

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

**EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE SABARÁ,
REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL**

por

Josiane Valadão Lopes

Belo Horizonte
Julho/2014

DISSERTAÇÃO MDIP - CPqRR

J.V. LOPES

2014

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

**EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE SABARÁ,
REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL**

por

Josiane Valadão Lopes

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

Orientação: Dr. Edelberto Santos Dias
Co-orientação: Dr.^a Érika Michalsky Monteiro

Belo Horizonte
Julho/2014

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

L864e 2014	<p>Lopes, Josiane Valadão.</p> <p>Epidemiologia da leishmaniose visceral no município de Sabará, Região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil / Josiane Valadão Lopes. – Belo Horizonte, 2014.</p> <p>xviii, 108 f.: il.; 210 x 297mm. Bibliografia: f.: 102-127</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.</p> <p>1. Leishmaniose Visceral/epidemiologia 2. Leishmaniose Visceral/diagnóstico 3. <i>Leishmania donovani</i>/parasitologia I. Título. II. Dias, Edelberto Santos (Orientação). III. Michalsky, Érika Monteiro (Co-orientação).</p> <p>CDD – 22. ed. – 616.936 4</p>
---------------	--

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

**EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE SABARÁ,
REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL**

por

Josiane Valadão Lopes

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Edelberto Santos Dias (Presidente)

Prof. Dr. João Carlos França da Silva

Prof. Dr. Daniel Moreira Avelar

Suplente: Dr. Márcio Sobreira S. Araújo

Dissertação defendida e aprovada em: 18/08/2014

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo, fará coisas admiráveis.”

José de Alencar
Escritor brasileiro

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre guiou meus passos, abençoou cada etapa; que me manteve lúcida e foi suporte nos momentos de fraqueza.

Ao meu marido, Júlio César, sempre companheiro e incentivador. Que, muitas vezes, foi privado de minha presença pelas incessantes viagens e sempre me esperou com o sorriso no rosto e muito amor. Te amo!

Ao meu orientador, Dr. Edelberto Santos Dias, por me dar a oportunidade de aprofundar meus conhecimentos. Que sempre me apoiou, motivou e proporcionou tantos ensinamentos. Foi amigo, companheiro de muitas risadas e, principalmente, um exemplo de profissional.

À Dr.^a Érika Michalsky, que, muito mais que uma co-orientadora, será eternamente uma amiga. Obrigada principalmente pela paciência, mas também pela imensa e constante ajuda, ensinamentos, lições e motivação. Você é um importante alicerce na vida de todos os que passam pelo Laboratório de Leishmanioses.

A todas as amigas do Lalei: Fabiana Lara, pelos conselhos sempre oportunos; Maiara Alves, pela disposição constante; Shara Regina, pelos ensinamentos; Lisiane, pela paciência; Fabiana Paixão, pelas boas risadas; Rosana, por transmitir tanta positividade; Jucélia, pelo apoio.

Ao amigo Ailton Costa, que trabalhou duro neste projeto, sempre colaborando, e me presenteou com o mapa deste estudo.

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

Aos moradores de Sabará, por abrirem a porta de suas casas para a realização deste trabalho. Espero que estes resultados possam beneficiá-los.

Ao Dr. George Luis Lins e à Dr.^a Consuelo Latorre, que gentilmente cederam seu tempo para colaborar nas análises estatísticas.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, e ao Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde (CPqRR/Fiocruz), pela oportunidade concedida no Curso de Mestrado, apoio financeiro e logístico durante a realização deste projeto e por todo o conhecimento adquirido.

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

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

Aos amigos Eduardo Levi, Carlos Henrique, Patrícia Gonçalves, Alexandre Duarte, Derly Fontes, Cláudio Machado, Vinícios Gomes, Tamara Esteves, Letícia Sena, Thiago Silva, que pacientemente me apoiaram, cederam os ombros e ouvidos e, com muito carinho, ficaram na torcida.

Aos meus familiares: avós, tios, primos e amigos, que me ajudaram e apoiaram-me para trilhar este caminho tortuoso da pesquisa. Em especial, ao meu avô Ezequiel Machado, que nos deixou recentemente, deixando saudade e que, em sua simplicidade, titulou-me como “Doutora Médica Veterinária Bióloga”. Não mereço tantos títulos, meu querido avô, mas agradeço e dedico este trabalho a você.

À nova família: Edite e Luiz, Nara, Alessandro e Tânia. Por carinhosamente acreditar e cuidar de mim, principalmente nos momentos mais difíceis.

Agradeço às instituições financiadoras que viabilizaram a execução desse projeto:

Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig)
Processo n° CDS - APQ - 03895-10

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
Processo n° 407634/2012-6

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)
Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR)

Apoio logístico

Centro de controle de Zoonoses do Município de Sabará- CCZ

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	XI
Lista de quadros de tabelas.....	XIII
Lista de abreviaturas e símbolos.....	XIV
Resumo.....	XVII
Abstract.....	XVIII
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 As leishmanioses.....	20
1.2 Leishmaniose visceral.....	21
1.3 Vetores da LV.....	23
1.4 Influência dos fatores climáticos sobre as populações de flebotomíneos.....	24
1.5 Ciclo evolutivo da <i>Leishmania</i>	25
1.6 Reservatórios da LV.....	26
1.7 Patologia da LV.....	28
1.7.1 A doença no cão.....	28
1.7.2 A doença no homem.....	29
1.7.3 Tratamento.....	30
1.8 Diagnóstico da LV.....	31
1.8.1 Diagnóstico clínico.....	31
1.8.2 Diagnóstico laboratorial.....	32
1.9 Controle da LV.....	36
2 JUSTIFICATIVA.....	40
3 OBJETIVOS	42
3.1 Geral.....	43
3.2 Específicos.....	43
4 METODOLOGIA.....	44
4.1 Área de estudo.....	45
4.2 Escolha dos bairros para o estudo.....	46
4.3 Levantamento entomológico.....	46
4.3.1 Montagem e identificação das espécies de flebotomíneos capturadas.....	49
4.3.2 Preparação das fêmeas capturadas para identificação taxonômica, detecção de infecção natural e repasto sanguíneo.....	50
4.4 Extração de DNA das fêmeas capturadas para detecção de infecção natural e determinação da fonte alimentar.....	51
4.4.1 Reação da polimerase em cadeia (PCR) de gene constitutivo de flebotomíneo (cacofonia).....	51
4.4.2 Identificação da fonte alimentar de flebotomíneos.....	52
4.4.3 Detecção da infecção natural de <i>Lu. longipalpis</i> por <i>Leishmania</i> spp.....	52
4.4.4 Análise dos produtos amplificados pela PCR.....	54
4.4.5 Cálculo da taxa mínima de infecção natural.....	54
4.4.6 Sequenciamento SSURrNA para determinação da espécie de <i>Leishmania</i> e determinação da fonte alimentar.....	55

4.5	Influencia dos fatores climáticos na densidade populacional dos flebotomíneos.....	56
4.6	Inquérito Canino	56
4.6.1	<i>Eutanásia e necropsia dos cães soropositivos.....</i>	57
4.6.2	<i>Isolamento de parasitos</i>	59
4.6.3	<i>Pesquisa direta de parasitos</i>	60
4.6.4	<i>Extração de DNA de medula óssea e tecidos.....</i>	60
4.6.5	<i>Reação em cadeia da polimerase.....</i>	60
4.7	Análises estatísticas.....	61
4.7.1	<i>Testes realizados no estudo entomológico</i>	61
4.7.2	<i>Testes realizados no estudo canino.....</i>	61
4.8	Distribuição espacial dos casos humanos, caninos e pontos de coleta entomológica.....	61
5	RESULTADOS	62
5.1	Levantamento da fauna flebotomínica	63
5.2	Influência das variáveis climáticas na densidade populacional de <i>Lu. longipalpis</i>.....	66
5.3	Determinação de fonte alimentar de fêmeas de <i>Lu. longipalpis</i>.....	68
5.4	Sequenciamento para determinação da fonte alimentar	68
5.5	Detecção de infecção natural de <i>Lu. longipalpis</i> por <i>Leishmania</i> spp.....	69
5.6	Sequenciamento SSUrRNA para determinação da espécie de <i>Leishmania</i> nas fêmeas de flebotomíneos capturadas no campo	70
5.7	Determinação da taxa de positividade canina do município de Sabará nos anos de 2011 e 2012.....	71
5.8	Distribuição de frequência de resultados dos testes parasitológico direto, PCR e mielocultura de cães assintomáticos e sintomáticos.....	72
5.9	Distribuição de frequência de resultados do teste de PCR de cães assintomáticos e sintomáticos	73
5.10	Distribuição de frequência de resultados cumulativos dos testes parasitológico direto, PCR e mielocultura de cães assintomáticos e sintomáticos	76
5.11	Frequência de sintomas sugestivos entre cães soropositivos sintomáticos	77
5.12	Comparação entre testes diagnósticos de cães assintomáticos e sintomáticos	78
5.13	Sequenciamento SSUrRNA para determinação da espécie de <i>Leishmania</i> nos cães soropositivos, amostras de linfonodo positivas.....	79
5.14	Epidemiologia descritiva.....	80
6	DISCUSSÃO	82
7	CONCLUSÕES	98
8	ANEXO	100
8.1	Certificado CEUA/Fiocruz.....	101
9	REFERÊNCIAS	102

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	25
FIGURA 2 - Localização geográfica de Sabará.....	45
FIGURA 3 - Vista parcial do município de Sabará.....	45
FIGURA 4 - Exemplos de residências onde foram realizadas as capturas entomológicas no município de Sabará.....	46
FIGURA 5 - Esquema de direcionamento dos espécimens capturados do estudo entomológico no município de Sabará, no período de Janeiro de 2011 a Dezembro de 2012.....	47
FIGURA 6 - Pontos de capturas entomológicas no município de Sabará, no período de Janeiro de 2011 a Dezembro de 2012.....	48
FIGURA 7 - Principais estruturas de identificação dos exemplares de flebotomíneos machos e fêmeas.....	50
FIGURA 8 - Desenho esquemático do resultado da Ln-PCR destinada a amplificar um fragmento do gene SSUrRNA de <i>Leishmania</i>	53
FIGURA 9 - Punção da veia marginal auricular do cão.....	57
FIGURA 10 - Punção de medula óssea (crista tibial).....	58
FIGURA 11 - Incisão pré-retroumbilical.....	58
FIGURA 12 - Fragmentos de pele e baço.....	59
FIGURA 13 - Semeadura de medula óssea em meio de cultura NNN/LIT.....	59
FIGURA 14 - <i>Imprint</i> em lâmina para diagnóstico parasitológico.....	60
FIGURA 15 - Porcentagem de <i>Lu. longipalpis</i> em relação às demais espécies capturadas no município de Sabará, utilizando armadilha luminosa HP, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012.....	64
FIGURA 16 - Número de espécimes de <i>Lu. longipalpis</i> capturados nos bairros do município de Sabará, em relação à endofilia e exofilia, utilizando armadilha luminosa HP, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012.....	65
FIGURA 17 - Correlação entre o número de flebotomíneos capturados e a variável climática (precipitação pluviométrica) no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012, no município de Sabará.....	66
FIGURA 18 - Correlação entre o número de flebotomíneos capturados e a variável climática (temperatura), no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012, no município de Sabará.....	67
FIGURA 19 - Correlação a variável climática (precipitação pluviométrica) e a variável climática (umidade relativa do ar) no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012, no município de Sabará.....	67
FIGURA 20 - Produtos de amplificação (<i>Lu. longipalpis</i>) obtidos com iniciadores do gene do citocromo B, observados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio.....	68

FIGURA 21 - Produtos de amplificação (<i>Lu. longipalpis</i>) obtidos com iniciadores do gene do SSUrRNA, observados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio.....	69
FIGURA 22 - Alinhamento das sequências editadas IN3, IN6 e IN8 positivas para o gênero <i>Leishmania</i> (município de Sabará), com amostras de <i>Leishmania</i> depositadas no GenBank <i>Le. braziliensis</i> , <i>Le. amazonensis</i> e <i>Le. infantum</i>	70
FIGURA 23 - Distribuição de resultados dos testes parasitológico direto, PCR e mielocultura entre cães sintomáticos e assintomáticos, Sabará, 2011 e 2012	72
FIGURA 24 - Distribuição da frequência, por porcentagem, de resultados do teste de PCR por tecido, entre cães assintomáticos e sintomáticos, Sabará, 2011 e 2012.	73
FIGURA 25 - Produtos de amplificação (amostras de linfonodo mesentérico) obtidos com iniciadores do gene do SSUrRNA, observados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio.	74
FIGURA 26 - Distribuição da frequência de resultados do teste de PCR por tecido, entre cães assintomáticos e sintomáticos, Sabará, 2011 e 2012.	75
FIGURA 27 - Frequência cumulativa dos resultados dos testes parasitológico direto, PCR e mielocultura entre cães sintomáticos e assintomáticos, Sabará, 2011 e 2012	76
FIGURA 28 - Frequência de sintomas sugestivos entre cães sintomáticos, Sabará, 2011 e 2012.....	77
FIGURA 29 - Comparação entre testes diagnósticos de cães sintomáticos e assintomáticos, Sabará, 2011 e 2012.....	78
FIGURA 30 - Alinhamento das sequências editadas 1L(Linfonodo mesentérico) positivas para o gênero <i>Leishmania</i> (município de Sabará), com amostras de <i>Leishmania</i> depositadas no GenBank <i>Le. braziliensis</i> , <i>le. amazonensis</i> e <i>le. infantum</i>	79
FIGURA 31 - Mapa vetorizado dos casos caninos, casos humanos, pontos de capturas entomológicas, flebotomíneos infectados naturalmente georreferenciados, nos bairros em estudo da área I, município de Sabará, anos 2011 e 2012	80

LISTA DE QUADRO E TABELAS

QUADRO 1 – Protocolo de preparação de flebotomíneos para montagem, segundo normas preconizadas pelo Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou (Langeron, 1949)	49
TABELA 1 - Flebotomíneos capturados no município de Sabará, utilizando armadilha luminosa HP, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012.....	63
TABELA 2 - Número mensal espécimes de <i>Lu. longipalpis</i> capturados nos bairros do município de Sabará, utilizando armadilhas luminosas HP, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012.	64
TABELA 3 - Número de espécimens de <i>Lu. longipalpis</i> capturados nos bairros do município de Sabará, em relação à endofilia e exofilia, utilizando armadilha luminosa HP, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012.....	65
TABELA 4 - Número de <i>pools</i> de fêmeas não ingurgitadas de <i>Lu. longipalpis</i> e local de captura no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012, no município de Sabará.....	69
TABELA 5 - Inquérito canino realizado em cães domiciliados no município de Sabará, pelos testes de ELISA e RIFI, no ano de 2011.	71
TABELA 6 - Inquérito canino realizado em cães domiciliados no município de Sabará, pelos testes de ELISA e RIFI, no ano de 2012.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BA - Bahia

BH - Belo Horizonte

BDMEP - Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BOD - Demanda bioquímica de oxigênio

CCZ - Centro de Controle de Zoonoses

CEUA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

CF - Citometria de fluxo

CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária

CP - Controle positivo

CN - Controle negativo

Cytb - Citocromo B

CPqRR - Centro de Pesquisas René Rachou

dATP - Trifosfato de desoxiadenosina

dCTP - Trifosfato de desoxicidina

dGTP - Trifosfato de desoxiguanosina

dTTP - Trifosfato de desoxitimidina

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

DMSO - Dimetil-sulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPP - *Dual Path Platform*

Elisa - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz

FML - Ligante manose-fucose

Funed - Fundação Ezequiel Dias

FUNASA – Fundação Nacional da Saúde

GPS - Sistemas de Posicionamento Global

H₂O - Água

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HP - *Hoover Pugedo*

IBAMA - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IgG - Imunoglobulina G

Inmet - Instituto Nacional de Meteorologia
KCL - Cloreto de potássio
KDNA - Kinetoplast DNA
Km² - Quilômetro quadrado
Le - *Leishmania*
LIT - *Liver infusion tryptose*
LnNestcd - *Leishmania* nested PCR
Ln PCR - *Nested PCR*
LT - Leishmaniose tegumentar
LTA - Leishmaniose tegumentar americana
Lu. - *Lutzomyia*
LV - Leishmaniose visceral
LVC - Leishmaniose visceral canina
LVF - Leishmaniose visceral felina
LVH - Leishmaniose visceral humana
m² - Metro quadrado
mm - Milímetro
MA - Maranhão
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG - Minas Gerais
Mg - Magnésio
mM - Milimolar
mL - Mililitro
MS - Ministério da Saúde
MS - Mato Grosso do Sul
NNN - *Novy MacNeal Nicolle*
ng - Nanograma
OMS - Organização Mundial de Saúde
OMM - Organização Meteorológica Mundial
Pb - Pares de bases
pH - Potencial hidrogeniônico
PCLV - Programa de Controle da Leishmaniose Visceral
PCR - *Polimerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)
PI - Piauí
pmol - Pico mol

qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RJ - Rio de Janeiro

RFLP - *Restriction fragment length polymorphism*

RNA - Ácido ribonucleico

rRNA - Ácido ribonucleico ribossomal

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

SP - São Paulo

SMF - Sistema fagocítico mononuclear

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

TMI - Taxa mínima de infecção

TO - Tocantins

SSUrRNA - *Small subunit ribosomal RNA*

UV - Ultravioleta

UTM - Universal transverso de Mercator

WHO - *World Health Organization*

μL - Microlitro

μg - Micrograma

RESUMO

A proposta deste trabalho foi estudar algumas das variáveis envolvidas na transmissão da leishmaniose visceral (LV) em oito bairros do município de Sabará (MG). Para o levantamento da fauna de flebotomíneos, influência dos fatores climáticos, identificação de repasto sanguíneo e infecção natural por *Leishmania*, para isso foram realizadas capturas utilizando armadilhas luminosas do tipo HP, tanto no peri como no intradomicílio, nos seguintes bairros: Alvorada, Novo Alvorada, Alvorada Velho, Bom Retiro, Nova Vista, Casa Branca, Rio Negro e Ana Lúcia, no período de janeiro de 2011 a dezembro 2012. Além desses estudos, foram realizados dois inquéritos caninos censitários nos mesmos bairros, nos anos de 2011 e 2012, para o cálculo da taxa de positividade. Para análises parasitológicas e moleculares, foram selecionados aleatoriamente 50 cães soropositivos para os testes de RIFI e ELISA, que foram eutanasiados e necropsiados para obtenção de amostras de pele, linfonodo mesentérico e baço, além de aspirado de medula óssea. Com essas amostras, foram realizados os testes: exame direto (parasitológico), PCR e mielocultura visando confirmar a infecção e identificar a espécie de *Leishmania* circulante. A fauna flebotomínica foi constituída de quatro espécies, sendo *Lutzomyia longipalpis* a mais abundante, totalizando 95,0% dos exemplares capturados. Destes, 23,0% foi capturado no intradomicílio. Verificou-se uma tendência no aumento do número de espécimens após o período chuvoso. Das 28 fêmeas ingurgitadas, 67,9% se alimentaram no homem (*Homo sapiens*) e 25,0% tiveram como fonte alimentar a ave (*Gallus gallus*). Nove pools foram utilizados para verificar a infecção natural, destes três se apresentaram positivos e, após sequenciamento de DNA, foi observado que a espécie circulante nos vetores foi *Leishmania infantum*. A taxa média de infecção canina foi de 4,25% em 2011 e 3,34% em 2012. A positividade das amostras (pele, baço, medula e linfonodo) obtidas dos cães soropositivos foi de 100,0% pela PCR, 76,0% pela mielocultura e 66,0% pelo exame parasitológico direto. Entre os quatro tipos de amostras estudadas, o linfonodo foi o tecido que apresentou maior positividade (98,0%). O sequenciamento de DNA das amostras positivas de linfonodo indicou *Le. infantum* como sendo a espécie circulante nos cães do município. Após se correlacionarem os casos humanos, caninos e a presença da espécie *Lu. longipalpis*, encontrada positiva para *Le. infantum*, pode-se sugerir que os bairros Alvorada e Nova Vista merecem atenção especial como importantes áreas de risco para LV no município.

ABSTRACT

The purpose of the present study was to investigate some epidemiological aspects related the transmission of visceral leishmaniasis (VL) in eight districts of the town of Sabará, in the Brazilian state of Minas Gerais. We surveyed the local phlebotomine sand fly fauna and the main feeding sources, analyzed the interference of climate variables on the populational fluctuation and verified the rates of natural infection of vector species of VL. The entomological captures were performed with HP light traps, from January 2011 to December 2012, in both intra and peridomiciles of houses located in the following districts of Sabará: Alvorada, Novo Alvorada, Alvorada Velho, Bom Retiro, Nova Vista, Casa Branca, Rio Negro and Ana Lúcia. During our study, the plebotomine sand fly population showed a tendency to increase after the rainy period. Four species of phlebotomine sand flies were present, most of them (95.0%) being *Lutzomyia longipalpis*. Twenty-three percent of them was captured inside the houses. Amongst 28 engorged females, 67.9% had fed on humans (*Homo sapiens*) and 25% on chicken (*Gallus gallus*). *Leishmania infantum* DNA was genotyped in three of nine pooled samples of *Lu. longipalpis*. Two canine census surveys were performed in the same districts allowing the calculation of the average positivity rate of canine VL, in each year of study, as 4.25% in 2011 and 3.34% in 2012. Fifty among the seropositive dogs for VL faded to euthanasia were randomly selected for parasitological and molecular analyses of tissues (skin, mesenteric lymph nodes and spleen, as well as bone marrow aspirates). All those samples gave 100% of positivity by PCR, 76% positivity by myeloculture and 66% positivity by direct parasitological examination. The highest overall positivity (98%) was obtained with lymph nodes, where the infecting parasite was also genotyped as *L. infantum*. The combined analysis of the human and canine cases of VL and the vector population data in Sabará, allow us to suggest that Alvorada and Nova Vista districts deserve special attention as main risk areas of VL in the city.

1 INTRODUÇÃO

1.1 As leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas por parasitas, protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* (Ross, 1903). Estas apresentam amplo espectro epidemiológico em todo o mundo, ocorrendo em vastas áreas tropicais e subtropicais do globo, podendo apresentar-se como zoonose, antroponose ou antropozoonose, estas duas últimas quando o homem acidentalmente atua como reservatório no ciclo de transmissão do parasito. Esses parasitas infectam uma grande variedade de hospedeiros mamíferos silvestres e domésticos (Passos, 1993).

Atualmente as leishmanioses encontram-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo, sendo reportada em 98 países e 3 territórios dos 5 continentes, acometendo 12 milhões de pessoas, sendo que 350 milhões estão vivendo em áreas de risco e expostas à infecção (Alvar *et al.*, 2012).

A Organização Mundial de Saúde (WHO) divide as leishmanioses em quatro grupos clínicos: cutânea, mucocutânea, cutâneo-difusa e visceral. A forma cutânea apresenta baixa gravidade, diferente da forma mucocutânea, que pode destruir parcial ou totalmente as mucosas do nariz, boca, garganta e tecidos circundantes. A forma cutâneo-difusa apresenta um aspecto hanseniforme, sendo o tratamento terapêutico extremamente difícil. A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é a forma mais letal e caracterizada por febre alta, perda de peso substancial, aumento do baço e do fígado, e anemia. Se não tratada, a doença pode ter taxa de mortalidade de até 100% em dois anos (WHO, 2014).

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

1.2 Leishmaniose visceral

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

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

Migone, no Paraguai, fez o registro do primeiro caso da doença no Brasil, que ocorreu em 1913, mediante análise de material necropsiado de um paciente de Boa Esperança, no Mato Grosso (Alencar, 1977). Entre 1936 e 1939, muitos estudos foram realizados por Evandro Chagas e colaboradores, demonstrando a doença em humanos e em cães, com a incriminação do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* como provável vetor e o parasito identificado como *Le. infantum* (Cunha; Chagas, 1937).

De todos os casos de LV, 90% ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (Chappuis *et al.*, 2007; Desjeux, 2004; WHO, 2014). Nas Américas, a LV ocorre desde o México até a Argentina, sendo que aproximadamente cerca de 90% dos casos humanos descritos são procedentes do Brasil (Grimaldi *et al.*, 1989; Desjeux, 2004).

A ocorrência da leishmaniose em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor susceptível e de um hospedeiro/reservatório igualmente susceptível. A doença se caracteriza por acometimento progressivo do sistema fagocítico mononuclear (SFM), levando à sua hiperplasia, hipertrofia e parasitismo. A patogenia da doença é determinada por múltiplos fatores que envolvem os hospedeiros e os parasitos, o estado imunológico e nutricional do indivíduo, além de fatores genéticos determinantes da susceptibilidade para a infecção e para a cura (Deane; Deane, 1956 e 1962).

Inicialmente a doença, descrita como doença esporádica, mantinha um perfil silvestre, rural, de transmissão peridomiciliar, principalmente ligada a bolsões de pobreza. Nos últimos anos, após a década de 1970, degradações ambientais, migrações de populações carentes para a periferia dos grandes centros, fixando-se em locais sem infraestrutura de saneamento básico e em convivência com animais domésticos, contribuíram para o processo de urbanização da doença. Essas mudanças, associadas à adaptação de determinados flebotomíneos a ambientes alterados pelo homem, aproximaram hospedeiros definitivos e intermediários, vetores e parasitos, e determinaram mudanças nos níveis endêmicos e epidêmicos das doenças infecciosas (Gomes, 1994; Ambroise-Thomas, 2000; Patz *et al.* 2000).

O Brasil enfrenta atualmente a expansão e urbanização da LV. Esse processo foi primeiramente alertado por Deane (1956), em seu clássico estudo sobre a doença, e, a partir de então, foi constatada em várias cidades de pequeno e médio porte. Hoje tem sido descritos casos de LV em importantes centros urbanos, como Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Campo Grande (MS), Araçatuba (SP), Palmas (TO), entre outros (Brasil, 2006).

1.3 Vetores da LV

A LV é transmitida pela picada de fêmeas de dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (Killick-Kendrick; Rioux, 1991). No Brasil, os flebotomíneos são conhecidos popularmente por mosquito-palha, birigui, cangalhinha, asinha-branca, tatuquira, entre outras denominações (Rebêlo, 1999).

De uma forma geral, caracterizam-se por serem insetos de pequeno porte (1 a 3 mm de comprimento), ter o corpo e as patas cobertas de cerdas, hábitos de voo crepusculares e abrigarem-se em locais úmidos e sombrios. Durante o pouso, mantêm suas asas em posição vertical característica. São encontrados no peridomicílio e intradomicílio, e alimentam-se de sangue em animais domésticos e silvestres (Forattini, 1953).

Os flebotomíneos, assim como muitos outros dípteros hematófagos, necessitam de suprimentos de carboidratos que, na natureza, adquirem diretamente da seiva de plantas, néctar (Alexander; Usma, 1994), secreções de afídeos e frutas maduras (Cameron *et al.*, 1995). Para as fêmeas, esses requerimentos são utilizados como complemento da alimentação sanguínea (Magnarelli; Modi, 1988; Van Handel, 1984).

Os flebotomíneos costumam abrigar-se em troncos de árvores, tocas de animais, folhas caídas no solo, copa de árvores, frestas em rochas que apresentam características peculiares, as quais favorecem a presença desses insetos, como pequenas variações de temperatura e umidade (Aguiar *et al.*, 1985; Azevedo *et al.*, 1993). Porém, com a destruição das matas nativas, o habitat natural foi alterado, havendo então uma restrição de ambientes por eles utilizáveis. Desse modo, as espécies que, de alguma forma, resistem às condições adversas conseguem explorar novos ambientes, aproximando-se cada vez mais dos peridomicílios (Forattini *et al.*, 1972; Gomes; Galati, 1989). Geralmente correspondem ao ambiente onde as fêmeas encontram hospedeiros vertebrados nos quais podem realizar seu repasto sanguíneo (Comer; Brown, 1993).

No Brasil, a LV tem como vetoras duas espécies de flebotomíneos: *Lu. longipalpis* (Lutz; Neiva, 1912) e *Lu. cruzi* (Mangabeira, 1938). A primeira espécie é a de maior importância, por estar em cinco regiões geográficas do país; e a segunda, específica do Estado do Mato Grosso do Sul (Santos *et al.*, 1998; Brasil, 2006).

1.4 Influência dos fatores climáticos sobre as populações de flebotomíneos

Os locais de abrigo e criadouro de flebotomíneos apresentam características peculiares, as quais favorecem a presença desses insetos, como pequenas variações de temperatura e umidade. Geralmente os locais de abrigo correspondem ao ambiente onde as fêmeas encontram seus hospedeiros vertebrados e realizam seu repasto sanguíneo (Basimike *et al.*, 1991; Memmott, 1991; Comer; Brown, 1993).

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

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

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

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

1.5 Ciclo evolutivo da *Leishmania*

Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, as fêmeas dos flebotomíneos ingerem macrófagos teciduais contendo em seu interior formas amastigotas de *Leishmania*, as quais, após ruptura celular, são liberadas no lúmen do trato digestivo dos insetos, quando o sangue ingerido ainda permanece fresco. Ainda dentro do bolo alimentar (matriz peritrófica) as leishmanias começam a se dividir por fissão binária e se diferenciam em formas promastigotas, alongadas com flagelo livre, colonizando o intestino dos flebotomíneos. Essas formas se transformam, então, em paramastigotas, aderidas ao epitélio por junções chamadas hemidesmossomas. Posteriormente ocorre nova transformação para promastigotas, dessa vez formas extremamente ágeis que nadam livremente – as promastigotas metacíclicas; ao exercer outro repasto sobre um hospedeiro susceptível o flebotomíneo inocula esses parasitos presentes no trato digestivo anterior, probóscide, faringe e esôfago. No local onde ocorreu a picada do inseto vetor as formas promastigotas são fagocitadas por células do SFM, macrófagos teciduais e granulócitos neutrófilos. As formas promastigotas se transformam em amastigotas, dentro do vacúolo fagocitário, se dividem rapidamente e quando o macrófago está densamente parasitado o vacúolo se rompe liberando as amastigotas, que serão novamente fagocitadas por outros macrófagos (Lainson; Shaw, 1988; Ashford, 2000; Bates, 2007) Todo o ciclo encontra-se resumido na FIG. 1.

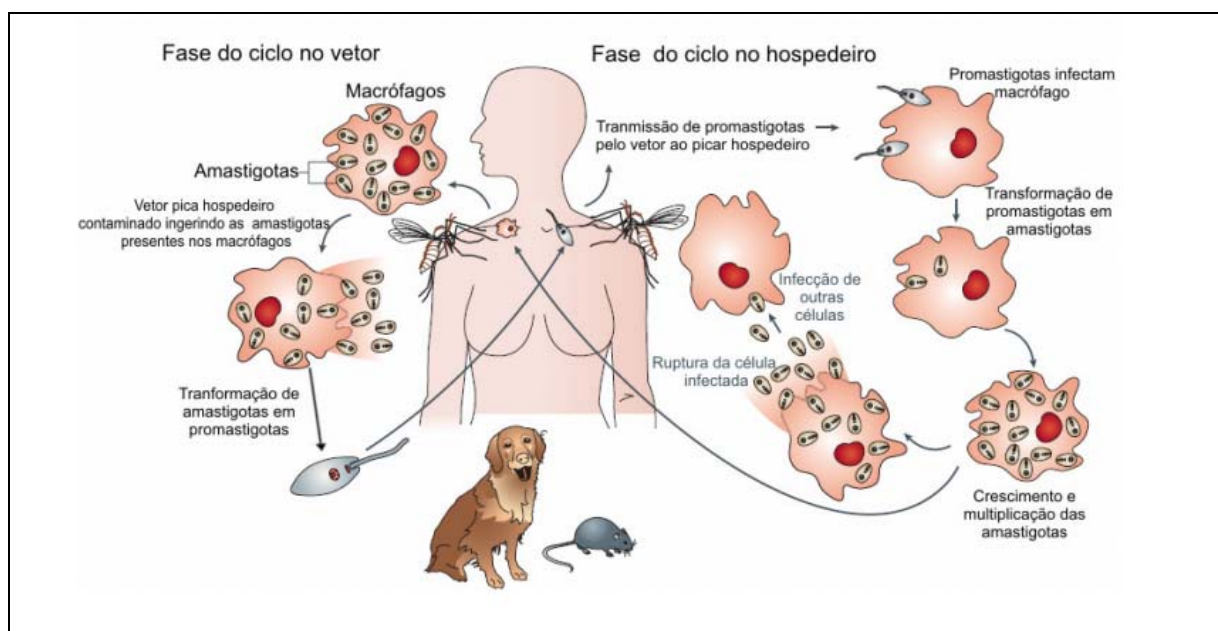


FIGURA 1 - Ciclo de vida da *Leishmania*.

Fonte: adaptado e traduzido de Lipoldová e Demant (2006).

Alguns autores levantam a hipótese de que o ciclo de transmissão da LV também possa ocorrer entre a população canina através de ectoparasitos, sugerindo a hipótese da capacidade vetorial de pulgas e carrapatos (Coutinho *et al.*, 2005; Coutinho; Linardi, 2007; Paz *et al.*, 2013).

Em estudo realizado no Brasil, pesquisadores coletaram 39 carrapatos de cães soropositivos, apresentando sinais clínicos sugestivos de LV, e verificaram a presença de DNA de *Leishmania* em seis desses carrapatos. No mesmo estudo, carrapatos foram macerados e inoculados em hamsters por via oral e intraperitoneal. Seis meses após a inoculação, 14 animais apresentaram sinais de infecção, sendo que 12 haviam sido inoculados por via intraperitoneal e 2 por via oral (Coutinho *et al.*, 2005).

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

As vias alternativas de infecção colocam em prova as estratégias de controle e erradicação da LV baseadas na eliminação do vetor, atestando que estas não seriam eficientes, pois a *Le. infantum* manteria seu ciclo, assumindo potencial importância no acasalamento de cães errantes positivos (Silva *et al.*, 2009).

1.6 Reservatórios da LV

A cadeia epidemiológica da LV se desenvolve em determinada área, mediante a presença concomitante do vetor, do reservatório e do hospedeiro susceptível. Os reservatórios da LV incluem uma grande variedade de hospedeiros mamíferos, sendo a ocorrência comum em roedores e canídeos, mas também em edentados, marsupiais, ungulados, primatas e, entre estes, o homem, que é atingido acidentalmente pela infecção (Deane; Deane, 1954a; Lainson *et al.*, 1985).

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

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

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

Diversos grupos de animais silvestres além dos canídeos, como felinos e roedores, também já foram incriminados como reservatórios de LV (Luppi *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008). Savani *et al.* (2004) descreveram o primeiro caso do Brasil e das Américas de leishmaniose visceral felina (LVF) e sugeriram que os gatos domésticos possam atuar como reservatório de LV. Silva *et al.* (2008) reportaram 25% de soroprevalência em gatos de área endêmica de LV no Rio de Janeiro. Os autores sugeriram que os gatos possam ser considerados como alternativa de hospedeiros domésticos de *Le. infantum* e deveriam ser incluídos nas investigações sorológicas realizadas em áreas endêmicas. Já os roedores constituem um dos grupos de animais sinantrópicos mais procurados pelos flebótomos. Esse achado reforça a necessidade de esses animais serem estudados como possíveis reservatórios de *Le. infantum* (Caldas *et al.*, 2001).

O papel do cão como reservatório de *Leishmania* foi tratado pela primeira vez por Nicolle, em 1908, na Tunísia, quando experimentalmente foi comprovada a infecção desse animal. No Brasil, nos anos 50, Deane e Deane, e Alencar, estudando o calazar no Ceará, estabeleceram a importância do cão doméstico como fonte de infecção e manutenção da LV. Genaro (2000) relata que os cães têm sido encontrados infectados em todos os focos da doença humana, sendo considerado o principal elo na cadeia de transmissão da LV.

O cão adquiriu grande importância como reservatório de *Le. infantum* no ambiente doméstico devido à sua convivência estreita com o homem. A elevada ocorrência de infecções inaparentes nesses animais, associada ao intenso parasitismo cutâneo, faz do cão uma fonte de infecção preferencial para o vetor, sendo importante na transmissão da doença para o homem (Feitosa *et al.*, 2000).

1.7 Patologia da LV

1.7.1 A doença no cão

A LV pode apresentar formas clínicas sintomáticas e assintomáticas, sendo que o período de incubação é incerto, podendo variar de três meses até vários anos (Deane; Deane, 1955; Genaro, 1993). Quando assintomáticos, os cães infectados podem apresentar aspecto aparentemente normal, mas com alto grau de parasitismo, tanto na pele quanto nas vísceras. Um ponto importante a ser considerado é que tanto animais sintomáticos quanto assintomáticos podem ser fonte de infecção para o inseto vetor, permitindo a transmissão do parasito para o homem e outros vertebrados (Molina *et al.*, 1994; Michalsky *et al.*, 2007)

Nos cães sintomáticos, o sinal mais frequente observado tanto por Alencar (1959) quanto por Almeida *et al.* (2005) é o emagrecimento, seguido de úlceras de pele, onicogribose, conjuntivite, descamação, esplenomegalia e hepatomegalia. Outras manifestações podem estar incluídas, como diarreia, envolvimento articular, fraqueza, redução das atividades, anorexia, anemia, linfadenopatia local ou generalizada, atrofia muscular e falência renal, sendo estas normalmente, as principais causas de morte de cães infectados (Pumarola *et al.*, 1991; Solano-Gallego *et al.*, 2001).

Em estudos de infecção experimental, Genaro *et al.* (1993) verificaram que cães inoculados com *Le. infantum* podem evoluir de quatro formas diferentes:

1) Evolução frusta: os animais não apresentam alterações visíveis e, após a inoculação, são detectados parasitos que desaparecem em seguida.

2) Evolução regressiva espontânea: os animais apresentam inicialmente um parasitismo transitório de medula óssea, que coincide com o período de emagrecimento e logo ocorre retomada do ganho de peso, sem apresentação de outro tipo de alteração.

3) Evolução aguda: os cães apresentam parasitismo de medula óssea e cutâneo, emagrecimento acentuado durante o curso da infecção, associado com alopecia generalizada, descamação e lesões crostosas por todo o corpo, onicogribose acentuada, envolvimento ocular e nasal e, finalmente, evolução para caquexia.

4) Evolução crônica: os animais apresentam parasitismo de medula óssea e cutâneo, emagrecimento leve ou moderado durante o curso da infecção, associado com alopecia localizada, lesões crostosas no pavilhão auditivo e em

áreas de articulação, onicogribose, apatia, adenopatia, edema de patas, também de forma leve ou moderada.

1.7.2 A doença no homem

A LV predomina em crianças nos primeiros anos de vida, e associa-se a grande morbidade e elevado número de óbitos (Al-Jurayyan *et al.*, 1995; Minodier *et al.*, 2005). Em contraposição, na vida adulta, a letalidade aumenta proporcionalmente à idade, especialmente após 60 anos de idade (Caldas *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2006).

Foi relatado, no Brasil, que a duração da doença é maior em adultos com LV e que estes apresentam mais sangramento e mais linfadenopatia, mas que as crianças estão em maior risco de apresentar doença grave, evidenciada pela maior incidência de hepatomegalia e de anemia (Caldas *et al.*, 2006).

A desnutrição tem sido descrita como fator de risco para a aquisição da LV, especialmente em crianças vivendo em áreas endêmicas (Badaró *et al.*, 1986; Dye; Williams, 1993; Maciel *et al.*, 2008)

Segundo Desjeux (2004), as principais manifestações clínicas da LV no homem são febre intermitente, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia e linfadenopatia. A tosse não produtiva, diarreia e dor abdominal são queixas frequentes na fase aguda da infecção. Progressivamente, no curso da doença, o paciente pode apresentar hemorragia gengival e digestiva, edema, icterícia, ascite, anorexia e desnutrição. Nesses pacientes, o óbito é geralmente determinado pelas hemorragias e infecções intercorrentes (Michalick; Genaro, 2005). A LV, quando não tratada, pode causar caquexia grave e sangramento por trombocitopenia, levando a hemorragia grave da mucosa, facilitando a sepse e causando a morte do enfermo (Kumar; Nylén, 2012).

Nas duas últimas décadas, a LV foi reconhecida como importante doença oportunista em pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV) e mudou a história natural da LV. A coinfeção LV/HIV já foi notificada em pelo menos 35 países, em uma proporção que varia de 2 a 12%, com tendências a aumentar drasticamente (WHO, 2007; Alvar *et al.*, 2008). No Brasil a coinfeção LV/HIV tem sido descrita em pequenas séries de casos, mas a real incidência pode estar subestimada devido a falhas do sistema de vigilância epidemiológica (Rabello *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2006)

Em pessoas com HIV, a infecção por LV é oportunista e, nesses casos, as manifestações clínicas são atípicas, como ausência de esplenomegalia e falta de resposta ao tratamento com antimoniais (Lachaud *et al.*, 2000)

1.7.3 Tratamento

O tratamento de primeira linha para todas as formas da doença se faz por meio de medicamentos à base de antimoniais pentavalentes, de forma sistêmica. Contudo, é importante se conhecer a epidemiologia do local no que diz respeito à suscetibilidade do parasito às diferentes drogas, o entendimento da farmacocinética do medicamento, assim como uma criteriosa avaliação clínica do paciente, levando em consideração características imunológicas e aspectos socioeconômicos. Estes pontos são fundamentais na escolha da terapia e consequente sucesso da mesma (Tuon *et al.*, 2008).

No Brasil, o tratamento da doença humana é feito usando formulação disponível do antimoniato de N-metil glucamina, de distribuição exclusiva do Ministério da Saúde, em ampolas de 5ml com 405mg de Sb+5kg/dia (1 ml = 81 mg de Sb+5), sendo recomendado para o tratamento da leishmaniose visceral a dose de 20mg de Sb+5kg/dia, por via endovenosa ou intramuscular profunda, por no mínimo vinte dias e no máximo quarenta dias. O tratamento deve ser limitado a duas ou três ampolas por dia com finalidade de cura, alcançando índices de cura de 95%.

Nos casos em que as drogas de primeira escolha (Glucantime® e Pentostan®) não se mostrarem efetivas devido aos longos esquemas terapêuticos, toxicidade (cardiotóxica e nefrotóxica) e limitações de uso nos dois primeiros trimestres de gestação, há alternativas de tratamento com a anfotericina B (lipossomal e dispersão coloidal), pentamidinas (sulfato e mesilato) e imunomediadores (interferon gama e fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos -GM-CSF-) que são utilizados nos serviços de referência de tratamento da leishmaniose visceral (Gontijo e Melo, 2004). Estas alternativas são indicadas para pacientes infantis, pessoas portadoras de coinfeções por patógenos oportunistas, infecções bacterianas e em pacientes imunossuprimidos (Santos *et al.*, 2002).

1.8 Diagnóstico da LV

O diagnóstico da LV, tanto em humanos quanto nos animais, é baseado em sinais clínicos, nos dados epidemiológicos (ocorrência ou não da enfermidade na área do indivíduo ou animal) e o diagnóstico laboratorial (Brasil, 2006).

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

1.8.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico humano baseia-se nos sinais e sintomas apresentados pelos pacientes associados à permanência em área endêmica. A sintomatologia típica da LV envolve febre baixa em longo prazo, aumento do baço e do fígado, perda de peso, pancitopenia e hipergamaglobulinemia (Kumar; Nylén, 2012). Outras manifestações clínicas citadas acima dificultam o diagnóstico diferencial com outras doenças de sintomatologia semelhante, como malária, toxoplasmose, febre tifoide, tuberculose, HIV, brucelose, hepatite crônica, esquistossomose, principalmente em áreas onde ocorre a superposição das doenças (WHO; ODA, 1996; Reiche *et al.*, 2006).

O diagnóstico clínico canino é bastante complexo, apresentando os sintomas mais comuns: alterações cutâneas, linfadenomegalia local ou generalizada, perda de peso, aumento do tamanho do baço e do fígado, onicogrifose e apatia (Maia; Campino, 2008), embora alguns cães que vivem em áreas endêmicas podem ter contato com o parasito e não desenvolver sinais clínicos da doença. Dessa maneira, a associação entre os parâmetros clínicos, epidemiológicos, parasitológicos e sorológicos faz-se necessária para o diagnóstico definitivo (Freitas *et al.*, 2012).

1.8.2 Diagnóstico laboratorial

Nos casos humanos e caninos da doença, o diagnóstico é rotineiramente realizado com base em parâmetros clínicos e epidemiológicos (Gontijo; Melo, 2004). O diagnóstico laboratorial da LV ainda representa um desafio, já que um teste eficaz deve detectar a infecção, ter alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, deve ser simples, de fácil execução, ter baixo custo, ser viável em laboratórios e adaptável a condições de campo. Preferencialmente, deve utilizar amostras biológicas não invasivas (Maia; Campino, 2008). Existem três tipos de abordagens no diagnóstico laboratorial que atende aos casos humanos e caninos: métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (Costa *et al.*, 1991; Sundar; Rai, 2002; Brasil, 2006).

O diagnóstico clássico é o parasitológico e depende de demonstração das formas promastigotas dos parasitos em cultura, ou de formas amastigotas de *Leishmania* em esfregaços de aspirados de linfonodo, medula óssea, baço e fígado corados por giemsa ou panótico (Dish *et al.*, 2003; Laurenti, 2009). Esse método é considerado o padrão-ouro, pois é o instrumento mais adequado de diagnóstico devido à sua alta especificidade (100%). Entretanto esses métodos parasitológicos são limitados pela baixa sensibilidade, requerem repetidas amostragens de tecidos e técnicos de laboratório experientes, além de serem muito invasivos, demorados e laboriosos, portanto inapropriados para estudos epidemiológicos e principalmente para subsidiar as ações de controle.

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

O diagnóstico sorológico RIFI (reação de imunofluorescência indireta) tem sensibilidade de 82 a 95% e especificidade de 78 a 92%, mas requer condições de laboratório sofisticadas que inviabilizam sua utilização em campo (Assis *et al.*, 2008). A técnica consiste em aderir antígenos constituídos de promastigotas de *Leishmania* em lâminas de microscopia para fluorescência, onde é processada a reação com o soro a ser testado. Ao final da reação, a ligação antígeno-anticorpo é observada com o auxílio de um conjugado fluorescente. A RIFI, apesar de ser menos sensível que o

teste imunoenzimático ELISA, é o método mais utilizado no Brasil por estar disponível gratuitamente na maioria das regiões endêmicas, por meio do Programa de Controle de Leishmanioses do Ministério da Saúde (PCLV) (Brasil, 2006).

O ELISA é um teste de diagnóstico simples, porém sensível, para a detecção de antígenos do patógeno ou anticorpos específicos produzidos pelo hospedeiro (Engvall; Perlmann, 1971). Esse processo permite analisar grande número de indivíduos com um volume pequeno de amostra. A técnica é altamente sensível, mas a sua especificidade depende do antígeno.

A RIFI e o ELISA são os testes mais usados no Brasil, devido à melhor sensibilidade e especificidade destes em comparação aos demais (Badaró *et al.*, 1983; Guimarães *et al.*, 1990). No entanto, esses métodos nem sempre são satisfatórios, já que muitos animais infectados apresentam testes sorológicos falso-negativos (Zaffaroni *et al.*, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2001).

Outros testes vêm se mostrando promissores para o diagnóstico da LV, como o ELISA, que utiliza o antígeno recombinante K39 (rK39) de *Le. infantum* (Badaró *et al.*, 1996; Kumar *et al.*, 2001), e a imunofluorescência baseada em citometria de fluxo (CF) (Brown; Wittwer, 2000). O desenvolvimento da PCR em tempo real (qPCR) também vem permitindo a quantificação acurada de espécies do complexo *Leishmania* e o monitoramento, em tempo real, do produto amplificado (Verma *et al.*, 2010).

Outro método considerado simples e de baixo custo é o teste de aglutinação direta (DAT). Este teste semi-quantitativo, foi desenvolvido para utilização em campo, que foi muito utilizado em áreas endêmicas da Índia (Sundar *et al.*, 2006). A grande vantagem do DAT é devido a sua realização em laboratório com infraestrutura limitada. Vários estudos têm demonstrado sensibilidade variando entre 93,4 a 98,9% e especificidade entre 85,9 a 96,9% (Chappuis *et al.*, 2006; Sundar *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2009).

Métodos de diagnósticos moleculares utilizando o DNA têm sido explorados visando a superar as inúmeras limitações que os métodos diagnósticos de rotina apresentam. Essa técnica se tornou uma ferramenta útil e muito usada no diagnóstico da LVC. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que vem sendo empregada com frequência no diagnóstico e monitoramento das leishmanioses. É capaz de detectar quantidades mínimas de DNA de *Leishmania* em ampla variedade de amostras clínicas de homem, cães, reservatórios silvestres e vetores. Vários trabalhos têm mostrado que os ensaios moleculares permitem uma

detecção mais rápida e sensível de diversas doenças parasitárias, além da possibilidade de caracterização dos microrganismos envolvidos. A PCR oferece um método confiável e rápido para diagnosticar a infecção por *Leishmania*, com sensibilidade de 70 a 100% e especificidade de 85 a 99% (No *et al.*, 2001). A alta sensibilidade e especificidade, a habilidade de detectar e identificar o protozoário envolvido (mesmo antes do aparecimento de quaisquer sintomas clínicos), o monitoramento da carga parasitária e o fato de poder ser aplicada diretamente em amostras clínicas, produzindo um resultado confiável dentro de poucas horas, são vantagens indiscutíveis da PCR em relação aos métodos de diagnóstico tradicionais (Gurumurthy *et al.*, 2012).

Outra vantagem atribuída à PCR é que ela detecta o material genético do parasito, podendo ser empregada como método confirmatório em caso de animais recém-infectados ou assintomáticos que, na maioria dos casos, não apresentam soroconversão e apresentam baixa carga parasitária (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Alves; Bevilacqua, 2004).

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

Outra importante técnica é a PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism), que é capaz de diferenciar *Le. amazonensis* de *Le. braziliensis* em pacientes infectados (Volpini *et al.*, 2004). Essa mesma técnica também permite diferenciar *Le. amazonensis* e *Le. braziliensis* de *Le. infantum*, que se torna importante em áreas endêmicas de LV e LTA, já que *Le. infantum* e *Le. braziliensis* são simpátricas. É importante dispor de testes de diagnóstico não só para confirmar

a presença do parasita, mas também identificar e distinguir as espécies de *Leishmania* em flebotómíneos naturalmente infectados.

Exclusivo no diagnóstico canino, segundo nota técnica do Ministério da Saúde (MS), Departamento de Vigilâncias das Doenças Transmissíveis de dezembro de 2011, o teste rápido imunocromatográfico *Dual Path Platform* (TR-DPP[®]), patenteado pela Chembio Diagnostics e desenvolvido pelo Instituto Biomanguinhos/Fiocruz, passou a ser o teste de triagem nos inquéritos caninos e o ensaio imunoenzimáticos (ELISA), o teste confirmatório do diagnóstico da LVC (Brasil, 2011). Um estudo de Grimaldi *et al.* (2012), utilizando o teste rápido DPP, demonstrou elevada especificidade (96%) e baixa sensibilidade (47%) na identificação de cães assintomáticos infectados, no entanto a sensibilidade do teste é significativamente maior (98%) para detecção de animais sintomáticos.

Outra possibilidade de diagnóstico de menor custo, porém menos sensível, é a dissecação dos flebotomos e posterior análise do seu tubo intestinal sob microscopia óptica (Myskova *et al.*, 2008). Já a técnica do xenodiagnóstico baseia-se na detecção e isolamento do patógeno usando o próprio vetor natural que é colocado para alimentar-se no hospedeiro. Após o repasto sanguíneo, diferentes métodos podem ser empregados para avaliar a presença da *Leishmania* no flebotómíneo, como a PCR que é altamente específica e sensível, podendo detectar cerca de 10 leishmanias por vetor (Michalsky *et al.*, 2007; Myskova *et al.*, 2008). A técnica de xenodiagnóstico é extremamente útil para avaliar a importância epidemiológica de cães parasitados com *Leishmania*, permitindo estabelecer não só as taxas de alimentação de flebotómíneos, mas também fornecendo dados importantes sobre o potencial destes cães na transmissibilidade da infecção (Molina *et al.*, 1994; Michalsky *et al.*, 2007). Embora seja uma técnica de grande utilidade, sua utilização não é recomendada na rotina, sendo seu uso limitado à pesquisa, uma vez que só pode ser executada em laboratórios especializados, onde uma colônia de flebotómíneos esteja bem estabelecida (da Costa-Val *et al.*, 2007; Maia e Campino, 2008).

1.9 Controle da LV

O PCLV no Brasil, iniciado há mais de 50 anos, tem como objetivo interromper a cadeia de transmissão em diferentes níveis. O Ministério da Saúde tem preconizado o diagnóstico precoce e o tratamento do paciente humano, a identificação e eliminação do reservatório doméstico em áreas de LV, e redução do contato homem-vetor pelo uso de telas, mosquiteiros, repelentes tópicos, borrifação ambiental e manejo ambiental (Brasil, 2006; Boraschi; Nunes, 2007).

O uso de inseticidas residuais de forma continuada (fosforados e piretroides sintéticos) no interior das casas e abrigos de animais, por aspersão espacial ou por aplicação residual, são medidas específicas para a forma adulta da *Lu. longipalpis* (Tesh, 1995; Costa; Vieira, 2001; Lacerda, 1994; Monteiro et al., 1994). Essa medida é considerada eficiente para reduzir a população peridoméstica dos flebotomos e, conseqüentemente, a transmissão parasitária. Contudo, diante da descontinuidade das ações de controle, os programas, em sua maioria, têm obtido efeito temporário e, como consequência, observa-se a reinfestação dos ambientes e o reaparecimento de casos humanos e caninos de LV.

Existem medidas alternativas para controle de flebotomíneos, usados principalmente durante o período de maior densidade vetorial. Em áreas endêmicas, a utilização de coleiras impregnadas com deltametrina ou mesmo o tratamento tópico por meio de banho ou aplicação localizada em cães pode diminuir a taxa de infecção canina, por evitar que o vetor se aproxime do reservatório (Manzillo *et al.*, 2006; Killick-Kendrick *et al.*, 1997; Lucientes, 1999; David *et al.*, 2001; Gavgani *et al.*, 2002). Recomenda-se também a colocação de telas e malhas finas impregnados com inseticida nas residências e canis (Brasil, 2006; Feliciangeli *et al.*, 1995; Perruolo, 1995; Killick-Kendrick *et al.*, 1997).

O manejo ambiental tem sido indicado na limpeza de quintais, terrenos e praças públicas, realização de podas, alterando as condições dos meios que propiciem o estabelecimento de criadouros das formas imaturas do vetor. Medidas simples, como limpeza urbana, eliminação dos resíduos, eliminação de fonte de umidade e a não permanência de animais domésticos dentro das casas contribuirão para evitar ou reduzir a proliferação do vetor (Brasil, 2006).

Com relação aos reservatórios, a medida de controle usada no ciclo urbano ou rural é a realização de inquéritos soroepidemiológicos, identificando os

animais positivos e realizando a eutanásia destes (Leão, 1997). Essa estratégia, apesar de sistematicamente empregada, tem apresentado resultados questionáveis, tornando-a, entre todos os métodos propostos para controle da doença, o mais controverso e o menos aceito pela sociedade (Oliveira *et al.*, 2008). Existem autores que contestam a eliminação canina, devido ao alto custo, ser extremamente laboriosa e de eficácia duvidosa. Isso provavelmente devido à baixa sensibilidade dos testes sorológicos utilizados para a detecção e do atraso na remoção dos cães das áreas endêmicas, e da resistência dos proprietários dos cães na retirada dos animais (Borja-Cabrera *et al.*, 2002).

Entretanto, existem autores que comprovam a redução de casos humanos de LV em locais onde houve eutanásia de cães e as medidas de controle realizadas de forma conjunta e sistemática (Magalhães *et al.*, 1980; Ashford, 1996; Barata *et al.*, 2011). A captura de cães errantes é essencial, especialmente em áreas urbanas, por ser fonte disseminadora de diversas doenças de importância médico-sanitária, entre elas a LV. No caso das doações de cães, é recomendada a realização de exames sorológicos antes da doação desses animais, principalmente em áreas de transmissão da LV.

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

Quanto às atividades de educação em saúde, é importante que seja distribuído à população de áreas endêmicas material informativo sobre a LV e que este contenha mensagem clara e pedagógica. O material educativo deve reduzir significativamente a complexidade da informação sobre a doença, já que é comum ser encontrada em informativos linguagem imprópria e técnica, gerando erros conceituais sobre o assunto (Luz *et al.*, 2005).

A inexistência de tratamento efetivo para a cura total da doença canina e a polêmica sobre a eliminação indiscriminada de cães infectados levaram à tentativa de desenvolvimento de novas estratégias de controle, como o desenvolvimento de

vacinas caninas. Essa descoberta seria a mais eficiente medida de controle para a LV, que poderá ter um impacto na diminuição da prevalência da infecção canina e, conseqüentemente, da humana (Marzochi, 1985; Hommel *et al.*, 1995, Tesh, 1995; Dye, 1996).

O Brasil é o primeiro país no mundo a ter vacinas contra LV canina sendo vendidas. Existem atualmente duas vacinas registradas no Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA): a Leishmune®, registrada em 2003 pela Fort Dodge (Palatnik-de-Sousa, 2012) baseada no antígeno glicoproteico ligante de fucose e manose (FML) de *Le. donovani* com adjuvante saponina (Da Silva *et al.*, 2001; Borja-Cabrera *et al.*, 2002; Parra *et al.*, 2007), e a Leish-Tec®, registrada em 2007 pela Hertape Calier Saúde Animal (Hermont, 2008), que contém o antígeno A2, proteína recombinante do estágio amastigota de várias espécies de *Leishmania*, e como adjuvante a saponina (Coelho *et al.*, 2003; Zanin *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2008). Essas vacinas, somadas à CaniLeish® (Virbac, França), lançada em 2011 na União Europeia (Moreno *et al.*, 2012), são as três únicas vacinas comerciais contra a LV canina em todo o mundo até o momento.

Entretanto, apesar de ambas as vacinas registradas no MAPA cumprirem com os requisitos técnicos exigidos, o Ministério da Saúde não autorizou seu uso em saúde pública, devido à falta de dados convincentes sobre sua efetividade (Brasil, 2009; Brasil, 2007, Brasil, 2005).

Outra limitação para a utilização da vacina Leishmune® é a impossibilidade de distinguir animais infectados de vacinados gerando um problema específico para levantamentos soropidemiológicos e, por consequência, nas campanhas de erradicação da LV, já que os testes sorológicos baseiam-se na detecção do IgG total, tornando esses cães vacinados passíveis de eutanásia, conforme o PCLV de 2003 (Brasil, 2003). Segundo o MS, que determinou, em nota técnica, a proibição do uso da vacina, os ensaios biológicos devem demonstrar a distinção entre infecção natural pela *Le. infantum* e a resposta imune à vacina por testes de rotina; e comprovação inequívoca da sua capacidade de bloquear o ciclo da doença, contudo os estudos publicados até o momento ainda não atenderam tal demanda do MS (Saraiva *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2008). Devido a essa problemática, muitos estudos atualmente estão sendo conduzidos para o desenvolvimento de um teste sorológico específico e discriminatório de subclasses de IgG, que poderia fornecer informações sobre a imunopatogênese natural do hospedeiro humano e canino (Oliveira *et al.*, 2009).

Em um estudo realizado em 2014, entre os cães imunizados com as vacinas Leishmune® ou Leish-Tec® não houve diferença significativa observada nos cães vacinados, com relação a taxas de soroconversão, sinais clínicos, parasitismo e transmissão do parasita para o vetor por xenodiagnóstico. Entretanto os animais vacinados com Leishmune® apresentaram maiores níveis de IgG, IgG1, IgG2 e os animais vacinados com Leish-Tec® apresentaram maior reações adversas com maior frequência de gravidade. (Fernandes *et al.*, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

As leishmanioses, nos últimos anos, são consideradas prioritárias entre as doenças tropicais e vêm aumentando sua importância no contexto da saúde pública em vários países, devido à expansão de sua área de abrangência com o processo de urbanização, invadindo áreas indenes da doença, e reemergência em focos endêmicos antigos, aumentando o número de casos humanos e caninos da doença.

O primeiro caso autóctone de LV em Sabará ocorreu em 1959 (Moreno *et al.*, 2002). No ano de 1989, foi notificado o óbito de uma criança de 2 anos acometida de LV, residente no bairro Alvorada. Estudos mostraram que, nesses locais, havia a presença do vetor e cães positivos nas residências, e em áreas adjacente à residência da criança doente, reforçando a hipótese da ocorrência de transmissão de leishmaniose no local (Genaro *et al.*, 1990).

Segundo o Ministério da saúde, o esquema de classificação de áreas para transmissão de LV deve ocorrer com média casos dos últimos três anos da seguinte forma: média casos $< 2,4$ considerada área de esporádica transmissão, médias casos $\geq 2,4$ e $< 4,4$ são consideradas áreas de moderada transmissão e áreas com média casos $\geq 4,4$ considerada áreas de intensa transmissão. O município de Sabará foi caracterizado pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), do Ministério da Saúde, como área de intensa transmissão de LV, devido à presença elevada do vetor, à alta taxa de prevalência canina e à ocorrência de casos humanos, traduzindo-se em um grave problema de saúde pública.

Desde 2003, houve um aumento significativo do número de casos humanos notificados de LV no município de Sabará, sendo 10 em 2003; 7 em 2004; 18 em 2005; 9 em 2006; 10 em 2007; 18 em 2008; 8 em 2009; 4 em 2010; 7 em 2011; e 5 em 2012. Em relação à prevalência canina no município de Sabará, no ano de 2009, os inquéritos sorológicos caninos passaram a ser censitários, com taxa média de soroprevalência de 4,37%.

O número crescente de notificações de casos de LV humana e canina impulsiona a traçar o perfil de LV do município de Sabará de forma conjunta, analisando os vários aspectos relacionados à epidemiologia da LV (infecção canina associada à densidade vetorial e à notificação de casos humanos), apontando as principais áreas de risco, visando a direcionar, de uma forma mais precisa, as ações de controle da LV.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Estudar os aspectos ecoepidemiológicos envolvidos na transmissão da LV no município de Sabará.

3.2 Específicos

a) Estudo de flebotomíneos

- Determinar a fauna de flebotomíneos das áreas selecionadas.
- Estabelecer a flutuação mensal das espécies de flebotomíneos e correlacioná-la com algumas variáveis climáticas (Precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar e temperatura).
- Verificar a preferência alimentar de espécies de flebotomíneos.
- Estudar a infecção natural por *Leishmania* dos espécimes vetores através de métodos moleculares.

b) Estudo da leishmaniose visceral em cães

- Determinar a soroprevalência anual da LVC nas áreas selecionadas.
- Necropsiar e coletar amostras biológicas de baço, linfonodo mesentérico, medula óssea e pele dos cães soropositivos.
- Detectar a infecção e identificar a espécie de *Leishmania* nas diferentes amostras dos cães soropositivos.

c) Epidemiologia descritiva

- Georrefenciar os casos humanos, caninos e os pontos entomológicos com presença de *Lu. longipalpis*.

4 METODOLOGIA

4.1 Área de estudo

O município de Sabará está localizado na região metropolitana de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais. Limita-se ao norte com Taquaraçu de Minas, a leste com o município de Caeté, ao sul com Raposos e Nova Lima, e a oeste com os municípios de Santa Luzia e Belo Horizonte (FIG. 2 e 3).

Sabará tem área de 302 km², correspondendo a 5,1% da região metropolitana de BH. Com 707 m² de altitude, tem sua posição determinada pelas coordenadas geográficas de 19°53'06" de latitude sul e 43°48'01" de longitude oeste. Sua população estimada é de 132 636 habitantes (IBGE, 2013).

O relevo caracteriza-se por uma paisagem montanhosa, com fortes rupturas de declive e vales encaixados. Predominam os itabiritos, calcários dolomíticos e filitos pertencentes à Série Minas, em contato com as rochas gnáissicas da região de Belo Horizonte. O município está localizado na bacia do Rio das Velhas e desenvolve-se ao longo do Ribeirão Sabará e do próprio Rio das Velhas. O clima é tropical de altitude com verões quentes, chuvas predominando nos meses de outubro a abril, com totais pluviométricos variando em torno de 1 500 mm anuais (Sabará-Net, 2014)

A temperatura média anual é de cerca de 21° C. A média das máximas fica em torno de 27° C e a das mínimas, de 16° C. A média da umidade relativa do ar é de 72,2%. A vegetação predominante é o cerrado. A presença do coqueiro macaúba comprova a existência de uma vegetação primitiva do tipo mata tropical. A área de preservação da natureza é o Parque Chácara do Lessa, ponto ecológico de Sabará (Sabará-Net, 2014).



FIGURA 2 - Localização geográfica de Sabará.

Fonte: Wikipédia



FIGURA 3 - Vista parcial do município de Sabará.

Fonte: Pedro Resende

4.2 Escolha dos bairros para o estudo

Todos os bairros do município de Sabará possuem características físicas parecidas, sendo todos bairros urbanizados. Entretanto, para nosso estudo, escolhemos os bairros apontados pelo Centro de Controle de Zoonose (CCZ) com maior problemática para LV, apresentando casos recentes da doença.

Para o levantamento entomológico, foram escolhidos oito bairros do município de Sabará (Alvorada, Novo Alvorada, Alvorada Velho, Bom Retiro, Nova Vista, Casa Branca, Rio Negro e Ana Lúcia), áreas consideradas críticas em relação à transmissão de LV no município. A escolha dos bairros baseou-se na ocorrência de casos caninos e também na ocorrência de casos humanos da doença (FIG 6). As residências foram escolhidas e georreferenciadas de acordo com os seguintes critérios: acúmulo de matéria orgânica, presença de árvores frutíferas, vegetação favorecendo áreas sombreadas e presença de animais domésticos (FIG. 4).



FIGURA 4 - Exemplos de residências onde foram realizadas as capturas entomológicas no município de Sabará.

Fonte: Érika Michalsky Monteiro

4.3 Levantamento entomológico

As capturas entomológicas foram realizadas utilizando-se armadilhas luminosas do tipo HP (Pugedo *et al.*, 2005), sendo uma instalada no intradomicílio e outra no seu respectivo peridomicílio, de maneira sistemática e de forma pareada, para fornecer subsídios para os estudos de endofilia e exofilia. As armadilhas foram colocadas em locais sombreados, próximos a galinheiros e a outros locais com presença de animais domésticos. Estas foram expostas a partir das 18 horas e recolhidas às 8 horas da manhã seguinte, durante três noites consecutivas de cada mês, realizadas sistematicamente durante 24 meses nas áreas selecionadas,

correspondendo a 1152 coletas no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012. O material entomológico capturado foi distribuído da seguinte forma: nos 1º, 2º e 3º dias de coleta, todos os machos foram acondicionados em tubos de hemólise contendo álcool 70% visando à identificação taxonômica. As fêmeas ingurgitadas coletadas nas três noites foram destinadas para identificação de repasto sanguíneo, e foram sacrificadas por congelamento, paralisando sua digestão. As fêmeas não ingurgitadas do 3º dia foram encaminhadas vivas ao Laboratório de Leishmanioses, para serem dissecadas, identificadas e examinadas, e, posteriormente, submetidas a análises de biologia molecular. Essas foram acondicionadas em tubos de criopreservação contendo DMSO 6% que preserva as células evitando seu rompimento e posteriormente congeladas a -20º C para futuramente realizar análise molecular (Nested PCR). As fêmeas não ingurgitadas do 1º e, 2º dias de coleta, foram acondicionadas em tubos de hemólise contendo álcool 70% visando a identificação taxonômica (FIG 5).

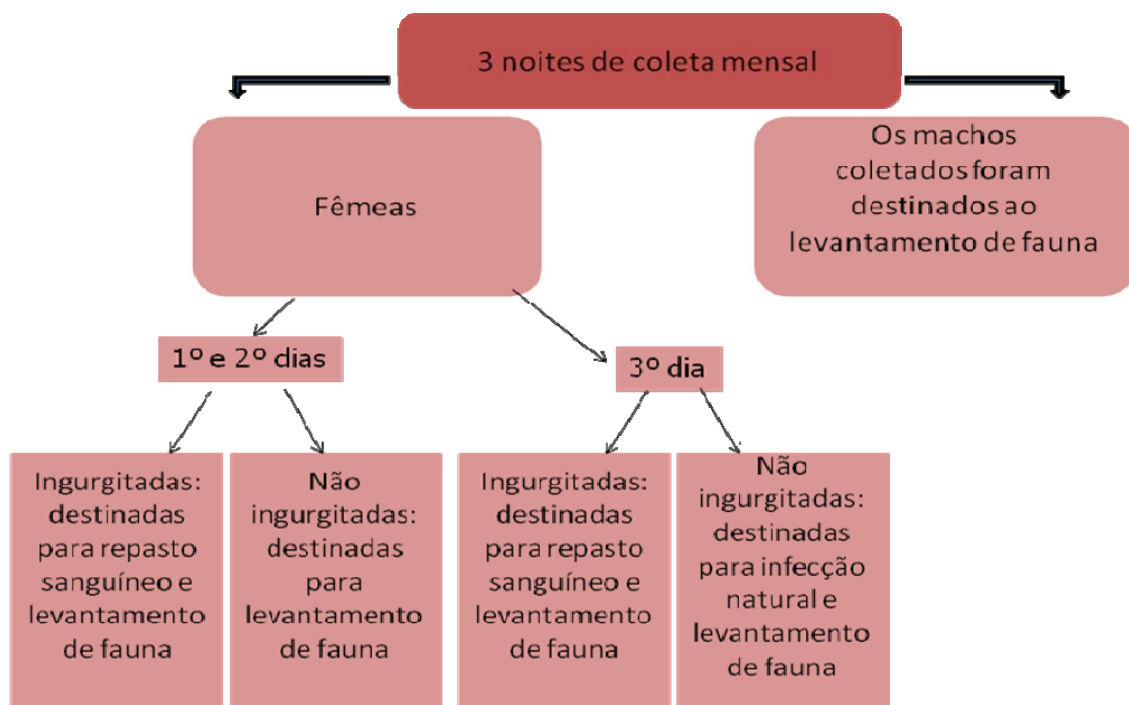


FIGURA 5 - Esquema de direcionamento dos espécimes capturados do estudo entomológico no município de Sabará, no período de Janeiro de 2011 a Dezembro de 2012.

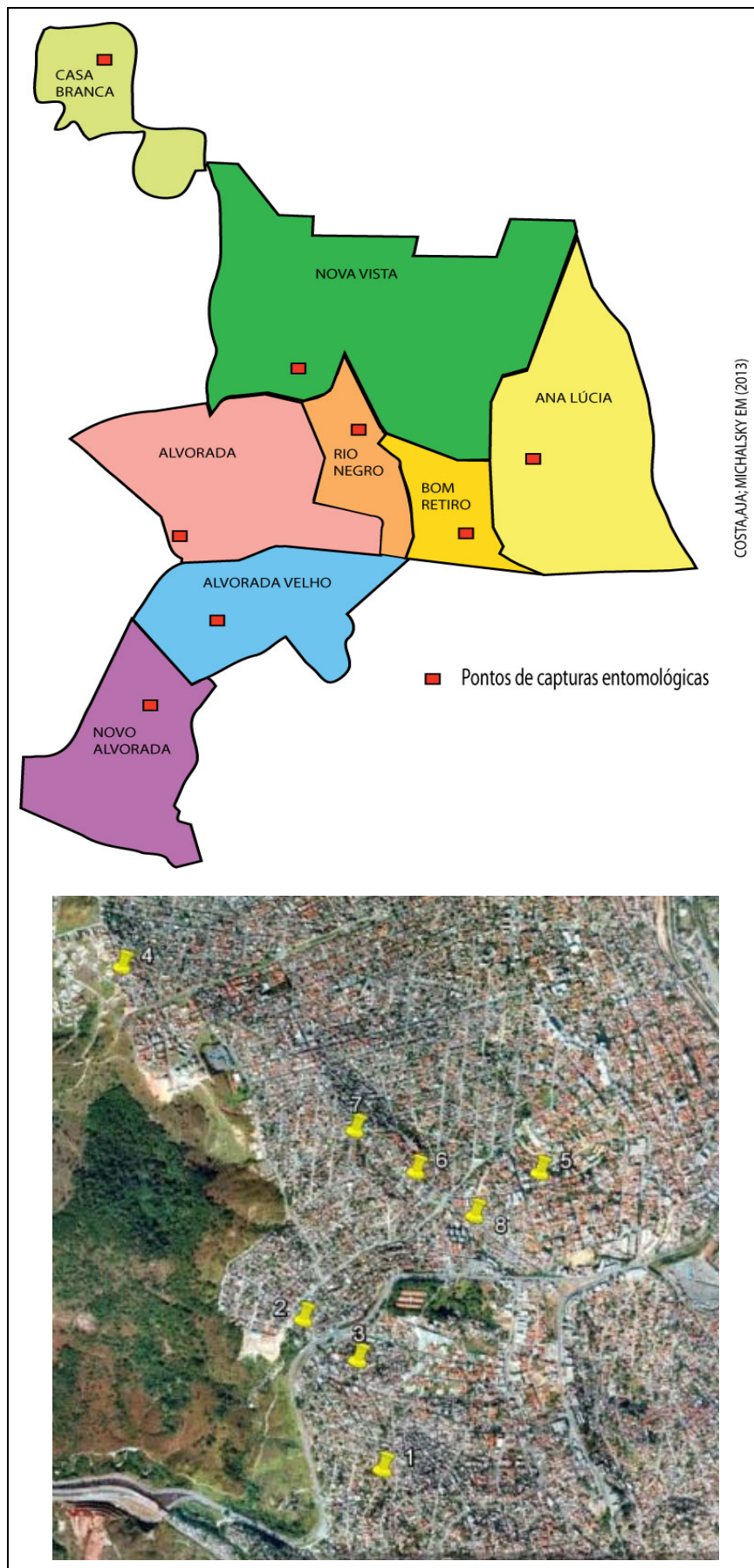


FIGURA 6 - Pontos de capturas entomológicas no município de Sabará, no período de Janeiro de 2011 a Dezembro de 2012.

Fonte: Google maps

4.3.1 Montagem e identificação das espécies de flebotomíneos capturadas

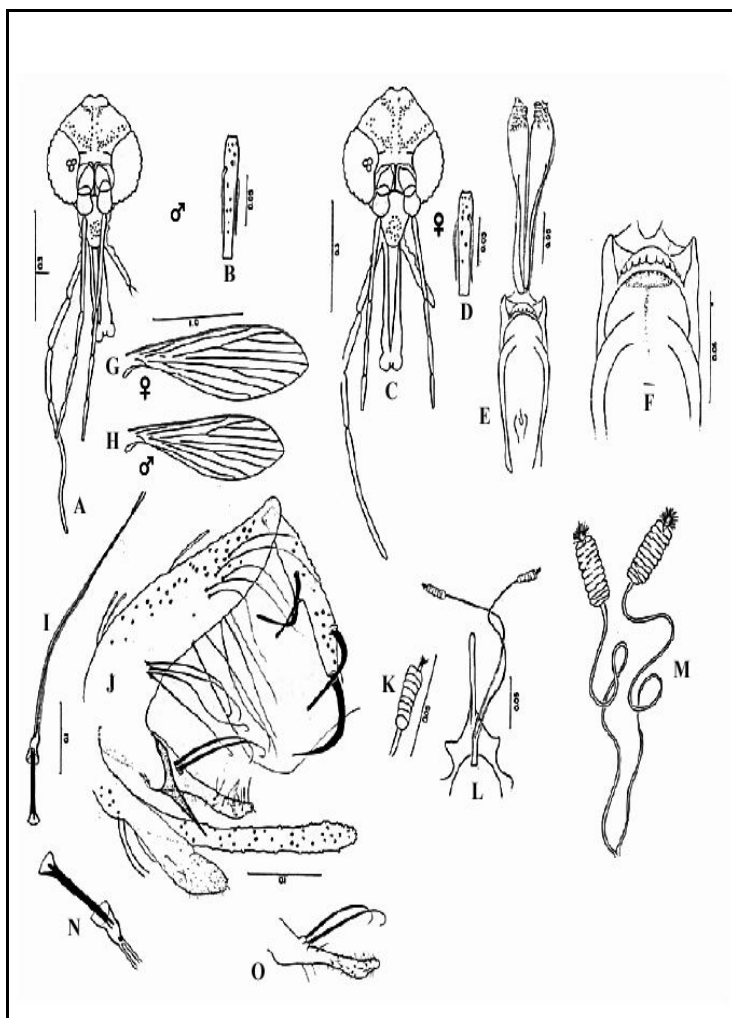
Os espécimes capturados foram sacrificados por congelamento e triados. Durante a clarificação os insetos são colocados em pequenas placas de Petri, numa solução de hidróxido de potassa (KOHl a 10%, onde permanecem entre 2-3 horas, para que haja o amolecimento da quitina; após esse período são transferidos para outras placas de Petri com ácido acético, por um período de 15-20 minutos, para retirar o excesso de hidróxido de potassa; a seguir, lava-se em água destilada por 15 minutos por 3 vezes; os insetos permanecem em lactofenol por 24 hora, para diafanizar; em seguida são montados entre lâmina e lamínula, em líquido de Berlese, procedimento baseado na metodologia preconizada por Langeron (1949), com modificações (Tabela 1).

Para a identificação, os insetos foram montados em Berlese, um meio aquoso de baixa refração, que possibilita passagem de luz com maior intensidade, facilitando a observação das estruturas internas, necessárias para a identificação taxonômica de machos e fêmeas. Todo material foi analisado no Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz.

Flebotomíneos	
Potassa 10%	3 h
Ácido acético 10%	20 min
Água destilada	15 min
Água destilada	15 min
Água destilada	15 min
Lactofenol	24 h

Quadro 1: Protocolo de preparação de flebotomíneos para montagem, segundo normas preconizadas pelo Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou (Langeron, 1949).

A identificação a nível específico foi realizada de acordo com Young e Duncan (1994), por meio do uso de descrições específicas, chaves taxonômicas e comparações com exemplares da coleção-referência do Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou (FIG. 7). O material que não permitiu identificar à nível específico, devido a não integridade de alguns exemplares, serão identificados apenas a nível de gênero.



Legenda

- A - Cabeça do macho
- B - Flagelômero II do macho
- C - Cabeça da fêmea
- D - Flagelômero II da fêmea
- E - Cibário e faringe da fêmea
- F - Cibário da fêmea
- G - Asa da fêmea
- H - Asa do macho
- I - Bomba e filamentos genitais
- J - Terminália do macho
- K- Corpo da espermateca
- L- Forquilha e espermateca
- M- Espermatecas
- N- Bomba genital
- O- Parâmero do macho

FIGURA 7 - Principais estruturas de identificação dos exemplares de flebotomíneos machos e fêmeas
 Fonte: Young; Duncan (1994)

4.3.2 Preparação das fêmeas capturadas para identificação taxonômica, detecção de infecção natural e repasto sanguíneo

A dissecação das fêmeas capturadas consistiu na retirada dos três últimos segmentos abdominais e cabeça; esses segmentos foram montados entre lâmina e lamínula utilizando-se líquido de berlese, e identificados ao nível específico. Para análise de infecção natural, foi realizada a Nested com o restante que sobrou do corpo da fêmea, que foram acondicionados em tubos tipo *ependorf*, formando *pools* de até dez espécimes; para análise do repasto sanguíneo, em que foi utilizada a técnica de citocromo b, as fêmeas foram acondicionadas individualmente em tubos tipo *ependorf*, ambos devidamente rotulados de acordo com o bairro, casa e espécie, e armazenados a -20° C para análises moleculares posteriores.

4.4 Extração de DNA das fêmeas capturadas para detecção de infecção natural e determinação da fonte alimentar

As fêmeas foram dissecadas para a confirmação da espécie e, para detecção de infecção natural, foram agrupadas em *pool* de até dez indivíduos em microtubos de fundo cônico, para extração de DNA, verificando posteriormente a infecção por *Leishmania*. A extração foi realizada através do *kit* de extração de tecidos e células da GE Amersham Biosciences e armazenados a -20° C para posterior utilização. Para determinação da fonte alimentar, as fêmeas acondicionadas individualmente em microtubos de fundo cônico foram extraídas através do *kit* Puragene® Core KitA da Qiagen, conforme especificações do fabricante e armazenados a -20° C até a sua utilização.

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

A amplificação de um gene constitutivo do DNA de flebotomíneos (cacofonia) teve como objetivo confirmar a presença do DNA de *Lutzomyia* spp., validando, assim, o processo de extração. Foi utilizado um par de iniciadores que amplificam a região IVS6 do gene constitutivo específico (cacofonia) de flebotomíneos neotropicais do gênero *Lutzomyia*.

A técnica foi realizada utilizando-se os seguintes iniciadores: 5' GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3' e 5' CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC 3' (Lins *et al.*, 2002). A amplificação do gene constitutivo foi realizada em equipamento termociclador automático (Perkin-Elmer - GeneAmpPCRSystem 2400). A mistura para a reação foi feita utilizando um *kit* para PCR (PureTaq Ready-To-Go PCR Beads/GE Healthcare) que contém aproximadamente 2,5 unidades de PureTaq™ DNA Polymerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 mM dATP, dCTP, dGTP e dTTP e estabilizadores, incluindo BSA. A cada *bead*, foram adicionados 1 µl de cada iniciador (20 pmol) e 21 µl de água MilliQ. Preparados os tubos, foram adicionados 2 µl de DNA (cerca de 10 ng/mL). O programa de amplificação utilizado foi: 94° C por 12 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação, 94° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos, 72° C por 30

segundos e uma extensão final de 72° C por 10 minutos e resfriamento a 4° C. Em cada conjunto de reação de PCR, foram incluídos um controle negativo e um positivo. Como controle negativo da reação, foi utilizado um tubo com todos os reagentes, exceto o DNA, e, no controle positivo, adicionado DNA purificado de flebotomíneo do gênero *Lutzomyia*.

4.4.2 Identificação da fonte alimentar de flebotomíneos

Os flebotomíneos capturados foram transportados vivos até o laboratório, onde as fêmeas ingurgitadas foram sacrificadas por congelamento e analisadas individualmente.

A reação de PCR do gene do citocromo B foi preparada com a utilização dos iniciadores cytb1: 5'- CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA -3' e cytb2: 5'- CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA -3' para um volume final de 25 µl. A mistura para a reação foi feita utilizando um *kit* para PCR (PureTaq Ready-To-Go PCR Beads/GE Healthcare) que contém aproximadamente 2,5 unidades de PureTaq™ DNA Polymerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 mM dATP, dCTP, dGTP e dTTP e estabilizadores, incluindo BSA. A cada *bead*, foram adicionados 1 µl de cada iniciador (20 pmol) e 21 µl de água MilliQ. Preparados os tubos, foram adicionados 2 µl de DNA (cerca de 10 ng/mL). A amplificação foi processada em aparelho termociclador automático utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94° C por cinco minutos, seguido de 35 repetições de desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 55° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos, extensão final a 72° C por cinco minutos e resfriamento a 4° C.

4.4.3 Detecção da infecção natural de *Lu. longipalpis* por *Leishmania* spp.

Para determinar a taxa de infecção natural, as amostras de DNA foram extraídas dos *pools* das fêmeas coletadas. Estas foram agrupadas em *pools* de até dez exemplares e analisadas por meio da técnica Nested PCR (LnPCR) dirigida ao gene SSUrRNA de *Leishmania*, que amplifica um fragmento desse gene, que é uma

região conservada entre todas as espécies de *Leishmania* (Van Eys *et al.*,1992; Cruz *et al.*, 2002, 2006).

Para a amplificação das amostras, foi realizada uma amplificação inicial de um fragmento de aproximadamente 603 pb, utilizando-se dos iniciadores R1: 5' GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG 3' e R2: 5' GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG 3', seguida da amplificação de um fragmento de aproximadamente 353 pb, a partir do produto amplificado da primeira reação, utilizando-se dos iniciadores R3: 5' TCC CAT CGC AAC CTC GGT T 3' e R4: 5' AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3', como demonstrado na FIG. 8.

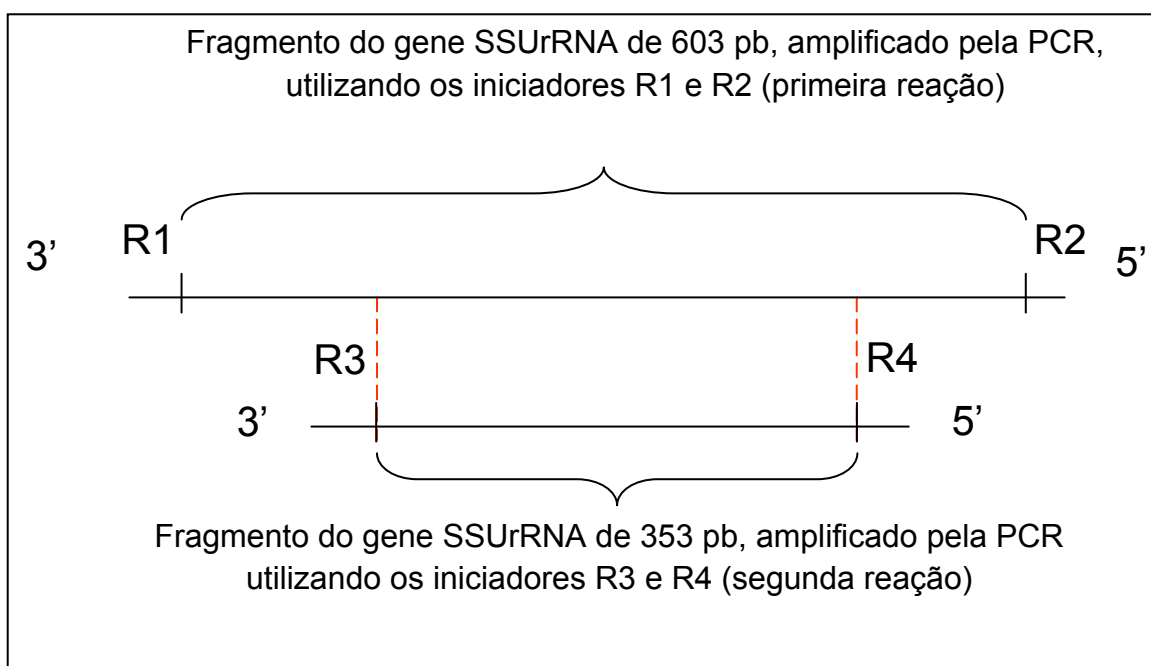


FIGURA 8 - Desenho esquemático do resultado da Ln-PCR destinada a amplificar um fragmento do gene SSUrRNA de *Leishmania*
Fonte: Eduardo de Castro Ferreira

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

A amplificação foi processada em aparelho termociclador automático, utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94° C por cinco minutos, seguido de 35 repetições de desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 60° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos, para a primeira reação e desnaturação inicial a 94° C por cinco minutos, seguido de 30 repetições de desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 65° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos. A extensão final foi a 72° C por cinco minutos para ambas as reações e resfriamento a 4° C.

Em todas as reações foi utilizado controle positivo com 20 ng de DNA extraído de cultura de *Le. infantum*, e como controle negativo foi utilizada H₂O destilada estéril como *template*.

4.4.4 Análise dos produtos amplificados pela PCR

Os produtos amplificados pelas PCRs utilizando iniciadores que amplificam fragmentos do gene constitutivo de flebotomíneos (cacofonia) e do gene do SSUrRNA foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 2% corados com brometo de etídio e examinados em exposição à luz ultravioleta (UV).

4.4.5 Cálculo da taxa mínima de infecção natural

Por estarem acondicionados em *pools*, a taxa mínima de infecção natural (TMI) para a espécie de flebotomíneo foi calculada pela seguinte fórmula:

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

4.4.6 Sequenciamento SSURrNA para determinação da espécie de *Leishmania* e determinação da fonte alimentar

Para a identificação das espécies de *Leishmania* e da fonte alimentar utilizada pelos flebotomíneos, foi realizado o sequenciamento do produto amplificado pela segunda reação da LnPCR (fragmento esperado de aproximadamente 353 pb) e pela PCR do citocromo B.

Todas as bandas de 353 pb e 358 pb com intensidade considerável foram cortadas e purificadas utilizando o *kit* comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante. O produto amplificado e purificado, eluído em 20 µl de H₂O destilada e estéril, foi utilizado como *template* para uma amplificação anterior ao processo de sequenciamento.

A reação de PCR para o sequenciamento foi preparada para um volume final de 10 µl, formada por 1 µl do Premix (BigDye® Terminator v3.1 Cycle), 1 µl de tampão do BigDye, 1 µl dos iniciadores (R3 e R4 para *Leishmania*) e (Cyt1 e Cyt2 para repasto sanguíneo), na concentração de 3,2 pmol e cerca de 1 µl do produto de PCR e 5 µl de H₂O. Esse *mix* foi colocado em um termociclador com o seguinte programa: 94° C por três minutos, seguido de 30 ciclos de 96° C por um segundo, 65° C por cinco segundos (essa temperatura depende da temperatura de anelamento do iniciador utilizado) e 60° C por quatro minutos. O sequenciamento propriamente dito foi posteriormente realizado em sequenciador automatizado ABI 3730 (Life Technologies) e um kit adequado (v3.1 Cycle BigDye® Terminator) em ambas as direções (Forward e Reverse).

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

As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências depositadas no GenBank : *Le. Braziliensis* (M80292.1), *Le. Amazonensis* (M80293.1) e *Le. Infantum* (M81430.1); fornecendo as informações necessárias para a identificação da espécie de *Leishmania* circulante nos vetores e reservatórios domésticos e da espécie de animal onde foi realizado o repasto sanguíneo.

4.5 Influencia dos fatores climáticos na densidade populacional dos flebotomíneos

Para avaliar a influência das variáveis climáticas (precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar e temperatura) em relação ao número de flebotomíneos capturados, foram utilizados os dados climatológicos obtidos no Instituto Nacional de Meteorologia – 5º Distrito Belo Horizonte e a densidade de flebotomíneos capturados durante o período de estudo. Esses dados obtidos foram analisados estatisticamente.

4.6 Inquérito Canino

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

Foi realizado inquérito censitário sorológico na população canina da área de estudo do município de Sabará, visando determinar a incidência anual de LVC nas áreas selecionadas nos anos de 2011 e 2012. Neste trabalho, foram avaliados os cães domiciliados na área de estudo, para que fosse calculada a taxa média de positividade canina anual do município.

Posteriormente, foram coletadas amostras de sangue por punção na veia marginal auricular e transferidas, por capilaridade, para lâminas de papel de filtro (FIG. 9). As lâminas foram separadas por papel celofane, para evitar a contaminação das amostras, e devidamente identificadas com o nome do animal, código da amostra e data de coleta. No momento da coleta, foram utilizados os formulários de rotina do PCLV do município: boletim diário de inquérito canino com identificação das amostras, responsável pela coleta, nome e endereço dos proprietários e nome do cão; protocolo de coleta de sangue para LV contendo código da amostra, dados do proprietário e dados do cão. Após a coleta o material, este foi enviado para o Laboratório de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Sabará, onde foram realizados os métodos diagnósticos de reação de imunofluorescência indireta RIFI (Camargo; Rebonato 1969) e ELISA (Voller *et al.*, 1979), em eluatos de sangue dessecado em papel filtro, segundo normas técnicas editadas no Manual de Controle da LV pela Secretaria de Vigilância em Saúde

(SVS/MS) (Brasil, 2003). A diluição discriminante do eluato foi de 1:40 padronizada no laboratório. Eluatos que se apresentaram reativos nessa diluição foram considerados positivos após repetição e confirmação do resultado. A retirada dos cães infectados e a eutanásia foram realizadas pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Sabará. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/Fiocruz), sob a licença nº LW-11/10 (protocolo nº P-28/10-3) (anexo 1). Todos os procedimentos utilizados seguiram as normas técnicas estabelecidas pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002). Os proprietários dos cães assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido a respeito da coleta de amostras para biópsia.



FIGURA 9 - Punção da veia marginal auricular do cão
Fonte: Érika Michalsky

4.6.1 Eutanásia e necropsia dos cães soropositivos

Após realização do inquérito canino, todos os cães considerados soropositivos para LV (assintomáticos e sintomáticos) foram eutanasiados e necropsiados de acordo com o protocolo descrito a seguir.

Primeiramente, foi realizada uma inspeção ectoscópica, objetivando preencher um boletim epidemiológico no qual os cães foram caracterizados quanto aos sinais clínicos sugestivos de LVC e definido o *status* clínico (assintomático e sintomático) de cada animal.

Em seguida, o cão foi anestesiado com Thionembutal (30 mg/mL) por via endovenosa e primeiramente realizada a punção de medula óssea utilizando-se

agulha de Salah (FIG. 10). Para a punção, foi feita a assepsia do local com álcool 70% e, em seguida, introduzida agulha na região da articulação fêmur-tíbio-patelar, perfurando a crista da tíbia, possibilitando amostra de aspirado da medula óssea. Posteriormente, o cão foi eutanasiado utilizando-se solução saturada de cloreto de potássio, via endovenosa, na proporção de 0,5 mL/kg de peso do animal. Com o animal em decúbito dorsal, a pele da região abdominal ventral foi rebatida e feita incisão pré-retroumbilical abrindo a cavidade abdominal (FIG. 11). Com a região abdominal rebatida, foram recolhidos, com auxílio de tesoura e pinça, fragmentos de baço, linfonodo mesentérico e pele da região distal da orelha (FIG. 12), necessários para realização de estudos moleculares.



FIGURA 10 - Punção de medula óssea (crista tibial)
Fonte: Érika Michalsky



FIGURA 11 - Incisão pré-retroumbilical
Fonte: Érika Michalsky



FIGURA 12 - Fragmentos de pele e baço
Fonte: Érika Michalsky

4.6.2 Isolamento de parasitos

A manutenção dos parasitos foi feita em meio de cultura NNN (Nicolle, 1908) enriquecido com meio LIT (Liver infusion tryptose ou Schneider). Parte da amostra de medula óssea coletada foi semeada a tubos contendo meio de cultura NNN (Novy; Mc Nel, 1903; Nicolle, 1908) enriquecidos com LIT e mantidos a $25^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ em estufa BOD (FIG. 13). O exame da cultura foi realizado semanalmente e considerado positivo quando foi observada a presença de formas promastigotas de *Leishmania*. Quando não ocorreu o aparecimento de formas flageladas depois de seis semanas, a cultura foi considerada negativa. As amostras isoladas foram criopreservadas e depositadas no banco de cepas do Laboratório de Leishmanioses do CPqRR.



FIGURA 13 - Semeadura de medula óssea em meio de cultura NNN/LIT
Fonte: Érika Michalsky

4.6.3 Pesquisa direta de parasitos

Dos fragmentos de tecido retirados de cada cão, como baço, linfonodo mesentérico, pele da região distal da orelha e medula, foram realizados exames direto por aposição (*imprint*) e esfregaço, para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania*, sendo as amostras coradas em giemsa (FIG. 14).



FIGURA 14 - *Imprint* em lâmina para diagnóstico parasitológico
Fonte: Érika Michalsky

4.6.4 Extração de DNA de medula óssea e tecidos

Os fragmentos de pele, linfonodo mesentérico e baço foram processados para pesquisa de *Leishmania* pelo *kit* de isolamento de DNA de células e tecidos Genomic Prep™ (GE Healthcare). Para extração de DNA de medula óssea e sangue, foi utilizado

o *kit* de cromatografia em coluna - GFX™ Genomic Blood DNA Purification (GE Healthcare). Esses procedimentos foram realizados conforme especificações dos fabricantes.

4.6.5 Reação em cadeia da polimerase

A pesquisa de DNA do parasito e a determinação da espécie de *Leishmania* foram realizadas nas amostras de tecidos (baço, linfonodo mesentérico e pele) e medula óssea, utilizando a técnica de Ln-PCR destinada a amplificar um fragmento do gene SSUrRNA de *Leishmania* (Van Eys *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 2002, 2006) e, posteriormente, sequenciamento, como descrito para flebotomíneos.

4.7 Análises estatísticas

4.7.1 Testes realizados no estudo entomológico

- Para verificar se existe correlação estatística significativa entre as variáveis climáticas precipitação, temperatura e umidade relativa do ar utilizamos o teste de regressão linear múltipla e testes de Pearson.

4.7.2 Testes realizados no estudo canino

- Para verificar se existe diferença estatística entre os grupos de cães sintomáticos e assintomáticos, avaliados pelos testes (Parasitológico direto, PCR e Mielocultura) utilizamos o teste de Fisher.
- Para verificar se existe diferença estatística entre os tecidos analisados (pele, medula, linfonodo e baço), utilizamos o teste qui-quadrado pareado com McNemar.
- Para verificar se existe diferença estatística entre cães sintomáticos e assintomáticos a partir da melhor técnica de diagnóstico utilizamos o teste qui-quadrado pareado com MC Nemar.
- Para verificar se existe diferença estatística ente os resultados cumulativos dos testes (Parasitológico direto, PCR e Mielocultura), utilizamos o teste qui-quadrado Pearson ou Fisher

4.8 Distribuição espacial dos casos humanos, caninos e pontos de coleta entomológica

Em cada bairro, foi escolhida uma residência para capturas entomológicas, e esses pontos foram georeferenciados por meio de GPS. Para detectar conglomerados de casos humanos e caninos de LV no espaço, foram utilizadas como unidades de análise as coordenadas x, y do ponto de captura, do caso humano e dos casos caninos, obtida pelo GPS marca Etrex, utilizando a projeção “Sistema Universal Transverso de Mercator” (UTM). Os casos foram alocados em seus respectivos setores censitários de domicílio e foram realizadas análises agregadas para identificação das áreas de risco, por meio da confecção de mapa.

5 RESULTADOS

5.1 Levantamento da fauna flebotomínica

A fauna de flebotomíneos da área estudada no município de Sabará foi constituída de quatro espécies, sendo elas: *Lutzomyia intermedia* (Lutz; Neiva, 1912), *Lutzomyia longipalpis* (Lutz; Neiva, 1912), *Lutzomyia cortelezzii* (Brethes, 1924), *Lutzomyia whitmani* (Antunes; Coutinho, 1939). Foram capturados 519 exemplares no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012, sendo 450 machos (87%) e 69 fêmeas (13%) (TAB. 1). Foram classificados apenas a nível de gênero *Lutzomyia* spp. aqueles exemplares que faltavam estruturas corporais necessárias para a identificação a nível específico.

TABELA 1 - Flebotomíneos capturados no município de Sabará, utilizando armadilha luminosa HP, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012.

Espécies	Machos	Fêmeas	Total	%
<i>Lu. cortelezzii</i>	8	4	12	2,30
<i>Lu. intermedia</i>	--	1	1	0,20
<i>Lu. longipalpis</i>	432	60	492	95,00
<i>Lu. whitmani</i>	7	1	8	1,50
<i>Lutzomyia</i> spp.	3	3	6	1,00
Total (%)	450 (87%)	69 (13%)	519	100

Os resultados desta pesquisa irão se concentrar na espécie *Lu. longipalpis* devido ao fato desta ser a maior responsável pela transmissão de LV no Brasil e não ter sido encontrada *Lu. cruzi* na fauna de Sabará; também devido ao interesse específico na epidemiologia de LV.

A espécie mais abundante foi a *Lu. longipalpis*, com 492 exemplares, totalizando 95% dos exemplares capturados (FIG. 15); destes 432 (87%) eram machos, e 60 (13%) eram fêmeas (TAB. 1).

A relação de *Lu. longipalpis* capturados mensalmente de acordo com os bairros está representada na TAB. 2. Pode-se observar na TAB. 3 que *Lu. longipalpis* foi encontrada em todos os bairros estudados e que o bairro Alvorada apresentou o maior índice dessa espécie (62%). Quanto ao comportamento de *Lu. longipalpis*, 115 (23%) foram capturados no intradomicílio e 377 (77%) no peridomicílio (FIG. 16).

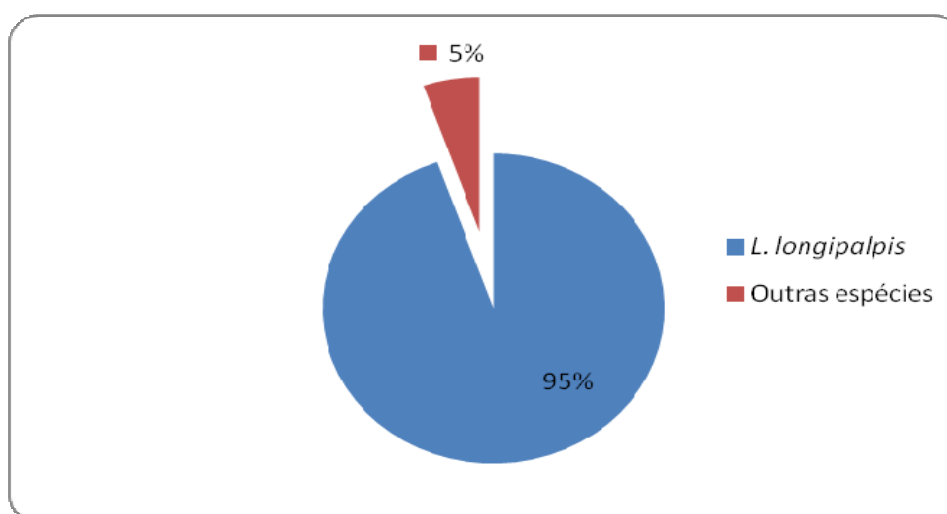


FIGURA 15 - Porcentagem de *Lu. longipalpis* em relação às demais espécies capturadas no município de Sabará, utilizando armadilha luminosa HP, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012.

TABELA 2 - Número mensal espécimes de *Lu. longipalpis* capturados nos bairros do município de Sabará, utilizando armadilhas luminosas HP, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012.

Ano	Mês	Alvorada	Novo Alvorada	Ana Lúcia	Nova Vista	Bom Retiro	Casa Branca	Rio Negro	Alvorada Velho	Total
2011	Jan	10	3	5	3	4	17	16	--	58
	Fev	69	1	25	2	7	1	4	1	110
	Mar	4	--	7	2	1	1	1	--	16
	Abr	166	9	3	3	1	--	1	3	186
	Mai	5	2	--	2	1	--	--	--	10
	Jun	9	--	--	--	--	--	--	--	9
	Jul	6	--	--	--	--	--	--	7	13
	Ago	24	1	3	--	--	--	--	--	28
	Set	--	1	--	--	--	--	--	--	1
	Out	--	--	--	--	--	--	--	--	0
	Nov	--	--	--	--	--	--	--	--	0
	Dez	4	--	--	--	--	--	--	--	4
2012	Jan	1	1	1	--	--	1	--	--	4
	Fev	--	5	--	--	--	--	--	--	5
	Mar	--	--	2	1	1	--	1	--	5
	Abr	1	3	--	3	--	--	1	--	8
	Mai	--	--	1	--	--	--	--	--	1
	Jun	--	--	11	--	1	--	--	--	12
	Jul	--	--	--	--	--	1	--	--	1
	Ago	--	--	--	--	--	--	--	--	0
	Set	6	--	2	--	--	--	--	--	8
	Out	--	1	--	1	--	--	--	--	2
	Nov	1	--	3	--	--	--	1	--	5
	Dez	--	2	2	--	1	1	--	--	6
		306	29	65	17	17	22	25	11	492

TABELA 3 - Número de espécimens de *Lu. longipalpis* capturados nos bairros do município de Sabará, em relação à endofilia e exofilia, utilizando armadilha luminosa HP, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012

Bairros	Peridomicílio	Intradomicílio	Total	%
Alvorada	283	23	306	62
Alvorada Velho	6	5	11	2
Ana Lúcia	14	51	65	13
Bom Retiro	11	6	17	3
Casa Branca	21	1	22	4
Nova Vista	10	7	17	3
Novo Alvorada	26	3	29	6
Rio Negro	6	19	25	5
Total (%)	377 (76,62%)	115 (23,38%)	492 (100%)	(100%)

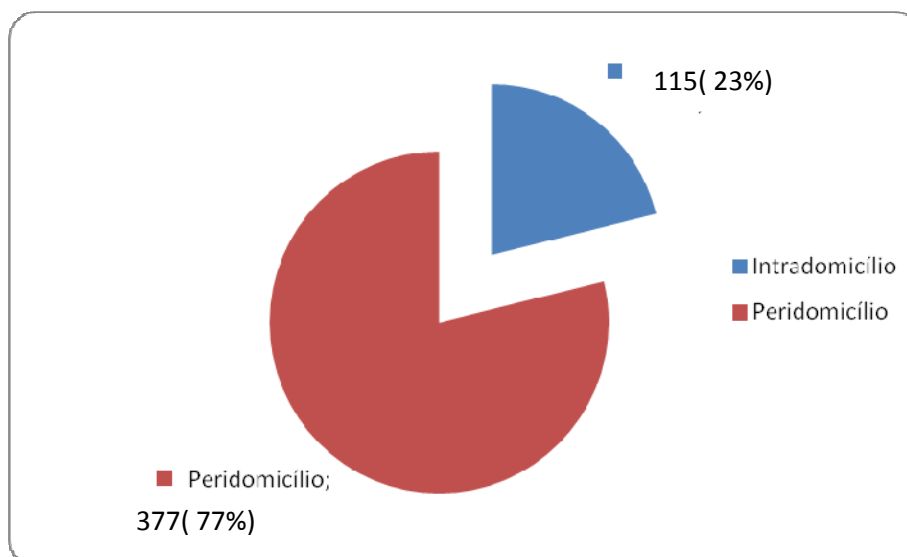


FIGURA 16 - Número de espécimens de *Lu. longipalpis* capturados nos bairros do município de Sabará, em relação à endofilia e exofilia, utilizando armadilha luminosa HP, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012

5.2 Influência das variáveis climáticas na densidade populacional de *Lu. longipalpis*

Nossos resultados mostraram que não houve associação evidente entre o número de *L. longipalpis* e quaisquer das variáveis climáticas isoladamente. Observou-se uma tendência no aumento do número de espécimes capturados nos dois meses após o período chuvoso (FIG. 17). A temperatura pareceu não ter influenciado na curva de flebotomíneos (FIG. 18). Na FIG. 19, foram correlacionadas precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar. Correlacionando precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar por meio do teste de Pearson, observa-se uma correlação estatisticamente significativa ($p < 0.0001$).

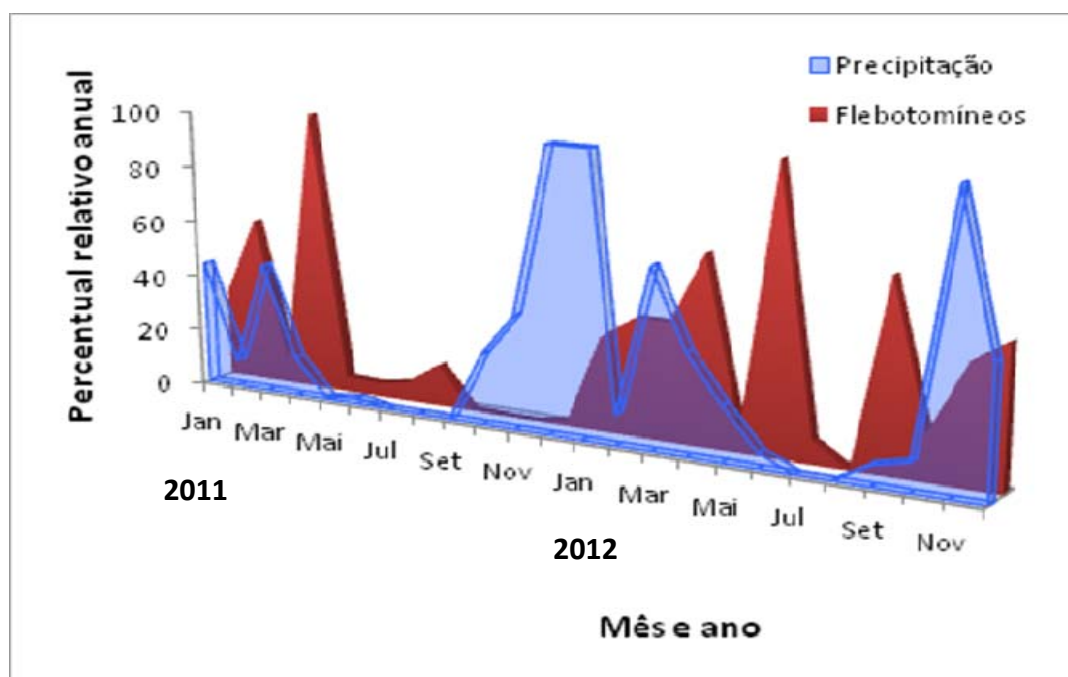


FIGURA 17 - Correlação entre o número de flebotomíneos capturados e a variável climática (precipitação pluviométrica) no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012, no município de Sabará

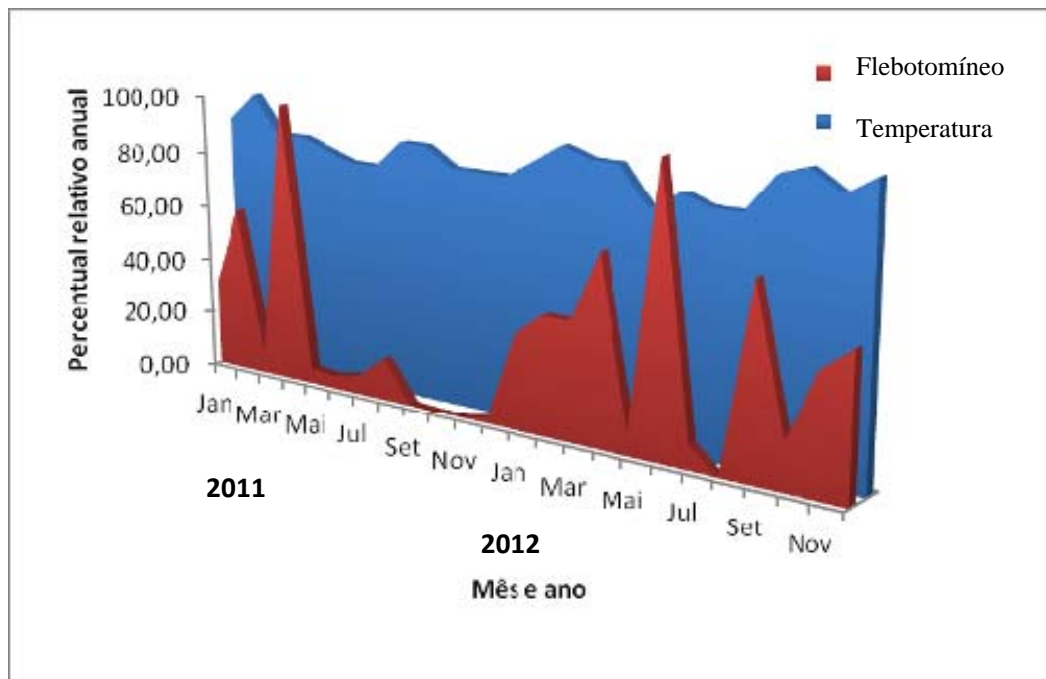


FIGURA 18 - Correlação entre o número de flebotomíneos capturados e a variável climática (temperatura), no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012, no município de Sabará.

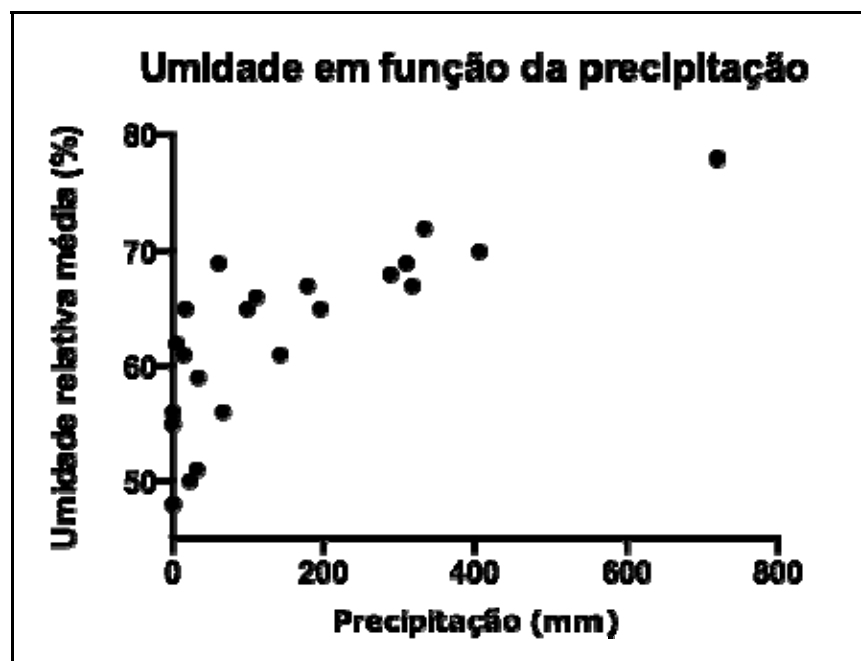


FIGURA 19 - Correlação a variável climática (precipitação pluviométrica) e a variável climática (umidade relativa do ar) no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012, no município de Sabará

5.3 Determinação de fonte alimentar de fêmeas de *Lu. longipalpis*

Das 60 fêmeas de *Lu. longipalpis* capturadas, foram encontradas 28 fêmeas ingurgitadas para determinação de fonte alimentar, que foram analisadas por meio da técnica de PCR do gene do citocromo B, no qual se pôde observar repasto sanguíneo realizado em vertebrados em todas as amostras, conforme mostrado na FIG. 20. O fragmento característico do gene do citocromo B (358 pb) foi observado em todas as amostras analisadas.

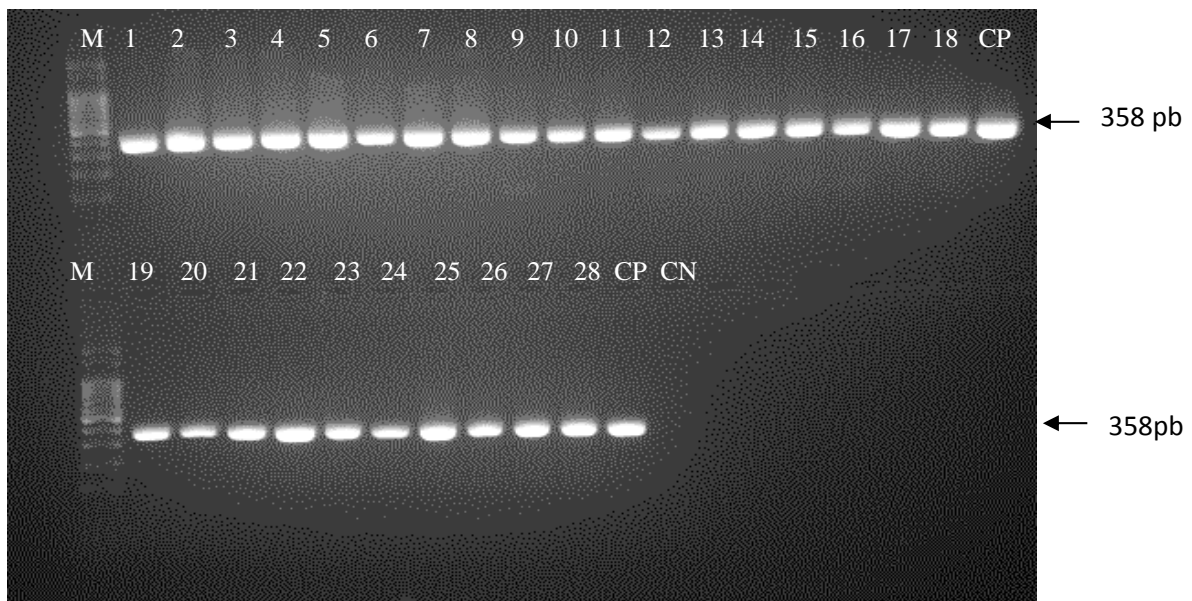


FIGURA 20 - Produtos de amplificação (*Lu. longipalpis*) obtidos com iniciadores do gene do citocromo B, observados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio.

5.4 Sequenciamento para determinação da fonte alimentar

Das 28 fêmeas de *Lu. longipalpis* analisadas por meio da técnica de PCR do gene do citocromo B, pôde-se observar o repasto sanguíneo em vertebrados realizado em todas as amostras. Estas foram sequenciadas e analisadas através do NCBI Blast nucleotide *blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Dessas amostras, 19 flebotomíneos tiveram como fonte alimentar *Homo sapiens* (67,9%) e 7 tiveram como fonte alimentar *Gallus gallus* (25,0%), não foi possível sequenciar 2 amostras.

5.5 Detecção de infecção natural de *Lu. longipalpis* por *Leishmania* spp.

Foram direcionadas 12 fêmeas de *Lu. longipalpis* não alimentadas, agrupadas em 9 *pools*, para detecção de infecção natural. Estas foram analisadas mediante a técnica de PCR genérico dirigida ao gene SSUrRNA Nested PCR. Dos 9 *pools*, 3 deles apresentaram-se positivos para o gênero *Leishmania* (FIG. 21), ficando a taxa mínima de infecção de 25% (taxa mínima de infecção: $3 \times 100/12 = 25\%$).

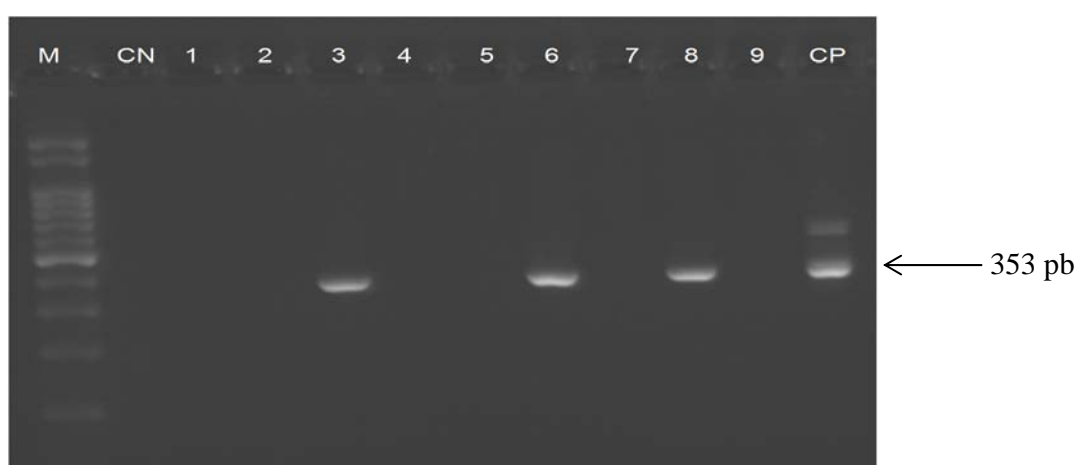


FIGURA 21 - Produtos de amplificação (*Lu. longipalpis*) obtidos com iniciadores do gene do SSUrRNA, observados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio.

Canaletas: **M**- marcador de peso molecular 120pb; **1 a 9**- amostras de *Lu. longipalpis*; **CP**- controle positivo da reação (*Le. infantum*) cepa de referência MHOM/BR/PP75; **CN**- controle negativo da reação (sem DNA)

TABELA 4 - Número de *pools* de fêmeas não ingurgitadas de *Lu. longipalpis* e local de captura no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012, no município de Sabará

<i>Pool</i>	Quantidade	Espécie	Bairro	Casa
1	3	<i>Lu. longipalpis</i>	Ana Lúcia	7
2	2	<i>Lu. longipalpis</i>	Ana Lúcia	7
3	1	<i>Lu. longipalpis</i>	Rio Negro	4
4	1	<i>Lu. longipalpis</i>	Alvorada	3
5	1	<i>Lu. longipalpis</i>	Novo Alvorada	1
6	1	<i>Lu. longipalpis</i>	Casa Branca	5
7	1	<i>Lu. longipalpis</i>	Ana Lúcia	7
8	1	<i>Lu. longipalpis</i>	Novo Alvorada	1
9	1	<i>Lu. longipalpis</i>	Novo Alvorada	1

5.6 Sequenciamento SSUrRNA para determinação da espécie de *Leishmania* nas fêmeas de flebotomíneos capturadas no campo

Dos três *pools* de fêmeas de *Lu. longipalpis* analisadas pela técnica de NestedPCR, positivas para o gênero *Leishmania*, foi feita a análise bioinformática das sequências obtidas pelo programa Bioedit, em que se pôde observar que a espécie de *Leishmania* circulante nos vetores no município de Sabará é *Le. infantum* (sin. *Le. chagasi*), conforme a FIG. 22, de acordo com os pontos de similaridade entre a espécie de *Le. infantum* de referência e a amostra de flebotomíneo positiva na área de estudo.

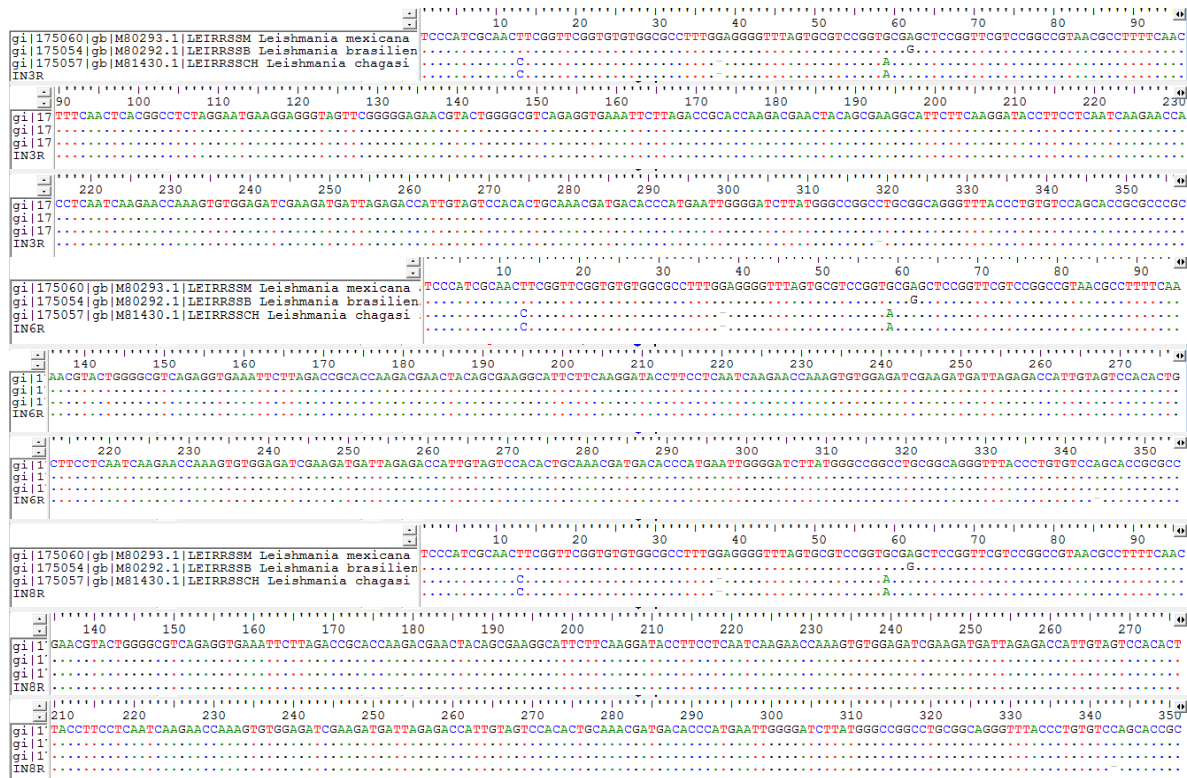


FIGURA 22 - Alinhamento das sequências editadas IN3, IN6 e IN8 positivas para o gênero *Leishmania* (município de Sabará), com amostras de *Leishmania* depositadas no GenBank *Le. braziliensis*, *Le. amazonensis* e *Le. infantum*

5.7 Determinação da taxa de positividade canina do município de Sabará nos anos de 2011 e 2012

As TAB. 5 e 6 mostram o número total de cães analisados e o número de cães soropositivos para cálculo da taxa de positividade da LVC nos bairros estudados, nos anos de 2011 e 2012. No primeiro inquérito sorológico canino, realizado em 2011, foram examinados 2 000 cães e, no segundo inquérito, realizado em 2012, foram examinados 1 944 cães. A taxa de positividade canina foi calculada por ano, sendo distribuída de forma variada nos bairros estudados, ficando a taxa média de infecção por ano em torno de 4,25% e 3,34%, respectivamente.

TABELA 5 - Inquérito canino realizado em cães domiciliados no município de Sabará, pelos testes de ELISA e RIFI, no ano de 2011.

Inquérito canino 2011					
Bairros	Amostras coletadas	Negativos	Positivos	Indeterminados	Taxa de positividade canina (%)
Alvorada	425	404	16	5	3,76
Alvorada Velho	177	170	4	3	2,26
Novo Alvorada	399	371	15	3	3,76
Ana Lúcia	244	232	12	SI*	4,92
Rio Negro	SI*	SI*	SI*	SI*	SI*
Casa Branca	SI*	SI*	SI*	SI*	SI*
Bom Retiro	SI*	SI*	SI*	SI*	SI*
Nova Vista	755	709	38	8	5,03
Total	2 000	1 886	85	19	4,25

* SI = Sem identificação

TABELA 6 - Inquérito canino realizado em cães domiciliados no município de Sabará, pelos testes de ELISA e RIFI, no ano de 2012.

Inquérito canino 2012					
Bairros	Amostras Coletadas	Negativos	Positivos	Indeterminados	Taxa de Positividade canina (%)
Alvorada	433	412	17	4	3,92
Alvorada Velho	154	152	1	1	0,64
Novo Alvorada	421	411	7	3	1,66
Ana Lúcia	141	132	7	2	4,96
Rio Negro	120	115	4	1	3,33
Casa Branca	8	4	2	2	2,5
Bom Retiro	110	106	3	1	2,72
Nova Vista	557	522	24	11	4,31
Total	1 944	1 854	65	25	3,34

5.8 Distribuição de frequência de resultados dos testes parasitológico direto, PCR e mielocultura de cães assintomáticos e sintomáticos

A FIG. 23 apresenta os resultados do diagnóstico parasitológico, PCR e mielocultura dos cães soropositivos para LV assintomáticos e sintomáticos. Parasitos de *Leishmania* foram detectados através de aspirados de medula óssea e em biópsias de baço, linfonodo mesentérico e pele, obtidas dos cães soropositivos do município de Sabará. Dos 50 cães soropositivos para LV examinados por meio do exame parasitológico direto, 33 cães (66%) foram positivos. Destes 33 cães, 21% (7) eram assintomáticos e 79% (26) eram sintomáticos. Em relação à PCR, todos os 50 cães analisados (100%) se apresentaram positivos, destes 22% (11) eram assintomáticos e 78% (39) eram sintomáticos. Os resultados da mielocultura, 38 amostras (76%) de medula óssea foram isolados os parasitos, destas 26% (10) eram provenientes de cães assintomáticos e 74% (28) de cães sintomáticos. Com o objetivo de verificar se havia diferença estatística entre grupos de cães sintomáticos e assintomáticos avaliados, por meio dos testes parasitológico direto, PCR e mielocultura, utilizou-se aqui o teste de Fisher e verificou-se que não apresentaram diferença estatisticamente significativa, como representado a seguir: parasitológico direto ($p=0,56$), mielocultura (0,18) e PCR ($p>0,05$).

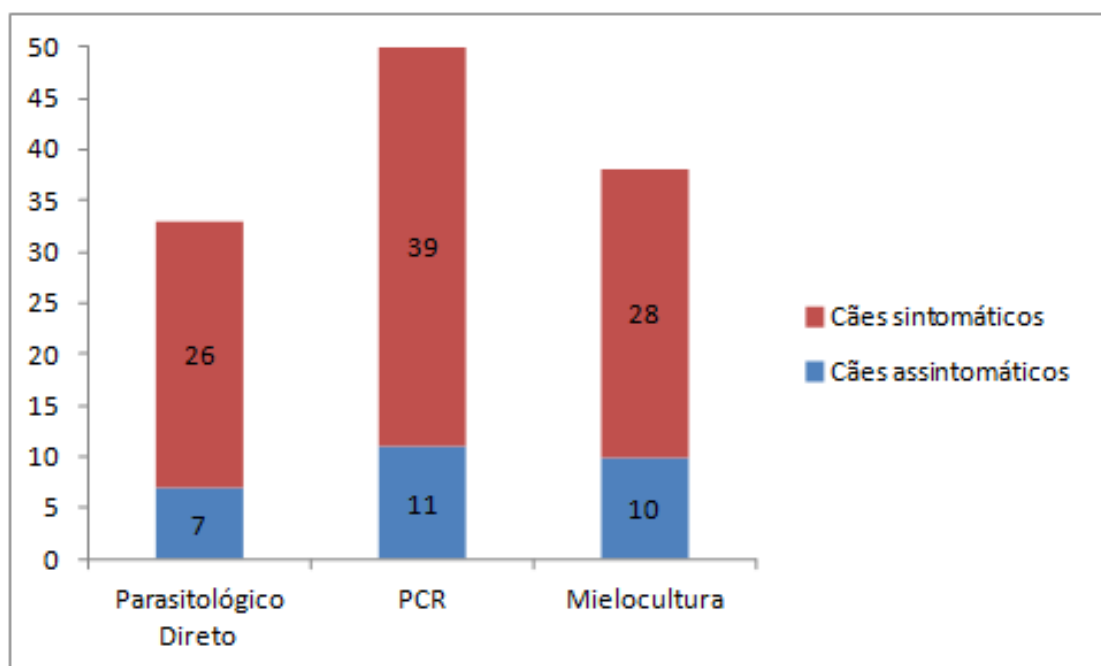


FIGURA 23 - Distribuição de resultados dos testes parasitológico direto, PCR e mielocultura entre cães sintomáticos e assintomáticos, Sabará, 2011 e 2012

5.9 Distribuição de frequência de resultados do teste de PCR de cães assintomáticos e sintomáticos

Das 50 amostras de baço, medula, linfonodo mesentérico e pele dos cães necropsiados, mostraram-se positivas 49 (98%) amostras de linfonodo, 48 (96%) de baço, 44 (88%) de pele e 39 (78%) de medula (FIG. 24). Com o objetivo de calcular se houve diferença entre tecidos usados na PCR, para verificar se um tecido é melhor que os outros, objetivando reduzir o consumo de material e carga de trabalho, utilizamos Teste qui quadrado pareado de McNemar, e verificou-se que o linfonodo se mostrou o órgão mais sensível, pois apresentou a maior positividade (98%), entretanto não houve diferença estatística entre os tecidos analisados, somente entre baço e medula ($p=0,022$).

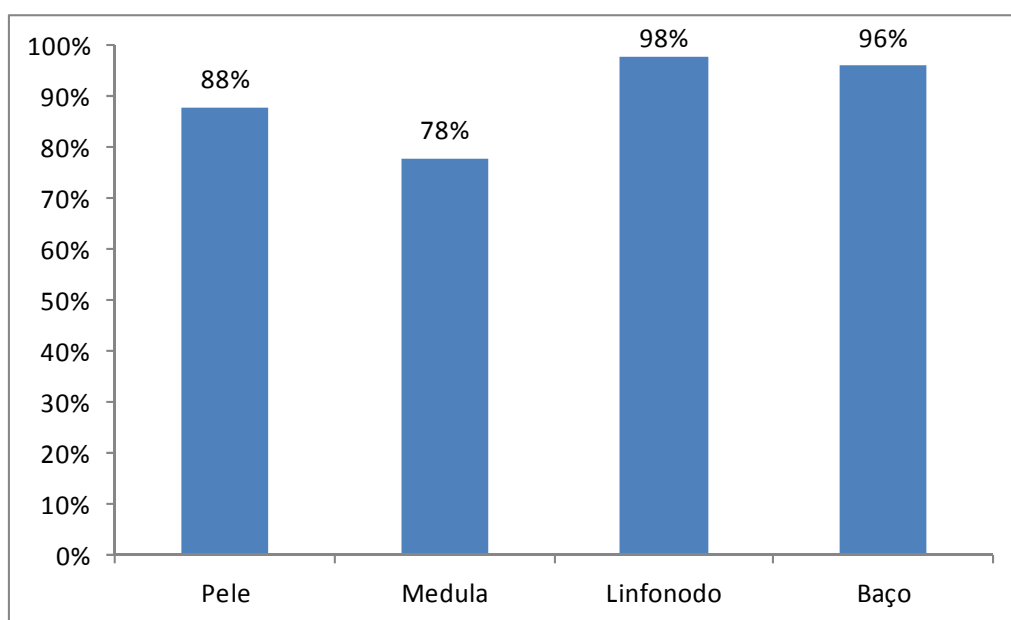


FIGURA 24 - Distribuição da frequência, por porcentagem, de resultados do teste de PCR por tecido, entre cães assintomáticos e sintomáticos, Sabará, 2011 e 2012.

Das 50 amostras dos cães provenientes do município de Sabará, apenas a amostra 18 não foi positivada pela técnica da PCR. A FIG. 25 mostra o fragmento de 353 pb característico de *Leishmania* observados nas amostras de linfonodo mesentérico. Todas amostras positivas foram enviadas para sequenciamento.

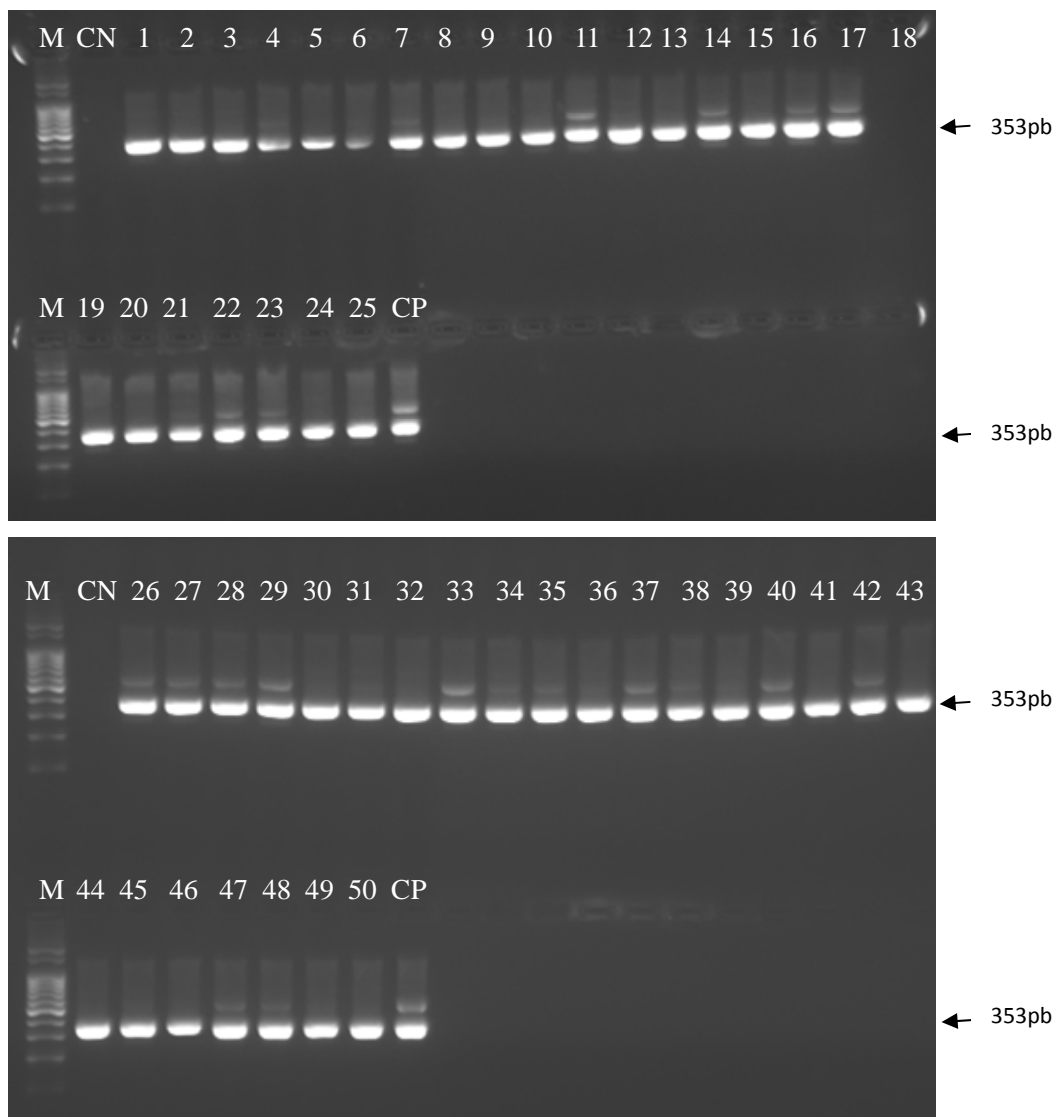


FIGURA 25 - Produtos de amplificação (amostras de linfonodo mesentérico) obtidos com iniciadores do gene do SSUrRNA, observados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio.

Canaletas: **M**- marcador de peso molecular 120 pb; **1 a 50**- amostras de linfonodo cães soropositivos; **CP**- controle positivo da reação (*Le. infantum*) cepa referência MHOM/BR/PP75; **CN**- controle negativo da reação (sem DNA).

A FIG. 26 mostra os resultados da PCR entre os cães assintomáticos e sintomáticos para cada tecido analisado. Não houve diferença estatística significativa, por meio do teste qui-quadrado pareado de McNemar, apenas uma tendência de cães sintomáticos apresentarem mais resultados positivos em relação aos assintomáticos.

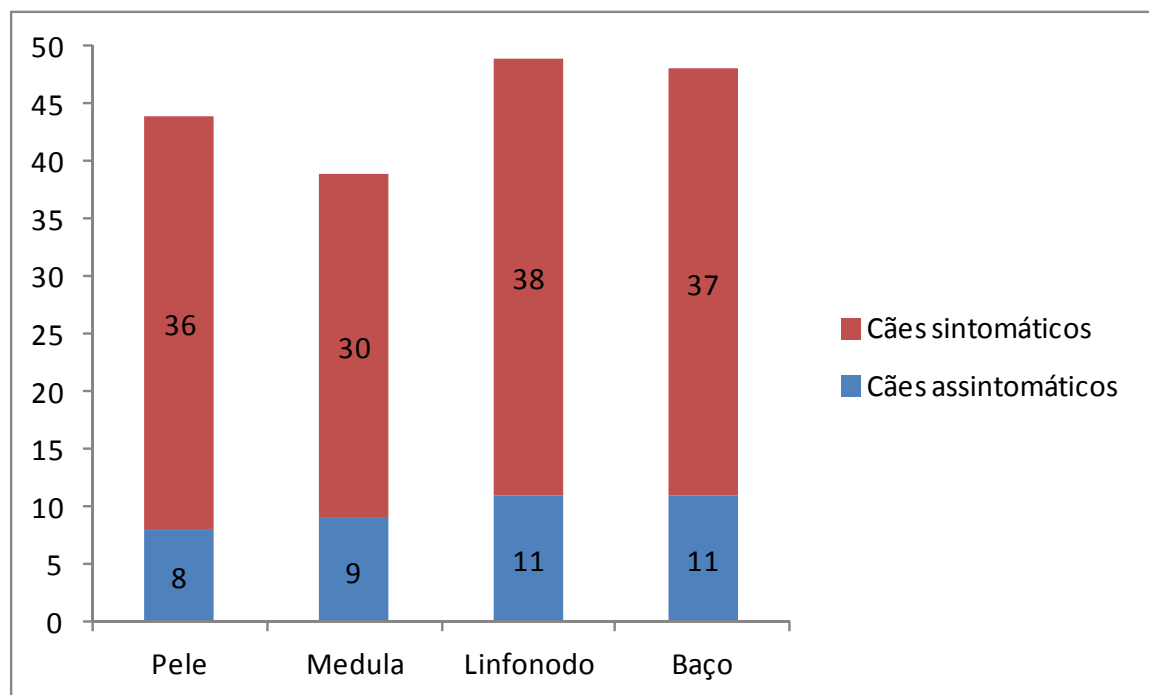


FIGURA 26 - Distribuição da frequência de resultados do teste de PCR por tecido, entre cães assintomáticos e sintomáticos, Sabará, 2011 e 2012.

5.10 Distribuição de frequência de resultados cumulativos dos testes parasitológico direto, PCR e mielocultura de cães assintomáticos e sintomáticos

Dos 50 cães soropositivos analisados (sintomáticos e assintomáticos) por meio dos testes parasitológico direto, PCR e mielocultura, 54% (27) foram confirmados pelos 3 testes, 34% (17) por 2 testes e 12% (6) foram confirmados somente por 1 teste, estes não tiveram confirmação parasitológica (FIG. 27). Mediante a análise do teste qui-quadrado de Pearson ou de Fisher, não se observou diferença estatística entre os grupos de cães assintomáticos e sintomáticos, apenas uma tendência de cães sintomáticos apresentarem um maior número de testes positivos.

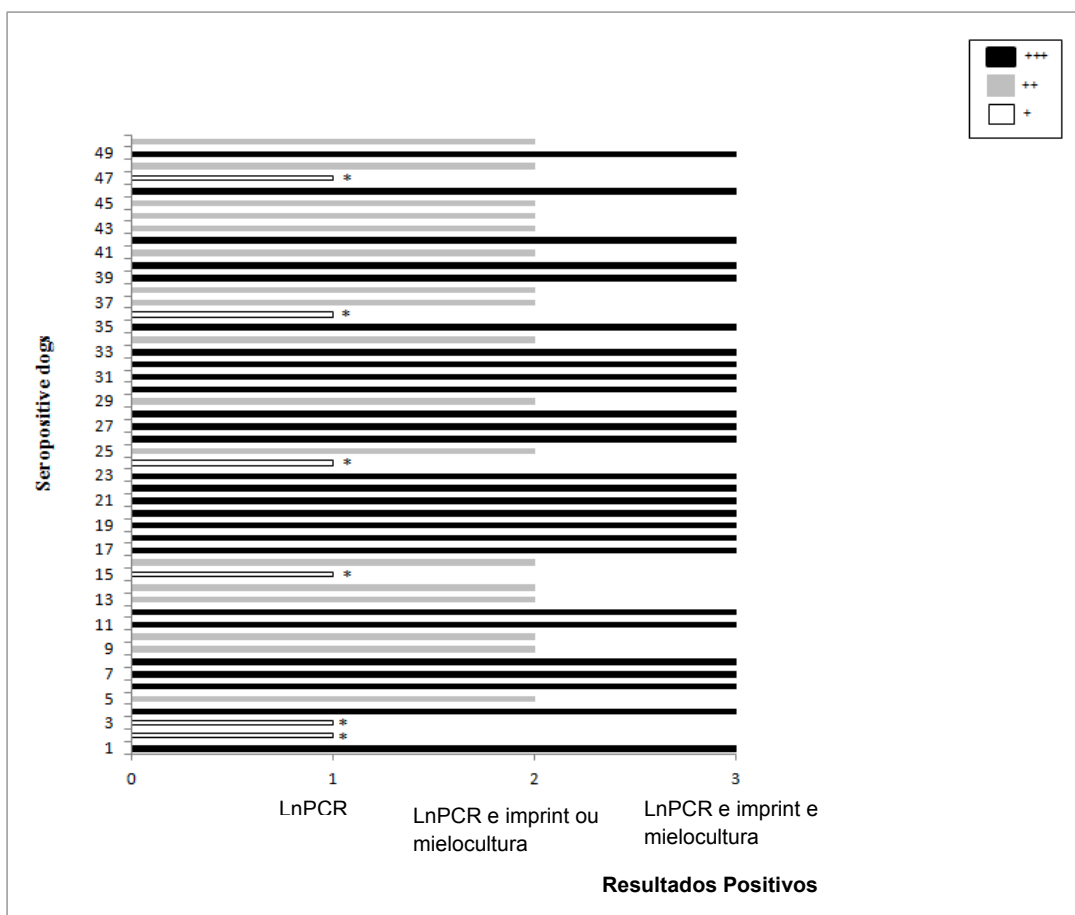


FIGURA 27 - Frequência cumulativa dos resultados dos testes parasitológico direto, PCR e mielocultura entre cães sintomáticos e assintomáticos, Sabará, 2011 e 2012

5.11 Frequência de sintomas sugestivos entre cães soropositivos sintomáticos

Na FIG. 28, é possível observar os diferentes sintomas clínicos apresentados pelos cães sintomáticos necropsiados neste estudo. Os mais comuns são hiperqueratose (25%), dermatite (30%), emagrecimento (42,5%), onicogrifose (60%) e linfadenopatia (100%).

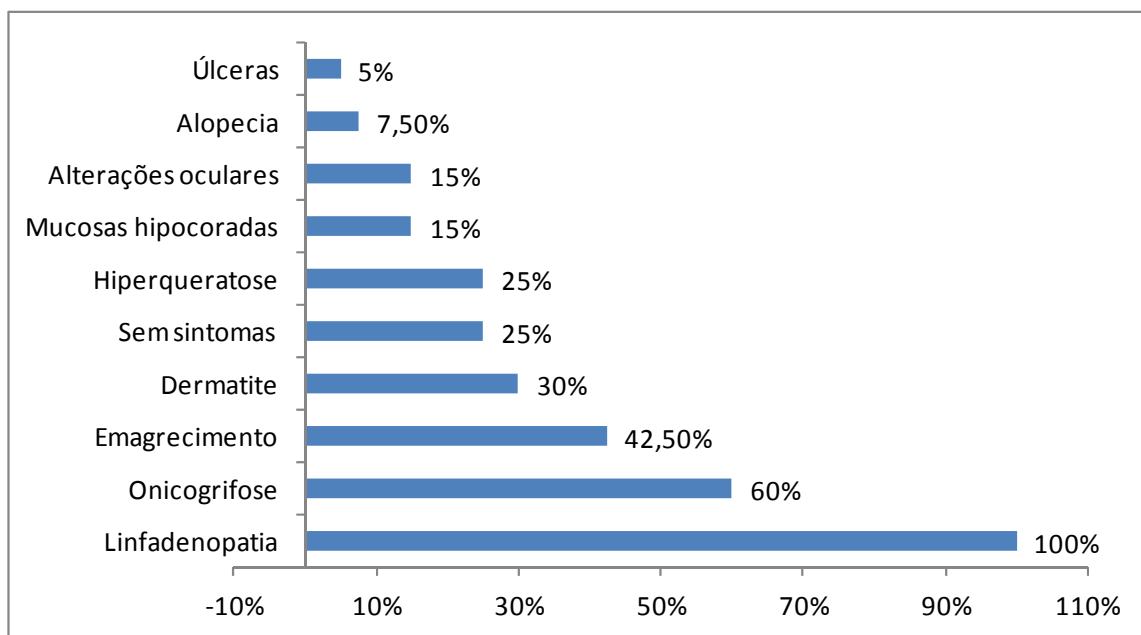


FIGURA 28 - Frequência de sintomas sugestivos entre cães sintomáticos, Sabará, 2011 e 2012

5.12 Comparação entre testes diagnósticos de cães assintomáticos e sintomáticos

Na FIG. 29, é possível observar que a PCR se mostrou o teste diagnóstico mais sensível (100%), seguido da mielocultura e exame clínico (76%), e o parasitológico direto (66%).

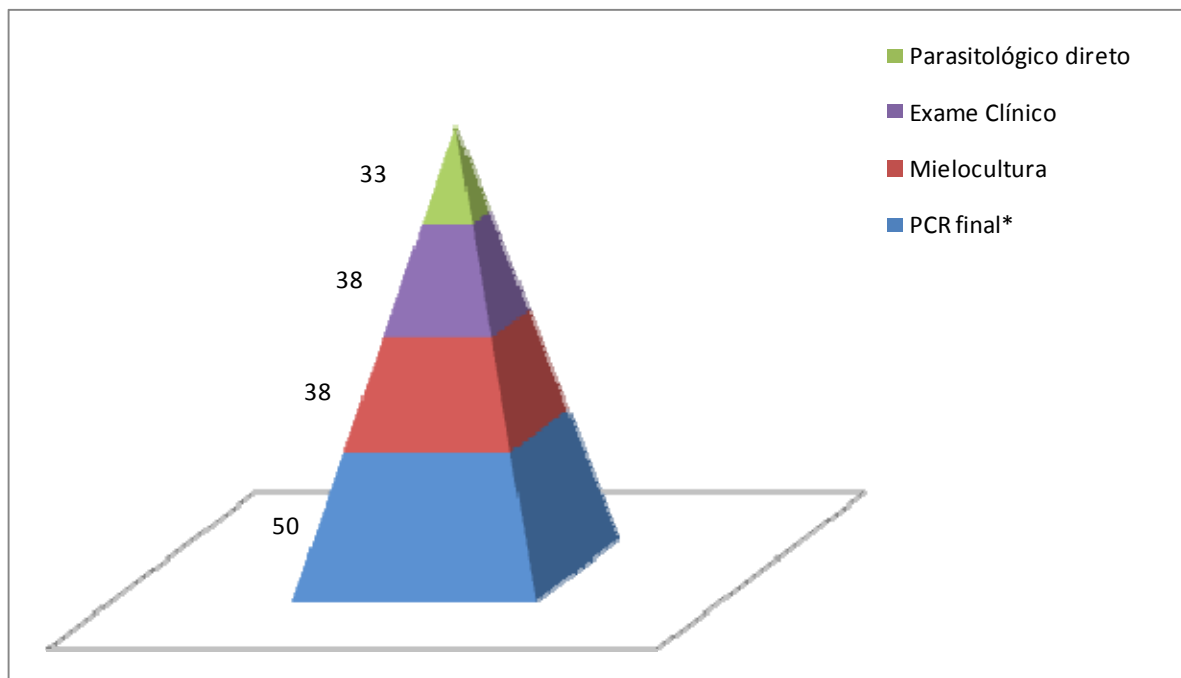


FIGURA 29 - Comparação entre testes diagnósticos de cães sintomáticos e assintomáticos, Sabará, 2011 e 2012

5.13 Sequenciamento SSUrRNA para determinação da espécie de *Leishmania* nos cães soropositivos, amostras de linfonodo positivas

Das 49 amostras analisadas por meio da técnica de NestedPCR positivas para o gênero *Leishmania*, foi feita a análise bioinformática das sequências obtidas através do programa Bioedit e pôde-se observar que a espécie de *Leishmania* circulante nos reservatórios no município de Sabará é *Le. infantum* (sin. *Le. chagasi*), conforme FIG. 30, de acordo com os pontos de similaridade entre a espécie de *Le. infantum* de referência e as amostras de linfonodo positivas na área de estudo. Foi possível o sequenciamento de 38 amostras (77,6%) das 49 amostras positivas. No restante das amostras positivas a nível genérico, 22,4%, não foi possível o sequenciamento e, portanto, não se identificou a espécie das devidas amostras.

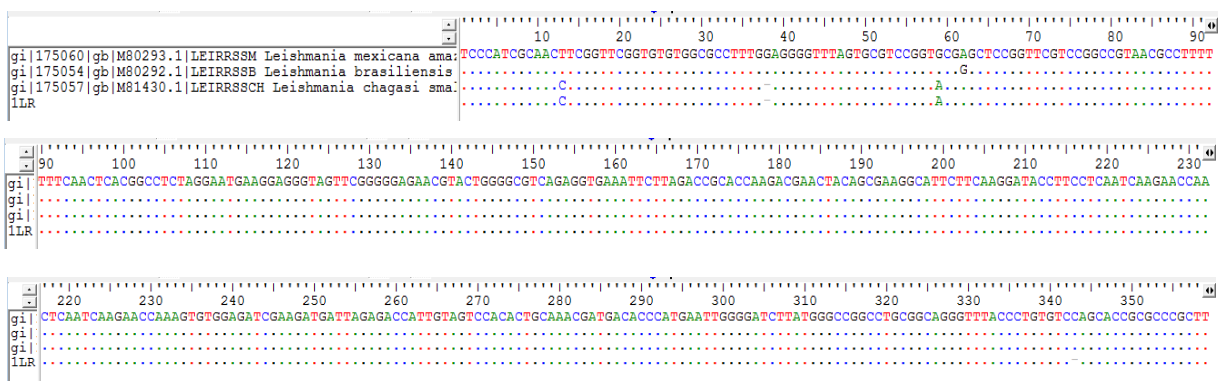


FIGURA 30 - Alinhamento das sequências editadas 1 L (linfonodo mesentérico) positivas para o gênero *Leishmania* (município de Sabará), com amostras de *Leishmania* depositadas no GenBank *Le. braziliensis*, *Le. amazonensis* e *Le. infantum*

5.14 Epidemiologia descritiva

Todos os casos humanos, caninos, pontos de captura entomológica e pontos entomológicos com presença de *Lu. longipalpis*, infectados naturalmente, foram georreferenciados e plotados em mapa, e posteriormente, analisadas as possíveis áreas de risco (FIG. 31).

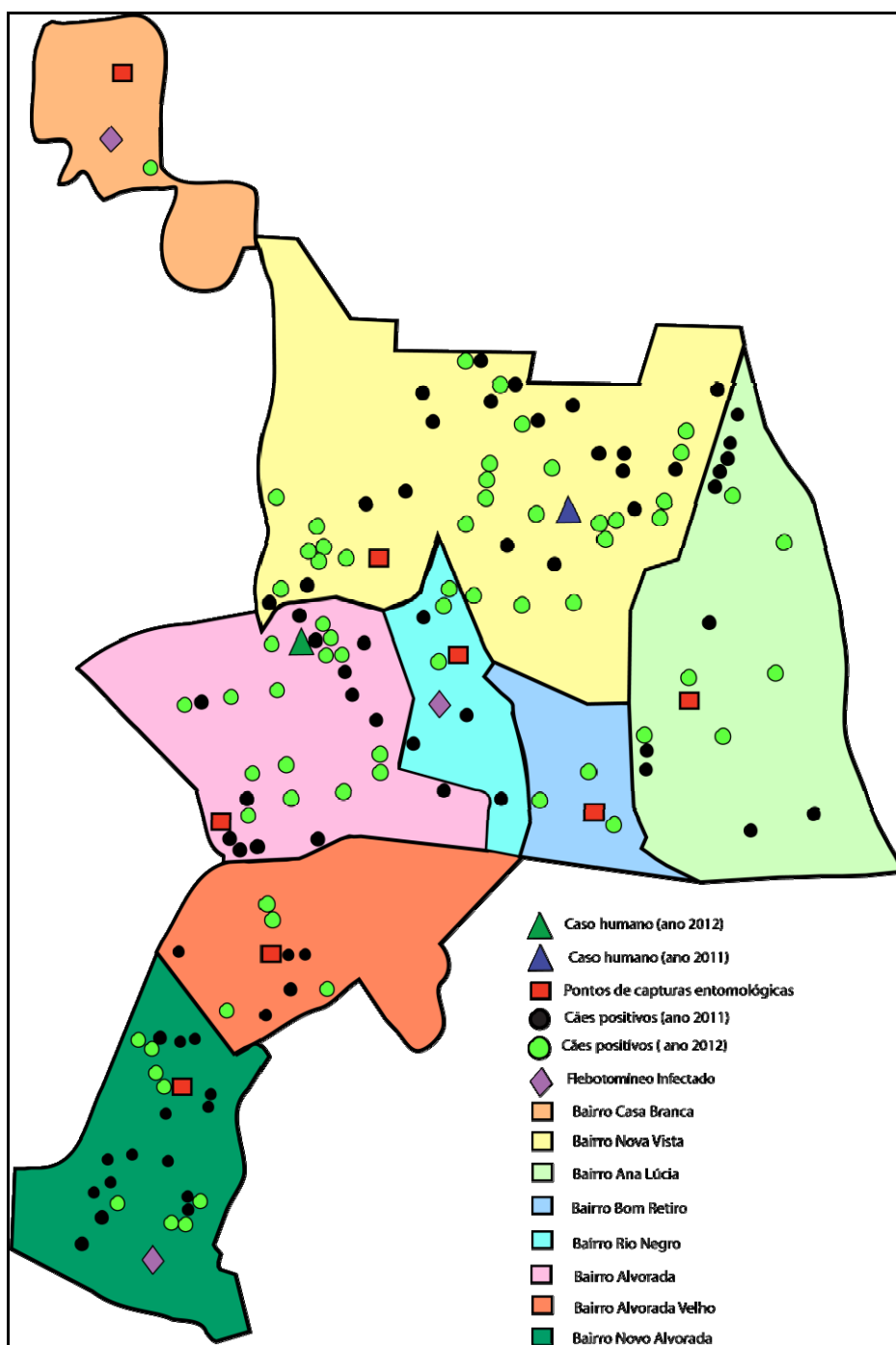


FIGURA 29 - Mapa vetorizado dos casos caninos, casos humanos, pontos de capturas entomológicas, febotomíneos infectados naturalmente georreferenciados, nos bairros em estudo da área I, município de Sabará, anos 2011 e 2012

O georreferenciamento dos cães e flebotômíneos positivos para LV bem como dos casos humanos de leishmanioses no município de Sabará demonstrou a existência de focos da doença no município. Na FIG. 31, os oito bairros presentes no estudo mostraram uma distribuição abrangente de vetores e hospedeiros. Os bairros Alvorada e Nova Vista podem ser apontados como área de risco por apresentarem casos humanos recentes, casos caninos e a presença de vetores para LV, mesmo não sendo encontrados *Lu. longipalpis* infectados naturalmente. Já os bairros Rio Negro, Casa Branca e Novo Alvorada apresentaram casos caninos recentes, *Lu. longipalpis* infectados, mas não tiveram casos humanos notificados, entretanto estes podem também ser considerados como possíveis áreas de risco, pois, de acordo com a literatura, os casos caninos precedem os casos humanos.

6 DISCUSSÃO

Até a década de 1970, no Brasil, a LV foi considerada uma doença de características silvestre ou rural, associada às condições precárias de vida. Atualmente é apontada como doença reemergente, com incidência crescente e em franco processo de urbanização (Boraschi; Nunes, 2007; Brasil, 2004). A doença era conhecida em áreas de clima seco com precipitações pluviométricas anuais inferiores a 800 mm, ambientes com aspecto fisiográfico composto por montanhas e vales. Esse perfil, no entanto, começou a mudar, observando-se casos nas periferias dos grandes centros urbanos (Brasil, 2006).

Existem muitas lacunas no processo de urbanização da LV, e esses conhecimentos insuficientes acerca da epidemiologia da transmissão em áreas urbanas contribuem para o agravamento desse quadro epidemiológico (Reithinger; Dujardin, 2007; Shaw, 2007). Contudo, sabe-se que as transformações no ambiente são provocadas pelo intenso processo migratório, em virtude de pressões econômicas e sociais, distorções na distribuição de renda, esvaziamento rural, o que acarreta a expansão da LV nas áreas endêmicas e aparecimento de novos focos (Brasil, 2003). O desmatamento, a urbanização descontrolada, com pessoas vivendo sob deficiência nutricional, em condições sanitárias e habitacionais precárias, além da associação com a epidemia de HIV são outros motivos apontados como responsáveis por essas alterações na história natural da doença (Desjeux, 2001; Alvar *et al.*, 2006).

Aliado a essa problemática, as modificações socioambientais devido à redução de animais silvestres disponíveis como fonte de alimentação para a fêmea de *Lu. longipalpis*, como consequência do desmatamento, coloca o cão e o homem como alternativas alimentares, e o convívio próximo dos humanos com cães associado com o aumento da densidade do vetor são considerados fatores responsáveis pelo aumento da LV nos grandes centros urbanos (Monteiro *et al.*, 2005; Monteiro, 2000; Campino; Abranches, 2002; Reithinger; Davies, 2002).

O processo de expansão geográfica e de urbanização da LV conduziu à necessidade dos serviços de saúde procurarem elos na cadeia de transmissão dessa endemia que viabilizassem medidas mais eficazes de controle. Na maior parte dos estudos epidemiológicos em áreas urbanas, tem sido relatado o encontro de muitos cães infectados, e, em algumas áreas, foi possível observar que a LV canina precedeu ao aparecimento da doença humana (Monteiro *et al.*, 2005; Luiz *et al.*, 2001).

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

Os exaustivos inquéritos sorológicos na população de cães e os levantamentos entomológicos flebotômicos em áreas endêmicas revelam, em alguns locais, altas taxas de prevalência canina e a presença predominante e abundante de espécies vetoras, o que eleva o risco de transmissão para o homem (Vieira; Coelho, 1998).

O município de Sabará foi caracterizado pela SVS, do Ministério da Saúde, como área de intensa transmissão de LV e, desde 1995, o município assumiu, de forma mais sistemática, as ações de controle de LV, seguindo as normas preconizadas do Manual de Controle da Leishmaniose da Fundação Nacional da Saúde (Funasa). Entretanto, mesmo com a adoção das ações de controle, novos casos de LV humana e canina são descritos. Diante dessa realidade, fazem-se necessários novos estudos para maiores esclarecimentos da epidemiologia da doença no município (Wilke, 2005).

Este estudo entomológico, realizado no município de Sabará, apresenta descrição da fauna flebotômica, composta de quatro espécies, que foram coletadas e identificadas, sendo a espécie *Lu. longipalpis* a mais abundante. É de extrema importância o conhecimento da fauna local, para direcionamento das medidas de controle. Isso, ligado ao conhecimento da época de maior densidade vetorial, contribuirá para realização de borrifação de inseticida nas residências, com o intuito de diminuir esse número.

Foram coletados 492 exemplares da espécie *Lu. longipalpis*, estando presentes nos oito bairros do estudo. O encontro da espécie *Lu. longipalpis*, vetora comprovada de *Le. infantum* *Sin. (chagasi)*, em elevada densidade, pode ter implicações importantes na transmissão da LV na região, visto que essa espécie está amplamente distribuída em todo o país e está presente em regiões onde a LV apresenta um problema para os programas de controle de saúde pública, como Teresina, Belo Horizonte, Araçatuba e Montes Claros (Costa *et al.*, 1990; Bevilacqua, 2001; Galimberti *et al.*, 1999; Michalsky, 2004; Michalsky *et al.*, 2009; Brasil, 2006). Os resultados obtidos são semelhantes aos registrados em outras pesquisas sobre vetores de leishmanioses, realizadas em diversas regiões brasileiras, nas quais *Lu. longipalpis* foi a espécie mais encontrada (Barata *et al.*,

2004; Dias *et al.*, 2007; Missawa; Dias, 2007; Michalsky, 2009b, 2011). A importância da presença de *Lu. longipalpis* nos ambientes urbanos se faz devido a essa espécie estar bem adaptada ao ambiente e ter um papel importante na epidemiologia da doença, como também sua ampla distribuição ao longo do País (Quinnel; Dye, 1994; Ximenes, 2000; Santos *et al.*, 2003; Dias *et al.*, 2003).

A espécie *Lu. whitmani* foi capturada no município, durante o período de estudo, e, apesar de não ter sido encontrada em elevada densidade, apresenta um importante dado, pois é incriminada como vetora de *L. braziliensis* em algumas regiões do Brasil (Queiroz *et al.*, 1994; Luz *et al.*, 2000). No município de Sabará, Passos *et al.* (1993) encontraram essa espécie em elevada densidade, tanto em áreas não urbanizadas como no ambiente doméstico, destacando a importância desta como vetora de LTA nessa região e sugerindo sua adaptação ao ambiente domiciliar. A espécie *Lu. Intermedia* também foi capturada em baixa densidade e tem sido assinalada como importante vetor do agente etiológico da LTA em diversas regiões do sudeste do Brasil (Gomes; Galati, 1989; Camargo-Neves *et al.*, 2002; Saraiva *et al.*, 2006;)

A espécie *Lu. cortelezzii* também foi capturada no município, entretanto não é reconhecida como espécie vetora de *Le. infantum*. Carvalho em 2006, relatou o encontro de *Lu. cortelezzii* infectado por *Le. infantum* na Região Metropolitana de Belo Horizonte. Entretanto não se pode incriminar essa espécie como vetora de LV, pois a competência de uma espécie de flebotomíneo, de ser infectada e de se transformar em vetor, depende de vários fatores intrínsecos que determinarão a sua capacidade de ser susceptível ou refratária ao desenvolvimento de determinadas espécies de *Leishmania*. São necessários maiores estudos sobre esta espécie, principalmente porque não se encontram relatos dessa espécie como vetora de *Leishmania* (Martins *et al.*, 2006; Galati *et al.*, 1997).

O número de machos foi mais elevado em relação às fêmeas, e isso parece decorrer porque os machos eclodem antes das fêmeas, e como os criadouros são próximos das moradias e fornecem umidade e abrigo, favorecem a presença dos machos nesse ambiente, prolongando seu tempo de vida. A abundância de animais domésticos (principalmente cães e aves) no peridomicílio atrairia as fêmeas para esse nicho, e logo os machos liberariam feromônios, atraindo as fêmeas para a cópula (Alvar *et al.*, 2006; Kelly; Dye, 1997; Ward *et al.*, 1993). Essas observações sugerem uma proximidade dos machos junto aos hospedeiros por mais tempo do que as fêmeas e podem explicar a razão sexual maior em favor

dos machos nas coletas. Por outro lado, as fêmeas, por seus hábitos hematófagos, são os agentes transmissores de *Leishmania*, e sua estratégia reprodutiva consistiria em voar para fora de seus abrigos e buscar um local para o repasto sanguíneo, ocorrendo, então, o acasalamento e a disputa por locais de criadouros (Lainson; Rangel, 2003, 2005).

Quanto ao comportamento de *Lu. longipalpis* capturadas no município de Sabará em relação à endofilia e exofilia, foram encontrados um elevado número (23%) no intradomicílio. Esses dados demonstram que o número de flebotomíneos capturados no intradomicílio sob o ponto de vista epidemiológico é relevante, pois o encontro de flebotomíneos e, particularmente, de *Lu. longipalpis* dentro das residências pode facilitar a transmissão da LV.

Na área estudada do município de Sabará, é encontrado um ambiente característico e propício à ocorrência de LV. As habitações são, em sua maioria, extremamente pobres, com deficiência de saneamento básico, e baixos índices socioeconômicos. Nelas, a convivência com animais domésticos é bastante elevada, resultando em acúmulo de matéria orgânica, proporcionando condições favoráveis para a ocorrência da transmissão da doença. Nesta pesquisa, observou-se que, na área de estudo, o bairro Alvorada representou 62% do total de flebotomíneos capturados. Isso provavelmente ocorreu devido às características ambientais do local, com presença de árvores frutíferas e grande concentração de matéria orgânica, e ainda, presença de mais de 30 animais, incluindo cães e gatos. Na literatura, está claro que ambientes como esses favorecem o desenvolvimento de flebotomíneos (Foratini, 1960; Sherlock; Guitton, 1969), podendo ter contribuído para ser o local de maior captura de espécimens. Camargo-Neves *et al.* (2001) consideram importante a análise da densidade do vetor e a correlação com aspectos ambientais do peridomicílio, como presença de vegetação, raízes, troncos de árvores e matéria orgânica no solo, representando os possíveis criadouros dos vetores, e também a associação com animais domésticos, que são fonte de alimentação para os flebotomíneos.

A correlação entre a densidade populacional dos flebotomíneos e os fatores abióticos já está bem estabelecida, uma vez que esses fatores interferem com o ciclo evolutivo dos flebotomíneos e alteram seus sítios reprodutivos. Sob o ponto de vista bioclimatológico, fatores climáticos e ecológicos são importantes conexões na epidemiologia da LV (Sherlock, 1996). Michalsky (2009) afirma que estudos voltados para as condições vetoriais e ambientais são fundamentais para

avaliar o risco de transmissão da LV. Deane, Deane e Alencar (1955) mostraram, em seus estudos, a nítida influência que as estações do ano exercem sobre a fauna de *Lu. longipalpis* e observaram também que a estação chuvosa propicia um aumento da umidade e favorece diretamente a proliferação e a sobrevivência dos flebotomíneos, sendo encontrados em altas densidades.

Os resultados desta pesquisa mostraram que não houve associação evidente entre o número de *Lu. longipalpis* e quaisquer das variáveis climáticas isoladamente. Nas coletas, foi observado que o pico de flebotomíneos foi maior nos períodos pós-chuvas, conseqüentemente aumentando a umidade e tendenciosamente elevando o pico de coleta logo após dois meses de precipitação. Quando se correlacionam precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar por meio do teste de Pearson, observa-se uma correlação estatisticamente significativa ($p < 0.0001$), reforçando os resultados de maior coleta pós-chuvas. Isso sugere que o período do ano mais propício para a intensificação das ações de controle, seja por ação de inseticidas ou manejo ambiental, seja após o período chuvoso, que corresponde ao nascimento e desenvolvimento dos flebotomíneos. Esse achado corrobora pesquisas prévias que demonstraram correlação positiva entre variáveis climáticas, como umidade relativa do ar e índice de precipitação pluviométrica, com a densidade flebotomínica (Deane; Deane, 1962; Rêbello, 2001; Resende *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008), uma vez que esta é também correlacionada à incidência da doença em humanos e caninos (Resende *et al.*, 2006; Ximenes *et al.*, 2006).

A temperatura não foi um fator determinante da densidade de flebotomíneos, como demonstrado também em outros trabalhos (Missawa; Dias, 2007; Dias *et al.*, 2007; Michalsky *et al.*, 2009). Resultado similar foi demonstrado em pesquisa realizada em Porteirinha, Minas Gerais, onde não houve correlação entre a temperatura e o aumento da densidade de flebotomíneos pelo fato de a primeira ter se mantido sem importantes oscilações no período avaliado. Segundo os autores, o índice pluviométrico e a umidade relativa do ar foram fatores decisivos para a dinâmica flebotomínea da região (Barata *et al.*, 2004).

A busca pelas fontes de alimentação é uma resposta comportamental que afeta a reprodução e a densidade populacional das espécies de flebotomíneos, e tem sido útil na compreensão da epidemiologia das leishmanioses, uma vez que permite a identificação dos hospedeiros sobre os quais os flebotomíneos se alimentam e pode indicar os reservatórios potenciais de *Leishmania* spp. (Barata *et al.*, 2005). A fêmea de *Lu. longipalpis* é bastante eclética quanto às suas

preferências alimentares, podendo sugar várias espécies animais (Missawa; Dias, 2007; Barata *et al.*, 2005). Das fêmeas encontradas ingurgitadas, destinadas para detecção de fonte alimentar, verificou-se que 67,9% se alimentaram em *Homo sapiens*, seguida por *Gallus gallus* (25%), confirmando ser uma espécie oportunista, em que as fêmeas ajustam seus hábitos alimentares à disponibilidade de fontes sanguíneas, como também assinalado em outros estudos (Aguiar *et al.*, 1987; Dias *et al.*, 2003; Barata *et al.*, 2005; Missawa *et al.*, 2008).

O papel das aves na epidemiologia da doença tem sido bastante discutido. Na literatura, não há relatos de que as aves sejam reservatórios de *Leishmania* spp., e sim refratárias à infecção (Dias *et al.*, 2003). Porém servem como fonte de alimentação para os flebotomíneos e atraem potenciais reservatórios de *Leishmania* para perto das habitações, possibilitando a instalação e manutenção do ciclo de transmissão (Rangel; Lainson, 2003). Sabe-se que os galinheiros próximos às casas servem como atrativos para os flebotomíneos. Uma vez que esse local é rico em matéria orgânica, torna-se propício ao desenvolvimento das formas imaturas e, assim, aumenta o contato dos vetores com os humanos, associação que tem grande importância epidemiológica, pois facilita a domiciliação do vetor (Afonso, 2008).

É conhecido que a densidade da população de *Lu. longipalpis* que transmite *Le. infantum* está associada a condições de peridomicílio e é frequentemente associada à presença de animais domésticos (Foratini, 1960; Sherlock; Guitton, 1969). Isso demonstra que sua presença no peridomicílio parece estar envolvida na epidemiologia da doença, pois, sendo uma fonte atrativa para os vetores, permite sua manutenção no ambiente urbano. Essas observações foram corroboradas por Araújo *et al.* (2000) e Carvalho *et al.* (2000) que, em seus estudos, puderam observar que o número de exemplares capturados no peridomicílio era maior quando utilizavam a galinha como isca.

O uso da PCR em estudos de infecção natural de flebotomíneos vem crescendo, e têm sido desenvolvidas novas padronizações e variações dessa técnica (Paiva *et al.*, 2007). A contaminação é comum nessa técnica, porém pode ser evitada se acompanhada por meio da utilização de rígidos controles negativos e controle interno com base na utilização de iniciadores para amplificar o gene constitutivo específico (cacofonia) de flebotomíneos para a certificação da extração de DNA e confirmação dos resultados negativos (Pita-Pereira *et al.*, 2005). A técnica de Nested PCR dirigida ao gene SSUrRNA amplifica um fragmento de uma região

conservada entre todas as espécies de *Leishmania*. Portanto foi aplicada neste estudo para determinar a infecção natural dos flebotomíneos coletados (Cruz *et al.*, 2002, 2006).

No processo de extração de DNA, foram utilizados apenas o tórax e o abdômen sem a terminália, e as taxas de infecção natural foram calculadas segundo o critério de taxa mínima de infecção, quando se tratava de *pools* de espécimes de uma mesma espécie. Atualmente, esses dois passos metodológicos estão se consagrando como os melhores para esse tipo de estudo (Paiva *et al.*, 2007; Pita-Pereira *et al.*, 2005). Na natureza, a prevalência da infecção por *Leishmania* na população global de flebotomíneos pode ser inferior a 0,1%, mesmo em áreas endêmicas e de alta transmissão.

A infecção de flebotomíneos por *Leishmania* spp. era frequentemente investigada por meio da dissecação do inseto e observação direta do parasito. Porém esse método é laborioso e requer grande habilidade técnica, devido ao tamanho reduzido dos insetos (Oliveira-Pereira *et al.*, 2006). Recentemente, o sequenciamento de fragmentos de DNA obtidos pela amplificação de diferentes genes-alvo tem sido realizado e utilizado junto com o alinhamento das sequências obtidas como uma forma de identificar a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (Parvizi *et al.*, 2008; Medeiros *et al.*, 2008). As fêmeas analisadas para detecção natural por *Leishmania* spp. presentes no estudo apresentaram-se positivas para o gênero *Leishmania*, ficando a taxa mínima de infecção em 25%. A taxa de infecção foi alta, e esse fato pode ser explicado pela utilização do alvo molecular em questão, visto que a técnica de Nested PCR dirigida ao alvo SSUrRNA tem se mostrado sensível (Schonian *et al.*, 2003).

As sequências obtidas pela bioinformática mostram a espécie *Le. infantum* ser a espécie circulante no município de Sabará. Esses dados corroboram estudos anteriores, que apontaram essa espécie de *Leishmania* presente no município (Moreno, 2002; Lima, 2007). Os três *pools* de vetores positivos para *Leishmania* eram de *Lu. longipalpis*.

Em um estudo de caráter epidemiológico, a identificação das espécies vetoras e hospedeiros potenciais, o conhecimento da biologia e a determinação da taxa de infecção natural destes, principalmente nas áreas endêmicas para a leishmaniose, são de fundamental importância para o entendimento da cadeia de transmissão da doença. Os resultados entomológicos deste estudo possibilitam à vigilância entomoepidemiológica acompanhar, de forma contínua, o comportamento

dos vetores na área estudada no município de Sabará, dispondo de informações necessárias para direcionar e orientar, de modo eficaz, a aplicação de medidas preventivas, melhorando a saúde da comunidade.

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

Recentemente, segundo nota técnica do MS, o teste rápido DPP passou a ser o teste de triagem nos inquéritos caninos, e o ELISA, como teste confirmatório do diagnóstico da LVC, porém, neste estudo, a avaliação da soroprevalência no inquérito epidemiológico em Sabará utilizou as técnicas sorológicas (RIFI e ELISA) anteriormente recomendadas pelo MS. A utilização dessa técnica em levantamentos epidemiológicos de infecção canina se torna justificável a partir do momento em que ela for usada com objetivo de detectar o cão parasitado e sua consequente eliminação, contribuindo, assim, para a diminuição das fontes de infecção. Baseado no fato de o cão ser considerado o principal reservatório urbano da doença e a enzootia canina preceder a ocorrência de casos humanos, além de ter maior prevalência (Brasil, 2006), a identificação, remoção e eutanásia do animal com LV é medida recomendada pelo MS para o controle da doença (Alves; Bevilacqua, 2004).

O inquérito censitário canino do município de Sabará, realizado no período de 2011 e 2012, teve a taxa média de positividade canina de 4,25% e 3,34% respectivamente, e média de 3,8%. Em inquérito realizado pelo CCZ de Sabará, 50 cães soropositivos para os testes de RIFI e ELISA foram eutanasiados e amostras de biópsia de pele, linfonodo e baço, e aspirado de medula óssea desses cães foram cedidas para a realização deste estudo.

O diagnóstico preciso da LVC é complexo e requer, frequentemente, o uso de diferentes técnicas, associando métodos sorológicos, parasitológicos e moleculares para a obtenção de um resultado conclusivo. O fato de os cães infectados apresentarem amplo espectro clínico e anormalidades clínico-patológicas diversas e não específicas reforça a necessidade do uso combinado de métodos

laboratoriais para o diagnóstico diferencial da LVC (Alvar *et al.*, 2004; Paltrinieri *et al.*, 2010).

O exame parasitológico direto ou a cultura de aspirado de medula óssea são as principais técnicas usadas para o diagnóstico da LV tanto em humanos como em cães. O exame microscópico de fragmentos de pele ou biópsia de lesão como *imprints*, embora rápido e de baixo custo, tem sensibilidade limitada em virtude da distribuição heterogênea do parasita numa amostra de tecido, particularmente em lesões crônicas (Feitosa *et al.*, 2000).

O teste parasitológico pesquisa diretamente amastigotas. É um método que tem especificidade de 100%, mas a sensibilidade depende do grau de parasitismo em virtude da distribuição heterogênea do parasita, do tipo de material biológico coletado, de seu processamento e coloração, além do observador (Alvar *et al.*, 2004; Tavares *et al.*, 2003). A sensibilidade pode ser de 50% a 83% em amostras de medula óssea e entre 30% a 85% em amostras de linfonodo (Laurenti, 2009). Neste estudo, 66% dos cães foram positivos para essa técnica, sendo esta a menos sensível.

Em muitos casos, especialmente em animais assintomáticos, nos quais apenas poucas formas amastigotas estão presentes nos tecidos, o diagnóstico parasitológico se torna difícil e duvidoso. Segundo Gomes *et al.* (2008), o método parasitológico direto pode fornecer resultados falso-negativos pela possibilidade de baixo número de parasitos em amostras clínicas ou pela dificuldade na identificação morfológica. Os dados coletados nesta pesquisa confirmam os encontrados na literatura, em que o teste parasitológico apresenta uma menor sensibilidade quando comparado aos demais testes diagnósticos (Moreira *et al.*, 2002, Brasil, 2003).

A busca microscópica do parasito ainda permanece como método de referência no diagnóstico da LV, embora necessite de procedimento invasivo, requeira laboratorista experiente, seja laborioso e não apresente sensibilidade ideal (Assis *et al.*, 2008). Devido às dificuldades para a demonstração direta do parasita e pela alta proporção de cães assintomáticos, métodos sorológicos são essenciais para o diagnóstico da LV canina (Rosário *et al.*, 2005). Este estudo concorda com Cakan *et al.* (2010), que observaram que o exame direto não é suficiente como única ferramenta para confirmação de LVC.

A técnica de mielocultura é laboriosa, cara e sujeita a contaminações microbiológicas, entretanto é mais sensível que o exame parasitológico (Manna *et al.*, 2004). A pesquisa direta de amastigotas em mielocultura normalmente

apresenta baixa sensibilidade (Xavier *et al.*, 2006; Alvar *et al.*, 2004; Tavares *et al.*, 2003), porém sofre um incremento quando esses materiais são semeados em meios de cultura (Alvar *et al.*, 2004). De acordo com Madeira *et al.*, (2006) e Maia *et al.* (2009), amostras de baço, linfonodo e medula óssea são os tecidos/órgãos com maiores índices de positividade em cultura. Neste trabalho, optou-se pela utilização unicamente de amostras de medula óssea, uma vez que a coleta desse material é asséptica, diminui a possibilidade de contaminações e aumenta as chances de isolamento. Das 50 amostras, 76% foram positivadas por essa técnica. E esse dado vem confirmar os resultados obtidos no teste de triagem, o que certifica a importância e qualidade dos testes sorológicos.

Segundo Queiroz (2010), quanto mais sintomático for o cão, mais fácil o diagnóstico pelas diferentes técnicas atualmente disponíveis. Vários estudos apontam que os testes aplicados aos cães soropositivos obtiveram um sucesso maior quanto à positividade em cães sintomáticos que assintomáticos (Michalsky *et al.*, 2007; Silva, 2009; Reis *et al.*, 2006). Neste estudo, independente da técnica utilizada (parasitológico direto, mielocultura ou PCR), sempre os cães sintomáticos apresentaram maior positividade nos testes. Com o objetivo de verificar se havia diferença estatística entre grupos de cães sintomáticos e assintomáticos avaliados, por meio dos testes parasitológico direto, PCR e mielocultura, utilizou-se aqui o teste de Fisher e verificou-se que não apresentaram diferença estatisticamente significativa, como representado a seguir: parasitológico direto ($p=0,56$), mielocultura (0,18) e PCR ($p>0,05$). Não foi necessário aplicar estatística na PCR, pois todas as amostras foram positivas.

A amplificação de DNA via PCR se constitui numa alternativa prática e vantajosa, por ser um método altamente sensível e específico na detecção, caracterização e identificação de *Leishmania* spp. em amostras clínicas, reservatórios e vetores infectados (Muller *et al.*, 2003; Weigle *et al.*, 2002, Minodier *et al.*, 1997; Michalsky *et al.*, 2002; Cortes *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2007, Moreira *et al.*, 2007). Embora a PCR exija infraestrutura mais elaborada e alto treinamento técnico, ela se tornou uma ferramenta de grande valia para o diagnóstico e estudos epidemiológicos da LVC.

O sucesso dessa técnica pôde ser observado neste estudo, pois, dos 50 cães analisados, 100% obtiveram positividade confirmada. Dos quatro tecidos utilizados, a PCR positivou pelo menos um. Vários autores já demonstraram que a prevalência da infecção é muito maior que a proporção de cães que apresenta

sintomatologia de LV (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Alvar *et al.*, 2004). Contudo isso pode ser atribuído ao uso da técnica de Nested PCR dirigida ao alvo SSUrRNA utilizado, que vem se mostrando sensível e pode ter favorecido a elevada sensibilidade da PCR (Schonian *et al.*, 2003).

Cakan *et al.* (2010) compararam a PCR com o exame direto e a cultura, confirmando que a técnica molecular apresenta o melhor desempenho. Trabalhos de Assis (2010) também chegam à conclusão que a PCR demonstrou ser o método mais sensível e preciso para o diagnóstico definitivo da LVC.

A PCR apresentou não apenas a positividade em 78% de cães sintomáticos, mas também positivou cães que não tinham a sintomatologia das doenças, estes representando 22%. Cães infectados, mesmo se assintomáticos, podem apresentar grande quantidade de parasitas na pele, fato que favorece a infecção do vetor e, conseqüentemente, a transmissão para o homem (Monteiro *et al.*, 1994; Michalsky *et al.*, 2007).

Devido à ampla variedade de alvos e iniciadores disponíveis no diagnóstico molecular, ainda não há um procedimento padrão-ouro, o que dificulta a inserção desse ensaio na rotina dos serviços de saúde (Cakan *et al.*, 2010).

Os dados deste trabalho corroboram Moreira *et al.* (2007), que compararam a eficácia de métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares em diagnosticar cães com diferentes sinais clínicos. Segundo os autores, os resultados obtidos das amostras de aspirado de linfonodo pela PCR apresentaram sensibilidade de 100% para cães sintomáticos, 96% para oligossintomáticos e 95,5% pra assintomáticos. De acordo com os resultados deste trabalho, a PCR demonstrou ser a mais sensível das técnicas analisadas, indicando ser esse método muito eficiente para o diagnóstico da LVC.

Os resultados da PCR variaram entre os tecidos dos cães necropsiados (baço, medula, linfonodo mesentérico e pele). O linfonodo apresentou a maior positividade, representando 98%, seguido de baço (96%), pele (88%) e medula (78%). Com o objetivo de calcular se houve diferença entre tecidos usados na PCR, para verificar se um tecido é melhor que os outros, objetivando reduzir o consumo de material e carga de trabalho, foi utilizado nesta pesquisa o teste qui-quadrado pareado de McNemar, e verificou-se que o linfonodo se mostrou o órgão mais sensível, pois apresentou a maior positividade (98%). Entretanto não houve diferença estatística entre os tecidos analisados, somente entre baço e medula ($p=0,022$). Esses dados vão ao encontro da anamnese realizada durante à

necropsia, em que a linfadenopatia foi descrita em 100% dos cães, sendo compatível com a elevada detecção de infecção na PCR no tecido linfonodo, órgão escolhido para busca de *Leishmania* presente na comunidade canina de Sabará. Moreira *et al.* (2007) corroboram os resultados deste trabalho, indicando o linfonodo como tecido apresentando grande positividade.

Gomes e colaboradores (2007), trabalhando com cães provenientes do estado de São Paulo, encontraram uma concordância de 95% entre os métodos parasitológico (isolamento em cultura e exame de lâmina) e molecular (PCR) no grupo de cães sintomáticos; para o grupo de cães assintomáticos, a concordância entre esses métodos foi de 90%. Quando, nesta pesquisa, foi avaliada a distribuição de frequência de resultados cumulativos pelas técnicas de exame parasitológico direto, PCR e mielocultura dos cães assintomáticos e sintomáticos, apenas 54% do total de amostras foram confirmados pelos três testes diagnósticos. Foram confirmados 34% em dois testes e apenas 12% foram confirmados por um teste. Os resultados deste estudo revelaram que apenas a PCR como prova diagnóstica, quando testada isoladamente, identificou adequadamente os cães com LV. A PCR foi responsável por positivar todos os cães e tem demonstrado ser uma técnica altamente sensível para o diagnóstico da LV, entretanto os testes parasitológicos (mielocultura e *imprints* em lâmina), mesmo sendo de baixa sensibilidade, são padrão-ouro pela possibilidade de se observar o parasito. Assim, existe a possibilidade de algumas amostras serem falso-positivas e a PCR ter reação cruzada com outras doenças, o que leva à busca por outras técnicas diagnósticas mais precisas.

O quadro clínico da LVC observado varia de cães aparentemente saudáveis a aqueles com manifestações severas da doença (Sanchis *et al.*, 1976; Lanotte *et al.*, 1979). Molina *et al.* (1994) demonstraram que a infectividade dos cães com LVC não está exclusivamente ligada ao estágio sintomático da doença. Entretanto, epidemiologicamente, é necessário considerar que cães soropositivos são capazes de infectar flebotomíneos indiferentemente da presença de sintomas (Michalsky *et al.*, 2007).

Diagnosticar clinicamente a LVC é um problema para as autoridades de saúde, primeiro devido à amplitude de sinais e sintomas que são observados nessa doença, tais como febre, emagrecimento, linfadenopatia, alterações de pele e olhos, insuficiência renal, anemia, epistaxe e onicogribose. Em segundo lugar, os animais podem se apresentar aparentemente saudáveis, com poucos sintomas, permanecendo

assintomáticos por longos períodos ou por toda a vida, ou até com a sintomatologia grave da doença (Silva, 2007).

Na avaliação clínica realizada nos 50 cães soropositivos do estudo, observou-se que 11 desses não apresentavam nenhum sinal clínico compatível com as alterações causadas pela LV e 39 cães tinham sinais clássicos da LV. Alterações clínicas apresentadas pelos animais com LVC foram anteriormente verificadas no Brasil por Feitosa *et al.* (2000), onde em 20% dos animais sororreativos para LV foi observado algum tipo de sinal clínico compatível com alterações provocadas pela doença, sendo os sinais mais frequentes a onicogribose (72%) entre os animais soropositivos, seguido de conjuntivite e emagrecimento, ambos com 36%.

Para Lima *et al.* (2004), na LVC, as alterações em órgãos linfoides são as lesões mais frequentes. Neste estudo, foi encontrado nos cães soropositivos de Sabará que a principal alteração provocada pela LVC foi linfadenopatia, em 100% dos cães, seguido de onicogribose, emagrecimento, dermatite e hiperqueratose, corroborando os resultados de Moreira *et al.* em 2007. Infelizmente, o diagnóstico clínico isoladamente não é bastante para identificar um cão infectado (Camargo; Langoni, 2006), tornando o emprego de exames laboratoriais de suma importância para confirmação diagnóstica (Brasil, 2006).

O diagnóstico da LVC representa, em si, um grande desafio, pois não existe um único método que seja simples, de baixo custo, reprodutível, sensível e específico para diagnosticar os vários estágios da doença. No entanto, neste estudo, percebeu-se que a PCR foi a técnica mais sensível, seguida da mielocultura, que ficou empatada com o exame clínico, e, por fim, em último, o exame parasitológico. Esses dados mostram a necessidade do contínuo desenvolvimento de técnicas de detecção da LVC que alcancem elevadas sensibilidade e especificidade para que possam ser empregadas na rotina de vigilância epidemiológica. O uso da sorologia para o diagnóstico das infecções por *Leishmania* em cães é questionado e sugere a PCR como o diagnóstico mais preciso para definir a infecção por esse parasita, quando comparado à cultura ou à inoculação em *hamster* (Ashford *et al.*, 1995). A PCR mostra ser mais sensível que qualquer método parasitológico convencional no diagnóstico de leishmaniose (Marques *et al.*, 2001)

Várias pesquisas utilizam sequenciamento de DNA ou RNA para identificação e caracterização genômica das espécies de *Leishmania* (Blackwell, 1992). O sequenciamento do DNA do cinetoplasto, utilizando produtos de extensão de *primers* por PCR, é realizado para caracterização da espécie da *Leishmania*

(Minodier *et al.*, 1997; Medeiros *et al.*, 2002). Essa técnica tem sido amplamente explorada em busca de mais informações sobre a sequência de DNA de *Leishmania*, a fim de aperfeiçoar o diagnóstico e a identificação das espécies (Schalling; Oskam, 2002). O projeto genoma de *Leishmania* veio acumulando informações acerca da estrutura e organização genômica e já tem seus dados armazenados em bancos *on-line* (Peacock *et al.*, 2007).

Para a identificação da espécie de *Leishmania* das amostras dos cães presentes neste estudo, foi realizada a reação de sequenciamento do produto amplificado da segunda reação da Nested PCR, sendo concluído pelo programa BLAST para o alinhamento das sequências obtidas com as sequências do GenBank. A caracterização enzimática das amostras de linfonodo isoladas dos cães soropositivos da área estudada no município de Sabará evidenciou que a espécie de *Leishmania* circulante nos reservatórios no município de Sabará é *Le. infantum* (sin. *Le. chagasi*), assim como em outros focos de LV, em diversas regiões do Brasil.

Por meio desses resultados, enfatiza-se a importância do conhecimento da situação epidemiológica da LV no município de Sabará, tanto em relação ao melhor entendimento do papel do cão como reservatório doméstico quanto à sua interação com o meio ambiente e os vetores da doença. Portanto esses resultados poderão contribuir para o fornecimento de subsídios para complementação de ações de controle e vigilância epidemiológica não só no município como em outras áreas endêmicas da doença.

A soroprevalência canina fazendo-se alta se torna iminente para o surgimento de novos casos humanos, e isso normalmente ocorre por falta de estratégias eficazes dos órgãos competentes, tanto no diagnóstico, que deveria ser realizado de maneira sistemática, quanto na retirada e eutanásia dos cães. Muitos moradores colaboram com a problemática, não permitindo a retirada dos cães soropositivos do imóvel. (Reithinger; Davies, 1999, Ashford, 2000, Silva *et al.*, 2001; Cabrera *et al.*, 2003).

O georreferenciamento como ferramenta em estudos epidemiológicos vem sendo cada vez mais explorada e aprimorada, permitindo uma melhor compreensão da distribuição de doenças (Carvalho; Souza-Santos, 2005; Rinaldi *et al.*, 2006). O georreferenciamento dos cães e flebotomíneos positivos para LV bem como dos casos humanos de leishmanioses no município de Sabará demonstrou a existência de focos da doença na área estudada. Na FIG. 31, é possível observar que os oito bairros presentes no estudo mostraram uma distribuição abrangente de

vetores e hospedeiros. Podem-se apontar como área de risco os bairros Alvorada e Nova Vista, pois estes apresentam a cadeia completa para transmissão da LV (casos humanos recentes, casos caninos e a presença do vetor *Lu. longipalpis*), embora não ter sido encontrado esse vetor infectado naturalmente.

Também podem ser considerados como possíveis áreas de risco os bairros Rio Negro, Casa Branca e Novo Alvorada, pois estes apresentaram *Lu. longipalpis* infectados e casos caninos recentes. Não foi identificada notificação de casos humanos nessa área, entretanto é provável o surgimento de casos, pois a literatura deixa claro que os casos caninos precedem os casos humanos, já que os cães são os principais reservatórios domésticos e são fundamentais na manutenção do ciclo da doença (Santa Rosa; Oliveira, 1997).

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

No geral, a área estudada apresenta grande relevância em relação à transmissão da LV, pois apresenta casos caninos dispersos por todos os bairros que a compõe, flebotomíneos vetores de LV (*Lu. longipalpis* em abundância: 95%) foram capturados em todos os bairros estudados, tanto no peridomicílio quanto no intradomicílio, além de encontrados vetores infectados naturalmente e casos humanos diagnosticados nos anos de estudo.

Portanto as ações de controle devem ser direcionadas de forma mais efetiva (controle do vetor, eliminação de cães soropositivos e tratamento dos casos humanos), conforme preconizado pelo Ministério da Saúde, principalmente para os bairros Nova Vista e Alvorada, onde foram diagnosticados casos humanos; e também devem ser realizadas ações de vigilância epidemiológica regularmente em toda a área estudada, devido à presença de cães soropositivos e vetores (*Lu. longipalpis*) infectados naturalmente ou não.

7 CONCLUSÕES

- A fauna flebotomínica no município de Sabará foi constituída de quatro espécies, sendo a *Lu. longipalpis* a predominante, com 95%, dos exemplares capturados.
- Devido ao grande número de exemplares de *Lu. longipalpis* capturados no município de Sabará e sua implicação na literatura como vetor natural da doença, acredita-se ser esta espécie a responsável pela transmissão da LVC no município.
- O grande número de *Lu. longipalpis* capturados no intradomicílio (23%) sugere a adaptação desse vetor ao ambiente doméstico, contribuindo para que a transmissão possa também estar ocorrendo no interior das residências.
- A correlação dos flebotomíneos capturados com os fatores climáticos apenas demonstrou uma tendência no aumento destes dois meses após o período chuvoso.
- A espécie de *Leishmania* circulante nos vetores e reservatórios domésticos no município de Sabará foi a *Le. infantum*.
- A taxa média de positividade para LVC, em torno de 3,8% nos anos de estudos, confirma o cão doméstico como um importante elo no ciclo de transmissão da doença no município.
- Houve uma tendência de cães sintomáticos apresentarem mais resultados positivos nos testes parasitológicos e moleculares em relação aos assintomáticos.
- A presença do vetor *Lu. longipalpis* e cães infectados por *Le. infantum* nos bairros estudados sugere que o ciclo da LV em Sabará tenha um perfil urbano e ativo de transmissão.
- Os bairros Alvorada e Nova Vista podem ser apontados como áreas de maior risco por apresentarem casos humanos, cães e *Lu. longipalpis* positivos para *Le. infantum*.
-

8 ANEXO

8.1 Certificado CEUA/Fiocruz



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-11/10

Certificamos que o protocolo (P-28/10-3), intitulado "Epidemiologia da Leishmaniose Visceral no município de Sabará, Região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.", sob a responsabilidade de ERIKA MICHALSKY MONTEIRO, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 24/05/2013 e inclui o uso total de :

Canis familiaris

- 50 Machos.

Rio de Janeiro, 24 de maio de 2010

**Drª Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora**

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manginhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

9 REFERÊNCIAS

- Adler S, Theodor O. Investigations on Mediterranean kala-azar. II- *Leishmania infantum*. Proc. R. Soc. Lond. 1931 B: 108: 453-502.
- Afonso MMS. Estudos sobre algumas populações brasileiras de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): morfologia, morfometria e hábitos alimentares [Dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2008.
- Aguiar GM, Vilela ML, Lima RB. Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1987; 82: 583-584.
- Aguiar GM, Vilela ML, Schuback P, Soucasaux T, Azevedo ACR. Aspectos da ecologia dos flebotomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. IV. Frequência mensal em armadilhas luminosas (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1985; 80: 465-482.
- Alencar IE. Calazar canino: contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. Fortaleza: Imprensa Oficial; 1959.
- Alencar JE. Leishmaniose visceral no Brasil. Revista Med. Un. Fed. Ceará. 1977-1978; 17-18: 129-48.
- Alexander B, Usma MC. Potential source of sugar for the phlebotomine sand fly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 1994; 88: 543-49.
- Al-Jurayyan NA, Al-Nasser MN, Al-Fawaz IM, Al-Ayed IH, Al-Herbish AS, Al-Mazrou AM *et al*. The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. J Trop Pediatr. 1995; 41(3): 143-48.
- Almeida MAO, Jesus EEV, Sousa-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Veterinary Parasitology. 2005; 127: 227-32.
- Alvar J, Canavate C, Molina R, Morene J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. Advances in Parasitology. 2004; 57: 1-88.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J *et al*. WHO. Leishmaniasis control team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PloS. 2012; 1(7): e35671.
- Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. Trends Parasitol. 2006; 22(12): 552-57.
- Alvar J, *et al*. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. Clin Microbiol. 2008; 21(2): 334-59.

Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad. Saúde Pública*. 2004; 20(1): 259-65.

Ambroise-Thomas P. Emerging parasites zoonosis: the role of host-parasite relationships. *Int. J. Parasitol.* 2000; 30: 1361-67.

Andrade HM, de Toledo VP, Marques MJ, França Silva JC, Tafuri WL, Mayrink W, Genaro O. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Vet. Parasitol.* 2002, 103(1-2) 71-81

Antinori S, Calattini S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Magni C *et al.* Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV - infected and HIV - uninfected patients: a single-center, 8 - year experience in Italy and review of the literature. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007; 44(12): 1602-10.

Araújo JC, Rebêlo JMM, Carvalho ML, Barros VLL. Composição dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) do Município de Raposa-MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. *Entomología y Vectores*. 2000; 7(1): 33-47.

Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulálio C *et al.* Comparison of the polymerase chain reaction and serology for detection of canine visceral

Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinic in Dermatology*. 1996; 14: 523-32.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal of Parasitology*. 2000; 30(12-13): 1269-81.

Assis TSM, Braga ASC, Pedras MJ, Barral AM, Siqueira IC, Costa CHN *et al.* Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2008; 17(2), 107-16.

Assis J, Queiroz NM, Silveira RC, Nunes CM, Oliveira TMFS, Noronha-Junio ACF *et al.* Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal. 2010 jan.-mar.; 19(1): 17-25.

Azevedo ACR, Bessa-Luz S, Vilela ML, Rangel EF. Studies on the sandfly fauna of Samuel Ecological Station, Porto Velho Municipality, Rondônia State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1993; 88: 509-12.

Badaró RD, Benson MC, Eulálio M, Freire S, Cunha EM, Netto D *et al.* rK39: a cloned antigen for *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 1996; 173: 758-61.

Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A *et al.* New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 1986; 154, 1003-11.

Badaró R, Duarte MIS. Leishmaniose visceral (calazar). In: Veronese R, Focacci R. *Tratado de Infectologia.* (v. 2). São Paulo: Atheneu; 1996, p. 1234-59.

Badaró R, Lourenço R, Carvalho EM, Teixeira R, Cerf B, Jones TC. 1983. Estudo longitudinal soro epidemiológico de leishmaniose visceral americana (LVA) em área endêmica de Jacobina-BA. In: *Reunião Anual sobre Doenças de Chagas.* 10, Caxambu.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 2008; 24(7): 324-30.

Barata RA, França-Silva JC, Fortes-Dias CL, Costa RT, Silva JC, Vieira EP *et al.* Phlebotomines sand flies in Porteirinha, an endemic área of American visceral leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2004; 99: 481-87.

Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES *et al.* Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2005; 38(5): 421-25.

Barata RA, França-Silva JC, Silva JC, Almeida SN, Teixeira LAS, Dias ES. Controle da leishmaniose visceral no município de Porteirinha, Estado de Minas Gerais, no período de 1998 a 2003. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2011; 44(3): 386-88.

Basimike M, Mutinga MJ, Kumar R. Distribution of sandflies (Diptera: Psychodidae) in three vegetation habitats in the Marigat area, Baringo district, Kenya. *J. Med. Entomol.* 1991; 28: 330-333.

Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. *Journal of clinical microbiology.* 2008; 46(6): 1897-900.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sandflies. *Int. J. of Parasitology.* 2007; 37(10): 1097-106.

Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez ID. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban Leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2002; 97(5): 645-47.

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

Blackwell JM. Leishmaniasis epidemiology: all down to the DNA. *Parasitology, Cambridge.* 1992; 104: s19-s34.

Boelaert M, El-Safi S, Hailu A, Mukhtar M, Rijal S, Sundar S *et al.* Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102: 32-40.

Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JK, Hostetter JM, Mullin K *et al.* Transplacental transmission of leishmania infantum as a means for continued disease incidence in North America. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 2011; 5(4): e1019.

Boraschi CSS, Nunes CM. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. *Clínica Veterinária.* 2007; 71: 44-8.

Borja-Cabrera GP, Correia-Pontes NN, Silva VO, Paraguai-de-Souza E, Santos WR, Gomes EM *et al.* Long-lasting protection against canine kala-azar using the FML-Quil A saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine.* 2002; 20: 3277-84.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Regulamento técnico para pesquisa, desenvolvimento, produção, avaliação, registro e renovação de licenças, comercialização e uso de vacina contra a leishmaniose visceral canina. Brasília: MAPA; 2007.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de controle da leishmaniose visceral: série A: normas e manuais técnicos. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2003.

Brasil, Ministério da Saúde (MS). Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota de esclarecimento sobre as vacinas antileishmaniose visceral canina registradas no MAPA. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica vacina antileishmaniose visceral canina Leishmune®. Brasília; Ministério da Saúde; 2005.

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

Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in Hematology. Clin. Chemistry. 2000; 46(8)(B): 1221-29.

Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AVM *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. Rev. Inst. Med. Trop. 2003; 45(2): 79-83.

Cakan H, Saribas S, Oz V, Polat E, Aslan M, Kocazeybek B. Patients with suspected visceral leishmaniasis in Istanbul. African J. Microbiology Research. 2010; 4: 103-9.

Caldas AJM, Costa JML, Silva AAM, Vinhas V, Barral A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2001; 95: 1-8.

Caldas AJ, Costa J, Aquino D, Silva AA, Barral-Neto M, Barral A. Are there differences in clinical and laboratory parameters between children and adults with American visceral leishmaniasis? Acta Trop. 2006; 97(3), 252-58.

Caldas AJM, Costa JML, Silva AAM, Vinhas V, Barral A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in North-East Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2002; 96(1): 21-8.

Camargo LB, Langoni H. Impact of leishmaniasis on public health. Journal of Venomous Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. 2006; 12(4): 546.

Camargo ME, Rebonato C. Cross reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. Am. Journal of Trop. Med. Hygiene. 1969; 18(4), 500-05.

Camargo-Neves VLF, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spínola RMF *et al.* Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana - Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. Cad. Saúde Pública. 2001; 17(5): 1263-67.

Camargo-Neves VLF, Gomes AC, Antunes JLF. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no estado de São Paulo, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 2002; 35: 299-306.

Cameron MM, Pessoa FA, Vasconcelos AW, Ward RD. Sugar meal sources for the phlebotomine sandflies *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil. Med. and Vet. Entomology. 1995; 9: 263-72.

Campino L, Abranches P. Cutaneous leishmaniasis. Unusual disease in Portugal? Acta Med Port. 2002; 15: 387-90.

Carvalho GML. Flebotomíneos vetores e prevalência da leishmaniose visceral canina, em área endêmica do município de Santa Luzia, Região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais/Brasil. [Dissertação]. Belo Horizonte: Curso de Pós-

- Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz; 2006.
- Carvalho ML, Rebêlo JMM, Araújo JC, Barros VLL. Aspectos ecológicos dos flebotomíneos (Díptera, Psychodidae) do Município de São José de Ribamar, MA, Brasil. Área endêmica de leishmanioses. *Entomologia y Vectores*. 2000; 7: 19-32.
- Carvalho MSM, Souza-Santos R. Análises de dados especiais em saúde pública: métodos, problemas, perspectivas. *Card. Saúde Públ*. 2005; 21: 361-78.
- Chaniotis BN, Neely JHMA, Tesh RB, Johnson KM. Natural populations dynamics of phlebotomine sandflies in Panamá. *J. Med. Ent*. 1971; 8: 339-52.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghabib H, Rijal S, Peeling RW *et al*. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol*. 2007; 5(11): 873-82.
- Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ*. 2006; 333(7571):723.
- Coelho EA, Tavares CA, Carvalho FA, Chaves KF, Teixeira KN, Rodrigues RC *et al*. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immunology*. 2003; 71(7): 3988-94.
- Comer JA, Brown J. Use of hollow trees as diurnal resting shelter by *Lutzomyia shannoni* (Diptera, Psychodidae) on Ossabaw island, Georgia. *Environmental Entomology*. 1993; 20: 613-17.
- Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani*. I. - specific kinetoplastid primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 2004; 98(1): 12-17.
- Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Pelaez D, Diaz A, Montilla M *et al*. *Didelphis marsupialis*: an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani* chagasi in Colombia, South America. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 1989; 83: 195.
- Costa AC, Genaro O, Lana M, Magalhães PA, Dias M, Michalick SMM *et al*. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 1991; 24: 21-25.
- Costa CHN, Pereira HF, Araujo MV. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Rev. Saúde Públ., São Paulo*. 1990; 24: 361-72.
- Costa CHN, Vieira JBF. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2001; 34: 223-28.

Coutinho MT, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M *et al.* Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 2005; 128(1-2): 149-55.

Coutinho MT, Linardi PM. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Veterinary Parasitology*. 2007; 147(3-4): 320-25.

Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Dye C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. *Parasitology*. 2002; 125: 407-14.

Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res*. 2006; 123(3): 357-88.

Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F *et al.* A nested polymerase chain reaction (Ln- PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in coinfecting patients with human immunodeficiency virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2002; 96: 185-89.

Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Cañavate C, Figueras MC *et al.* Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 2343-47.

Cunha AM, Chagas E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem (nota prévia). *Hospital*. 1937; 11: 5-9.

Da Silva VO, Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, Paraguai-de-Souza E, Luz KG, Palatnik M *et al.* A phase III Trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine*. 2001; 19(9-10): 1068-81.

Da Costa-Val AP, Cavalcanti RR, Gontijo NF, Michalick MSM, Alexander B, Williams P, Melo MN. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet. J.* 2007; 174(3) 636-643.

David JR, Stamm LM, Bezerra HS, Souza RN, Killick-Kendrick R, Lima JWO. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2001; 96(6): 839-47.

Deane LM, Deane MP, Alencar JE. Tipo de região e prevalência de leishmaniose visceral em uma região endêmica do Ceará. *Rev. Paul. Med.* 1955; 46: 130-31.

Deane LM, Deane MP. Encontro de cães naturalmente infectados pela leishmânia donovani, no Ceará. *Hospital*. 1954a; 45: 703-07.

Deane LM, Deane MP. Encontro de leishmânias nas vísceras e na pele de urna raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. *Hospital*. 1954b; 45: 419-21.

Deane LM, Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*; 1962; 4: 198-212.

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

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection typing of *Leishmania*: a mini review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1994; 89: 463-69.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2004; 27(5): 305-18.

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc TropMed Hyg*, 2001; 95: 239-243.

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

Dias FOP, Lorosa ES, Rebêlo JMM. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad. Saúde Públ.* 2003; 19(5): 1373-80.

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

Dish J, Maciel FC, Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnostics of human infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2003; 97: 1-5.

Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; 55: 125-30.

Dye C, Williams B. Malnutrition, age and the risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited. *Proced. R. Soc. Lond. B.* 1993; 254: 33-39.

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

Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). *Rev. Clínica Vet.* 2000; 5(28): 36-43.

Feliciangeli MD. Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in the northern Venezuela. IV - Sandfly monthly fluctuation and leishmaniasis incidence relationship. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1987; 82: 177-79.

Feliciangeli MD, Maroli M, Wheeler A, Towson H, Ward R, Maigon R. Sandfly control trial with deltamethrin impregnated curtains in El Ingenio, Miranda State, Venezuela. *Bo. Dir. Marlariol. y San. Amb.* 1995; 35(supl. 1): 127-32.

Fernandes AP, Costa MMS, Coelho EAF, Michalick MSM, Freitas E, Melo MN *et al.* Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine.* 2008; 26(46), 5888-95.

Fernandes CB, Junior JT, de Jesus C, Souza BM, Laranjeira DF, Fraga DB, Tavare Veras OS, Barrouin-Melo SM. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic áreas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. *Vaccine.* 2014; 32(11) 1287-1295.

Forattini OP. Novas observações sobre a biologia de flebótomos em condições naturais (Diptera, Psychodidae). *Arq. Hig. Saúde Públ.* 1960; 25: 209-15.

Forattini OP, Pattoli DBG, Tabeto EX, Ferreira OA. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Públ.* 1972; 6(3), 255-61.

Forattini OP. Nota sobre criadouros naturais de flebótomos em dependências peridomiciliares no Estado de São Paulo. *Arq. Fac. Hig. S. Públ. Univ. São Paulo.* 1953; 7: 158-67.

Freitas JC, Nunes-Pinheiro DC, Neto B, Santos G, Abreu C, Braga R, Campos R, Oliveira L. Alterações clínicas e laboratoriais em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012; 45(1): 24-9.

Galati E, Nunes VLB, Rego-Jr FA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Saúde Públ.* 1997; 31: 378-90.

Galimbertti MZ, Katz G, Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Casanova C, Costa IP *et al.* Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1999; 32(supl. 1): 217-18.

Gavvani ASM, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomized trial. *The Lancet*. 2002; 360: 374-79.

Genaro O, Da Costa CA, Williams P, Silva JE, Rocha NM, Lima SL *et al*. Ocorrência de calazar em área urbana da Grande Belo Horizonte, MG. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1990; 23: 121.

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

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

Genaro O, Hermeto MV, Chaves KM, Michalick MSM, Costa CA, Toledo VPC *et al*. Eco-epidemiological aspects of the leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Brazil. In: *Research and Control of Leishmaniasis in Brazil*, Recife. Proceedings of a National Workshop. 1993; 67-81.

Gomes AC, Galati EAB. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana: capacidade vetorial flebotomínea em ambiente florestal primário do Sistema da Serra do Mar, região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Públ.* 1989; 23: 136-42.

Gomes AC. Sand fly vectorial ecology in the State of São Paulo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1994; 89(3): 457-60.

Gomes AHS, Ferreira IMR, Lima MLSR, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MFL *et al*. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 2007; 144: 234-41.

Gomes YM, Cavalcanti MP, Lira RA, Abath FG, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet. J.* 2008; 175(1): 45-52.

Gontijo CMF, Melo NM. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.* 2004; 7(3): 338-49.

Grimaldi JG, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of geographical distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1989; 41: 687-725.

Grimaldi JR, Teva A, Ferreira AL, Dos Santos CB, Pinto IS, De-Azevedo CT *et al*. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP(R) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2012; 106(1), 54-59.

Guimarães MC, Celeste BJ, Franco EL. Diagnostic performance indices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis sera from

northern and northeastern Brazil. Bulletin of the World Health Organization. 1990; 68: 39-43.

Gurumurthy S, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. Parasitol Res. 2012; 110: 1065-78.

Hermont VJ. Leish-tec: vacina recombinante contra leishmaniose visceral canina: manual técnico. 1. ed. Juatuba: Hertap Calier Saúde Animal; 2008. [acesso em 12 dez. 2013]. Disponível em: <http://www.hertapecalier.com.br/images/arqConteudo/4900aabb8f1dc.pdf>.

Hommel M, Jaffe CL, Travi B, Milon G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. Ann. Trop. Med. Parasitol. 1995; 89: 55-73.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas). Sabará. Rio de Janeiro, Brasil; 2013. [capturado 16 dez. 2013]. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=315670&search=minas-gerais|sabara>.

Kelly DW, Dye C. Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Anim. Behav. 1997; 53(4): 721-31.

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Killick-Kendrick C, Focheux J, Dereure M, Puech P *et al.* Protection of dogs from bites of phlebotomus sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. Med. Vet. Entomol. 1997; 11: 15-21.

Killick-Kendrick R, Rioux JA. Intravectorial cycle of *Leishmania* in the sandflies. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 1991; 66(suppl.1): 71-74.

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

Kumar R, Nylén S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. Front Immunol. 2012; 3: 251.

Kumar R, Pai K, Pathak K, Sundar S. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2001; 8: 1220-24.

Lacerda M. The Brazilian leishmaniasis control program. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1994; 89: 489-95.

Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, Dedet JP *et al.* Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. Parasitology. 2002; 125(3): 197-207.

Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin JM, Oziol E *et al.* Optimized PCR using patient blood sample for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 236-40.

Lainson R, Dye C, Shaw JJ, Macdonald DW, Courtenay O, Souza AA *et al.* Amazonian visceral leishmaniasis: distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1990; 85: 235-37.

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2005; 100(8): 811-27.

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* e a eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana (LVA) no Brasil. In: RANGEL EF, LAINSON, R. (Eds.). *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003, p. 311-36.

Lainson R, Shaw JJ, Lins ZC. Leishmaniasis in Brazil. IV. The fox, *Cerdocyon thous* as a reservoir of *Leishmania donovani* in Pará State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1969; 63: 741-45.

Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Ribeiro RS, Silveira FT. Leishmaniasis in Brazil. XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1985; 79: 223-26.

Lainson R, Shaw JJ. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* (Cunha and Chagas) in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). *Ann Parasitol Hum Comp.* 1988;63(2):134-45.

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

Lanotte G, Rioux JA, Crosset H, Vollhardt Y. Écologie des leishmanioses dans le Sur de la France: les formes évolutives de la leishmaniose visceral canine. Élaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Annales de Parasitologie.* 1979; 54: 277-95.

Laurenti MD. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. *Bepa.* 2009; 6: 13-23.

Leão RNQ. *Doenças infecciosas e parasitárias, enfoque amazônico*. Belém: Cepuj; 1997, p. 885.

Lima WG. Leishmaniose visceral canina: estudo quantitativo e comparativo da expressão do receptor do complemento do tipo 3 (cr3 – cd11b/cd18) com alguns aspectos histológicos e parasitológicos do baço, fígado e linfonodos de cães

naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.

Lima WG, Michalik MSM, Melo MN, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop.* 2004; 92: 43-53.

Lins RM, Oliveira SG, Souza NA, Queiroz RG de, Justiniano SC, Ward RD *et al.* Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sand flies. *Insect. Mol. Biol.* 2002; 11: 117-22.

Lipoldová M, Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat. Rev. Genet.* 2006; 7: 294-305.

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

Luiz ZMP, Pimenta DN, Cabral AL, Fiuza VD, Raello A. A Urbanização das Leishmanioses e a baixa resolutibilidade diagnóstica em mamíferos da Região Metropolitana de Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001; 34: 249-54.

Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KW, Jirku M, Chocholova E, Haralambous C, Pratlong F, Obornik M, Horak A, Ayala FJ, Miles MA. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 9375-80

Luppi MM, Malta MCC, Silva TMA, Silva FL, Motta ROC, Miranda I *et al.* Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. *Veterinary Parasitology.* 2008; 55(1-2): 146-51.

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

Luz E, Membrive N, Castro EA, Dereure J, Pratlong E, Dedety A, *et al.* *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná state, Southern Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2000; 94: 623-31.

Luz ZMP, Schall V, Rabêllo A. Evaluation of a pamphlet of visceral leishmaniasis as a tool for providing disease information to healthcare professionals and laypersons. *Cad. Saúde Púb.* 2005; 21(2): 606-21.

Maciel BL, Lacerda HG, Queiroz JW, Galvão J, Pontes NN, Dimenstein R *et al.* Association of nutritional status with the response to infection with *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Méd. Hyg.* 2008; 79(4): 591-98.

- Madeira MF, Schubach A, Schubach TM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA *et al.* Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.* 2006; 100(5): 442-45.
- Magalhães PA, Mayrink W, Costa CA, Melo MN, Dias M, Batista SM *et al.* Calazar na Zona do Rio Doce - Minas Gerais: resultados de medidas profiláticas. *Rev. Inst. Med. Trop.* 1980; 22: 197-202.
- Magnarelli LA, Modi GB. Caloric determination of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 1988; 20: 568-69.
- Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology.* 2008; 158(4): 274-87.
- Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet. J.* 2009; 179(1): 142-44.
- Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad. Saúde Públ.* 2008; 24(12): 2941-47.
- Mangabeira FO. Sobre duas novas espécies de *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1938; 33(3): 349-56.
- Manna L, Vitale F, Reale S; Caracappa S, Pavone LM, Della Morte R *et al.* Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 2004; 125: 251-62.
- Manzilo V, Oliva G, Pagano A, Manna L, Maroli M, Gradoni L. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Vet. Parasitol.* 2006; 142: 142-45.
- Marques MJ, Volpini AC, Genaro O, Mayrink W, Romanha AJ. Simple form of clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001; 65(6): 902-06.
- Martins AV, Barreto MP, Brener Z, Pellegrino J. Observações preliminares sobre um foco de leishmaniose tegumentar americana em Minas Gerais. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.* 2006; 8: 577-81.
- Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJ, Amendoeira MR. Leishmaniose visceral (calazar). *J. Bras. Med.* 1981; 41(5): 61-84.
- Marzochi MCA. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro - Brasil. *Cad. Saúde Públ.* 1985; 1: 432-46

- Mauricio IL, Stohard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*. 2000; 16: 188-89.
- Medeiros AR, Silva Jr WA, Roselino AM. DNA sequencing confirms the involvement of *Leishmania (L.) amazonensis* in american tegumentary leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. *Clinics*. 2008; 64: 451-56.
- Medeiros ACR, Rodrigues SS, Roselino AMF. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of leishmania for the diagnosis of american cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002; 35(4), 421-24.
- Memmott J. Sandfly distribution and abundance in a tropical rain forest. *Med Vet Entomol.* 1991; 5: 403-11.
- Michalick MSM, Genaro O. Leishmaniose visceral americana. In: Neves DP (ed.). *Parasitologia humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu; 2005, p. 67-83.
- Michalsky ÉM. Aspectos entomológicos associados à transmissão de leishmaniose visceral canina no Município de Montes Claros, Minas Gerais. [Dissertação]. Uberaba: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro; 2004.
- Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, França-Silva JC, Rocha MF, Barata RA, Dias ES. Association of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) population density with climate variables in Montes Claros, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009; 104(8), 1191-93.
- Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES. Assessment of PCR in the Detection of *Leishmania* spp. in Experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev. Inst. Med. Trop.* 2002; 44(5): 255-59.
- Michalsky ÉM, França-Silva JC, Barata RA, Lara-Silva FO, Loureiro AMF, Fortes-Dias CL *et al.* Phlebotomine distribution in Janaúba, na area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009; 104(1): 56-61.
- Michalsky ÉM, Guedes KS, Silva FOL, França-Silva JCD, Fortes-Dias CL, Barata RA *et al.* Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2011; 44(1), 58-62.
- Michalsky ÉM, Rocha MF, Lima ACVMR, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS *et al.* Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet. Parasitol.* 2007; 147: 67-76.
- Minodier P, Robert S, Noël G, Blanc P, Retornaz K, Garnier JM. First-line liposomal amphotericin B for pediatric visceral leishmaniasis in southern France. *Arch. Pediatr.* 2005; 12(7): 1102-08.

Minodier P, Piarroux R, Gambarelli F, Joblet C, Dumon H. Rapid identification of causative species in patients with old world leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(10): 2551-55.

Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniasis: new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.* 2008; 24(8): 371-77.

Miscevic Z. Dependence of the flight of sandflies (Diptera, Phlebotomidae) in artificial light on the temperature and relative humidity. *Acta Veterinaria.* 1981; 31: 32-39.

Missawa NA, Dias ES. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Várzea Grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2007; 102(8): 913-18.

Missawa NA, Lorosa ES, Dias ES. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008; 41(4): 365-68.

Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andres M, Gonzalez F, Castillo JA *et al.* Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994; 88(4): 491-93.

Monteiro SP, Lacerda MM, Arias JR. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1994; 1(27): 67-72.

Monteiro EM, Silva JCF, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, Machado-Coelho GLL, Rocha MF, Fontes-Dias C, Dias ES. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev Soc Brasil Med Trop.* 2005; 38: 147-52.

Monteiro CP. Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do País e suas doenças. 2 ed. rev. aum. São Paulo: Hucitec-Nupens/USP, 2000.

Moreira MAB, Luvizotto MCR, Garcia JF, Corbett CEP, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol.* 2007; 145: 245-52.

Moreira MAB, Luvizotto MCR, Nunes CM, Silva TCC, Laurenti MD, Corbett CEP. Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2002; 39(2): 103-06.

Moreno EC. Epidemiologia da leishmaniose visceral humana em área urbana de Minas Gerais: identificação da infecção assintomática e seus fatores de risco. [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2002.

Moreno EC, Melo MN, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade ASR, Antunes CMF *et al.* Epidemiology of asymptomatic human visceral leishmaniasis in an urban area of Sabará, Minas Gerais State, 1998-1999. *Inf. Epidemiol. Sus.* 2002; 11(1): 37-39.

Moreno J, Vouldoukis L, Martin V, Mcgahie D, Cuisinier A, Gueguen S. Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. *Plos – Negl Trop Dis.* 2012; 6(6): 1-7.

Muller N, Zimmermann V, Forster U, Bienz M, Gottstein B, Welle M. PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. *Vet. Parasitol.* 2003; 114: 223-29.

Myskova J, Votypka J, Volf P. *Leishmania* in sand flies: comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. *Journal of Med. Entomol.* 2008; 45 (1) 13 -138.

Naucke TJ, Lorentz S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniasis from naturally infected dogs in Germany. *Parasites & Vectors.* 2012; 5: 67.

Neves, DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. *Parasitologia humana*. 12. ed. São Paulo: Atheneu; 2011, p. 69-88.

Neves DP. *Parasitologia dinâmica*. 2. ed. São Paulo: Atheneu; 2005, p. 67-84.

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

No ET, Mustafa EF, Mauricio I, Miles MA, Oskam L, El Safi SH *et al.* *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based Analyses and DNA Sequencing. *Experimental Parasitology.* 2001; 97: 35-44.

Novy FG, McNeal WJ. The cultivation of *Trypanosoma brucei*: a preliminary note. *J. Amer. Med. Ass.* 1903; 41: 1266-68.

Oliveira ALL, Paniago AMM, Dorval MEC, Oshiro ET, Leal CR, Sanches M *et al.* Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006; 39(5): 446-50.

Oliveira CD, Morais MH, Machado-Coelho GL. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. *Cad. Saúde Públ.* 2008; 24(12): 2953-58.

Oliveira-Pereira YN, Rebêlo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp. na Amazônia maranhense. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006; 39(6): 540-43.

Oliveira TMFS, Mineo TWP, Bason M, Day MJ. IgG subclass profile of serum antibodies to *Leishmania chagasi* in naturally infected and vaccinated dogs. *Vet. Parasitol.* 2009; 162: 16-22.

Oliveira E, Pedras MJ, De Assis IE, Rabello A. Improvement of direct agglutination test (DAT) for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009; 103(12): 1279-81.

Paiva BR, Secundino NFC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade-Junior HF, Malafronte RS. Padronização de condições para a detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. *Cad. Saúde Públ.* 2007; 23: 87-94.

Palatnik-de-Sousa CB. Vaccines for canine leishmaniasis. *Frontiers in Immunology.* 2012; 3(69): 1-15.

Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Grandoni L, Castagnaro M *et al.* Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 2010; 236(11): 1184-91.

Parra LE, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Souza LO, Palatnik-de-Sousa CB, Menz I. Safety trial using the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine.* 2007; 25(12): 2180-86.

Parvizi P, Moradi G, Akbari G, Farahmand M, Ready PD, Piazak N *et al.* PCR detection and sequencing of parasite ITS-rDNA gene from reservoirs host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Parasitol. Res.* 2008; 103: 1273-78.

Passos VMA, Falcao AL, Marzochi MCA, Gontijo CMF, Dias ES, Barbosa-Santos E *et al.* Epidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1993; 88(1): 103-10.

Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vitor A. Effects of environmental changes on emerging parasitic disease. *Int. J. Parasitol.* 2000; 30: 1395-405.

Paz GF, Reis IA, Avelar DM, Ferreira ECM, Werneck GL. Ectoparasites and anti-*Leishmania* antibodies: association in an observational case-control study of dogs from a Brazilian endemic area. *Prev. Vet. Med.* 2013; 112: 156-59.

Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature genetics.* 2007; 39: 839-47.

Perruolo G. Factibilidad de utilizacion de cortinas impregnadas com deltametrina para el control de flebotomos. *Bol. Dir. Malariol. y San. Amb.* 1995; 35(supl. 1): 295-304.

Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Barbosa AF *et al.* Identifications of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. *Acta. Trop.* 2005; 99: 905-13.

Prata A, Silva LA. Calazar. In: COURA, J. R. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. (v. 1). 2005; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005, p. 713-32.

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

Pumarola M, Brevik L, Badiola J, Vargas A, Domingo M, Ferrer L. Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *Journal of Comparative Pathology.* 1991; 105: 279-86.

Queiroz NMGP, Assis J, Oliveira TMFS, Machado RZ, Nunes CM, Starke-Buzetti WA. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos e associação com a RIFI e ELISA-teste. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2010; 19(1): 32-38.

Queiroz RG, Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Pessoa FAC, Souza RN, David JR. Cutaneous Leishmaniasis in Ceará State in Northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturite municipality. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 50: 693-98.

Quinnel RJ, Dye C. Na experimental study of the distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). *Bul. Entomol. Res.* 1994, 84: 379-82.

Rabello A, Orsini M, Disch J. *Leishmania/HIV* co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2003; 97(suppl. 1): 17-28.

Rangel EF, Lainson R. Ecologia das leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In: Rangel EF, Lainson R (eds.). *Flebotomíneos do Brasil*. 20. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003, p. 291-309.

Rebêlo JMM . *Flebótomos vetores das leishmanioses: manual para técnicos e profissionais de saúde*. São Luis: Universidade Federal do Maranhão, Ministério da Saúde; 1999.

Rebêlo JMM. Frequência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na ilha de São Luis, Maranhão, Brasil. *Cad. Saúde Públ.* 2001; 17: 221-27.

Reiche EM, Inouye MM, Bonametti AM, Jankevicius JV. Doença de chagas congênita: epidemiologia, diagnóstico laboratorial, prognóstico e tratamento. *Jornal de Pediatria.* 2006; 72: 125-32.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC *et al.* Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 2006; 81(1): 68-75.

Reithinger R, Davies C. R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 61: 530-41.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7(9): 581-96.

Reithinger R, Davies CR. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. *Trends Parasitol.* 2002; 18: 289-90.

Resende MC, Camargo MC, Vieira JR, Nobi RC, Porto MN, Oliveira CD *et al.* Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006; 39(1): 51-55.

Rinaldi L, Musella V, Biggeri A, Cringoli G. New insights into the application of geographical information systems and remote sensing in veterinary parasitology. *Geospatial Health.* 2006; 1(1): 33-47.

Roberts DM. Arabian sand flies (Díptera: Psychididae) prefer the hottest nights? *Med. Vet. Entomol.* 1994; 8: 194-98.

Rosário EY, Genaro O, Silva JCF, Costa RT, Mayrink W, Reis AB *et al.* Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2005; 100: 197-203.

Ross. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Br. Med. J.* 1903; 2(2237): 1261-62.

Rutledge LC, Ellenwood DA. Production of phlebotomine sandflies on the open forest floor in Panama: the species complement. *Environ Entomol.* 1975; 4: 71-77.

Sabará-Net. Aspectos geográficos. [acesso em 28 nov. 2011]. Disponível em <http://www.sabaranet.com.br/aspectos.asp>.

Sanchis R, Vitu C, Giauffre A. Les examens de laboratoire dans la leishmaniose canine. II. Evolution des tests biologiques dans la maladie expérimentale. *Revue Me. Vet.* 1976; 127: 1191-202.

Santa Rosa ICA, Oliveira ICS. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. *Clínica Veterinária.* 1997; 2(11): 24-28.

Santos SO, Arias JR, Hoffmann MP, Furlan MBG, Ferreira WF, Pereira C *et al.* The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul State. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2003; 36(5): 633-34.

Santos SO, Arias JR, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. Med. Vet. Entomol. 1998; 12, 315-317.

Santos MA, Marques RC, Farias CA, Vasconcelos DM, Stewart JM, Costa DL e Costa CHN. Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American Visceral Leishmaniasis. Rev. Soc. Brasil. Med. Trop. 2002,35(6):629-33.

Saraiva EM, Figueiredo BA, Santos FN, Borja-Cabrera GP, Nico D, Souza LO *et al.* The FML - vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. Vaccine. 2006; 24(13): 2423-31.

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

Savani ESMM, Camargo MCGO, Carvalho MR, Zampieri RA, Santos MG, D'Auria SRN *et al.* The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. Vet. Parasitol. 2004; 120: 229-33.

Schalling HD, Oskam L. Molecular biological applications in the diagnostic and control of Leishmaniasis and parasite identification. Trop. Med. Int. Health. 2002; 7(8): 641-51.

Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schalling HD, Presber W *et al.* PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2003; 47: 349-58.

Scorza JV, Ortiz I, Gomes I. Observaciones biológicas sobre algunos flebotomos de Rancho Grande (Venezuela). Sobre los factores microclimáticos que determinan la endemicidad de la flebotomo fauna de "Rancho Grande". Acta Biol. Venezolánica. 1968; 6: 76-83.

Shaw JJ. The leishmaniasis: survival and expansion in a changing world. A minireview. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102(5): 541-47.

Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in Bahia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1996; 91: 671-83.

Sherlock IA, Guitton N. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. IV. Variação horária e estacional de *Phlebotomus longipalpis*. Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop. 1969; 21: 715-27.

Sherlock IA. Interações ecológicas da leishmaniose visceral no Estado da Bahia, Brasil. [Tese]. Salvador: Fundação Oswaldo Cruz; 1997.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr G. Natural infection in the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1984; 79: 515.

Silva AVM, Candido CDS, Pereira DP, Brazil RP, Carreira JCA. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. Acta Trop. 2008; 105: 92-94.

Silva FL, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. Vet. Parasitol. 2009, 160(1-2) 55-59.

Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiúza VP, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2001; 96(3): 285-91.

Silva FS. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. Rev. Trop. - Ciên. Agr. Biol. 2007; 1(1): 20.

Silva SR. Análise comparativa de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares na confirmação do diagnóstico em cães com sorologia positiva para leishmaniose visceral canina. [Dissertação]. Belo Horizonte: Programa Pós-graduação em Ciências da Saúde, Centro Pesquisas René Rachou; 2009.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 560-63.

Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Clin Diagn. Lab. Immunol. 2002; 9: 951-58.

Sundar S, Singh RK, Maurya R, Kumar B, Chhabra A, Singh V, Rai M. Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006; 100, 533-537.

Sundar S, Singh RK, Bimal SK, Gidwani K, Mishara A, Maurya R, Singh SK, Manandhar KD, Boelaert M, Rai M. Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in india: a phase III diagnostic accuracy study. Trop Med Int Health. 2007; 12(2): 284-89.

Tauil P.L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2006; 39(3): 275-77.

- Tavares CAP, Fernandes AP, Melo MN. Molecular diagnosis of Leishmaniasis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2003; 3(5): 657-67.
- Tesh RB. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995; 52: 287-92.
- Tuon FF, Amato VS, Graf ME, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis - a systematic review with a meta-analysis. *Int.J. Dermatol.* 2008; 47: 109-24.
- Van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992; 51: 133-42.
- Van Handel E. Metabolism of nutrients in the adult mosquito. *Mosquitoes News.* 1984; 44 :573-79.
- Verma S, Kumar R, Katara GK, Singh LC, Negi NS, Ramesh V *et al.* Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. *PLoS One.* 2010; 5: e10107.
- Vieira JBF, Coelho GE. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1998; 31(supl. 2): 85-92.
- Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 2004; 90(1): 31-37.
- Voller A, Bidwell DE, Barlett A. The enzyme linked immunossorbente assay (Elisa): a guide with abstracts of microplate applications. Guernsey: Dynatech, 1979.
- Ward RD, Hamilton JGC, Dougherty M, Falcão AL, Feliciangeli MD, Perez JE *et al.* Pheromone disseminating structures in tergides of male phlebotomines (Diptera; Psychodidae). *Bull Entomol Res.* 1993; 83: 437-45.
- Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*). *J. Clin Microbiol.* 2002; 40: 601-06.
- Wilke VML. Avaliação das atividades de controle da leishmaniose visceral canina no município de Sabará, Minas Gerais, 1995 a 2000. [Dissertação] Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.
- WHO (World Health Organization). Control of leishmaniasis. [capturado em 5 jan. 2014]. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/en/index.html>.
- WHO (World Health Organization), ODA. Manual on visceral leishmaniasis control. Geneva: WHO/Leish/96.40; 1996.

WHO (World Health Organization). Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection. Addis Abeba: WHO; 2007.

Wolda H. Fluctuations in abundance of tropical insects. *Am. Naturalist*. 1978; 112: 1017-45.

Wolda H, Spitzer K, Leps J. Stability of environment and of insect populations. *Res Populations Ecology*. 1992; 34: 213-225.

Woolhouse ME, Dye C, Etard JF, Smith T, Charlwood JD, Garnett GP *et al*. Heterogeneity in the transmission of infectious agents: implications for the design of control programs. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1997; 94: 338-42.

Xavier SC, Andrade HM de, Monte SJ, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MS *et al*. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of Leishmania infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Veterinary Research*. 2006; 8: 2-17.

Ximenes MDFFDM, Castello EG, Souza MDFD, Menezes AAL, Queiroz JW, Silva VPME *et al*. Effect of abiotic factors on seasonal population dynamics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) in Northeastern Brazil. *J. Med. Entomol*. 2006; 43(5): 990-95.

Ximenes MFFM, Castellón EG, Souza MF, Freitas RA, Pearson RA, Wilson ME *et al*. Distribution of Phlebotominae sand flies (Diptera:Psychodidae) in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Journal Medical Entomology*. 2000; 37(1): 162-69.

Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem. Am. Entomol. Inst*. 1994; 54(1): 881.

Zaffaroni E, Rubaldo L, Lanfranchi P, Migone W. Epidemiological patterns of canine leishmaniasis in Western Liguria (Italy). *Veterinary Parasitology*. 1999; 81: 11-19.

Zanin FH, Coelho EA, Tavares CA, Marques-Silva EA, Silva-Costa MM, Rezende as *et al*. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes Infect*. 2007; 9(9): 1070-77.