i>
10	AND C11-10	AND	F	<i>Migonemyia migonei</i>
11	AND C11-7	AND	F	<i>Migonemyia migonei</i>
12	AND C11-6	AND	F	<i>Migonemyia migonei</i>
13	AND C11-5	AND	F	<i>Migonemyia migonei</i>
14	AND C11-4	AND	F	<i>Migonemyia migonei</i>
15	AND C11-3	AND	F	<i>Pintomyia fischeri</i>
16	AND C11-2	AND	F	<i>Pintomyia fischeri</i>
17	AND C11-1	AND	F	<i>Pintomyia fischeri</i>

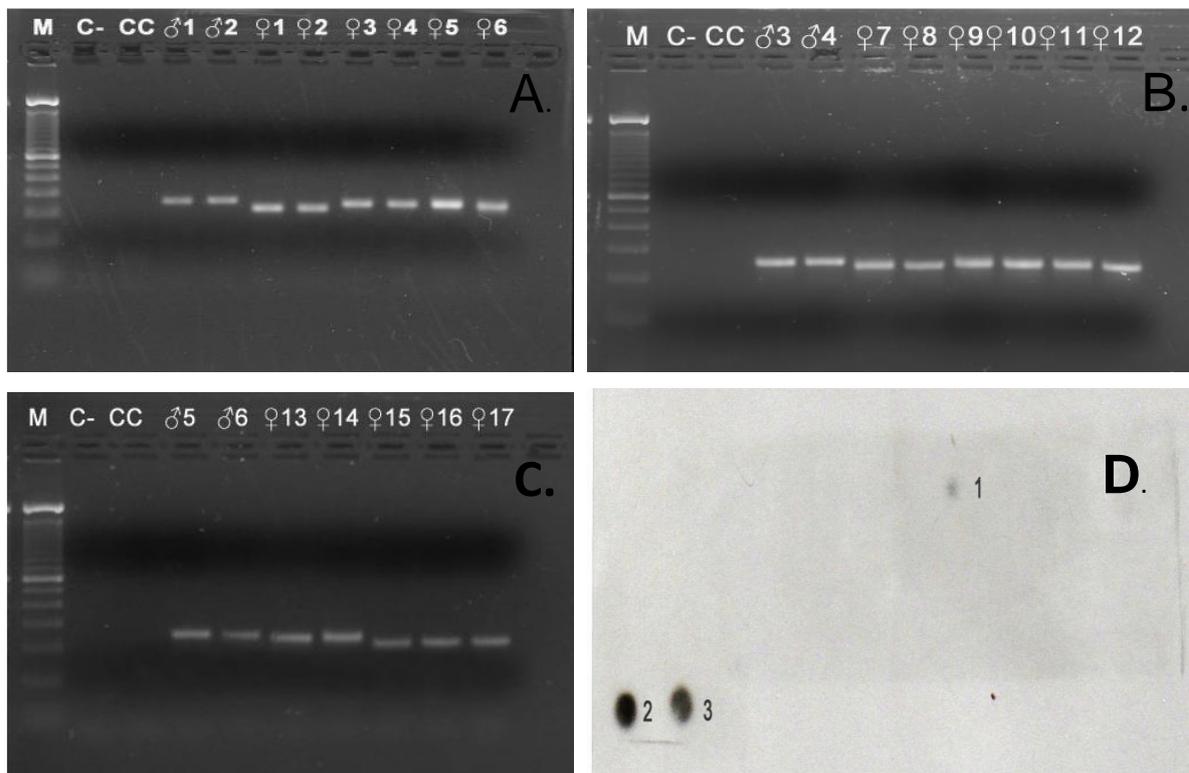


Figura 33 Eletroforese em gel de agarose à 2% corado com Nancy para avaliação de infecção natural em fêmeas de flebotomíneos por *Leishmania* sp. M: Marcador de peso; Em A - (1-2); B - (3,4); C- (5,6) Controles negativos - DNA extraído de flebotomíneos machos; Em A(1-6); B(7-12);C(12-17) - Fêmeas de flebotomíneos coletados nos municípios Poços de Caldas e Andradas -MG submetidas ao diagnóstico molecular que se apresentaram negativas para *Leishmania* spp. Em D-Hibridização dos produtos amplificados com sonda específica para *Leishmania infantum* (Dot-Blot) - 1: *Psychodopygus lloydi* - peridomicílio- Sítio do Lobato (Poços de Caldas-MG); 2 e 3: controles positivos (sinal mais intenso) - 10 µL DNA de *L. (L.) infantum* (658 ng/ µL) (MHOM/MA/67/ITMAP263) extraído de cultura celular.

Este Estudo tem grande importância para o serviço de Epidemiologia dos Municípios, uma vez que confirma a presença de flebotomíneos no município, um problema que até este momento era desconhecido. A partir das informações contidas neste estudo se torna possível se antecipar, com medidas de prevenção e controle, podendo assim minimizar os impactos na saúde pública.

Limitações do estudo:

- Só foi possível coletar amostras de sangue. Não havendo tempo necessário para treinamento dos profissionais para realizar a coleta de outro tipo de amostra, como aspirado de linfonodo.
- Não foi possível realizar o DPP no início do projeto, quando as primeiras amostras de sangue foram coletadas, devido à falta de kits no município por se tratar de município indene. Depois, conseguimos doação de BioManguinhos. Porém, foi necessário realizar uma segunda coleta de sangue, uma vez que a primeira amostra foi preservada em guanidina-EDTA. Com isso, não foi possível realizar o teste em alguns animais, que já não estavam nos CCZs.
- As alterações climáticas, frio e chuva, na maior parte do ano, limitaram a coleta dos flebotomíneos.
- Algumas amostras conservadas em guanidina-EDTA coagularam após um período de armazenamento, não sendo possíveis reutilizá-las na abertura dos pools.

6 CONCLUSÃO

- Foram encontradas três espécies de flebotomíneos em Poços de Caldas: *Pintomyia fischeri* (PINTO, 1926), *Evandromyia tupynambai* (MANGABEIRA, 1942), *Psychodopygus lloydi* (ANTUNES, 1937).
- No município de Andradas foram encontradas três espécies que são: *Migonemyia migonei* (França 1920), *Brumptomyia nitzulescui* (Costa Lima 1932) e *Pintomyia fischeri* (PINTO, 1926).
- Identificamos infecção natural em uma fêmea coletada Poços de Caldas, sendo esta da espécie *Psychodopygus lloydi* encontrada pela primeira vez infectada com *Leishmania infantum*.
- No diagnóstico molecular não detectamos positividade nas amostras coletadas em Espírito Santo do Pinhal-SP.
- Nas amostras dos cães coletadas em Poços de Caldas detectamos três (3) positivas pela PCR em tempo real, sendo 1 identificada como *L. (L.) infantum* e 1 co-infectada com *L. infantum* e *Leishmania* do subgênero *Viannia*.
- Nas análises utilizando DPP®, encontramos duas amostras positivas, porém, foram negativas pela técnica de PCR em TEMPO REAL.

7 PERSPECTIVAS

Este estudo levanta um questionamento para os municípios avaliados que se encontram classificados como municípios indenes para LV, até o momento a presença de flebotomíneos era desconhecida e agora, com este estudo onde, identificamos a presença do inseto em ambos os municípios, isso norteia diversas ações preventivas que podem ser desencadeadas para evitar que a leishmaniose se torne um problema de saúde pública nesses municípios. Esse levantamento foi realizado em áreas específicas durante este estudo, é importante a continuidade desse estudo em outras áreas para se conhecer a fauna flebotomínica e compreender como esta se comporta, quais as espécies presentes, fontes alimentares, e assim poder traçar um perfil dentro da paisagem ecológica em que estes insetos estão inseridos. Traçar um plano de ação intersetorial que envolva a Secretaria Municipal de Saúde (SMS), atenção primária, vigilância ambiental, vigilância epidemiológica e as demais secretarias que compõem organograma municipal para que juntos possam cobrir todas as áreas para se preparar para receber casos da doença, uma vez que foram encontrados cães positivos e flebotomíneos naturalmente infectados em Poços de Caldas. Preparar a atenção básica para identificar casos em humanos, preparar as clínicas veterinária para identificar casos caninos, solicitar junto ao estado a disponibilização de testes para triagem dos cães alojados sob responsabilidade do município, melhorar o fluxo de notificação dos casos suspeitos de leishmaniose visceral humana e canina para a vigilância epidemiológica, traçar um mapa de risco junto com a vigilância ambiental do município, selecionando áreas com maior risco de transmissão.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. magnitude of the problem [Internet]. Available from: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/
2. Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* 2006;22(12):552–7.
3. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012;7(5).
4. Lainson R, Rangel BF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(8):811–27.
5. Moreira J. Existe na Bahia o botão de Biskra. *Gaz Médica da Bahia.* 1895;254–6.
6. Lindemberg A. A. úlcera de Bauru e seu o micróbio. *Comunicação preventiva. Revista médica de São Paulo*12: 116-120, 1909. *Revista Médica de São Paulo.* 1909;116–20.
7. Afonso Splendore. *Bouba, Blastonotas sobre algumas afecções framboesicas observadas no Brasil.* Imprensa Medica. 1911;
8. Brasil-Ministério da Saúde ,Secretaria de Vigilância em Saude, Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Editora do Ministério da Saúde 2006. 120 p.: il. color – (Serie A. Normas e Manuais Técnicos). *Leishmaniose Visceral* [Internet]. Brasilia-DF; 2014. (Manuais Técnicos). Available from: <http://editora.saude.gov.b>
9. Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT FH. Leishmaniasis in Brazil. XIX: visceral leishmaniasis in the Amazon Region, and the presence of *Lutzomyia longipalpis* on the Island of Marajo, Para State. *Soc Trop Med Hyg.* 1983;323–30.
10. Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: XI. Observations on the morphology of *Leishmania* of the *braziliensis* and *mexicana* complexes. *J Trop Med Hyg.* 1976;79(1):9–13.
11. Furtado T. Leishmaniose tegumentar no Brasil : revisão histórica da related to the origin , expansion and etiology *. 2005;80(4):421–8.
12. Nonata R, Sampaio R, Ribeiro D. Leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal *Mucocutaneous leishmaniasis in the Federal District.* *Rev Soc*

- Bras Med Trop. 1999;32(5):523–8.
13. Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. J Bras Med. 1992;63(June):82–104.
 14. Brasil - Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde Coletiva. Guia de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde - 3ª edição [Internet]. 2019. 741 p. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_volume_unico_3ed.pdf
 15. World Health Organization. WHO | Leishmaniasis: the global trend. WHO. 2011;
 16. Alencar JE, Neves J DRL, Doenças visceral (calazar). IVR (ed), Guanabara I e P 8ª E, Koogan, Rio de Janeiro L. Leishmaniose Visceral (Calazar).
 17. ALENCAR JE. Leishmaniose visceral no Brasil. Revista de Medicina. 1978;129–48.
 18. Osvaldo P.Foratini , Ernesto X.Rabelo DP. CULICOIDES DA REGIÃO NEOTROPICAL - OBSERVAÇÕES SÔBRE BIOLOGIA EM CONDIÇÕES NATURAIS.pdf. 1958.
 19. W.Hennig. Insektenfossilien aus der unteren Kreide. IV. Psychodidae (Phlebotominae), miteiner kritischen Übersicht über das phylogenetische System der Familie und die bisher beschriebenen Fossilien (Diptera). Stutt Beitr Naturkd. 1972;241 ,1-69.
 20. Galati EAB. . Biologia, Classificação. Terminologia, Morfologia e Identificação de Adultos. Sao Paulo; 2003. (Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública/USP], 193 p.).
 21. Martins AV M-FE. Sobre a distribuição geográfica dos flebotomíneos americanos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Revista Brasileira de Biologia. 1972;361–71.
 22. Muzón J, Spinelli GR, Salomón OD RG. A first record of phlebotomine from Argentinean Patagonia (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2002;797–8.
 23. Rebêlo JMM, Mendes WA CJC. Lista preliminar das espécies do gênero *Lutzomyia*, França, 1924 (Psychodidae, Phlebotominae) do Estado do Maranhão, Brasil. Caderno de Saúde Pública 12(4). 1996;545–9.
 24. Martins AV, Williams P F AL. No Title. Acd Brasil Ciências. 1978;195.
 25. Young, D. C.; Duncan Na. Guide to the identification and geographic distribution

- of *Lutzomyia* sandflies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem An Ent Inst, [S I] 54. :1–881.
26. Forattini OP. Entomologia Médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose. Vol. IV. E. São Paulo; 1973.
 27. Gontijo CMF, Coelho MV, Falcão AR FA (1987). The finding of one male specimen of *Lutzomyia renei* (Martins, Falcão & Silva, 1957) experimentally infected by *Leishmania*. Mem Instituto Oswaldo Cruz ; 82(3). 1987;445.
 28. Tesh RB, Chaniotis BN, Carrera BR JK (1972). Further studies on the natural host preferences of panamanian sandflies. Amer J Epidem 95(1). 1972;88–93.
 29. Ngumbi PM, Lawyer PG, Johnson RN, Kiilu G AC. Identification of phlebotomine sandfly bloodmeals from Baringo district, Kenya, by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Med Vet Ent 1992; 6:385-8. 1992;
 30. Morrison AC, Ferro C, Morales A, Tesh RB WM. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. J Med Entomol ; 30. 1993;30:1993.
 31. Ogusuku E, Perez JE, Paz L, Nieto E MJ & GH. Identification of bloodmeals sources of *Lutzomyia* spp. in Peru. Ann Trop Med Parasit 1994; 88(3):329-35. 1994;
 32. Colmenares M, Portús M, Botet J, Dobaño C, Gállego M, Wolff M SG. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay Biotin/Avidin Method. J Med Ent. 1995;32(3):229–33.
 33. Galati EAB, Nunes VL, Dorval MRC, Boggiani PC, Shaw JJ, Cristaldo J, Rocha HC A, RMG, Oshiro ET, Casanova C NG (1999a). Ecological aspects of the phlebotomine fauna from Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Braz. In: Programme & Abstracts of the 3rd International Symposium on Phlebotomine Sandflies Montpellier, 1999a. Montpellier; p. 36.
 34. Miles MA, Arias JR, Valente SAS, Naiff RD, Souza AA, Povoá MM, Lima JAN CR. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. AmJTropMedHyg. 1983;32:1251–9.
 35. Rodrigues AAF, Barbosa V de A, Andrade Filho JD, Brazil RP. The sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;

36. Feliciangeli M. . Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in northern Venezuela. I. Description of the study area, catching methods and species composition. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 1987;82(1):119 a 124. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761987000100019>
37. Memmott J. Sandfly distribution and abundance in a tropical rain forest. Med Vet Entomol. :403–11.
38. Jane Memmot. Sandfly distribution and abundance in a tropical rain forest. Med Vet Entomol [S I], v 4.
39. Casanova C. Avaliação de potencial biológico de *Lutzomyia intermedia* s. l. como vetor da leishmaniose tegumentar americana na zona rural do município de Conchal, Estado de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública- Universidade do Estado de São Paulo; 2001.
40. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. Medical and veterinary entomology [S I], v 4. 1990;1–24.
41. Cipa Grou: Bermudes H, Dedet JP, Falcão AL, Feliciangeli D, Ferro C, Galati EAB, Gomez EL, Herrero MV, Hervas D, Lebbe J, Morales A, Oguzuku E, Perez E, Rangel EF, Sherlock IA, Torres M, Vignes R W, Colmenares. No Title. 1999.
42. Barros GC, Sessa PA, Mattos EA, Carias VRD, Mayrink W, Alencar JTA, Falqueto A J. Foco de Leishmaniose Tegumentar Americana nos municípios de Viana e Cariacica, Estado de Espírito Santo, Brasil. Revista de Saúde Pública. 1985;1985; 19 (2): 146-153.
43. Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MCA TNA survey for A cutaneous and visceral leishmaniasis among 1. 34. dogs from areas in R de J (Brazil) where the human diseases occur. MIOC 1985; 80 (1): 17-22. A Survey for american cutaneous and visceral leishmaniasis among 1.342 dogs from areas in Rio de Janeiro(Brazil) where the human disease occur. Mem Instituto Oswaldo Cruz ; 82(3). 1985;17–22.
44. American leishmaniasis epidemiology in Brazil. :457–60.
45. Aguillar CM, Rangel EF, Grimaldi-Filho G MHA freqüência de MIOC. leishmaniose tegumentar canina em um foco endêmico do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Mem Instituto Oswaldo Cruz. :82(Supl. 1):56.
46. Gomes AC. American leishmaniasis epidemiology in Brazil. An Bras Dermatol.

- 1992;55–60.
47. Albuquerque A, Campino L, Cardoso L, Cortes S. Evaluation of four molecular methods to detect *Leishmania* infection in dogs. *Parasites and Vectors*. 2017;10(1):1–5.
 48. Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994;88(4):491–3.
 49. Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, et al. Relationship between Canine Visceral Leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* Burden in Dermal Inflammatory Foci. *J Comp Pathol*. 2006;135(2–3):100–7.
 50. Quaresma PF, Carvalho GM de L, Ramos MC das NF, Filho JDA. Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(4):480–5.
 51. Celia Maria Ferreira Gontijo, Alberto Rocha Falcão ALF de VC. The development of species of *Leishmania* Ross , 1903 in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva , 1912). *Mem Instituto Oswaldo Cruz*. 1995;90(3):367–73.
 52. Lessa MM, Lessa HA, Castro TWN, Oliveira A, Machado P, Carvalho EM, et al. Resumo / Summary. 2007;73(6):843–7.
 53. Carvalho GM1, Andrade Filho JD, Falcao AL, Rocha Lima AC GC. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008 Jun;407–14.
 54. Nieves, E., Pimenta PFP. Nieves, E., Pimenta, P.F.P., 2000. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*. 37, 134-40. *J medicinal Entomol*. 2000;37:131–40.
 55. Gontijo B. *Leishmaniose tegumentar americana* American cutaneous leishmaniasis. 2014;(January 2003).
 56. Nery-Guimaraes , F.; Damasceno R. A. *Leishmaniose tegumentar – zoonose de roedores silvestres na Amazônia*. 1968;151–68.
 57. Sherlock, IA.; Miranda, JC.; Sadigursck, M.; Grimaldi Junior G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania*

- donovani in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1984. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1984;79(4): 511.
58. Brasil, RP.; Nascimento, MDSB.; Macau R. Infecção natural do porco (*Sus scrofa*) por *Leishmania* em foco recente de leishmaniose tegumentar na Ilha de São Luís, Maranhão. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1987;82 (1): 145.
 59. Pennisi M. Case report of Leishmaniasis in four cats. . 2004. Veterinary Research Communications. 2004;28(1): 363-366.
 60. Loiola CF, Silva DA, Galati EAB. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and species abundance in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;
 61. São Paulo (Estado). Secretaria de Estado da Saúde - Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo [Internet]. São Paulo; 2006. (Manuais Técnicos). Available from: http://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/homepage/downloads/arquivos-leishmaniose-visceral-americana/manual_lva.pdf%5C
 62. Casanova C, Colla-Jacques FE, Hamilton JGC, Brazil RP, Shaw JJ. Distribution of *Lutzomyia longipalpis* Chemotype Populations in São Paulo State, Brazil. Bates PA, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2015 Mar 17 [cited 2019 Mar 5];9(3):e0003620. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003620>
 63. Silva A, Atlanta CDC, Branco CMC, Fm F. Bepa 15. 2019;16.
 64. Lemes M, Resende M, Vygotsky LS, Brasileira L, Fundamental E, Vygotsky LS. Vygotsky: Um Olhar Sócio-Interacionista do Desenvolvimento da Língua Escrita. 2019;(1995):1–6.
 65. Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. Parasites and Vectors. 2009;2(SUPPL.1):1–8.
 66. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística | IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística | [Internet]. 2017. Report No.: v4. Available from: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/pocos-de-caldas/panorama>
 67. Instituto Brasileiro de geografia e estatística. No Title. Poços de Caldas MG; 2019.

68. Prefeitura Municipal de Poços de. Poços de Caldas [Internet]. 03/08/2018. [cited 2019 Jul 7]. Available from: <http://pocosdecaldas.mg.gov.br/perfil/>
69. Prefeitura Municipal de Poços de Caldas. Poços de Caldas [Internet]. 2019. Available from: <http://www.pocosdecaldas.mg.gov.br/site/?p=2660>
70. (https://ambientes.ambientebrasil.com.br/ecoturismo/destinos/andradas_-_mg.html). Ambiente Brasil. 03/08/2018.
71. <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/minas-gerais/andradas-25042>. Climate-data.03/08/2018.
72. Brasil C. <https://www.cidade-brasil.com.br/municipio-espirito-santo-do-pinhal.html>.03/08/2018.
73. Sudia WD. Battery-operated light trap, an improved model. *Mosq News*. 1981;37:265.
74. Brazil R.P. ,Ponte MC., Passos W.L., Rodrigues , A.A. F, Brazil B.G.. The sand fly fauna (Psychodidae: Phlebotominae) in the region of Saquarema, State of Rio de Janeiro, Brazil, an endemic area of cutaneous leishmaniasis transmission. *J Vector Ecol*. 2011;
75. Rodrigues AAF. Estudo da Fauna Flebotomínica (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brasil. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011. [Internet]. Fundação Oswaldo cruz; 2011. Available from: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/7050>
76. Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Gonçalves M, Reis MG, Carvalho L, et al. Frequency of infection of *Lutzomyia phlebotomines* with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(2):185–8.
77. Passos VM, Lasmar EB, Gontijo CM, Fernandes O, Degraive W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996;91(1):19–20.
78. Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 2006;137(3–4):214–21.
79. Moreira OC, Verly T, Finamore-Araujo P, Gomes SAO, Lopes CM, De Sousa DM, et al. Development of conventional and real-time multiplex PCR-based

- assays for estimation of natural infection rates and *Trypanosoma cruzi* load in triatomine vectors. *Parasites and Vectors*. 2017;10(1):1–14.
80. Barreto MP. Observações sobre a biologia, em condições naturais, dos flebotomos do Estado de São Paulo (Diptera: Psychodidae). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Tese. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1943.
 81. Rangel EF., Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. [Internet]. 20th ed. Editora Fiocruz, editor. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro; 2003. 368 p. Available from: <http://www.fiocruz.br>
 82. Bispo GB da S, da Silva MD, Neto JRG, Galati EAB, Galvis-Ovallos F, de Oliveira AG, et al. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum* . *Parasite*. 2017;24:2.
 83. Britto C, Pereira T de A, Pita-Pereira D de, Rangel EF, Souza GD, Zwetsch A. *Lutzomyia* (*Pintomyia*) *fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American Cutaneous Leishmaniasis: Detection of natural infection by *Leishmania* (*Viannia*) DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using . *Acta Trop*. 2011;120(3):273–5.
 84. Shimabukuro PHF, Galati EAB. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotrop*. 2011;11(supl 1):685–704.
 85. Rodrigues AAF. Avaliação do papel epidemiológico das Leishmanioses em Comunidades Inseridas em Área de Preservação Ambiental, Parque Estadual da Serra da Tiririca, Niterói e Maricá, RJ, Brasil [Internet]. Fundação Oswaldo Cruz- Pós- Graduação em Medicina Tropical; 2016. Available from: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/28087>
 86. Afonso MMS, Costa WA, Azevedo ACR, Da Costa SM, Vilela ML, Rangel EF. Data on sand fly fauna (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Itatiaia National Park, Rio de Janeiro State, Brazil | Dados sobre a fauna flebotomínica (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) do Parque Nacional de Itatiaia, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saude Publica*. 2007;23(3):725–30.
 87. Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae:

- Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(6):759–65.
88. Carvalho BM, Maximo M, Costa WA, De Santana ALF, Da Costa SM, Da Costa Rego TAN, et al. Leishmaniasis transmission in an ecotourism area: Potential vectors in Ilha Grande, Rio de Janeiro State, Brazil. Parasites and Vectors. 2013;6(1):1–12.
 89. E.A.B Galati. Sobre a identificação de *Psychodopygus* (*Psychodopygus*) *arthuri* (Fonseca, 1936) e *P. (P.) lloydi* (Antunes, 1937) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Revista Brasileira de Entomologia. 1981;321–2.
 90. Tonelli GB, Tanure A, Rêgo FD, De Lima Carvalho GM, Simões TC, Filho JDA. Aspects of the ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the Private Natural Heritage Reserve Sanctuary Caraça. PLoS One. 2017;12(6):1–13.
 91. Aguiar GM, Vilela ML LR. Ecologia de Flebotomíneos em Itaguaí-RJ, preferência alimentar. Aguiar et al, 1987.PDF. 1987.
 92. Pessoa JC. Infecção natural do *Phlebotomus* pessoa por formas em leptomonas, provavelmente da *Leishmania brasiliensis* SB. Rev Biol. & Hig. 1940;
 93. Infecção natural e experimental dos flebotomos pela *Leishmania braziliensis* no Estado de São Paulo SB Pessoa, JO Coutinho - Hospital. Hosp (Lond 1886). 1941;
 94. Azevedo AC, Rangel EF, Costa EM, David J, Vasconcelos AW, Lopes UG. Natural infection of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) by *Leishmania* of the *braziliensis* complex in Baturité, Ceará State, northeast Brazil. Vol. 85, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1990. p. 251.
 95. de Carvalho MR, Valença HF, da Silva FJ, de Pita-Pereira D, de Araújo Pereira T, Britto C, 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. 2010;116(1):108–10.
 96. Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MMDS, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(7):831–46.

97. Silva GAR da, Boechat T de O, Ferry FR de A, Pinto JF da C, Azevedo MCVM de, Carvalho R de S, et al. First Case of Autochthonous Human Visceral Leishmaniasis in the Urban Center of Rio De Janeiro: Case Report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2014;56(1):81–4.
98. Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Azevedo AC, Barbosa AF, Andrade CA. Flebótomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. Vol. 81, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1986. p. 347–9.
99. GM Aguiar, WM Medeiros, EF Rangel, R Lainson - Rangel EF L. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro; 2003.