

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

**ESTUDO DOS FLEBOTOMÍNEOS E DA CAPACIDADE INFECTANTE DE
CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL TRATADOS COM
MILTEFOSINA/ALOPURINOL PARA *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* EM
IGUATAMA, MINAS GERAIS**

por

Camila Binder Soares de Souza

Belo Horizonte

2022

DISSERTAÇÃO MCS-IRR

C.B.S. SOUZA

2022

CAMILA BINDER SOARES DE SOUZA

**ESTUDO DOS FLEBOTOMÍNEOS E DA CAPACIDADE INFECTANTE DE
CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL TRATADOS COM
MILTEFOSINA/ALOPURINOL PARA *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* EM
IGUATAMA, MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - Área de concentração Doenças infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis.

Orientação: Dra. Célia M. Ferreira Gontijo

Coorientação: Dr. Felipe Dutra Rêgo

Belo Horizonte

2022

O presente trabalho foi realizado com apoio de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) - Código de Financiamento 001.

S729e Souza, Camila Binder Soares de.
2022

Estudo dos flebotomíneos e da capacidade infectante de cães com leishmaniose visceral tratados com Miltefosina / Alopurinol para *Lutzomyia longipalpis* em Iguatama / Camila Binder Soares de Souza. - Belo Horizonte, 2022.

80 f. : il. color.

Orientadora: Célia M. Ferreira Gontijo.

Coorientador: Felipe Dutra Rêgo

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências da Saúde), Belo Horizonte, 2022.

Bibliografia: f. 67 - 77.

1. Leishmaniose Visceral/transmissão. 2. *Phlebotomus*/patogenicidade. 3. Epidemiologia/estatística & dados numéricos. I. Título.

CDD 616.936

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica:

Segemar Oliveira Magalhães – CRB/6 1975 FIOCRUZ. Instituto René Rachou.

Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener

CAMILA BINDER SOARES DE SOUZA

**ESTUDO DOS FLEBOTOMÍNEOS E DA CAPACIDADE INFECTANTE DE
CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL TRATADOS COM
MILTEFOSINA/ALOPURINOL PARA *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* EM
IGUATAMA, MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Doenças infecto- parasitárias e crônicas não transmissíveis..

Banca examinadora:

Prof. Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo (IRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil (IOC/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Fredy Galvis Ovallos (USP) Titular

Prof. Dra. Mariana Lourenço Freire (IRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 5/09/2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as instituições envolvidas na criação, implementação e financiamento desse trabalho:

Instituto René Rachou – IRR – Fiocruz Minas – Suporte logístico e financeiro;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Conselho Nacional de Pesquisas – CNPq – Suporte financeiro;

Projeto Inova – Fiotec – Suporte financeiro;

Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH) da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Disponibilização de exemplares de flebotomíneos da colônia;

Prefeitura de Iguatama – Suporte logístico e financeiro;

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde do IRR. Aos professores e demais profissionais por todo aprendizado e assistência;

Aos meus orientadores Dr^a. Célia Maria Ferreira Gontijo e Dr. Felipe Dutra Rêgo por todo ensinamento, paciência, assistência e amizade;

Aos membros da banca examinadora por aceitarem contribuir com minha pesquisa;

A todos os alunos, técnicos e pesquisadores do Grupo de Estudos em Leishmanioses, por todos os momentos compartilhados, pela assistência e troca de conhecimento;

Ao Dr. José Dilermando por todo ensinamento, suporte e principalmente, a oportunidades de fazer parte do GEL;

Ao Dr. Daniel Avelar pelo suporte com a biologia molecular;

Aos meus familiares pelo suporte e compreensão;

À Marcela Carreiro por todo apoio, suporte, paciência e por sempre torcer por mim;

À Flávia e Carol pelo suporte no laboratório e pela amizade;

À Débora Capucci por todo companheirismo, amizade e suporte no desenvolvimento do projeto;

Aos meus amigos e familiares pelo incentivo e compreensão;

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

E a todos que direta ou indiretamente me incentivaram e torceram pelo meu sucesso no desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença grave que acomete o homem e outros hospedeiros vertebrados. Os cães são considerados reservatórios do parasito e podem ser uma fonte de infecção para a *Lutzomyia longipalpis*, principal vetora da *Leishmania infantum* no Brasil. O município de Iguatama apresenta alta prevalência de cães sororreagentes (7,4%). O objetivo desse estudo foi realizar um estudo dos flebotomíneos no domicílio dos cães tratados para LV com Miltefosina/Alopurinol e a sua capacidade infectante para *Lu. longipalpis* em Iguatama, Minas Gerais. As coletas entomológicas foram realizadas em quatro campanhas, sendo a primeira um mês antes do tratamento, duas durante e uma ao final do acompanhamento dos cães tratados. Foram utilizadas armadilhas luminosas modelo CDC dispostas por duas noites consecutivas em cada campanha. Foram selecionados 30 cães domiciliados e positivos em pelo menos um teste parasitológico, esses cães foram divididos em dois grupos de acordo com a administração do Alopurinol. O Grupo 1 utilizou o Milteforan e o Alopurinol por 28 dias. Já o Grupo 2 utilizou o Milteforan por 28 dias e o Alopurinol por 12 meses. Após 12 meses de acompanhamento foi realizado o xenodiagnóstico para verificar a capacidade infectante dos cães para a *Lu. longipalpis*. Foram coletados 762 flebotomíneos, sendo 57,6% dos indivíduos da espécie *Lu. longipalpis*. A fauna de flebotomíneos no município se mostrou diversa, porém com maior abundância de espécies de importância médica. Foram encontradas 28 fêmeas com presença de DNA de *Leishmania* sp., com uma taxa de positividade de 12,5%. Verificou-se nas fêmeas com sinal de repasto sanguíneo recente, DNA de *Homo sapiens* (83,33%), *Rattus rattus* (8,33%), *Gallus Gallus* (4,16%) e *Canis familiaris* (4,16%). Dos 30 cães tratados, 19 chegaram ao final do acompanhamento e a capacidade infectante para *Lu. longipalpis* foi de 52,6%. Um maior número de cães negativos no xenodiagnóstico foi observado no Grupo 2 (4/10), porém não há diferença estatística em relação ao Grupo 1 (6/9), onde os cães foram medicados com o Alopurinol apenas durante os 28 dias de uso do Milteforan. A comparação do score clínico entre os dois grupos evidenciou uma diminuição no score do Grupo 2 em relação ao Grupo 1 ($p=0,027$). Apesar de observarmos a manutenção ou diminuição do score clínico de 73,7% dos cães tratados, 52,6% deles se mantiveram infectantes para *Lu. longipalpis*. Os resultados da PCR kDNA da pele dos cães no T12 foi positiva

em dois cães, contrastando com os resultados do xenodiagnóstico onde 10 dos 19 cães foram infectantes para *Lu. longipalpis*. O xenodiagnóstico se mostrou uma ferramenta mais eficiente na detecção da capacidade infectante de cães tratados do que a PCR kDNA. O desenvolvimento de métodos mais eficazes de verificação da infectividade de cães como o aprimoramento de protocolos de tratamento são necessários.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, Milteforan/Alopurinol, *Leishmania infantum*, xenodiagnóstico, flebotomíneos.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a serious disease that affects humans and other vertebrate hosts. Dogs are considered reservoirs of the parasite and can be a source of infection for *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of *Leishmania infantum* in Brazil. The municipality of Iguatama has a high prevalence of seroreactive dogs (7.4%). The aim of this study was to carry out a study of sand flies in the peridomicile of dogs treated for VL with Miltefosine/Allopurinol and their infective capacity for *Lu. longipalpis* in Iguatama, Minas Gerais. Entomological collections were carried out in four campaigns, the first was one month before treatment, two during and one at the end of the follow-up of treated dogs. Light traps model CDC were used for two consecutive nights in each campaign. Thirty domiciled dogs positive in at least one parasitological test were selected and divided into two groups according to the administration of Allopurinol. Group 1 used Milteforan and Allopurinol for 28 days. Group 2 used Milteforan for 28 days and Allopurinol for 12 months. After 12 months of follow-up, xenodiagnosis was performed to verify the infective capacity of dogs for *Lu. longipalpis*. A total of 762 sandflies were collected, being 57.6% of individuals of the *Lu. longipalpis*. The sandfly fauna in the municipality was diverse, but with a greater abundance of species of medical importance. Were found 28 sand flies females with presence of *Leishmania* sp. DNA, with a positivity rate of 12.5%. It was found in females with a recent blood meal sign, DNA of *Homo sapiens* (83.33%), *Rattus rattus* (8.33%), *Gallus Gallus* (4.16%) and *Canis familiaris* (4.16%). Of the 30 treated dogs, 19 reached the end of follow-up and the infective capacity for *Lu. longipalpis* was 52.6%. A greater number of xenodiagnostic negative dogs was observed in Group 2 (4/10), but there is no statistical difference in relation to Group 1 (6/9), where the dogs were medicated with Allopurinol only during the 28 days of use of Milteforan. The comparison of the clinical score between the two groups showed a decrease in the score of Group 2 in relation to Group 1 ($p=0.027$). The continuous use of allopurinol can be an ally to the treatment, especially in dogs that start treatment in the first stages of the disease. Although we observed the maintenance or decrease of the clinical score in 73.7% of the treated dogs, 52.6% of them remained infective for *Lu. longipalpis*. The PCR kDNA results from the skin of the dogs at T12 were positive in two dogs, contrasting with the results of the xenodiagnosis where 10 of the 19 dogs were infective for *Lu. longipalpis*.

Xenodiagnosis proved to be a more efficient tool in detecting the infective capacity of treated dogs than PCR kDNA. The development of more effective methods of verifying the infectivity of dogs as well as the improvement of treatment protocols are necessary.

Keywords: Visceral leishmaniasis, Milteforan/Allopurinol, *Leishmania infantum*, xenodiagnosis, sand flies.

Lista de Figuras

Figura 1: Status de endemicidade da leishmaniose visceral no mundo, 2020.	20
Figura 2: Localização geográfica do município de Iguatama, na Mesorregião Oeste do estado de Minas Gerais, Brasil.....	29
Figura 3 - Distribuição dos pontos de coleta de flebotomíneos e dos cães participantes do xenodiagnóstico na área urbana do município de Iguatama, Minas Gerais.	31
Figura 4 - Armadilha luminosa modelo CDC disposta em peridomicílio no município de Iguatama, Minas Gerais.	32
Figura 5 - Armadilha luminosa modelo CDC com tubo de 50ml contendo álcool 90% e glicerina sendo colocada no peridomicílio de casa participante do estudo	33
Figura 6- Cão participante do estudo sendo encoleirado com coleira impregnada com deltametrina e propoxur (Leevre®, Ourofino).	38
Figura 7- Representação do exame de xenodiagnóstico realizado em um cão com leishmaniose visceral, no município de Iguatama, Minas Gerais.	40
Figura 8 - Gel representativo de PCR dirigida a uma região do kDNA de Leishmania em amostras de fêmeas de flebotomíneo coletadas em Maio e Setembro de 2019.	51
Figura 9 – Distribuição dos pontos com fêmeas de flebotomíneo positivas para Leishmania sp. No município de Iguatama, Minas Gerais.....	52

Lista de Gráficos

Gráficos 1 - Curva acumulação de espécies de flebotomíneos coletados nos meses de Agosto/2018, Janeiro/2019, Maio/2019 e Setembro/2019 no município de Iguatama, Minas Gerais.....	44
Gráficos 2 - Abundância de flebotomíneos coletados nos meses de Agosto/2018, Janeiro/2019, Maio/2019 e Setembro/2019 no município de Iguatama, Minas Gerais. ..	45
Gráficos 3 - Frequência de ocorrência (Índice de Linsdale) de flebotomíneos coletados nos meses de Agosto/2018, Janeiro/2019, Maio/2019 e Setembro/2019 no município de Iguatama, Minas Gerais.	47
Gráficos 4 - Distribuição temporal de <i>Lutzomyia longipalpis</i> e <i>Nyssomyia neivai</i> coletados nos meses de Agosto/2018, Janeiro/2019, Maio/2019 e Setembro/2019 no Município de Iguatama, Minas Gerais.	48

Lista de Quadros

Quadro 1 - Protocolo de estadiamento clínico, manejo e tratamento da leishmaniose visceral canina proposto em cartilha do Brasileish, 2018 (adaptado)	37
---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Indivíduos fêmeas e machos de flebotomíneos coletados no município de Iguatama, Minas Gerais, nos meses de Agosto/2018, Janeiro/2019, Maio/2019 e Setembro/2019.....	43
Tabela 2 - Total de flebotomíneos coletados nos meses de Agosto/2018, Janeiro/2019, Maio/2019 e Setembro/2019 no município de Iguatama, Minas Gerais.	46
Tabela 3 - Flebotomíneos coletados nos meses de Agosto/2018, Janeiro/2019, Maio/2019 e Setembro/2019 no município de Iguatama, Minas Gerais , destacando os seis pontos de coleta com maior abundância.....	49
Tabela 4 - Detecção molecular de Leishmania em fêmeas de flebotomíneos coletadas nos meses de Agosto/2018, Janeiro/2019, Maio/2019 e Setembro/2019 no município de Iguatama, Minas Gerais.	53
Tabela 5 - Identificação da fonte alimentar realizada nas fêmeas de flebotomíneos que apresentavam sinal de repasto sanguíneo recente.	55
Tabela 6 - Resultado do xenodiagnóstico e PCR de pele dos cães tratados com Milteforan + Alopurinol do Grupo 1 e Grupo 2.....	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL – Microlitro

DMSO – Dimetilsulfóxico

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos 5 fosfato

Ev - *Evandromyia*

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

IRR - Instituto René Rachou

ITS1 - *Internal Transcribed Spacer 1*

kDNA - DNA do cinetoplasto de *Leishmania*

Kg - quilograma

Le - *Leishmania*

LFIH - Fisiologia de Insetos Hematófagos

LTA - leishmaniose tegumentar americana

Lu - *Lutzomyia*

LV - leishmaniose visceral

LVC - leishmaniose visceral canina

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

Mg - miligrama

MS - Ministério da Saúde

Ny - *Nyssomyia*

°C - graus celsius

OMS - Organização Mundial da Saúde

Pa - *Psathyromyia*

pb - pares de bases

PCR - *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

Pi - *Pintomyia*

Sc – *Sciopemyia*

Sumário

1	Introdução.....	19
1.1	Leishmaniose visceral	19
1.2	Agente Etiológico.....	20
1.3	Vetor.....	21
1.4	Reservatórios	22
1.5	Controle da LV no Brasil e tratamento dos cães.....	23
2	Justificativa	26
3	Objetivos.....	27
3.1	Objetivo geral	27
3.2	Objetivos específicos.....	27
4	Material e métodos	28
4.1	Procedimentos éticos	28
4.2	Área de estudo	28
4.3	Delineamento do estudo.....	29
4.4	Coleta, montagem e identificação dos flebotomíneos	30
4.5	Extração de DNA das fêmeas sem sinal de repasto sanguíneo.....	34
4.6	Extração de DNA das fêmeas alimentadas	34
4.8	Identificação da fonte de repasto sanguíneo.....	35
4.9	Protocolo de tratamento dos cães com LV e xenodiagnóstico	36

4.10 Análises estatísticas.....	41
5 Resultados.....	42
5.1 Caracterização da fauna de flebotomíneos	42
5.3 Identificação da fonte alimentar nas fêmeas de flebotomíneo.....	54
5.4 Avaliação da capacidade infectante dos cães com LV e tratados para o vetor <i>Lu. longipalpis</i>	56
6 Discussão	58
6.1 Estudo dos flebotomíneos	58
6.2 Repasto sanguíneo	62
6.3 Capacidade infectante.....	63
7 Conclusões.....	66
Referências Bibliográficas.....	67
Anexos	78
Anexo 1: <i>Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São João Del Rei (Protocolo n.º 032/2018)</i>	78
Anexo 2: Licença permanente para coleta de material zoológico.....	79

1 Introdução

1.1 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como Calazar e esplenomegalia tropical, é uma doença parasitária amplamente distribuída pelo mundo, configurando, segundo a Organização Mundial de Saúde, um grande problema de saúde pública. A doença humana pode evoluir para o óbito em mais de 90% dos casos na ausência de tratamento.

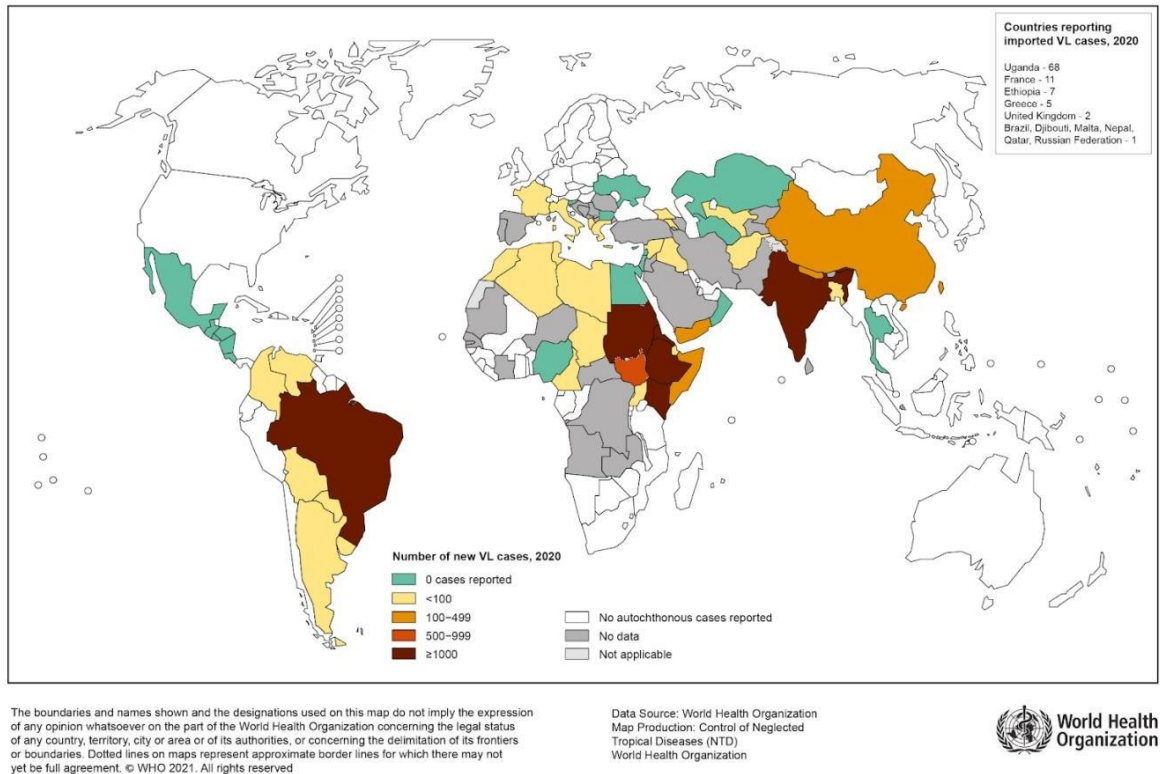
A LV está presente em 83 países, sendo 78 deles considerados endêmicos (Figura 1). Ocorrem, anualmente, aproximadamente 50.000 a 90.000 novos casos no mundo (MS, 2019; WHO, 2022a). O Brasil faz parte dos países mais afetados por essa enfermidade, juntamente com Bangladesh, China, Etiópia, Índia, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão, onde juntos, no ano de 2017, foram responsáveis por quase 95% dos novos casos relatados no mundo (OMS, 2017).

É uma doença regularmente associada a questões socioeconômicas, uma vez que as condições de habitação e saneamento podem influenciar na ocorrência e reprodução dos vetores, além das condições de nutrição dos indivíduos em regiões mais pobres, tornando-os ainda mais susceptíveis à infecção. A falta de acessibilidade a serviços básicos, como os de saúde e saneamento, a indisponibilidade de trabalhos formais, além da organização do espaço físico, podem favorecer o aumento na incidência da leishmaniose (ALVAR et al, 2006; MISSAWA & BORBA, 2009; WHO, 2022b).

Nas Américas, o Brasil é o país com mais casos da doença, sendo registrados em todas as Unidades da Federação. Nota-se uma crescente urbanização da LV (CRUZ et al., 2021), uma vez que seus vetores, flebotomíneos das espécies *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* e *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi*, apresentam grande adaptação a ambientes antropizados (GALATI et al., 1997; MS, 2019). Essa capacidade de adaptação ao meio urbano pode ocasionar o aumento dos casos da doença (ANDRADE-FILHO et al., 2001; SARAIVA et al., 2009; BASTOS, 2012; VILELA et al., 2013).

Figura 1: Status de endemidade da leishmaniose visceral no mundo, 2020

Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2020



Fonte: WHO, 2020.

1.2 Agente Etiológico

No Brasil, essa zoonose é causada por parasitos do complexo donovani, espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle 1908), um protozoário unicelular heteroxeno pertencente à classe Kinetoplastea e à família Trypanosomatidae. É encontrado em duas formas: flagelada promastigota, encontrada no trato digestivo de flebotomíneos e amastigota, encontrada em células do sistema mononuclear fagocitário dos hospedeiros vertebrados (ESPINOSA et al., 2016). Essa espécie também é o agente etiológico da LV em outros países da América do Sul, no Mediterrâneo, no oeste e na região central da Ásia. A *Le. infantum* foi introduzida nas Américas por portugueses e espanhóis durante o período de colonização (MOMEN et al., 1993).

Ao infectar o homem, pode infectar células do sistema fagocítico mononuclear, atingindo a medula óssea, fígado, baço e gânglios, causando um espectro de manifestações clínicas, como febre prolongada, hepatoesplenomegalia e pancitopenia. Após serem fagocitadas pelos macrófagos, as leishmanias se diferenciam em amastigotas e se multiplicam causando rompimento dessas células e consequente extravasamento, sendo então fagocitadas por novos macrófagos e assim sucessivamente (SCHIMMING et al., 2012).

1.3 Vetor

A *Leishmania (Leishmania) infantum* tem como vetor no Brasil, fêmeas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae). Os flebotomíneos são insetos dípteros, medindo aproximadamente 3 mm, cobertos de cerdas e coloração clara. Possuem asas em formato lanceolado, pernas longas e aparelho bucal com probóscide adaptada para a estratégia de repasto a telmatofagia (pool-feeding). Essa estratégia consiste em produzir lesões na pele do hospedeiro, resultando em extravasamento de sangue que será sugado pela fêmea. Os flebotomíneos apresentam hábito crepuscular e noturno e a espécie incriminada como principal vetora da *Le. infantum* no Brasil é a *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (LEHANE, 2005; MAROLI et al., 2013).

A espécie *Lu. longipalpis* possui alta plasticidade, apresentando grande grau de adaptação e dispersão em ambiente antropizado, sendo registrados no intra e peridomicílio. Possui hábito alimentar generalista, podendo se alimentar tanto em animais sinantrópicos quanto em animais domésticos (ALMEIDA et al., 2013).

As fêmeas se infectam ao realizarem seu repasto sanguíneo em um reservatório do parasito. No interior dos insetos ocorre uma série de transformações morfológicas que culminam com as formas metacíclicas infectantes (BATES, 2007). As formas metacíclicas são então inoculadas na pele do hospedeiro suscetível durante sucessivos repastos sanguíneos juntamente com elementos da microbiota intestinal (DEY et al., 2018), proteínas salivares, exosomas e proteofosfoglicanos derivados das promastigotas (ASHFORD, 1996; HANDMAN, 2001). O sangue é a principal fonte de alimentação em fêmeas e hábito necessário à maturação de seus ovos (LEHANE, 2005; MARTINS, 2015).

Além da *Lu. longipalpis*, outras espécies apresentam importância médica. É estimado que mais de 90 espécies de flebotomíneos são possíveis vetores de *Leishmania* spp. (RANGEL & SHAW, 2018).

O controle desses insetos é complexo, uma vez que suas larvas se desenvolvem em solo úmido e matéria orgânica, diferente de outros dípteros, como mosquitos do gênero *Aedes*, que se reproduzem em água. O encontro dos criadouros das larvas é um desafio e o controle tem sido feito direcionado apenas às formas adultas (MAROLI et al., 2013).

1.4 Reservatórios

Reservatório pode ser definido como o habitat onde um patógeno é capaz de se estabelecer, se multiplicar e/ou crescer, podendo ser transmitido a um hospedeiro suscetível (ROQUE & JANSEN, 2014).

Os cães (*Canis familiaris*) são considerados como principal reservatório na área urbana, exercendo importante papel no ciclo de transmissão da doença. Ainda no ambiente doméstico, gatos (*Felis catus*) têm sido encontrados infectados por *Le. infantum*, porém o seu papel epidemiológico ainda não está bem descrito (GONTIJO & MELO, 2004; ROCHA et al., 2019; SILVA et al., 2020; BALDINI-PERUCA et al., 2022). No ambiente silvestre, por sua vez, outras espécies de mamíferos, tais como cachorro do mato, morcegos, ratos e marsupiais são suspeitos de atuar como hospedeiros, podendo desempenhar função na dinâmica de distribuição e transmissão das leishmanioses (ROQUE & JANSEN, 2014).

Sabe-se que nas áreas urbanas, os casos enzoóticos precedem os casos humanos. A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) pode apresentar um grande espectro de manifestações clínicas, sendo as mais frequentes lesões cutâneas, linfadenomegalia, onicogribose, perda de peso, alopecia e ceratoconjuntivite (MARCONDES & ROSSI, 2013). Geralmente, os cães doentes são demasiadamente imunodeprimidos e em muitos casos, cerca de 40% a 60%, o cão soropositivo não desenvolve a doença, sendo considerado assintomático (FERRER, 2002; MS, 2014). Porém, mesmo assintomáticos, esses cães apresentam intenso parasitismo de formas amastigota na pele e podem ser infectivos para o vetor reforçando sua importância na manutenção do ciclo da doença (REIS et al., 2006; COSTA-VAL et al.,

2007; MICHALSKY et al., 2007). A alta densidade de insetos vetores e a grande prevalência de cães positivos para LVC podem contribuir para uma rápida propagação da doença em condições favoráveis (BENETH et al., 2008).

1.5 Controle da LV no Brasil e tratamento dos cães

As ações de controle da LV no Brasil remonta à década de 50 e visava interromper os elos epidemiológicos da cadeia de transmissão. Com o aumento do número de casos e a expansão geográfica da doença foi proposto o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) do Ministério da Saúde na tentativa de propor medidas integrativas incluindo ações educacionais, visando a redução da transmissão e da morbimortalidade. As estratégias voltadas a interrupção da transmissão propostas são o controle vetorial e inquéritos soropidemiológicos caninos com posterior eutanásia dos cães soropositivos. Para a redução da letalidade recomenda-se o diagnóstico e tratamento precoces. Apesar dos esforços e dos recursos disponíveis para o desenvolvimento do PVCLV, os resultados alcançados não tem surtido o efeito desejado pois permanecem ocorrendo os casos humanos e a expansão da doença para áreas não endêmicas. As estratégias podem ser falhas, principalmente devido a necessidade de utilização de estratégias combinadas a fim de aumentar a acurácia diagnóstica, recusa do tutor em eutanasiar os cães e a ineficiência da vigilância por parte dos municípios (RIBEIRO et al., 2019; PEREIRA DA SILVA et al., 2017).

O tratamento dos cães com LV não era permitido no Brasil até o ano de 2016, sendo a eutanásia a única medida adotada para os animais soropositivos. Entretanto, em Setembro deste mesmo ano, o medicamento Milteforan™ (VIRBAC) foi registrado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como opção para a terapêutica de cães com LV (MAPA, 2016).

O Milteforan, cujo princípio ativo é a Miltefosina (hexadecilfosfocolina, 20 mg/mL, Virbac) é um medicamento de uso oral, incolor e viscoso, inicialmente utilizado para o tratamento de câncer, que demonstrou atividade leishmanicida e vem sendo utilizado na terapêutica de cães com LV por causar apoptose e distúrbios das vias de sinalização celular dependentes de lipídeos (SUNDAR et al., 2002; DORLO et al., 2012). De acordo com as informações disponibilizadas pelo fabricante, os sinais

clínicos da doença começam a diminuir logo após o início do tratamento, com redução significativa após duas semanas, podendo perdurar por algumas semanas após o fim do uso do medicamento. Além disso, o medicamento é capaz de reduzir a carga parasitária em até 74%, levando a redução dos sinais clínicos, mas não à parasitológica (NOGUEIRA et al., 2018).

O Alopurinol, medicamento usado de forma combinada ao Milteforan na terapia da LV canina no Brasil, é um potente inibidor da biossíntese de ácido úrico e do metabolismo das purinas, reduzindo a replicação da *Leishmania*, causando efeito leishmaniostático. Este medicamento tem se demonstrado eficiente no controle da carga parasitária, sendo importante para o controle das recidivas na LV canina (GONÇALVES et al., 2019).

Até o momento, poucos estudos foram feitos no Brasil para avaliar a eficácia do Milteforan na redução dos sinais clínicos dos cães infectados e a sua infectividade para o vetor. Destes, destaca-se o estudo conduzido por Nogueira et al., (2019), que demonstrou uma melhora clínica significativa dos cães, bem como reduzida infectividade para flebotomíneos em exame de xenodiagnóstico. Apesar deste importante resultado, é importante salientar que devido a recém incorporação do Milteforan como método de tratamento dos cães com LV, mais estudos precisam ser realizados. Além disso, apesar da melhora clínica e da reduzida infectividade, o cão permanece como reservatório do parasito, haja vista que não ocorre cura parasitológica e por este motivo, o tratamento de cães não é considerado uma medida de controle da doença. Estudos sugeriram que a variação na carga parasitária na pele dos cães está relacionada com a capacidade infectiva deste animal para o vetor sendo, portanto, um potencial biomarcador para avaliação da infectividade (BORJA et al., 2016).

Para avaliar a capacidade infectante de cães para o vetor *Lu. longipalpis*, tem-se utilizado o exame de xenodiagnóstico. Essa técnica consiste em alimentar insetos vetores de determinado parasito, e criados em colônia, no hospedeiro a ser investigado e posteriormente verificar sua infectiosidade (MONDAL et al., 2018). Singh et al., (2020) afirmam que o xenodiagnóstico é uma ferramenta importante para a vigilância epidemiológica, uma vez que fornece evidências científicas sobre o

potencial de transmissão dos reservatórios de *Le. infantum* ao vetor, fornecendo assim dados para os programas de controle da LV.

2 Justificativa

O tratamento da LVC com Milteforan foi permitido no Brasil no ano de 2016. Portanto, faz-se necessária uma avaliação da ação deste medicamento, bem como o acompanhamento de cães tratados. É importante verificar sua eficácia sobre a sintomatologia, a carga parasitária de cães naturalmente infectados e tratados, como também a sua capacidade infectante para o vetor.

Desde a liberação do tratamento, apenas um artigo foi publicado avaliando a terapia com Milteforan em cães no Brasil e que utilizou o xenodiagnóstico como método para verificar a infectividade dos cães tratados para o vetor. Este estudo avaliou os cães apenas durante três meses pós-tratamento sendo que os animais foram mantidos em canis. Portanto, nenhum ensaio analisou a capacidade infectante de cães tratados com Milteforan domiciliados, encoleirados e mantendo sua rotina e alimentação habituais, isto é, vivendo nas condições epidemiológicas de áreas de transmissão no Brasil.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar aspectos ecológicos da fauna de flebotomíneos e a capacidade infectante de cães com LV, tratados com Milteforan/Alopurinol para o vetor *Lutzomyia longipalpis*.

3.2 Objetivos específicos

Descrever a fauna de flebotomíneos no domicílio dos cães selecionados para tratamento.

Detectar a presença de DNA de *Leishmania* e identificar a fonte alimentar nas fêmeas de flebotomíneo coletadas;

Avaliar a capacidade infectante dos cães tratados com Miltefosina/Alopurinol para o vetor *Lutzomyia longipalpis*.

4 Material e métodos

4.1 Procedimentos éticos

Todos os procedimentos que envolveram a pesquisa de *Leishmania* e a capacidade infectante dos cães, foram realizados de acordo com as normas e regulamentos do Comitê de Ética e Experimentação em Animais (CEUA). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São João Del Rei (Protocolo n.º 032/2018) (Anexo 1). As coletas de flebotomíneos no município de Iguatama foram realizadas em consonância com o Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), registrada sob a licença 15237-2 (Anexo 2).

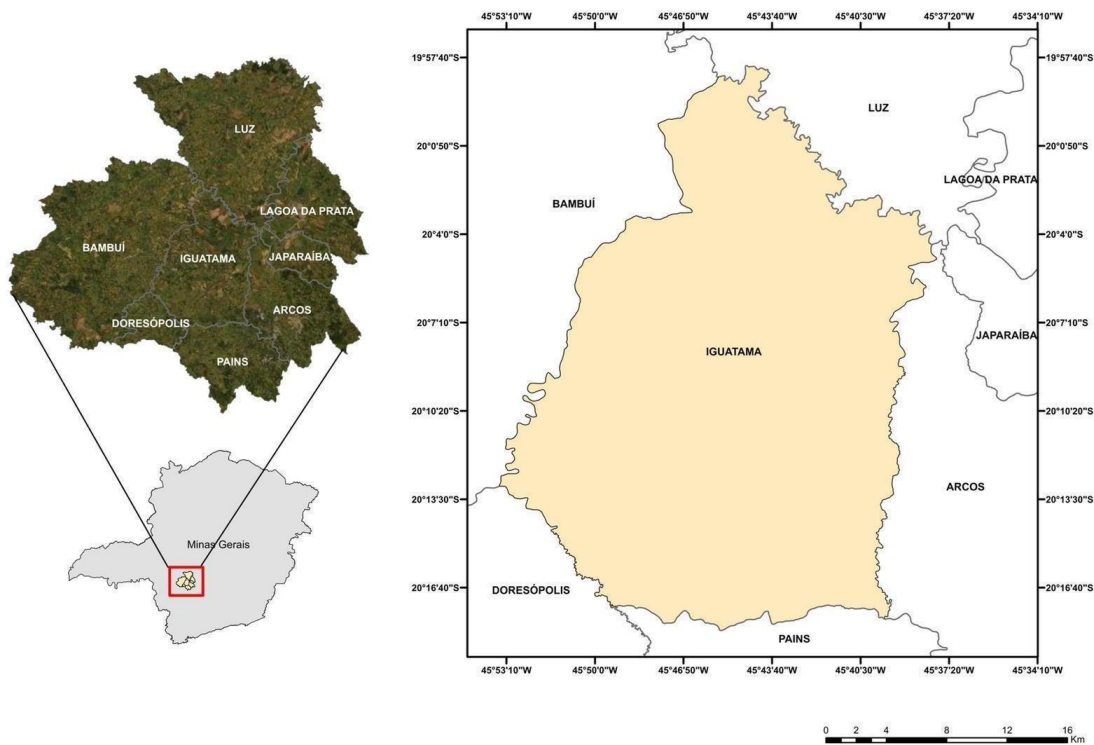
4.2 Área de estudo

O estudo foi realizado no município de Iguatama, localizado na Mesorregião Oeste de Minas Gerais e Microrregião de Piumhi, (Figura 2). Iguatama possui população estimada em 7.901 habitantes e faz divisa com os municípios de Arcos, Doresópolis, Bambuí, Pains e Luz (IBGE, 2021).

Em 2013 foi realizado inquérito sorológico amostral canino, sendo estimada a prevalência de 8,3% para LVC. Na ocasião, como medida de controle da LV, cerca de 84% dos cães sororreagentes foram sacrificados (FARIA et al., 2014) e ao longo dos anos subsequentes os cães remanescentes vieram a óbito. Em 2017 foi realizado um novo inquérito canino com prevalência de 7,4% para LV (VAZ et al., 2020). Comparando a prevalência dos inquéritos caninos, não foi observada diferença significativa ($P=0,764$).

Em consonância com a situação epidemiológica da leishmaniose visceral no município, principalmente no que tange a doença canina, este estudo teve como foco estudar os aspectos relacionados à população de flebotomíneos nos domicílios onde os casos caninos foram reportados além de avaliar a infectividade dos cães para *Lu. longipalpis* após o tratamento com Milteforan/Alopurinol.

Figura 2: Localização geográfica do município de Iguatama, na Mesorregião Oeste do estado de Minas Gerais, Brasil.



Fonte: Elaborado pela autora e Débora Cristina Capucci.

4.3 Delineamento do estudo

Este estudo é parte integrante do projeto intitulado “Avaliação do tratamento com Miltefosina em cães domiciliados e naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*” aprovado na Chamada Universal MCTIC/CNPq n.º 28/2018 e foi desenvolvido seguindo as seguintes etapas:

- **Agosto de 2018:** primeira coleta de flebotomíneos nos domicílios que apresentavam cães positivos para LV, antes do início do tratamento dos cães;
- **Setembro de 2018:** início do tratamento dos cães com LV, utilizando Milteforan e Alopurinol em associação. Neste momento, foi realizada coleta amostras biológicas de medula óssea e pele de orelha para análise parasitológica e molecular, além do encoleiramento dos cães (Tempo 0 - “T0”);

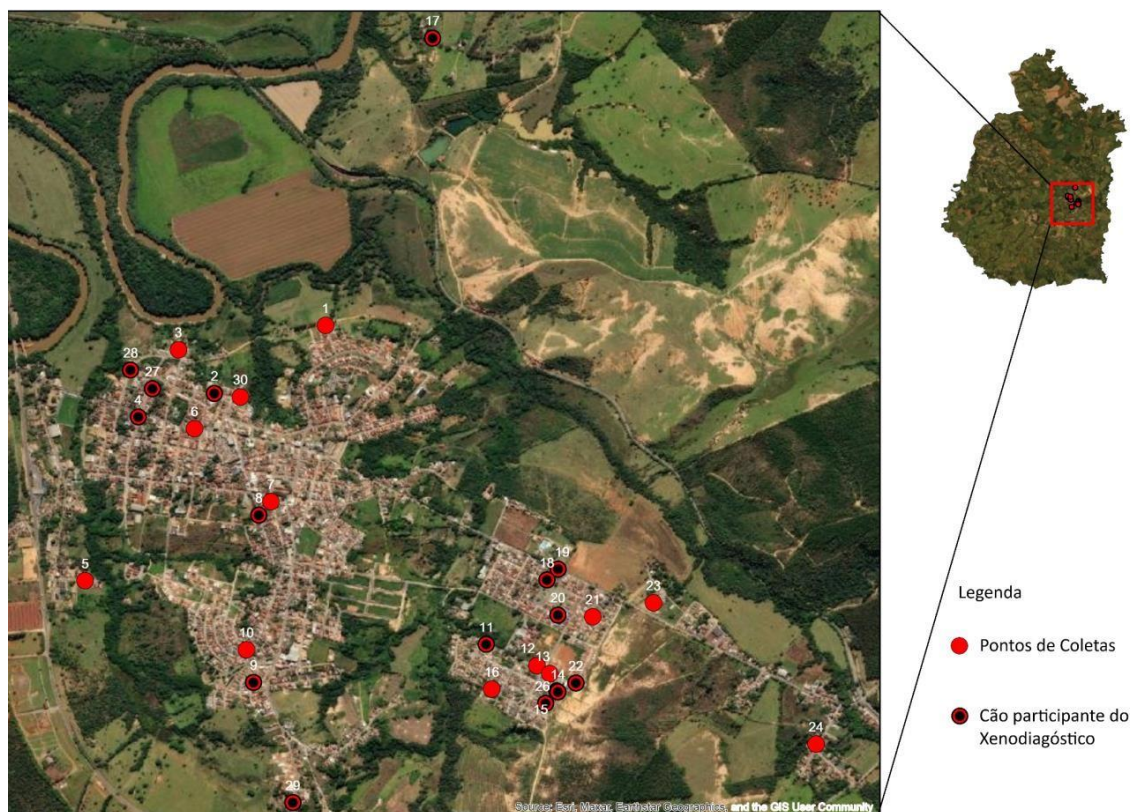
- **Janeiro de 2019:** segunda coleta de flebotomíneos nos domicílios que apresentavam cães positivos para LV, quatro meses após o início do tratamento dos cães;
- **Março de 2019:** coleta de amostras biológicas de medula óssea e pele dos cães, para análise parasitológica e molecular, seis meses após o início do tratamento (Tempo 6 - “T6”);
- **Mai de 2019:** terceira coleta de flebotomíneos nos domicílios que apresentavam cães positivos para LV, oito meses após o início do tratamento dos cães;
- **Setembro de 2019:** coleta de amostras biológicas de medula óssea e pele dos cães para análise parasitológica e molecular e coleta de flebotomíneos doze meses após o início do tratamento (Tempo 12 - “T12”);
- **Outubro de 2019:** realização do xenodiagnóstico um mês após o término do acompanhamento dos cães.

Nesta dissertação, serão apresentados os resultados referentes aos estudos dos flebotomíneos, aos experimentos de xenodiagnóstico e da análise molecular das amostras de pele dos cães no T12, permitindo a avaliação em conjunto da detecção molecular de *Leishmania* nos cães e o resultado do xenodiagnóstico.

4.4 Coleta, montagem e identificação dos flebotomíneos

Os flebotomíneos foram coletados no peridomicílio de 29 casas que apresentavam cães sororreagentes selecionados para o estudo de avaliação do tratamento para LVC (Figura 3). Foram realizadas quatro campanhas de coleta, sendo a primeira realizada antes do tratamento, no mês de agosto de 2018. As demais coletas ocorreram quadrimestralmente, concomitante ao acompanhamento dos cães tratados.

Figura 3 - Distribuição dos pontos de coleta de flebotomíneos e dos cães participantes do xenodiagnóstico na área urbana do município de Iguatama, Minas Gerais.



Fonte: Elaborado por Débora Cristina Capucci.

Os flebotomíneos foram coletados utilizando armadilhas luminosas automáticas modelo CDC contendo uma malha fina e tubo cônico de polipropileno para captura dos insetos. Os insetos coletados foram mantidos em solução de álcool 70% contendo 10% de glicerol, acrescidos ao tubo coletor durante a instalação das armadilhas (Figuras 4 e 5). Em residência, duas armadilhas foram instaladas e permaneceram expostas por duas noites consecutivas, das 18:00 às 6:00 horas, totalizando 24 horas de esforço amostral por armadilha. A escolha dos locais de coleta baseou-se na distribuição espacial dos casos de LVC, compreendendo todos os bairros do município de Iguatama. De modo geral, os peridomicílios apresentavam características semelhantes, com presença de área externa contendo árvores frutíferas e, na maioria das vezes, outros animais domésticos, predominantemente galinhas.

Figura 4 - Armadilha luminosa modelo CDC disposta em peridomicílio no município de Iguatama, Minas Gerais.



Fonte: arquivo pessoal da autora.

Figura 5 - Armadilha luminosa modelo CDC com tubo de 50ml contendo álcool 90% e 20% glicerina sendo colocada no peridomicílio de casa participante do estudo



Fonte: Felipe Dutra Rêgo.

Os flebotomíneos capturados foram separados de acordo com o sexo e montados entre lâmina e lamínula utilizando líquido de Berlese. Os machos foram montados posicionando a cabeça no sentido dorsal do lado esquerdo do inseto enquanto as fêmeas foram dissecadas, removendo a cabeça e os três últimos segmentos abdominais, montados em lâmina no sentido ventral, possibilitando a visualização do cibário, antena, palpo e espermateca. O restante do corpo das fêmeas (tórax e abdômen) foi armazenado a seco em tubos de polipropileno de 1,5mL a -20°C até a utilização das técnicas moleculares. A identificação da espécie foi realizada em observação por microscopia óptica, seguindo a classificação proposta por Galati (2018).

4.5 Extração de DNA das fêmeas sem sinal de repasto sanguíneo

As fêmeas que não apresentavam sinais de alimentação recente, foram processadas individualmente para detecção molecular de *Leishmania* através da técnica de PCR. Para isso, o DNA total foi extraído utilizando o kit Gentra Puregene Tissue Kit (Qiagen, EUA). Inicialmente, foi realizado o procedimento de maceração individual das fêmeas com auxílio de pistilos estéreis em 100 µL de solução de lise celular e após esta etapa, o protocolo seguiu conforme as instruções do fabricante. O DNA extraído foi eluído em 30µL de solução de eluição e mantidos a -20°C até a realização dos ensaios moleculares.

4.6 Extração de DNA das fêmeas alimentadas

As fêmeas que apresentaram sinais de alimentação sanguínea recente, caracterizado pela presença de sangue na região abdominal, tiveram seu abdômen e tórax armazenados individualmente, a seco em tubo estéril de polipropileno de 1,5 mL. Antes da extração de DNA, as fêmeas foram retiradas do tubo em que estavam armazenadas e lavadas três vezes em solução de hipoclorito de sódio a 2% e água destilada estéril, com o intuito de eliminar contaminantes (DNA humano) presente na parte externa dos flebotomíneos, oriundo dos procedimentos de coleta, triagem e montagem em lâmina. Após esta etapa, as fêmeas foram submetidas à extração de DNA, que por sua vez, foi realizada com o kit QIAamp® Blood (Qiagen, USA), seguindo as instruções do fabricante. Esta técnica, requer grande cautela devido ao alto risco de contaminação com DNA humano durante o manuseio. Portanto, durante todo o procedimento, foram utilizados EPIs como jaleco, luvas, touca e máscara de proteção facial, evitando a contaminação cruzada com DNA humano. Além disso, a cabine de segurança biológica e todos os instrumentos utilizados foram descontaminados com hipoclorito de sódio a 1% e soluções de DNAZap (Invitrogen™), seguindo as instruções do fabricante. Os materiais utilizados no procedimento de extração de DNA, como pistilos, ponteiros e microtubos, foram autoclavados e abertos somente dentro da cabine de segurança biológica, durante o procedimento.

Após a extração, o DNA total foi armazenado em freezer a -20°C até a utilização nos ensaios moleculares.

4.7 Detecção molecular de *Leishmania* sp.

Para detectar a presença de DNA de *Leishmania* nas fêmeas de flebotomíneos, o material genético extraído foi submetido a técnica de PCR dirigida à região intergênica ITS 1 de *Leishmania* (EL TAI et al., 2000). A reação de PCR foi realizada utilizando o par de iniciadores LITSR: 5´ CTGGATCATTTTCCGATG 3´ e L5.8S: 5´ TGATACCACTTATCGCACTT 3´, que amplifica um fragmento de aproximadamente 300-350 pares de bases, conforme descrito por Schonian et al. (2003).

De forma complementar, a detecção molecular foi realizada utilizando o par de iniciadores 150/152 que amplificam uma região conservada do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA), gerando um fragmento de 120pb (DEGRAVE et al., 1994). As reações foram preparadas para um volume final de 25µL seguindo o protocolo descrito por Passos et al. (1996). As reações foram processadas em termociclador automático ProFlex™ 3 x 32-well PCR System (Applied Biosystems™, California, USA) e os resultados foram visualizados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídio, expostos sob luz ultravioleta (UV). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram amplificação correspondente ao peso molecular esperado. Em todas as reações, o DNA extraído de culturas *in vitro* de formas promastigotas de *Le. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) foi utilizado como controle positivo, e os componentes da reação de PCR, exceto o DNA, foi utilizado como controle negativo da reação., 300-350 pb., utilizando o peso molecular (PM) de 100pb.

4.8 Identificação da fonte de repasto sanguíneo

A identificação de fonte de alimentação sanguínea das fêmeas que apresentavam sinais de alimentação recente foi realizada através da amplificação de um fragmento de 359 pb do gene Citocromo b (Cytb), utilizando os iniciadores universais Cytb1: 5'CCATCAAACATCTCAGCATGAAA 3' e Cytb2: 5' CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC3', de acordo com o protocolo proposto por Steuber et al. (2005). Em todas as reações, foram incluídos como controle positivos, DNA extraído de uma amostra de sangue de cão (*Canis familiaris*) e como controles

negativos, DNA extraído de flebotomíneos machos (controle interno da extração) e os componentes da reação de PCR, exceto o DNA (controle interno da reação). Os produtos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (10mg/mL). As amostras positivas foram purificadas utilizando o kit de Extração de bandas de Gel QIAquick (QIAGEN) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram submetidos a reação de sequenciamento, conforme protocolo descrito por Rêgo et al. (2015). Para análise da qualidade das sequências, os eletroferogramas foram manualmente verificados utilizando o software FinchTV (Geospiza, Inc.) e o software SeqTrace (STUCKY, 2012) foi utilizado para alinhamento e formação das sequências consenso, que foram posteriormente utilizadas para verificação de similaridade com sequências depositadas no GenBank através da ferramenta de alinhamento BLASTN. Para esta análise foram consideradas apenas as identificações que apresentavam similaridade maior ou igual a 95% com as sequências depositadas no banco de dados.

4.9 Protocolo de tratamento dos cães com LV e xenodiagnóstico

Trinta cães naturalmente infectados por *Le. infantum* diagnosticados no inquérito canino realizado no município de Iguatama em 2017 (VAZ et al., 2018) foram selecionados para avaliação do tratamento utilizando os medicamentos Milteforan® e Alopurinol, fazendo uma nova testagem desses cães. O Milteforan® foi administrado por via oral durante 28 dias na dosagem de 2mg por Kg de peso do animal, enquanto o Alopurinol foi administrado por via oral, na dose de 10mg por Kg de peso do animal, a cada 12 horas.

Os cães com diagnóstico confirmatório para LV em pelo menos um teste parasitológico foram divididos em dois grupos uniformemente distribuídos, levando em consideração o equilíbrio entre os sexos, a presença de sinais clínicos o estadiamento da doença (BRASILEISH, 2018) (Quadro 1). Levou-se em consideração também, o compromisso do tutor com a administração do Alopurinol, de modo que os dois grupos apresentassem características semelhantes. Os cães que compuseram o grupo 1, receberam o tratamento composto por Miltefosina e Alopurinol por 28 dias, período referente à administração da Miltefosina. Já os cães que compuseram o grupo 2, receberam o tratamento com Miltefosina e Alopurinol por 28 dias e permaneceram

com a administração do Alopurinol por 12 meses. Durante todo o experimento, desde o início do tratamento (T0) até o final do período de acompanhamento após 1 ano (T12), todos os cães receberam coleiras impregnadas com deltametrina e propoxur, seguindo o tempo de uso do fabricante (Leevre®, Ourofino) (Figura 6) a fim de reduzir a atratividade de flebotomíneos.

Quadro 1 - Protocolo de estadiamento clínico, manejo e tratamento da leishmaniose visceral canina proposto em cartilha do Brasileish, 2018 (adaptado)

Estádios clínicos	Sinais clínicos
ESTÁDIO I Sem doença	Ausentes.
ESTÁDIO II Sem doença/Doença leve	Sinais clínicos ausentes a leves, como linfadenopatia periférica, dermatite papular, emagrecimento discreto.
ESTÁDIO III Doença moderada	Sinais do Estádio II, além de outros como lesões cutâneas difusas ou simétricas, onicogrifose, ulcerações, anorexia e emagrecimento.
ESTÁDIO IV Doença grave	Sinais de Estádio IV, além de tromboembolismo pulmonar ou síndrome nefrótica e doença renal em estágio final.
ESTÁDIO V Doença muito grave	Sinais do Estádio IV, além de tromboembolismo pulmonar ou síndrome nefrótica e doença renal em estágio final.

Fonte: Brasileish - Grupo de Estudos em leishmaniose animal.

Figura 6- Cão participante do estudo sendo encoleirado com coleira impregnada com deltametrina e propoxur (Leevre®, Ourofino)



Fonte: Felipe Dutra Rêgo.

Os cães receberam a visita diária de um médico veterinário que acompanhou a evolução clínica do animal, assim como o surgimento de possíveis efeitos colaterais até o final do medicamento Milteforan®. Após esse período, os cães foram acompanhados mensalmente por 12 meses. Um mês após o período de acompanhamento (T12), os cães foram submetidos ao exame de xenodiagnóstico, a fim de verificar a capacidade infectante para o vetor *Lu. longipalpis*. Para isto, exemplares de *Lu. longipalpis* provenientes da colônia fechada mantida no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH) do Departamento de Parasitologia da UFMG foram utilizados. Os flebotomíneos foram separados em recipientes individuais contendo algodão embebido com solução açucarada (glicose 30%), mantidos em caixas de isopor com monitoramento constante de temperatura e umidade e transportados ao município de Iguatama.

Quinze dias antes da realização do xenodiagnóstico, as coleiras impregnadas com deltametrina foram retiradas, evitando a interferência do inseticida piretróide na

alimentação dos flebotomíneos. Durante este período, para evitar a atratividade dos cães aos flebotomíneos, foi utilizado o repelente em gotas de aplicação tópica Advantage® Max3 (Bayer) seguindo a dosagem recomendada de acordo com o peso do cão. No dia da realização do xenodiagnóstico, os cães foram submetidos ao procedimento de banho, removendo resíduos do repelente tópico.

Para a realização do xenodiagnóstico, os cães foram sedados com Xilazina e Cetamina, e tiveram seus parâmetros clínicos acompanhados por um médico veterinário. Após a constatação do plano anestésico, o recipiente contendo os flebotomíneos foi colocado em contato com a superfície interna do pavilhão auricular do cão, permanecendo por cerca de 30 minutos (Figura 7). Após este período, os cães foram acompanhados até o final da sedação, garantindo o bem estar animal.

Os flebotomíneos foram mantidos em caixa de isopor com monitoramento constante de temperatura e umidade e transportados ao insetário do Grupo de Entomologia Médica do Instituto René Rachou, Fiocruz Minas, sendo oferecido solução açucarada (glicose 30%) por cinco dias. Após este período, os insetos foram sacrificados em baixa temperatura, agrupados em cinco *pools* contendo dez fêmeas cada (totalizando 50 fêmeas por cão), para realização da extração de DNA, utilizando o kit Gentra Puregene Tissue Kit (Qiagen, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente a pesquisa por *Leishmania* foi realizada através da técnica de PCR direcionada à uma região do kDNA de *Leishmania* (PASSOS et al., 1996).

Ao início do estudo, 30 cães foram selecionados e iniciaram o tratamento com Milteforan e Alopurinol, porém apenas 19 cães concluíram os 12 meses de acompanhamento, estando aptos ao xenodiagnóstico.

Figura 7- Representação do exame de xenodiagnóstico realizado em um cão com leishmaniose visceral, no município de Iguatama, Minas Gerais.



Fonte: Felipe Dutra Rêgo.

4.10 Análises estatísticas

Análises descritivas da fauna de flebotomíneos, a curva de acumulação de espécies e regressão linear preditiva da riqueza esperada para a área de estudos foram realizadas utilizando o software Microsoft Excel (Office 2016), de acordo com a proposta de Gotelli & Colwell (2001). O índice *Chao 1*, um estimador não-paramétrico de riqueza mínima esperada, foi calculado utilizando a fórmula clássica proposta por CHAO (1984).

Os índices de diversidade de Shannon (H) e Simpson (1-D) e índice de equitabilidade de Pielou (J) foram utilizados nas análises ecológicas entre os meses de coleta na área de estudos. Estes índices heterogêneos utilizam de forma integrada a quantidade de espécies amostrada e os componentes relacionados à heterogeneidade da comunidade (padrões de distribuição das espécies), sendo portanto, sensíveis à presença de espécies raras e dominantes e a tamanhos amostrais variados (PEET, 1974; LANDE, 1996; LANDE et al., 2000; BUCKLAND et al., 2005).

Todos os índices ecológicos foram calculados usando o software EstimateS, versão 9.1 (COLWELL, 2013).

Para as análise comparativa na proporção de cães positivos no xenodiagnóstico de acordo com o protocolo de tratamento, foi utilizado modelo de regressão logística, considerando o intervalo de confiança de 95% e valor de $p = 0,05$. O ajuste do modelo de regressão foi verificado através da análise de Deviance e do teste de Lemeshow & Hosmer, (1982). A comparação entre os estadiamentos clínicos no T0 e T12 entre os grupos foi realizada através da equação de estimativa generalizada.

Todas as análises referentes ao estudo da capacidade infectante de cães para *Lutzomyia longipalpis* foram realizadas utilizando o software IBM SPSS Statistics, versão 22.0.

5 Resultados

5.1 Caracterização da fauna de flebotomíneos

Durante as quatro campanhas de coleta, realizadas de Agosto de 2018 a Setembro de 2019, foram coletados 762 flebotomíneos (224 fêmeas e 538 machos) pertencentes a sete gêneros (*Brumptomyia*, *Evandromyia*, *Lutzomyia*, *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Psathyromyia* e *Sciopemyia*) e 12 espécies: *Brumptomyia brumpti* (Larrousse, 1920), *Evandromyia cortelezii* (Brèthes, 1923), *Evandromyia evandroi* (Costa Lima & Antunes, 1936), *Evandromyia lenti* (Mangabeira, 1938), *Evandromyia termitophila* (Martins, Falcão, & Silva, 1964), *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912 Nicolle, 1908), *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926), *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), *Pintomyia christenseni* (Young & Duncan, 1994), *Pintomyia pessoai* (Coutinho & Barretto, 1940), *Psathyromyia lutziana* (Costa Lima, 1932) e *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927) (Tabela 1). A curva de acumulação de espécies atingiu saturação a partir da terceira campanha de coleta, quando o valor se estabilizou em 12 espécies amostradas (Gráfico 1). A linha de tendência preditiva obtida através da técnica de regressão linear indica estabilização da riqueza estimada para a área em 14 espécies, fato corroborado pelo estimador de riqueza Chao 1 ($13,5 \pm 2,6$), indicando que a amostragem realizada no município de Iguatama durante as quatro campanhas de coleta foram representativas para a fauna local.

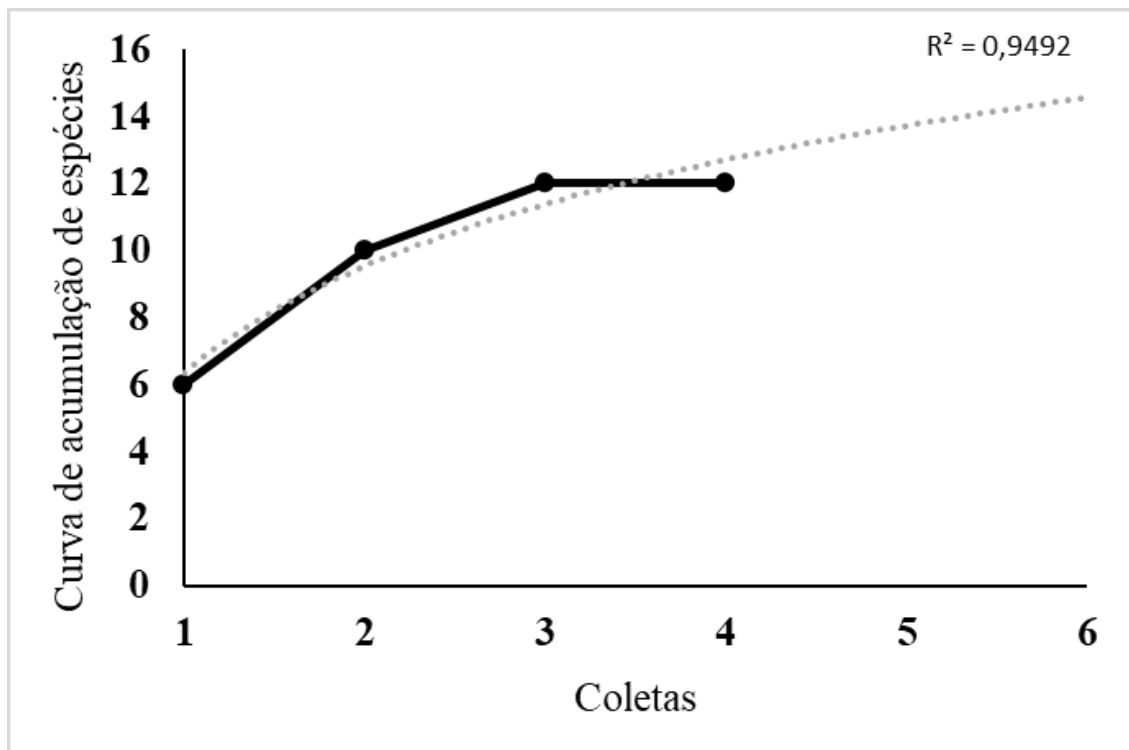
Tabela 1 - Indivíduos fêmeas e machos de flebotomíneos coletados no município de Iguatama, Minas Gerais, nos meses de Agosto/2018, Janeiro/2019, Maio/2019 e Setembro/2019.

Espécie	Sexo		Total (%)
	♂	♀	
<i>Brumptomyia brumpti</i>	2	1	3 (0,4)
<i>Evandromyia cortelezzii</i>	25	36	61 (8,0)
<i>Evandromyia evandroi</i>	0	1	1 (0,1)
<i>Evandromyia lenti</i>	10	8	18 (2,4)
<i>Evandromyia termitophila</i>	0	1	1 (0,1)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	361	78	439 (57,6)
<i>Nyssomyia neivai</i>	92	57	149 (19,6)
<i>Nyssomyia whitmani</i>	46	34	80 (10,5)
<i>Pintomyia christenseni</i>	0	3	3 (0,4)
<i>Pintomyia pessoai</i>	2	0	2 (0,3)
<i>Psathyromyia lutziana</i>	0	1	1 (0,1)
<i>Sciopemyia sordellii</i>	0	4	4 (0,5)
Total (%)	538 (70,6)	224 (29,4)	762 (100)

♂ : espécimes machos. ♀ espécimes fêmeas.

Fonte: Elaboração própria.

Gráficos 1 - Curva acumulação de espécies de flebotomíneos coletados nos meses de Agosto/2018, Janeiro/2019, Maio/2019 e Setembro/2019 no município de Iguatama, Minas Gerais.

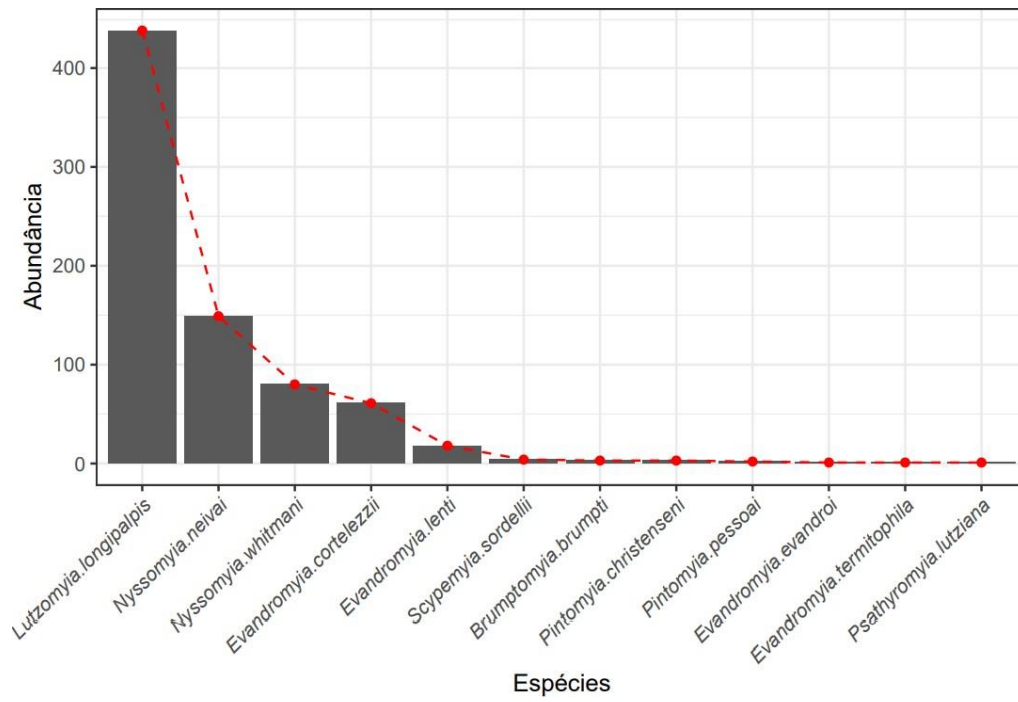


No eixo x (meses), os números 1 a 4 referem-se aos meses de coleta, onde, 1: Agosto/2018; 2: Janeiro/2019; 3: Maio/2019 e 4: Setembro/2019. Os tempos 5 e 6 referem-se a coletas hipotéticas. No eixo y (curva de acumulação de espécies), a riqueza de espécies. Curva em preto: espécies coletadas. Curva pontilhada: estimativa de espécies coletadas em novas coletas hipotéticas.

Fonte: Elaboração própria.

As espécies mais abundantes foram *Lu. longipalpis* (57,6%), *Ny. neivai* (19,6%) e *Ny. whitmani* (10,5%), que juntas representaram 87,7% dos flebotomíneos coletados (Gráfico 2). Estas espécies, além de mais abundantes, foram coletadas todos os meses, assim como *Ev. cortelezzii* e *Ev. lenti*. Nota-se também a presença de espécies que podem ser consideradas frequentes, como *Pi. christenseni* e *Sc. sordellii*, além de espécies ocasionais como *Br. brumpti*, *Ev. evandroi*, *Ev. termitophila*, *Pi. pessoai* e *Ps. lutziana* (Tabela 2 e Gráfico 3).

Gráficos 2 - Abundância de flebotomíneos coletados nos meses de Agosto/2018, Janeiro/2019, Maio/2019 e Setembro/2019 no município de Iguatama, Minas Gerais.



No eixo x estão representadas as espécies coletadas e no eixo y, observa-se a abundância das espécies coletadas durante o período do estudo.

Fonte: Elaborado por Eduardo Fernandes.

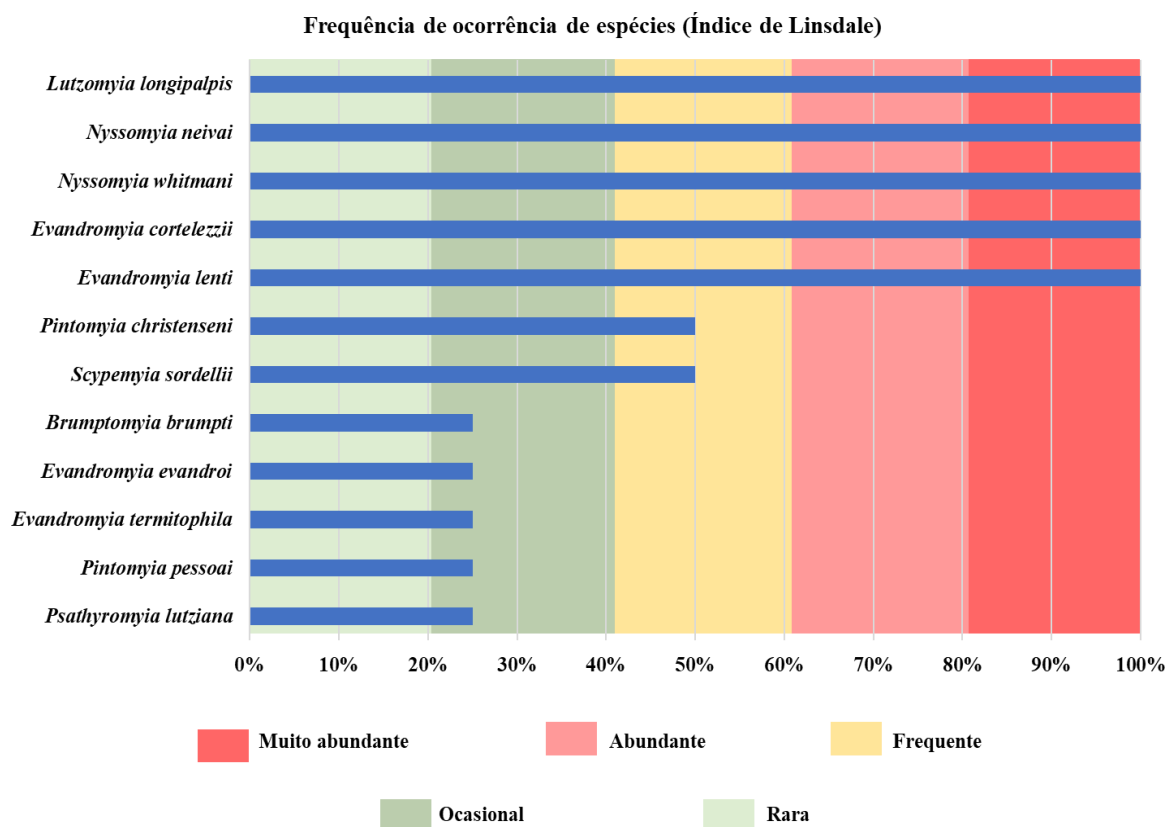
Tabela 2 - Total de flebotomíneos coletados nos meses de Agosto/2018, Janeiro/2019, Maio/2019 e Setembro/2019 no município de Iguatama, Minas Gerais.

Espécie	Meses de coleta								Total (%)
	Agosto/2018		Janeiro/2019		Maio/2019		Setembro/2019		
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
<i>Brumptomyia brumpti</i>	0	0	2	1	0	0	0	0	3 (0,4)
<i>Evandromyia cortelezii</i>	7	15	14	17	4	3	0	1	61 (8,0)
<i>Evandromyia evandroi</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1 (0,1)
<i>Evandromyia lenti</i>	0	2	8	3	2	1	0	2	18 (2,4)
<i>Evandromyia termitophila</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1 (0,1)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	129	30	135	30	72	10	25	8	439 (57,6)
<i>Nyssomyia neivai</i>	16	17	52	26	24	12	0	2	149 (19,6)
<i>Nyssomyia whitmani</i>	4	3	9	7	27	23	6	1	80 (10,5)
<i>Pintomyia christenseni</i>	0	0	0	2	0	1	0	0	3 (0,4)
<i>Pintomyia pessoai</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	2 (0,3)
<i>Psathyromyia lutziana</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1(0,1)
<i>Sciopemyia sordellii</i>	0	1	0	3	0	0	0	0	4 (0,5)
Total (%)	156	68	222	90	129	52	31	14	762 (100)
	224 (29,4)		312 (40,9)		181 (23,8)		45 (5,9)		
Estimador <i>Chao</i> 1 (± SD)	8,3 (1,1)		10,6 (2,1)		12,8 (3,0)		13,5 (2,6)		13,5 (2,6)
Índice de Shannon (H)	0,92		1,35		1,31		0,87		1,27
Diversidade de Simpson (1-D)	0,53		0,35		0,31		0,55		0,38
Índice de Pielou (J)	0,51		0,58		0,63		0,54		0,51

♂ : indivíduos do sexo masculino. ♀ indivíduos do sexo feminino. SD: desvio padrão.

Fonte: Elaboração própria.

Gráficos 3 - Frequência de ocorrência (Índice de Linsdale) de flebotomíneos coletados nos meses de Agosto/2018, Janeiro/2019, Maio/2019 e Setembro/2019 no município de Iguatama, Minas Gerais.



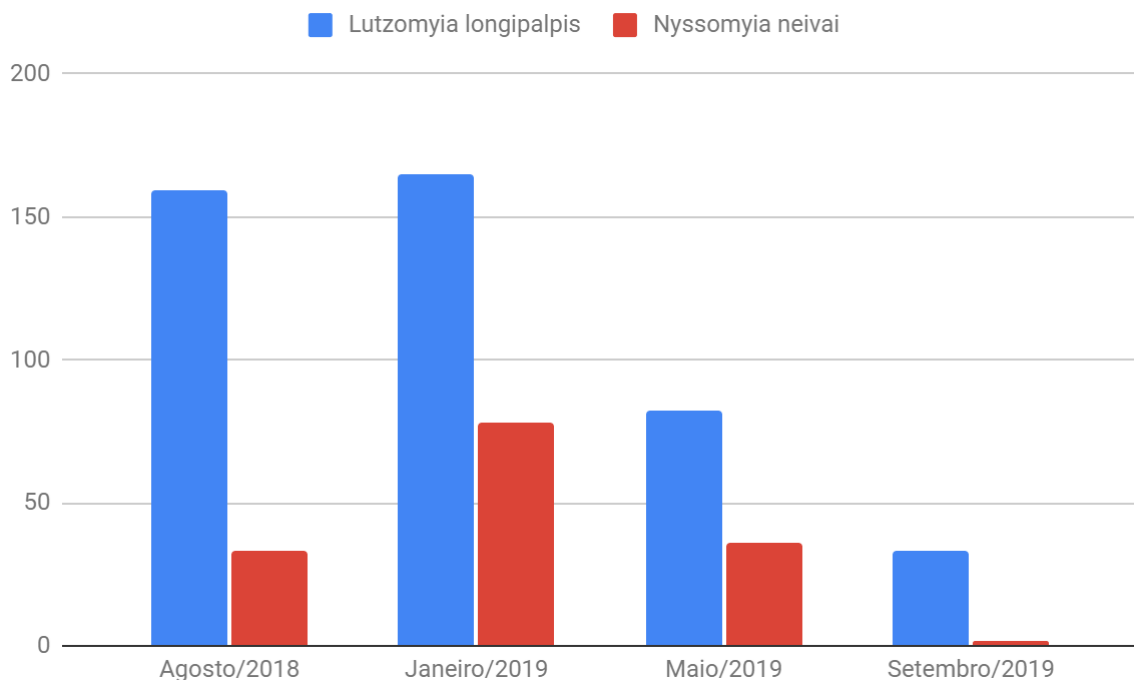
Fonte: Elaboração própria.

O mês de maior abundância foi Janeiro/19, no qual 312 espécimes (40,9%) foram coletados, seguido por Agosto/18 (224 indivíduos, 29,4%) e Maio/19 (181 indivíduos, 23,8%), de modo que, Setembro/19 representou o mês de menor abundância com 45 indivíduos coletados (5,9%). A maior riqueza de espécies foi observada em Janeiro/19 (10 espécies), seguido por Maio/19 (8 espécies) e Agosto/18 (6 espécies), que apresentaram respectivamente os maiores índices de diversidade de Shannon. Curiosamente, de acordo com o índice de diversidade de Simpson, o mês de Maio/19 apresentou maior diversidade ($D = 0,31$), seguido do mês de Janeiro/19 ($D = 0,35$) e Agosto/18 ($D = 0,53$). Um fator que pode explicar esta diferença com relação ao índice de Shannon é a maior dominância de *Lu. longipalpis* no mês de Janeiro/19 (52,8% dos flebotomíneos coletados) quando comparado ao mês de Maio/19 (45,3% dos flebotomíneos coletados). Esta dominância também pode ser observada através do índice de equitabilidade de Pielou, no qual a fauna de

flebotomíneos referente ao mês de Maio/19 apresentou-se mais uniformemente distribuída ($J = 0,63$) quando comparado aos meses de Janeiro/19 ($J = 0,58$) e Agosto/18 ($J = 0,51$) (Tabela 2).

Lu. longipalpis e *Ny. neivai* representaram 77,1% dos indivíduos coletados durante as quatro campanhas realizadas e a maior abundância foi observada no mês de Janeiro/19, no qual, respectivamente, 165 e 78 indivíduos foram coletados (Gráfico 4).

Gráficos 4 - Distribuição temporal de *Lutzomyia longipalpis* e *Nyssomyia neivai* coletados nos meses de Agosto/2018, Janeiro/2019, Maio/2019 e Setembro/2019 no Município de Iguatama, Minas Gerais.



Fonte: Elaboração própria.

A maior abundância foi observada na casa 12, onde 98 flebotomíneos foram coletados, compreendendo 12,9% do total, seguido pela casa 03 (93 indivíduos, 12,2%) e pela casa 07 (89 indivíduos, 11,7%) (Tabela 3). Enquanto 67,3% dos flebotomíneos foram coletados em apenas seis residências, nenhum inseto foi coletado nas casas 05, 06, 10, 19, 22, 23, 26 e 30.

Tabela 3 - Flebotomíneos coletados nos meses de Agosto/2018, Janeiro/2019, Maio/2019 e Setembro/2019 no município de Iguatama, Minas Gerais , destacando os seis pontos de coleta com maior abundância.

Espécie	Ponto de coleta						Total (%)	Demais casas	Total (%)
	Casa 01	Casa 03	Casa 07	Casa 12	Casa 14	Casa 29			
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	41	3	85	89	45	67	330 (43,3)	109	439 (57,6)
<i>Nyssomyia neivai</i>	23	86	3	0	1	1	114 (15,0)	35	149 (19,6)
Demais espécies	7	4	1	9	28	20	69 (9,0)	105	174 (22,8)
Total (%)	71 (9,3)	93 (12,2)	89 (11,7)	98 (12,9)	74 (9,7)	88 (11,5)	513 (67,3)	249 (32,7)	762 (100)

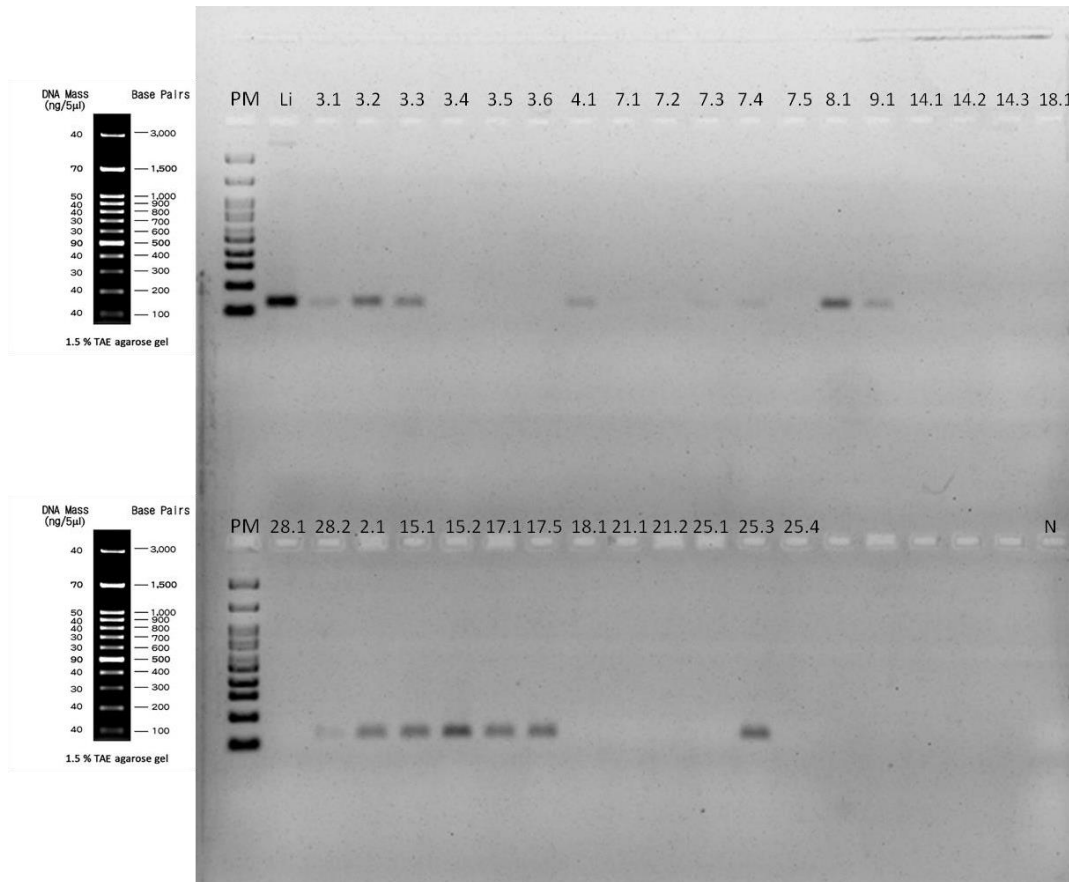
Fonte: Elaboração própria.

5.2 Detecção molecular de *Leishmania* sp.

As 224 fêmeas de flebotomíneos foram submetidas a pesquisa de DNA de *Leishmania* por PCR dirigida ao alvo ITS1 não sendo possível identificar a presença do fragmento de 300-350 pb em nenhuma das amostras. A partir desse resultado optamos por utilizar um alvo mais sensível considerando a baixa concentração de DNA nas amostras. Foi realizada a PCR dirigida ao kDNA de *Leishmania* (PASSOS et al., 1996)

Ao todo, 163 fêmeas (72,8%) não apresentavam sinal de alimentação recente, enquanto 61 fêmeas (27,2%) tinham sinais de repasto sanguíneo recente. A presença do fragmento de 120pb foi observada em 28 amostras, representando uma taxa de positividade de 12,5%. Deste total, 25 amostras (89,3%) foram positivas para *Le. infantum* e em 3 amostras (10,7%) não foi possível identificar a espécie de *Leishmania* (Figura 8). Dentre as espécies positivas para *Leishmania*, destacam-se *Ny. neivai* (24,6%) e *Lu. longipalpis* (14,1%) com as maiores taxas de positividade ($p=0,20$) seguidas por *Ev. lenti* (12,5%) (Tabela 4). As fêmeas positivas para *Leishmania* sp. são pertencentes aos pontos Casa 01, 02, 03, 04, 07, 08, 09, 11, 15, 17 e 28 (Figura 9). Do total de 28 amostras positivas, apenas duas fêmeas, pertencentes a *Ny. neivai*, apresentavam sinais de alimentação recente, sendo as amostras positivas para *Le. infantum* e *Leishmania* sp.

Figura 8 - Gel representativo de PCR dirigida a uma região do kDNA de *Leishmania* em amostras de fêmeas de flebotomíneo coletadas em Maio e Setembro de 2019.



Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo. Canaletas: PM: Peso Molecular 100pb. Controle positivo (Li) - cepa de referência *Leishmania infantum* (MHOM/BR/74/PP75). N: controle negativo. Amostras positivas: 3.1, 3.2, 3.3, 4.1, 7.3, 7.4, 8.1, 9.1, 28.2, 2.1, 15.1, 15.2, 17.1, 17.5 e 25.3. Amostras negativas: 3.4, 3.5, 3.6, 7.1, 7.2, 14.1, 14.2, 14.3, 18.1, 28.1, 18.1, 21.1, 21.2, 25.1 e 25.4.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 9 – Distribuição dos pontos com fêmeas de flebotomíneo positivas para *Leishmania* sp. No município de Iguatama, Minas Gerais.



Fonte: elaboração própria.

Tabela 4 - Detecção molecular de *Leishmania* em fêmeas de flebotomíneos coletadas nos meses de Agosto/2018, Janeiro/2019, Maio/2019 e Setembro/2019 no município de Iguatama, Minas Gerais.

Espécie	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Leishmania</i> sp.	Total (%)	Fêmeas coletadas	Taxa de positividade (%)
<i>Evandromyia cortelezzii</i>	2	-	2 (7,1)	36	5,6
<i>Evandromyia lenti</i>	1	-	1 (3,6)	8	12,5
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	9	2	11 (39,3)	78	14,1
<i>Nyssomyia neivai</i>	13*	1	14 (50)	57	24,6
Total	25	3	28 (100)		

*Duas fêmeas de *Ny. neivai* encontravam-se com sinal de repasto sanguíneo recente.

Fonte: Elaboração própria.

5.3 Identificação da fonte alimentar nas fêmeas de flebotomíneo

Durante o estudo no município de Iguatama, foram coletadas 61 fêmeas de flebotomíneo que apresentavam sinais de alimentação sanguínea recente. Deste total, 24 fêmeas (39,3%) foram positivas para a PCR direcionada ao alvo Citocromo B (Tabela 5). O sequenciamento genético do material amplificado revelou que as fêmeas de flebotomíneos se alimentaram em quatro espécies de vertebrados: *Homo sapiens* (83,3%), *Rattus rattus* (8,3%) *Canis familiaris* e *Gallus gallus* (ambos 4,2%). Destaca-se que 41,6% das fêmeas alimentadas pertenciam à espécie *Ny. neivai* e 33,3% à *Lu. longipalpis*. Apenas uma fêmea de *Ev. cortelezzii* se alimentou em cão doméstico, enquanto duas fêmeas, pertencentes à *Ev. cortelezzii* e *Sc. sordellii*, se alimentaram em *Rattus rattus* (Tabela 5).

A identificação da fonte alimentar nas duas fêmeas de flebotomíneos positivas para *Leishmania* que apresentavam sinais de alimentação recente foi realizada, indicando que estes insetos se alimentaram em seres humanos.

Tabela 5 - Identificação da fonte alimentar realizada nas fêmeas de flebotomíneos que apresentavam sinal de repasto sanguíneo recente.

Espécie	<i>Homo sapiens</i>	<i>Canis familiaris</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Rattus rattus</i>	Total (%)
<i>Evandromyia cortelezii</i>	1	1	-	1	3 (12,5)
<i>Evandromyia lenti</i>	1	-	-	-	1 (4,2)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	8	-	-	-	8 (33,3)
<i>Nyssomyia neivai</i>	9	-	1	-	10 (41,6)
<i>Nyssomyia whitmani</i>	1	-	-	-	1 (4,2)
<i>Sciopemyia sordellii</i>	-	-	-	1	1 (4,2)
Total (%)	20 (83,3)	1 (4,2)	1 (4,2)	2 (8,3)	24 (100)

Fonte: Elaboração própria.

5.4 Avaliação da capacidade infectante dos cães com LV e tratados para o vetor *Lu. longipalpis*

O total de 19 cães com LV foram tratados e acompanhados por 12 meses, seguindo o protocolo proposto para o tratamento, de modo que no grupo 1, composto por nove animais, o tratamento foi realizado com Milteforan e Alopurinol em associação por 28 dias (período correspondente ao tratamento preconizado com Milteforan) e o grupo 2, composto de dez animais, o tratamento foi realizado com Milteforan e Alopurinol em associação por 12 meses.

Após o período de tratamento e acompanhamento dos sinais clínicos, dez animais (52,6%) foram infectivos para *Lu. longipalpis* pela técnica de xenodiagnóstico. A análise molecular realizada utilizando PCR dirigida à uma região do kDNA de *Leishmania* e posterior sequenciamento genético do fragmento amplificado foi o método de identificação da espécie de *Leishmania*. A análise dos sequenciamentos apontou que todos os pools foram positivos para *Le. infantum*. Cabe ressaltar que, deste total, seis cães pertenciam ao grupo 1 e quatro cães pertenciam ao grupo 2. Não houve diferença significativa na proporção de animais positivos entre os grupos ($P = 0,25$).

Os cães positivos no xenodiagnóstico não apresentaram melhora clínica no T12 em relação ao T0, de modo que o estadiamento clínico se manteve igual ou aumentou após um ano do tratamento.

Os animais que compuseram o Grupo 2 apresentaram estadiamento clínico menor que o Grupo 1, independente do momento analisado, T0 e T12 ($P = 0,21$). Entretanto, foi observada uma maior diminuição do estadiamento clínico no T12 para os animais do Grupo 2, quando comparado ao Grupo 1 ($P = 0,027$).

Curiosamente, todos os animais pertencentes ao Grupo 2, foram negativos para a presença de DNA de *Leishmania* em fragmentos de pele de orelha no T12. Porém, dois animais pertencentes ao Grupo 1 apresentaram resultado positivo para *Leishmania* quando analisados os fragmentos de pele no T12, e destes, apenas um foi positivo no xenodiagnóstico (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultado do xenodiagnóstico e PCR de pele dos cães tratados com Milteforan + Alopurinol do Grupo 1 e Grupo 2.

	Cão	Casa	Xenodiagnóstico	Estadiamento		PCR pele
				T0	T12	T12
Grupo 1	1	2	Negativo	III	III	Negativo
	2	28	Negativo	III	III	Negativo
	3	2	Positivo	III	III	Negativo
	6	4	Negativo	III	III	Positivo
	7	4	Positivo	II	III	Negativo
	9	19	Positivo	III	III	Negativo
	11	11	Positivo	III	III	Positivo
	14	20	Positivo	I	III	Negativo
	19	14	Positivo	III	III	Negativo
Grupo 2	4	8	Negativo	I	I	Negativo
	5	9	Negativo	II	III	Negativo
	8	18	Positivo	III	IV	Negativo
	10	15	Positivo	II	II	Negativo
	12	22	Negativo	II	I	Negativo
	13	27	Negativo	III	II	Negativo
	15	17	Positivo	III	IV	Negativo
	16	26	Negativo	III	I	Negativo
	17	29	Negativo	II	I	Negativo
	18	18	Positivo	III	III	Negativo

Grupo 1: cães que utilizaram o medicamento Alopurinol durante 28 dias, período de administração do Milteforan. Grupo 2: cães que utilizaram o medicamento Alopurinol durante 12 meses.

Fonte: Elaboração própria

6 Discussão

A investigação acerca do ponto de vista biológico e ecológico dos flebotomíneos têm grande importância para a compreensão do papel desses insetos no ciclo de transmissão das espécies de *Leishmania* e têm sido objeto de diversas pesquisas, bem como o papel dos reservatórios, em especial os cães (LAISON & RANGEL, 2005;; GOMES et al., 2019; LEAL-LIMA et al., 2021).

O presente estudo se destaca por ser o primeiro a realizar coletas de flebotomíneos no município de Iguatama, Minas Gerais, área com alta prevalência de cães positivos para leishmaniose visceral e sem a presença de casos humanos registrados. Além disso, foi realizado o xenodiagnóstico para verificar a capacidade infectante de cães tratados com Milteforan/Alopurinol após um ano do início do tratamento. Os cães foram mantidos em domicílio e sob responsabilidade do tutor, evitando assim um ambiente controlado e simulando condições que se aproximam da realidade praticada no Brasil.

O agravamento do avanço da leishmaniose visceral no Brasil está altamente ligado ao seu processo de urbanização. Portanto, é importante compreender os aspectos eco epidemiológicos e sociais da leishmaniose visceral para o desenvolvimento de estratégias de controle dessas doenças.

6.1 Estudo dos flebotomíneos

Em sua maioria, os domicílios apresentavam características semelhantes. Casas com quintal, árvores frutíferas, ambientes com disponibilidade de matéria orgânica e em alguns casos, presença de galinheiro, condições favoráveis à criação de flebotomíneos (LAISON & RANGEL et al., 2005; QUEIROZ et al., 2012; CASANOVA et al., 2013; BERROZPE et al., 2019; TONELLI et al., 2021).

Do total de exemplares coletados, os espécimes machos foram mais abundantes, com 70,6%, apesar de entre as fêmeas haver uma maior diversidade, exceto na campanha realizada no mês de Maio/2019. Foram observadas 11 espécies entre espécimes fêmeas e sete espécies entre os machos, havendo mais uniformidade entre os machos. Esses resultados são observados em diversos estudos, corroborando com os achados desta pesquisa (BARATA et al., 2005;

BOUSSAA et al., 2005; LOIOLA et al., 2007; DORVAL et al., 2009), apesar de não haver um padrão na proporção entre machos e fêmeas em estudos realizados em diversas regiões.

A riqueza estimada para a área amostrada foi de 13,5 (\pm SD = 2.6). Com o esforço amostral realizado, foi possível encontrar um valor bem próximo, com 12 espécies capturadas. Portanto, a amostragem realizada nas quatro coletas foi representativa. Outros estudos em municípios da mesorregião onde se encontra Iguatama, apresentaram riqueza de espécies maior que os encontrados em nossa área de estudo (SILVA, 2019; CAPUCCI, 2021). Em estudo realizado em Divinópolis, município próximo a Iguatama, Margonari et al. (2010) encontraram 21 espécies e Nascimento et al. (2013) encontraram uma riqueza de 18 espécies. Uma possível explicação para as diferenças observadas foi que as coletas em Divinópolis foram realizadas em um parque onde a diversidade de espécies geralmente é maior devido ao fato de que o ambiente é menos antropizado.

O Índice de Shannon mostra que houve maior diversidade na coleta realizada em Janeiro/2019, que pode estar relacionada à temperatura. As condições de umidade e calor deste período do ano podem favorecer a manutenção desses insetos, o que já foi observado em vários estudos (GOMES et al., 1977; AGUIAR & SOUCASAUX, 1984; SARAIVA et al., 2006; MORAIS et al., 2016). Entretanto, outros autores afirmam não ter uma correlação clara entre umidade, calor e a presença de flebotomíneos. No estudo realizado por Macedo et al. (2008) no município de Sobral, Ceará, não foi possível correlacionar a fauna de flebotomíneos à temperatura, uma vez que houve uma baixa variação no ano estudado. Teodoro et al. (1993) e Tonelli et al. (2021) encontraram resultados similares, não podendo afirmar a correlação entre condições climáticas e a frequência de flebotomíneos, mas devem ser levadas em consideração as questões ambientais e características de cada região. Para uma compreensão da sazonalidade dos flebotomíneos na região seriam necessárias coletas sistematizadas e com maior esforço amostral.

Como esperado, a espécie *Lu. longipalpis* foi a mais abundante, encontrada em todas as quatro campanhas e representando 57,6% do total de indivíduos coletados. Sabe-se que essa espécie é altamente adaptada a ambientes alterados e muito presente em áreas urbanas, o que foi observado em muitos estudos (LAISON

& SHAW, 1998; RANGEL & VILELA, 2008; ALMEIDA et al., 2013; SALOMON et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2018; BERROZPE et al., 2019). A *Lu. longipalpis* apresenta distribuição geográfica abrangente mas sua capacidade de dispersão tem sido pouco investigada.

Estudo realizado em área urbana endêmica para LV no estado de São Paulo avaliou, entre outros aspectos, o padrão de dispersão de *Lu. longipalpis* utilizando a metodologia de marcação-liberação-recaptura. Os autores observaram uma baixa taxa de dispersão explicada pela presença de condições favoráveis para o estabelecimento e manutenção dos flebotomíneos nos peridomicílios. Além disso, foi observada uma alta taxa de sobrevivência dessa espécie (GALVIS-OVALLOS et al., 2018).

Neitzke-Abreu et al., 2022 analisaram a distribuição geográfica de flebotomíneos e os casos humanos de leishmaniose no Mato Grosso do Sul e observaram que a expansão da LV no estado se deveu a muitos fatores sendo que um deles é a ampla distribuição de *Lu. longipalpis* no estado sugerindo sua expansão nos últimos anos provavelmente devido ao desflorestamento e empreendimentos agrícolas.

Em nosso estudo exemplares de *Lu. longipalpis* foram encontrados em vários pontos do município, sugerindo sua ampla circulação e capacidade de dispersão em Iguatama.

Além de altamente adaptada ao ambiente urbano, a *Lu. longipalpis* é uma espécie antropofílica, além de ter uma gama de outros vertebrados como fonte de alimentação. Essa grande atração por humanos chama a atenção para a possibilidade de haver casos de leishmaniose visceral humana nesses ambientes (MONTROYA-LERMA, et al., 2003; SOARES & TURCO, 2003; LAISON & RANGEL, 2005; MACEDO-SILVA, et al., 2014; SALOMON et al., 2015; LANA et al.; 2018). Entretanto, até o momento não foi registrado no Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN) nenhum caso de leishmaniose visceral no município de Iguatama.

O gênero de maior riqueza foi *Evandromyia*, com quatro espécies (*Ev. cortelezzi*, *Ev. evandroi*, *Ev. lenti* e *Ev. termitophila*), que, apesar de não ter relação confirmada com a leishmaniose visceral, é um gênero que compreende espécies

suspeitas e incriminadas como vetoras da *Le. braziliensis*, importante espécie no ciclo da leishmaniose tegumentar americana (LTA). *Ev. lenti* é considerada neste estudo como muito abundante e foi encontrada alimentada com sangue de *H. sapiens*. Já foi detectada a presença de DNA de *Le. braziliensis* no município de Divinópolis/MG, também pertencente à mesorregião Oeste de Minas (MARGONARI et al., 2010).

O gênero *Nyssomyia* também tem grande importância médica, com a presença de espécies incriminadas como vetoras de espécies causadoras da LTA. *Ny. whitmani*, que representou 10,5% dos indivíduos coletados, é uma espécie que já teve seu papel na transmissão de *Le. braziliensis* confirmado, sendo então incriminada como principal vetora nas regiões sul, sudeste, nordeste e centro-oeste do Brasil. (MISSAWA et al., 2008; DA COSTA et al., 2021). A *Ny. whitmani* tem sido frequentemente encontrada em ambientes impactados. Isso demonstra um perfil altamente adaptativo a diferentes condições, como áreas preservadas e ambientes urbanos e alterados (RANGEL & LAISON, 1996; 2009; ALVES et al., 2020). Essa capacidade pode ser um dos componentes que explica nossos achados, pois a *Ny. whitmani* foi encontrada em todas as campanhas, totalizando 80 indivíduos coletados.

Nyssomyia neivai representou a metade das fêmeas encontradas com DNA de *Leishmania* (14/28), sendo 13 positivas para DNA de *Le. infantum* e uma para DNA de *Leishmania* sp.. Os estudos de Saraiva et al. (2009) e Margonari et al. (2014) encontraram resultados semelhantes, com a presença de DNA de *Le. infantum* e *Leishmania* sp.. Ressalta-se que foi detectada como fonte de repasto sanguíneo *Homo sapiens* em duas fêmeas de *Ny. neivai*, sendo uma positiva para *Le. infantum* e uma para *Leishmania* sp.. É uma espécie oportunista e ocasionalmente é encontrada em regiões endêmicas para LV na ausência da principal espécie vetora, a *Lu. longipalpis*, (CÓRDOBA-LANÚS et al., 2006; STEINDEL et al., 2013).

No Sul do Brasil, estudos apontam a presença de *Ny. neivai* em região com casos de LV e ausência *Lu. longipalpis*. Os autores discutem um possível papel dessa espécie no ciclo de transmissão da doença na região, porém ressaltam que mais estudos são necessários para compreender melhor a importância da espécie na dinâmica do ciclo da forma visceral da leishmaniose (DIAS et al., 2013; THOMAZ-SOCCOL et al., 2018). Saraiva et al., (2009) também encontraram um exemplar de *Ny. neivai* infectado por *Le. infantum* em Minas Gerais. É uma espécie frequentemente

encontrada em ambientes antropizados e peridomicílios, como afirma Andrade-Filho et al. (2007). Estudos indicam que a *Ny. neivai* pode ter importância na transmissão de espécies causadoras da LTA, apesar de não ter sido incriminada como vetora (ANDRADE-FILHO et al., 2007; SARAIVA et al., 2009; PITA-PEREIRA et al., 2009).

Ao utilizarmos a PCR dirigida ao ITS1 de *Leishmania*, não foi possível detectar a presença de DNA do parasito nas fêmeas de flebotomíneo coletadas. Então, optamos por utilizar o alvo de uma região conservada do kDNA que apresenta alta sensibilidade por possuir elevado número de cópias por genoma. Um estudo que comparou a positividade para DNA de *Leishmania* em flebotomíneos utilizando como alvos o kDNA e o ITS1 encontrou as taxas de 18,5% (128/691) e 6,4% (44/691) respectivamente (Azmi et al, 2020). Portanto, foi verificada a importância de se utilizar diferentes alvos na pesquisa de *Leishmania* em flebotomíneos o que aumenta as chances da detecção da presença de DNA nas amostras. Em estudo realizado por Lidiani et. al., (2014) o kDNA se mostrou um alvo de elevada confiabilidade como marcador do parasito.

A taxa geral de infecção de 12,5% (28/224) foi observada nas fêmeas de flebotomíneo coletadas no período de estudo. Missawa et al., (2010) afirmam que as taxas de infecção, mesmo em áreas endêmicas, são baixas e próximas a 3%, o que não está de acordo com os achados de nossa pesquisa. Vale ressaltar que apesar de não haver casos humanos de LV no município de Iguatama, a taxa de soropositividade dos cães é relativamente alta, com a prevalência de 7,4%, demonstrando a circulação do parasito (VAZ et al., 2020).

6.2 Repasto sanguíneo

As espécies positivas para sangue de vertebrado foram *Ev. cortelezzii*, *Ev. lenti*, *Lu. longipalpis*, *Ny. neivai*, *Ny. whitmani* e *Sc.sordellii*. Chama-se a atenção para *Lu. longipalpis* por ser a principal espécie vetora de *Leishmania infantum* no Brasil. Todas as fêmeas de *Lu. longipalpis* foram encontradas com sangue humano, demonstrando seu antropofilismo (MACEDO-SILVA, et. al., 2014). Das 61 fêmeas analisadas somente uma foi encontrada com o repasto sanguíneo positivo para *Canis familiaris*. As demais fêmeas se alimentaram, em sua maioria, em *Homo sapiens*, (83,3%). A alimentação em *Rattus rattus* foi detectada em dois exemplares e em somente um o

repasto se deu em *Gallus gallus*. Esse resultado pode ser explicado pela ausência de diferentes espécies de vertebrados nos arredores das casas, uma vez que Iguatama é um município urbanizado. Na maioria dos domicílios os únicos animais presentes eram cães, gatos e galinhas.

Ressaltamos que todos os cães do estudo utilizaram coleira impregnada com inseticida, o que pode ter evitado que as fêmeas presentes nos peridomicílios das residências dos cães tratados tenham se alimentado nos mesmos.

Estudos têm apontado a importância do uso de coleira impregnada com deltametrina 4% para o controle da leishmaniose visceral canina (SILVA et. al., 2018; DE LIMA et. al., 2019; YIMAM & MOHEBALI, 2020; DE CAMARGO-NEVES et. al., 2021), evitando a infecção e reinfecção dos cães. Os resultados também mostram que nas áreas onde os cães utilizam coleira observou-se menor incidência do vetor *Lutzomyia longipalpis*, reiterando a importância dessa medida (SILVA et. al., 2018; COURTENAY et. al., 2019; WILSON et. al., 2020). Estudo recente mostrou que os cães encoleirados tem 3 vezes menos chance de apresentarem LV do que os não encoleirados (MATSUMOTO et al., 2022). Esses achados ressaltam a relevância da saúde única e a necessidade de criação de políticas públicas para a integração entre saúde humana, animal e do meio ambiente (DANTAS-TORRES et. al., 2019).

Foi encontrada uma fêmea de *Sc. sordellii* que realizou seu repasto sanguíneo em *R. rattus*, o que é um dado interessante, uma vez que essa espécie é conhecida por se alimentar em animais de sangue frio. Seu hábito alimentar está relacionado a anfíbios, como relatado por Cutolo et al. (2009), Carvalho et al. (2013). Apesar disso, têm sido observada a presença de DNA de *Leishmania* sp. em fêmeas dessa espécie, como constatado por diversos autores (CARVALHO et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2014; LANA et al., 2015; CARVALHO et al., 2017; DA SILVA et al., 2020; COSTA et al., 2021).

6.3 Capacidade infectante

Quando pretendemos analisar a capacidade infectante de um cão portador de LV para o vetor *Lu. longipalpis* uma série de questões precisam ser avaliadas. O cão foi vacinado? Em que fase da doença o cão se encontra? O cão passou por processo de tratamento? Qual o protocolo do tratamento?

Nosso estudo avaliou cães que não haviam sido vacinados, tratados com dois tipos de protocolos (G1-miltefosina/alopurinol por 28 dias; G2-miltefosina por 28 dias e alopurinol por 12 meses) e realizado o estadiamento dos cães seguindo as orientações do Brasileish.

Observamos um maior número de cães negativos no xenodiagnóstico no “Grupo 2” (4/10), mas não há diferença estatística em relação ao “Grupo 1” (6/9). Apesar disso, no grupo que utilizou o Alopurinol durante todo o período de acompanhamento, é possível observar uma melhora significativa do estadiamento em relação ao Grupo 2 ($P = 0,027$). Os resultados estão de acordo com os encontrados por Penissi (2005), que afirma que o Alopurinol é um medicamento eficaz na redução dos sinais clínicos a curto prazo, mas o título de anticorpos não altera, necessariamente. Por ter atividade leishmanioestática, o Alopurinol mantém a carga parasitária baixa, evitando recidivas (GONÇALVES et. al., 2019).

Outros estudos demonstram uma melhora clínica dos cães submetidos ao tratamento da LVC com miltefosina (DOS SANTOS NOGUEIRA et al., 2019), sobretudo nos cães que apresentam poucos sinais clínicos no início da terapia. Portanto, é importante que esse tratamento se inicie o quanto antes, possibilitando um melhor prognóstico. Apesar de apresentar um bom perfil terapêutico, não ocorre a eliminação completa dos parasitos nos cães tratados, portanto, não há cura parasitológica (MATEO, 2009).

Guinel et. al., (1998) também afirmam que o Alopurinol é capaz de melhorar significativamente o prognóstico da LVC, podendo ser utilizado tanto de forma isolada quanto em conjunto com outros fármacos. Ayres et al., 2022 observaram que a eficiência do Alopurinol é potencializada quando associada a miltefosina. Apesar disso, a cura parasitológica não é alcançada utilizando-se esses medicamentos (MARCONDES & DAY, 2019). Essa afirmação ficou patente quando analisamos os resultados que obtivemos no xenodiagnóstico.

Os cães submetidos ao xenodiagnóstico pertencentes ao grupo 2, que fez o uso do Alopurinol por 12 meses, apresentaram um estadiamento levemente menor que os cães do grupo 1, apesar de já apresentarem valores de estadiamento menores no T0. Essa característica pode ter influenciado em uma maior melhora clínica dos

indivíduos desse grupo, uma vez que o prognóstico dos cães nos estádios II e III são considerados bom e bom a reservado, respectivamente (BRASILEISH, 2018).

Dos 19 cães participantes do xenodiagnóstico, 52,6% apresentaram capacidade infectante para o vetor *Lutzomyia longipalpis* após 12 meses do início do tratamento. Em estudo realizado por Dos Santos Nogueira et al. (2019), 74,29% dos cães foram negativos para o xenodiagnóstico e/ou permaneceram não infectantes. Porém, diferentemente de nosso estudo, a avaliação da infectividade foi realizada após 12 semanas do início do tratamento e os cães foram mantidos em ambiente controlado.

Nossos resultados devem ser analisados não somente considerando o aspecto epidemiológico mas também a prática clínica. A maioria das clínicas veterinárias que realizam o tratamento de cães acometidos por LV faz o monitoramento do tratamento utilizando testes sorológicos e observando a evolução clínica dos cães. Somente algumas clínicas com um público de melhor poder aquisitivo realizam a PCR. Os resultados que obtivemos com a PCR kDNA da pele dos cães no T12 foi positiva em dois cães, contrastando com os resultados do xenodiagnóstico onde 10 dos 19 cães foram infectantes para *Lu. longipalpis*.

Sabemos das dificuldades operacionais em se realizar o xenodiagnóstico como método de controle da infectividade do cão tratado mas nossos resultados alertam para o problema da manutenção de cães tratados como fonte de infecção para o vetor.

Novas metodologias devem ser investigadas para que tenhamos métodos mais seguros de verificação da infectividade dos cães como também aprimorar os protocolos de tratamento.

7 Conclusões

- A fauna de flebotomíneos no município foi composta por doze espécies e com grande abundância de espécies de importância médica, principalmente a *Lutzomyia longipalpis*;
- O estudo demonstra a circulação do parasito, de espécies vetoras e casos caninos, o que chama a atenção para o risco da ocorrência de leishmaniose visceral humana;
- Mesmo após o tratamento com os medicamentos Milteforan e Alopurinol, os cães apresentaram capacidade infectante para o vetor *Lutzomyia longipalpis*;
- O xenodiagnóstico se mostrou uma ferramenta mais eficiente na detecção da capacidade infectante de cães tratados do que a PCR kDNA na pele;

Referências Bibliográficas

AGUIAR, Gustavo Marins de; SOUCASAUX, Thais. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. I-Frequência mensal em isca humana (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 79, p. 197-209, 1984.

ALMEIDA, Paulo Silva de et al . Predicting the geographic distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro , v. 108, n. 8, p. 992-996, Dec. 2013.

ALVAR, Jorge; YACTAYO, Sergio; BERN, Caryn. Leishmaniasis and poverty. Trends in parasitology, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.

ANDRADE FILHO, José Dilermando et al. Flebotomíneos do Estado de Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 34, p. 323-329, 2001.

ANDRADE FILHO, José Dilermando; GALATI, Eunice A. Bianchi; FALCÃO, Alda Lima. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926)(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 102, p. 481-487, 2007.

ASHFORD, Richard W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clinics in dermatology, v. 14, n. 5, p. 523-532, 1996.

AYRES, Eveline da Cruz Boa Sorte et al. Clinical and parasitological impact of short-term treatment using miltefosine and allopurinol monotherapy or combination therapy in canine visceral leishmaniasis. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.31, 2022.

AZMI, Kifaya; SCHONIAN, Gabriele; ABDEEN, Ziad. Specification of blood meals ingested by female sand flies caught in Palestinian foci and identification of their concomitant leishmanial infections. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 14, n. 10, p. e0008748, 2020.

BALDINI-PERUCA LC. et. al. *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) infection in cats from a brazilian southeastern endemic area for canine and human leishmaniasis. Vet. e Zootec. 2017 mar.; 24(1): 216-225.

BANETH, Gad et al. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends in parasitology, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.

BANETH, Gad et al. L. Leishmaniasis. In: Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. 4. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. p. 735-748, 2012.

BARATA, Ricardo Andrade et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, p. 421-425, 2005.

BASTOS, Thiago Souza Azeredo. Estudos introdutórios sobre flebotomíneos. Goiânia, 2012. Disponível em: [:http://ppgca.evz.ufg.br/up/67/o/1%C2%BA_Semin%C3%A1rio_Flebotom%C3%ADneos_CORRE%C3%87%C3%83O_thiago_Bastos.pdf?1351508420](http://ppgca.evz.ufg.br/up/67/o/1%C2%BA_Semin%C3%A1rio_Flebotom%C3%ADneos_CORRE%C3%87%C3%83O_thiago_Bastos.pdf?1351508420). Acesso em: 14 de Março de 2022.

BATES, Paul A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International journal for parasitology*, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BERROZPE, Pablo Eduardo et al. Spatiotemporal dynamics of *Lutzomyia longipalpis* and macro-habitat characterization using satellite images in a leishmaniasis-endemic city in Argentina. *Medical and veterinary entomology*, v. 33, n. 1, p. 89-98, 2019.

BORJA, L. S. et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Veterinary Parasitology*, v. 229, p. 110–117, 2016.

BOUSSAA, S. et al. Seasonal fluctuations of phlebotomine sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the urban area of Marrakech, Morocco. *Acta tropica*, v. 95, n. 2, p. 86-91, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia e Serviços. – 1. ed. atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 773 p.

BRASILEISH. Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina. Diretrizes. Brasileish. 2018. Disponível em <https://issuu.com/integrativa.vet/docs/brasileish-diretrizes-lvc> Acesso em Ago. 2022.

BUCKLAND, Stephen T. et al. Distance sampling. *Encyclopedia of biostatistics*, v. 2, 2005.

CAPUCCI, Débora Cristina et al. Investigação da comunidade de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em diferentes ambientes ecológicos visando o monitoramento e controle das leishmanioses. 2021. Tese de Doutorado.

CARVALHO, Gustavo Mayr de Lima et al. Ecological aspects of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from a cave of the speleological province of Bambuí, Brazil. *PLoS One*, v. 8, n. 10, p. e77158, 2013.

CARVALHO, Gustavo Mayr de Lima et al. Molecular detection of *Leishmania* DNA in wild-caught phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cave in the state of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 54, n. 1, p. 196-203, 2017.

CASANOVA, Cláudio et al. Larval breeding sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in visceral leishmaniasis endemic urban areas in southeastern Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 9, p. e2443, 2013.

CHAO, Anne. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of statistics*, p. 265-270, 1984.

COLWELL, Robert K. EstimateS 9.1. 0. World Wide Web publication. <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates> (last access at 23/November/2016), 2013.

CÓRDOBA-LANÚS, Elizabeth et al. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. *Acta Tropica*, v. 98, n. 1, p. 1-5, 2006.

COSTA, Tiago Silva da et al. Ecological aspects and molecular detection of *Leishmania* DNA (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a rural settlement in the Eastern Amazon, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 65, 2021.

COSTA-VAL, Adriane Pimenta et al. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. *The Veterinary Journal*, v. 174, n. 3, p. 636-643, 2007.

COURTENAY, Orin et al. Insecticide-impregnated dog collars reduce infantile clinical visceral leishmaniasis under operational conditions in NW Iran: a community-wide cluster randomised trial. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 13, n. 3, p. e0007193, 2019.

CRUZ, Cleya da Silva Santana et al. Factors associated with human visceral leishmaniasis cases during urban epidemics in Brazil: a systematic review. *Parasitology*, v. 148, n. 6, p. 639-647, 2021.

CUTOLO, André Antonio; VON ZUBEN, Claudio José; GALATI, Eunice Aparecida Bianchi. Anomalia bilateral no gonóstilo de *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Ponte)(Diptera, Psychodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, p. 67-69, 2009.

DA COSTA, Simone Miranda et al. Using Geoprocessing Techniques to Analyze the Geographic Distribution of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *Whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Associated With Vegetation Cover, and the Impacts on the Expansion of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) In Brazil. 2021.

DA SILVA, Yury Yzabella et al. Detection of *Leishmania* DNA in sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cutaneous Leishmaniasis outbreak area in Northeastern Brazil. *Journal of medical entomology*, v. 57, n. 2, p. 529-533, 2020.

- DANTAS-TORRES, Filipe et al. Canine leishmaniasis control in the context of one health. *Emerging infectious diseases*, v. 25, n. 12, p. 1, 2019.
- DEBORGGRAEVE, Stijn et al. A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 198, n. 10, p. 1565-1572, 2008.
- DEGRAVE, W. et. al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89(3): 463-469.
- DE CAMARGO-NEVES, Vera Lucia Fonseca et al. Control of Canine Visceral Leishmaniasis: A Success Case Based on Deltamethrin 4% Collars. *Epidemiologia*, v. 2, n. 4, p. 502-518, 2021.
- DE LIMA, Denise Alves et al. Aspectos epidemiológicos, sociais e ambientais relacionados a transmissão e ao controle da leishmaniose visceral canina na Ilha da Marambaia, Mangaratiba–Rio de Janeiro. *Revista Saúde e Meio Ambiente*, v. 9, n. 3, p. 64-81, 2019.
- DE OLIVEIRA, E. F. et al. Behavioral aspects of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in urban area endemic for visceral leishmaniasis. *Journal of Medical Entomology*, v. 50, n. 2, p. 277-284, 2013.
- DEY, R. et al. Gut microbes egested during bites of infected sand flies augment severity of leishmaniasis via inflammasome-derived IL-1 β . *Cell Host Microbe* 23, 134–143.e6, 2018.
- DIAS, Edelberto Santos et al. Detection of *Leishmania infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis, in *Lutzomyia neivai*, a putative vector of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Vector Ecology*, v. 38, n. 1, p. 193-196, 2013.
- DORLO, Thomas PC et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, 2012.
- DORVAL, Maria Elizabeth C. et al. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of an American cutaneous leishmaniasis endemic area in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 695-702, 2009.
- DOS SANTOS NOGUEIRA, Fabio et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites & vectors*, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2019.
- EL TAI, NO. et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (sscp) and sequencing. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*. v. 94, p. 1-5, 2000.
- ESPINOSA, O.A. et. al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol.* p. 1-13, 2016.
- FARIA, M.T. Prevalência de leishmaniose canina no município de IguatamaMG, utilizando diagnóstico imunológico. Master's Thesis, Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Centro-Oeste, Divinópolis. 97p., 2014.

FERRER, L. Canine Leishmaniosis: Evaluation of the immunocompromised patient. Wsava Congress Chooses 8 2002. [Acesso ago. 2020] Disponível em: <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?meta=&pld=11147&id=3846264>

GALATI, Eunice AB et al. Study of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in focus of visceral leishmaniasis in Brazil. *Revista de Saúde Pública*, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101997000400007>.

GALATI, Eunice AB. Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF, Lainson R. (Org.). *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz. p. 23-52, 2003.

GOMES, L. B. et al. Estudo eco-epidemiológico da fauna flebotomínica e dos aspectos ambientais relacionados à transmissão das leishmanioses em um município de Minas Gerais, Brasil, 2015-2016. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 71, p. 1805-1814, 2019.

GONÇALVES, Ana Alice Maia et al. An overview of immunotherapeutic approaches against canine visceral leishmaniasis: what has been tested on dogs and a new perspective on improving treatment efficacy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 9, p. 427, 2019.

GONTIJO, C.M.F. & MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.* Vol. 7, Nº 3, 2004.

GOTELLI, Nicholas J.; COLWELL, Robert K. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology letters*, v. 4, n. 4, p. 379-391, 2001.

GUIMARÃES, Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso et al. Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies in a cutaneous and visceral leishmaniasis endemic area in northeastern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 56, p. 357-360, 2014.

GINEL, P. J. et al. Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*, v. 39, n. 6, p. 271-274, 1998.

HANDMAN, E. Development Leishmaniasis: Current Status of Vaccine. *Clin. Microbiol. Rev.* p. 229-243, 2001.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Cidades: Iguatama. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/mg/iguatama.html>. Acesso em: 07 de Julho de 2022.

GALVIS-OVALLOS, Fredy et al. A field study of the survival and dispersal pattern of *Lutzomyia longipalpis* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 4, p. e0006333, 2018.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis the neotropical leishmania species. Topley & Wilsons Microbiology and Microbial Infections, Parasitology. Arnold, London, United Kingdom. p. 241-266, 1998.

LAINSON, Ralph; RANGEL, Elizabeth F. Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 100, p. 811-827, 2005.

LEMESHOW, Stanley; HOSMER JR, David W. A review of goodness of fit statistics for use in the development of logistic regression models. American journal of epidemiology, v. 115, n. 1, p. 92-106, 1982.

LANA, Rosana Silva et al. Phlebotomine sand fly fauna and Leishmania infection in the vicinity of the Serra do Cipó National Park, a natural Brazilian heritage site. BioMed Research International, v. 2015, 2015.

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

LANDE, Russell. Statistics and partitioning of species diversity, and similarity among multiple communities. Oikos, p. 5-13, 1996.

LANDE, Russell; DEVRIES, Philip J.; WALLA, Thomas R. When species accumulation curves intersect: implications for ranking diversity using small samples. Oikos, v. 89, n. 3, p. 601-605, 2000.

LEAL-LIMA, Adam et al. Tríade canina na Leishmaniose Visceral: Reservatório-vítima-sentinela. Pubvet, v. 15, p. 180, 2021.

LEHANE, Michael J. The Biology of Blood-Sucking in insects. Cambridge University Press. 337p, 2005.

LIDANI, Kárita Cláudia Freitas; REASON, Iara José de Messias; ISHIKAWA, Edna Aoba Yassui. A comparison of molecular markers to detect Lutzomyia longipalpis naturally infected with Leishmania (Leishmania) infantum. 2014.

LOIOLA, Carlos Frederico; SILVA, Delano Anibal da; GALATI, Eunice Aparecida Bianchi. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and species abundance in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 102, p. 581-585, 2007.

MACEDO-SILVA, Virgínia P. et al. Feeding preferences of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae), the sand fly vector, for Leishmania infantum (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Journal of medical entomology, v. 51, n. 1, p. 237-244, 2014.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Nota técnica Nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA: PROCESSO Nº 21000.042544/2016-94, 2016.

MARCONDES M, ROSSI CN. Leishmaniose visceral no Brasil. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 50, p. 341-352, 2013.

MARGONARI, Carina et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: psychodidae) and leishmania infection in Gafanhoto park, Divinópolis, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 47, n. 6, p. 1212-1219, 2010.

MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and veterinary entomology*, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013.

MARTINS, Keislândia Aguiar. Comportamento alimentar de dípteros vetores de patógenos e estudo da expressão de proteínas de choque térmico (HSP 70 e 90) de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae) frente a diferentes estresses relacionados à hematofagia. Tese (Doutorado em Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais). Minas Gerais. 103 p, 2015.

MATEO, Marta et al. Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniasis. *Parasitology research*, v. 105, n. 1, p. 155-162, 2009.

MATSUMOTO, Patricia Sayuri Silvestre et al. Efficacies of insecticide dog collars against visceral leishmaniasis in low and high-income areas and the effects for non-collared neighbor dogs. *Acta Tropica*, p. 106626, 2022.

MICHALSKY, Erika Monteiro et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Veterinary parasitology*, v. 147, n. 1-2, p. 67-76, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2014.

MISSAWA NA, BORBA JF. Leishmaniose visceral no município de Várzea Grande, Estado de Mato Grosso, no período de 1998 a 2007. *Rev Soc Bras Med Trop*. v. 42, n. 5, p. 496-502, 2009.

MISSAWA, Nanci Akemi; MACIEL, Giovana Belém Moreira Lima; RODRIGUES, Hilda. Distribuição geográfica de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) no Estado de Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, p. 369-373, 2008.

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

MS - Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2014.

MOMEN, H. *et al.* Molecular evidence for the importation of Old World *Leishmania* into the Americas. *Biol. Res.* v. 26, p. 249–255, 1993.

MONDAL D. et al. Quantifying the Infectiousness of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis Toward Sand Flies, *Clinical Infectious Diseases*, 2018, <https://doi.org/10.1093/cid/ciy891>

MONTOYA-LERMA, J. et al. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Tropica*, v. 85, n. 1, p. 19-29, 2003.

MORAIS, Ingrid Câmara. Sazonalidade na exposição a flebotomíneos em cães e humanos em área endêmica para leishmaniose visceral: um estudo de intervenção. Dissertação de Mestrado. Brasil, 2016.

NASCIMENTO, Bruno Warley Leandro et al. Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state–Brazil. *Acta Tropica*, v. 125, n. 3, p. 262-268, 2013.

NEITZKE-ABREU, Herintha Coeto et al. Geographic distribution of human leishmaniasis and phlebotomine sand flies in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Parasites & Vectors*, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2022.

DOS SANTOS NOGUEIRA, Fabio et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites & vectors*, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3323-0>

OLIVEIRA, Agda M. et al. Dispersion of *Lutzomyia longipalpis* and expansion of visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil: identification of associated factors through survival analysis. *Parasites & vectors*, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2018.

OPAS. Módulos de Princípios de Epidemiologia para o Controle de Enfermidades. Módulo 2: Saúde e doença na população / Organização Pan-Americana da Saúde. Brasília : Organização Pan-Americana da Saúde ; Ministério da Saúde. v. 7, p. 48, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Leishmaniose: Folha de dados da OMS. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 22 de Março de 2021.

PEET, Robert K. The measurement of species diversity. *Annual review of ecology and systematics*, p. 285-307, 1974.

PENNISI, M. G. et al. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Veterinary research communications*, v. 29, n. 2, p. 301-303, 2005.

PEREIRA DA SILVA, Savio T. et al. Leishmaniose visceral humana: reflexões éticas e jurídicas acerca do controle do reservatório canino no Brasil. *Revista de bioética y derecho*, n. 39, p. 135-151, 2017.

PITA-PEREIRA, Daniela et al. First report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 80, n. 4, p. 593-595, 2009.

QUEIROZ, Mirian Francisca Martins et al. Analysis of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Barra do Garças, State of Mato Grosso, Brazil, and the influence of environmental

variables on the vector density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, p. 313-317, 2012.

RANGEL, Elizabeth F.; LAINSON, Ralph. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 937-954, 2009.

RANGEL, Elizabeth F. et al. Variation between geographical populations of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) sensu lato (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, p. 43-50, 1996.

RANGEL, Elizabeth F.; SHAW, Jeffrey J. (Ed.). *Brazilian sand flies: biology, taxonomy, medical importance and control*. Springer, 2018.

RANGEL, Elizabeth F.; VILELA, Maurício L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, p. 2948-2952, 2008.

REIS, Alexandre B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in veterinary science*, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.

RIBEIRO, Vitor Márcio et al. Performance of different serological tests in the diagnosis of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs. *Veterinary parasitology*, v. 274, p. 108920, 2019.

ROCHA, Ana Vitória Verde Oliveira et al. Diagnosis and epidemiology of *Leishmania infantum* in domestic cats in an endemic area of the Amazon region, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 273, p. 80-85, 2019.

ROQUE, André Luiz R.; JANSEN, Ana Maria. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014.

SALOMÓN, Oscar Daniel et al. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, p. 831-846, 2015.

SARAIVA, Lara et al. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, p. 56-63, 2006.

SARAIVA, Lara. et al. Natural Infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *Journal of Medical Entomology*. Minas Gerais. v. 46 n. 5, p. 1159-1163, 2009.

SCHIMMING, Bruno Cesar et al. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, p. 1-17, 2012.

SCHÖNIAN, Gabriele et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 47, n. 1, p. 349-358, 2003.

SILVA, Danyele Franca da et al. Aspectos epidemiológicos das leishmanioses no município de Pains, Centro Oeste Mineiro. 2019. Tese de Doutorado.

SILVA, Raizza Barros Sousa et al. Natural Infection by *Leishmania infantum* in domestic cats (*Felis catus*) in a municipality of moderate transmission in the Brazilian semi-arid region. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 29, 2020.

SILVA, Rafaella Albuquerque et al. Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, 2018.

SINGH, Om Prakash et al. Xenodiagnosis to address key questions in visceral leishmaniasis control and elimination. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 8, p. e0008363, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008363>.

SOARES, Rodrigo PP; TURCO, Salvatore J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: psychodidae: phlebotominae): a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 75, p. 301-330, 2003.

STEINDEL, Mário et al. Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, p. 490-496, 2013.

STEUBER S, Abdel-Rady A, Clausen PH. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Parasitol Res.* v. 97, p. 247-254, 2005.

STUCKY, Brian J. SeqTrace: a graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, v. 23, n. 3, p. 90, 2012.

SUNDAR, Shyam et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *New England journal of medicine*, v. 347, n. 22, p. 1739-1746, 2002.

TEODORO, Ueslei et al. Flebotomíneos em área de transmissão de leishmaniose tegumentar na região norte do Estado do Paraná-Brasil: Variação Sazonal e Atividade Noturna. *Revista de Saúde Pública*, v. 27, p. 190-194, 1993.

THOMAZ-SOCCOL, Vanete et al. Hidden danger: Unexpected scenario in the vector-parasite dynamics of leishmaniasis in the Brazil side of triple border (Argentina, Brazil and Paraguay). *PLoS neglected tropical diseases*, v. 12, n. 4, p. e0006336, 2018.

TONELLI, Gabriel Barbosa et al. The sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the urban area of Lassance, Northeast Minas Gerais, Brazil. *Plos one*, v. 16, n. 10, p. e0257043, 2021.

TUPPERWAR, Nitin et al. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution

of the pathogen. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 61, n. 1, p. 23-30, 2008.

VAZ, T. P. Reavaliação de uma área enzoótica para a leishmaniose canina no Centro Oeste de Minas Gerais. 2018. Tese de Doutorado. Master's Thesis, Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Centro-Oeste, Divinópolis. 78p.

VAZ, Talita Pereira et al. Evaluation of the euthanasia of seropositive dogs for canine visceral leishmaniasis as the only method of controlling the disease in the enzootic area in the Midwestern Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 40, p. 107-112, 2020.

VILELA, Maurício Luiz et al. The phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of Guaraí, state of Tocantins, with an emphasis on the putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in rural settlement and periurban areas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, p. 578-585, 2013.

VIRBAC. Produtos: cães: antiparasitários internos: Milteforan. 2017.

WILSON, Anne L. et al. The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 14, n. 1, p. e0007831, 2020.

WHO – World Health Organization. The global health observatory Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/imr-details/3762>. Acesso em 08 de Março de 2022 a.

WHO – World Health Organization. The global health observatory Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em 14 de Março de 2022 b.

YIMAM, Yonas; MOHEBALI, Mehdi. Effectiveness of insecticide-impregnated dog collars in reducing incidence rate of canine visceral leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*, v. 15, n. 9, p. e0238601, 2020.

Anexo 1: Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São João Del Rei (Protocolo n.º 032/2018).



Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSJ – CEUA/UFSJ

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação da resposta ao tratamento com Miltefosina em cães domiciliados e naturalmente infectados por Leishmania (Leishmania) infantum.”, protocolo nº 032/2018 sob a responsabilidade de Gilberto Fontes que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de São João del-Rei, em reunião de 21/09/18.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Início: 01/10/2018 Término: 01/10/2020
Espécie/Linhagem/raça	Cão - qualquer portador de Leishmaniose
Nº de animais	Total 70
Peso / Idade	Não se aplica
Sexo	35 Fêmeas e 35 Machos
Origem	Não se aplica

Prof.ª Liliam Midori Ide

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-UFSJ

Anexo 2: Licença permanente para coleta de material zoológico



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15237-2	Data da Emissão: 29/11/2011 17:39
Dados do titular	
Nome: José Dilermando Andrade Filho	CPF: 835.584.546-34
Nome da Instituição : CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0008-01

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo ICMBio, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	FAMILIA	Psychodidae
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFMG - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	coleção
2	CENTRO DE PESQUISAS RENE RACHOU-FIOCRUZ	coleção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36646273





Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15237-2	Data da Emissão: 29/11/2011 17:39
Dados do titular	
Nome: José Dilermando Andrade Filho	CPF: 835.584.546-34
Nome da Instituição : CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ	CNPJ: 33.781.055/0008-01

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36646273



Página 2/2