

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

**Leishmanioses: estudos epidemiológicos e o conhecimento da população de Formiga,
Minas Gerais, Brasil**

por

Júlia Alves Menezes

Belo Horizonte

Fevereiro/ 2014

DISSERTAÇÃO MDIP – CPQRR

J.A. MENEZES

2014

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

**Leishmanioses: estudos epidemiológicos e o conhecimento da população de Formiga,
Minas Gerais, Brasil**

por

Júlia Alves Menezes

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

Orientação: Dr. Rodrigo Pedro Pinto
Soares

Co-orientação: Dra. Carina Margonari de
Souza

Belo Horizonte

Fevereiro/ 2014

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

M534l Menezes, Júlia Alves.
2014

Leishmanioses: estudos epidemiológicos e o conhecimento da população de Formiga, Minas Gerais / Júlia Alves Menezes. – Belo Horizonte, 2014.

XIX, 122 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 107 - 141

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

1. Leishmaniose/epidemiologia 2. Conhecimento 3. Phlebotomus/parasitologia 4. Cães/parasitologia I. Título. II. Soares, Rodrigo Pedro Pinto (Orientação). III. Souza, Carina Margonari de (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

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

**Leishmanioses: estudos epidemiológicos e o conhecimento da população de Formiga,
Minas Gerais, Brasil**

por

Júlia Alves Menezes

Foi avaliado pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares (Presidente)

Dra. Carina Margonri de Souza

Dr. Edward José de Oliveira

Dra. Maria Norma de Melo

Suplente: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo

Dissertação defendida e aprovada em: 14/02/2014

DEDICATÓRIAS

Dedico esse trabalho à minha família e a todos que colaboraram de alguma forma para a concretização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me iluminado em todas as etapas desse projeto e por ter permitido que eu realizasse meu sonho.

A meus pais, Zilá e Fernando, pelo apoio, pela compreensão nos momentos em que não pude estar presente e pelo amor incondicional. Amo vocês.

A minha tia Lourdes, por ter me recebido e me incentivado sempre, desde o início dessa caminhada.

A Mário Henrique Gontijo de Araújo por todo o carinho, amor e dedicação; e por ter acreditado no meu sonho, me apoiando desde o processo seletivo.

A minha orientadora, Dra. Carina Margonari, pela amizade, força e fé de que tudo daria certo. Serei eternamente grata pelos ensinamentos, incentivo e competência dedicados à condução desse trabalho e à minha formação profissional.

Ao Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares, por ter me aceitado como aluna e pelo conhecimento e presteza sempre dedicados à construção desse trabalho.

Ao Dr. George L. L. Machado-Coelho por me ceder a infraestrutura do Laboratório de Epidemiologia das Doenças Parasitárias da Universidade Federal de Ouro Preto (LEPI) e a todos os membros do LEPI por terem me recebido e contribuído com tantas etapas desse projeto.

Agradeço especialmente a Ana Maria Sampaio Rocha (LEPI/UFOP) por ter sido uma parceira tão paciente e generosa na condução dos experimentos.

A Alessandra e ao Mayron pela amizade e parceria construídas durante o projeto, pela ajuda importantíssima no campo e pelos momentos divertidos que passamos juntos.

À Dra. Ana Paula Madureira pela ajuda nas análises estatísticas dos flebotomíneos e cães.

Ao Msc. Christian Rezende Freitas pela grande contribuição às análises espaciais.

Ao Dr. Eduardo de Castro Ferreira pelos ensinamentos em biologia molecular.

Ao Dr. José Dilermando Andrade Filho por me receber em seu laboratório e pela ajuda importantíssima na identificação dos flebotomíneos e na revisão de parte desse trabalho.

A todos do Centro de Referência Nacional e Internacional em Flebotomíneos, especialmente à Cris, Dany, Lara, Rogério e Juliana pela ajuda e presteza nos momentos que precisei.

Ao Dr. Edelberto Santos Dias e a Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo do Laboratório de Leishmanioses pela infraestrutura concedida.

A todos do Laboratório de Educação em Saúde e Ambiente, especialmente à Dra. Tatiana Borges pela colaboração com as análises estatísticas dos questionários e a Aline Sodré por me tirar tantas dúvidas e estar sempre pronta para ajudar.

À secretaria de saúde de Formiga, em nome da então secretária Luiza Flora de Oliveira e a Juliana, Fernanda e ao “Padre” pelo apoio logístico durante os trabalhos de campo.

À população do município de Formiga pela compreensão e colaboração imprescindíveis para a conclusão desse trabalho.

A todos os agentes de endemias que colaboraram com a realização das capturas entomológicas.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Centro de Pesquisas René Rachou e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade ofertada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG - APQ-01657-11) pelo financiamento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XVI
RESUMO	XVIII
ABSTRACT	XIX
1 INTRODUÇÃO	20
2 JUSTIFICATIVA	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 REVISÃO DE LITERATURA	24
4.1 Perspectivas gerais das leishmanioses	24
4.2 Mudanças no perfil ecoepidemiológico das leishmanioses no Brasil.....	26
4.3 A população e as leishmanioses no contexto da saúde pública	27
4.4 Características gerais e importância médica dos flebotomíneos	29
4.5 O cão doméstico no cenário das leishmanioses	31
4.6 Ferramentas para o diagnóstico da leishmaniose canina	33
4.6.1 Métodos sorológicos preconizados pelo ministério da saúde.....	34
4.6.2 Aplicação de métodos moleculares na detecção de <i>Leishmania</i> spp.....	34
4.7 Ferramentas de geoprocessamento e sua contribuição às políticas públicas de saúde ..	36
5 METODOLOGIA	38
5.1 Área de estudo	38
5.2 Estudo do conhecimento da população.....	39
5.2.1 Cálculo da amostra da população de Formiga.....	39
5.2.2 Delineamento do estudo e construção do questionário	40
5.2.3 Construção dos indicadores (variáveis dependentes).....	40
5.2.3.1 Determinação do nível de conhecimento das leishmanioses.....	40
5.2.3.2 Determinação dos fatores de risco.....	41
5.2.4 Análise dos dados	41
5.3 Estudo entomológico	42
5.3.1 Escolha dos domicílios	42

5.3.2 Capturas sistemáticas.....	43
5.3.3 Dados climáticos e sazonalidade.....	43
5.3.4 Análise estatística.....	44
5.4 Investigação da leishmaniose canina.....	44
5.4.1 Amostragem canina.....	44
5.4.2 Coleta de amostras biológicas.....	44
5.4.3 Exame clínico.....	45
5.4.4 Métodos sorológicos.....	46
5.4.4.1 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	46
5.4.4.2 Teste de imunocromatografia rápida de duplo percurso (Dual Path Plataforma – DPP®).....	46
5.4.5 Métodos moleculares.....	48
5.4.5.1 Extração de DNA.....	48
5.4.5.2 Nested PCR para o gene SSUrRNA de Leishmania (LnPCR).....	48
5.4.5.3 Identificação das espécies de Leishmania.....	50
5.4.5.3.1 Sequenciamento.....	50
5.4.5.3.2 PCR- RFLP dirigida ao minicírculo do kDNA.....	50
5.4.6 Análise estatística dos testes diagnósticos.....	52
5.5 Análises de geoprocessamento.....	52
5.5.1 Construção dos mapas de densidade flebotomínica e canina.....	52
5.5.2 Mapa das características ambientais.....	53
5.5.3 Análise de Assinatura.....	53
5.6 Considerações éticas.....	54
6 RESULTADOS.....	58
6.1 O conhecimento da população sobre as leishmanioses.....	58
6.2 O estudo da fauna flebotomínica de Formiga.....	62
6.3 O estudo da infecção canina.....	65
6.4 Análises espaciais e geoprocessamento.....	70
7 DISCUSSÃO.....	77
7.1 O conhecimento da população de Formiga.....	77
7.2 A fauna flebotomínica.....	81
7.3 A infecção canina no município de Formiga.....	86
7.4 Análise espacial das leishmanioses e o meio ambiente.....	94
8 CONCLUSÕES.....	99

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
10 ANEXOS	101
10.1 Anexo 1 - Questionário quantitativo.....	101
10.2 Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	104
10.3 Anexo 3 - Ficha de avaliação física e identificação do cão	105
11 REFERÊNCIAS	107

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Situação da leishmaniose visceral humana (LVH) e da leishmaniose tegumentar americana (LTA) na região de saúde de Formiga, MG, de 2008 a 2013. Fonte: SINAN, SRS Divinópolis 2013. 21
- Figura 2.** Localização do município de Formiga no estado de Minas Gerais, Brasil..... 38
- Figura 3.** Plataforma de teste rápido imunocromatográfico (DPP®) mostrando o local de aplicação da amostra e do tampão. O local onde é feita a leitura do resultado a partir das linhas teste (T) e controle (C) é mostrado na parte superior da plataforma (Fonte: Júnior EMQ 2011). 47
- Figura 4.** Alinhamento das sequências do fragmento do gene SSUrRNA das espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum* (sin. *L. chagasi*) depositadas no GenBank. 51
- Figura 5.** Mapa temático da vegetação do município de Formiga, Minas Gerais..... 55
- Figura 6.** Mapa temático da altimetria do município de Formiga, Minas Gerais..... 56
- Figura 7.** Mapa temático da rede hidrográfica do município de Formiga, Minas Gerais..... 57
- Figura 8.** Precipitação (mm³), temperatura (°C) e densidade de flebotomíneos capturados mensalmente com armadilha luminosa de HP entre maio de 2012 e abril de 2013 em 24 domicílios do município de Formiga, Minas Gerais, Brasil..... 65
- Figura 9.** Frequência dos resultados positivos e indeterminados nos testes sorológicos DPP® e ELISA e no método molecular LnPCR. 66
- Figura 10.** Representação da localização das armadilhas luminosas tipo HP, dos casos humanos de leishmaniose visceral (ícone humano) e da densidade de Kernel dos flebotomíneos (todas as espécies) sobre a malha urbana de Formiga, Minas Gerais..... 72
- Figura 11.** Densidade de Kernel dos cães positivos em pelo menos um teste diagnóstico (sorológico ou molecular) e as variáveis vegetação e hidrografia representados sobre a malha urbana do município de Formiga, Minas Gerais. O ícone humano representa os casos de leishmaniose visceral..... 73
- Figura 12.** Densidade de Kernel de *Lutzomyia longipalpis* e de cães positivos em pelo menos um teste diagnóstico (sorológico ou molecular), localização dos casos humanos de LV (ícone humano) e representação das variáveis vegetação e hidrografia sobre a malha urbana do município de Formiga, Minas Gerais. 74

Figura 13. Densidade de Kernel de *Lutzomyia whitmani* e de cães positivos em pelo menos um teste diagnóstico (sorológico ou molecular), localização dos casos humanos de LV (ícone humano) e representação das variáveis vegetação e hidrografia sobre a malha urbana do município de Formiga, Minas Gerais.....75

Figura 14. Densidade de Kernel de flebotomíneos total (todas as espécies) e de cães positivos em pelo menos um teste diagnóstico (sorológico ou molecular), localização dos casos humanos de LV (ícone humano) e representação das variáveis vegetação e hidrografia sobre a malha urbana do município de Formiga, Minas Gerais..... 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificação do tamanho dos estratos de acordo com o que foi estipulado para compor a amostra e o que foi realizado, segundo o sexo e idade, no município de Formiga. .	40
Tabela 2. Características socioeconômicas da população do município de Formiga, Minas Gerais.....	58
Tabela 3. Respostas dos entrevistados para as perguntas mais relevantes quanto ao ciclo epidemiológico das leishmanioses presentes no questionário aplicado à população do município de Formiga, Minas Gerais.	59
Tabela 4. Análise bruta e ajustada entre o conhecimento das leishmanioses e as características da população de estudo no município de Formiga, Minas Gerais.....	60
Tabela 5. Análise bruta e ajustada entre fatores de risco peridomiciliares e as características da população de Formiga, Minas Gerais.	61
Tabela 6. Número de flebotomíneos capturados por espécie e sexo (Macho e Fêmea), através de armadilhas HP no município de Formiga, Minas Gerais, Brasil.	62
Tabela 7. Número de flebotomíneos coletados no peridomicílio de 24 domicílios de Formiga, Minas Gerais, separados por espécie e armadilha, utilizando armadilha HP entre maio de 2012 e abril de 2013.....	64
Tabela 8. Coeficiente Kappa obtido na análise de correlação entre os diagnósticos de DPP® x ELISA, DPP® x LnPCR, e ELISA x LnPCR, considerando os resultados indeterminados no ELISA como negativos.....	67
Tabela 9. Coeficiente Kappa obtido entre os diagnósticos de DPP®x ELISA, DPP® x LnPCR, e ELISA x LnPCR, considerando os resultados indeterminados no ELISA como positivos.....	67
Tabela 10. Número de cães sintomáticos e assintomáticos soropositivos ou indeterminados nos testes sorológico (ELISA e DPP®) e molecular (LnPCR).	68

Tabela 11. Identificação das espécies de <i>Leishmania</i> , de acordo com as técnicas de sequenciamento e PCR-RFLP, das amostras que não haviam produzido resultado definitivo no sequenciamento.	69
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CODEVIDA: Centro de Defesa da Vida Animal
CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou
CRNIF: Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos
DNA: ácido desoxirribonucleico
dNTP: desoxirribonucleotídeos 5' fosfato
DPP: Dual Path Platform
EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz
FUNED: Fundação Ezequiel Dias
FUNEDI: Fundação Educacional de Divinópolis
I.C.: intervalo de confiança
kDNA: ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto
Km²: quilômetro quadrado
L.: *Leishmania*
LC: leishmaniose canina
LEPI: Laboratório de Epidemiologia das Doenças Parasitárias
LnPCR: Nested Polymerase Chain Reaction
LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana
LTC: Leishmaniose tegumentar canina
LV: Leishmaniose Visceral
LVC: Leishmaniose Visceral Canina
LVH: Leishmaniose Visceral Humana
MS: Ministério da Saúde
nm: nanômetros
O.R.: Odds ratio
OMS: Organização Mundial de Saúde
Pb: pares de bases
PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism
pmol: pico mols
rDNA: ácido desoxirribonucleico ribossomal

RIFI: reação de imunofluorescência indireta

rpm: rotações por minuto

rRNA: ácido riconucleico ribossomal

SDS: Sodium Dodecyl Sulphate

SIG: sistema de informação geográfica

SMS: Secretaria Municipal de Saúde

SR. sensoreamento remoto

SSUrRNA: Small subunit Ribossomal RNA

SUS: sistema único de saúde

U.V.: ultravioleta

U: unidades

UEMG :Universidade Estadual de Minas Gerais

UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto

V.: *Viannia*

WHO: World Health Organization

RESUMO

No Novo Mundo, as leishmanioses constituem um grupo de doenças negligenciadas, com alta prevalência mundial e que podem assumir formas graves. Elas são transmitidas ao homem pela picada de flebotomíneos, existindo uma gama de reservatórios, sendo o cão o principal hospedeiro urbano. Neste contexto, as leishmanioses, principalmente a forma visceral zoonótica, tem se urbanizado no Brasil e em várias partes do mundo. O objetivo do presente trabalho foi estudar alguns aspectos epidemiológicos das leishmanioses e o conhecimento da população sobre a doença no município de Formiga, MG. Estes aspectos se referem principalmente à fauna flebotomínica e à infecção canina. Para se conhecer a fauna flebotomínica, foram realizadas coletas sistemáticas mensais entre maio 2012 e abril 2013 utilizando armadilhas luminosas HP em 24 peridomicílios. Os exemplares foram identificados e sua densidade relacionada a fatores climáticos e ambientais. O estudo da frequência da leishmaniose canina foi realizado através da coleta de sangue de 570 cães e posterior análise sorológica (DPP[®] e ELISA) e molecular (LnPCR). As amostras positivas no LnPCR foram submetidas ao sequenciamento e PCR-RFLP a fim de determinar a espécie de *Leishmania*. Todos os locais de captura entomológica e os endereços dos cães positivos foram georreferenciados sobre a malha urbana do município e correlacionados aos casos humanos e a fatores ambientais locais. A população foi entrevistada a partir de um questionário quantitativo validado que abordou conceitos relevantes sobre a doença e sobre as condições do peridomicílio. Foram capturados 224 flebotomíneos de 10 espécies diferentes, sendo *Lutzomyia longipalpis* (35,3%), *Lutzomyia cortelezzii* (33,5%) e *Lutzomyia whitmani* (18,3%) as mais abundantes. Foi observada correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a densidade total de flebotomíneos e a precipitação e temperatura. Em relação aos cães, a taxa de infecção encontrada, considerando os testes sorológicos e o molecular, foi de 19,1%. O sequenciamento e a PCR-RFLP permitiram identificar as espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* infectando os cães. As análises espaciais demonstraram que *L. whitmani* (99,8%) se concentra nas proximidades de extensas áreas verdes e em distâncias de até 200m da vegetação. *Lutzomyia longipalpis* está mais associado à rede hidrográfica, se concentrando, principalmente, nas faixas distantes até 400m de um curso d'água. Para o município, flebotomíneos, cães positivos e casos humanos estão geograficamente relacionados, embora com pouca sobreposição de suas áreas de ocorrência. O estudo sobre o conhecimento da população revelou que os moradores de Formiga desconhecem completamente a doença (93%) e que 95% deles estão sob algum fator de risco. A existência de flebotomíneos comprovadamente vetores de leishmaniose visceral e tegumentar associado ao fato de existirem cães infectados com espécies, tanto dermatrópicas quanto viscerotrópicas do parasito, sugerem que no município está ocorrendo um ciclo de transmissão de leishmanioses visceral. Além disso, pode ocorrer um possível surgimento de casos humanos de leishmaniose tegumentar. Dessa forma, fica evidente que medidas de vigilância e controle precisam ser urgentemente estabelecidas na cidade para se evitar a dispersão e os óbitos por leishmaniose na região.

ABSTRACT

Leishmaniasis in the New World are neglected diseases with high prevalence worldwide and may assume severe forms. They are transmitted to humans by the bite of sand flies and exhibit a range of wild and domestic reservoirs including the dog as the main urban host. In this context, especially zoonotic visceral leishmaniasis form has urbanized in Brazil and around the world. The aim of this work was to study some epidemiological aspects of leishmaniasis and the population's knowledge about the disease in Formiga, Minas Gerais State. Those aspects are mainly related to the phlebotomine fauna and canine infection. To determine the sand fly fauna, monthly systematic collections were performed between May 2012 and April 2013 using HP light traps in 24 peridomicile. Specimens were identified and their density related to climatic and environmental conditions. The study of the frequency of canine leishmaniasis was performed by collecting blood samples from 570 dogs and subsequent serologic (DPP and ELISA) and molecular (LnPCR) analysis. The LnPCR positive samples were subjected to sequencing and PCR-RFLP to determine the *Leishmania* species. All the entomological capture sites and addresses of positive dogs were georeferenced on the urban grid of the city and correlated to human cases and local environmental factors. The population was interviewed using a validated quantitative questionnaire addressing relevant concepts about the disease and the conditions of the peridomicile. Two hundred twenty-four phlebotomines from 10 different species were captured, where *Lutzomyia longipalpis* (35.3%), *Lutzomyia cortelezzii* (33.5%) and *Lutzomyia whitmani* (18.3%) were the most abundant. Statistically significant correlation ($p < 0.05$) was observed between total sandfly density and precipitation and temperature. Regarding the dogs, the rate of infection found by considering the serologic and molecular assays was 19.1%. Sequencing and PCR-RFLP allowed the identification of the species *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* infecting dogs. The spatial analysis showed that *L. whitmani* (99.8%) is concentrated close to green areas and up to a distance of 200m from vegetation. *Lutzomyia longipalpis* is most associated with the hydrographic network, concentrating mainly on the distances up to 400m alongside the water. For the Formiga city, phlebotomines, positive dogs and human cases are geographically related, although poor overlap of their occurrence areas has been observed. The study on the knowledge of the population revealed that the residents of Formiga are completely unaware of the disease (93%) and that 95% of them are under some risk factor. The existence of proven sandflies vectors of visceral and tegumentary leishmaniasis and the existence of infected dogs - with both dermatotropic as visceral species - suggest that the city is experiencing a cycle of transmission of visceral leishmaniasis. Besides, the city may be also in risk of an outbreak of tegumentary human cases. It is clear that surveillance and control measures need to be urgently established in the town to avoid dispersion and deaths per leishmaniasis in the region.

1 INTRODUÇÃO

Nas Américas, as leishmanioses são um complexo de doenças causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* Ross 1903 transmitidas por flebotomíneos (Diptera, Psychodidae: Phlebotominae), variando de úlceras localizadas a doença sistêmica. As formas zoonóticas possuem uma gama diversa de hospedeiros silvestres (raposa, gambá, roedores) e domésticos (cão, gato), além do homem (Quinnell & Courtenay 2009). São transmitidas ao homem nos ciclos silvestre, doméstico e peridoméstico, alcançando desde os centros urbanos aos desertos e florestas tropicais em todos os continentes, exceto na Antártica (Bern et al 2008).

Devido à complexidade do diagnóstico, tratamento e controle e em sua estreita associação com a pobreza, as leishmanioses são consideradas umas das doenças mais negligenciadas, ocupando o segundo lugar em mortalidade e o quarto em morbidade dentre as doenças tropicais (Alvar 2006, Mathers 2007). Nas últimas décadas, a doença vem apresentando intensa expansão pelo Brasil, estando presentes em todas as regiões do país e atingindo grandes centros urbanos - principalmente no que se refere à leishmaniose visceral (LV) (Brasil 2006, Cruz et al 2013).

Essa expansão representa um desafio para as políticas públicas de controle, uma vez que estas têm se mostrado incapazes de conter o avanço da doença e a ocorrência de novas epidemias. Inicialmente pautadas na tríade combate ao vetor, tratamento dos casos humanos e eliminação do reservatório doméstico, a política de controle incorporou também estratégias focadas no manejo ambiental e na conscientização da população (Gontijo & Melo 2004).

Nesse sentido, estudos que busquem compreender os aspectos epidemiológicos das leishmanioses são uma importante ferramenta para a implantação de planos de controle eficazes. Isso porque as condições de transmissão variam entre as regiões de ocorrência devido à variedade dos reservatórios, das espécies de *Leishmania* e dos vetores envolvidos, além da influência de fatores ecológicos e sociais locais.

No presente trabalho, a cidade de Formiga, Minas Gerais, foi escolhida como área de estudo por interesse da própria Secretaria de Saúde do município. Formiga não apresenta nenhum estudo prévio sobre a doença, mas já registra casos humanos de LV. Por isso, em razão do número reduzido de casos humanos, a cidade se torna ideal para a implantação de um programa de controle adequado à realidade local, eficiente e de execução possível.

2 JUSTIFICATIVA

O município de Formiga, localizado na região centro-oeste de Minas Gerais, é considerado de transmissão moderada para a leishmaniose. A cidade vem registrando casos humanos de LV desde 2011, com óbito pela doença em 2012. Apesar de se encontrar em situação de atenção, não existe nenhum estudo que esclareça quais são os condicionantes epidemiológicos das leishmanioses em Formiga. Para o município, não existem informações quanto à fauna flebotomínica, presença de flebotomíneos vetores e de cães infectados atuando como reservatórios. Cabe ressaltar que na micro-região de Formiga existem outros municípios, alguns limítrofes à área de estudo, que apresentam casos humanos com óbito por LV, casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e presença de vetores comprovados (Fig. 1) (SRS, 2013).

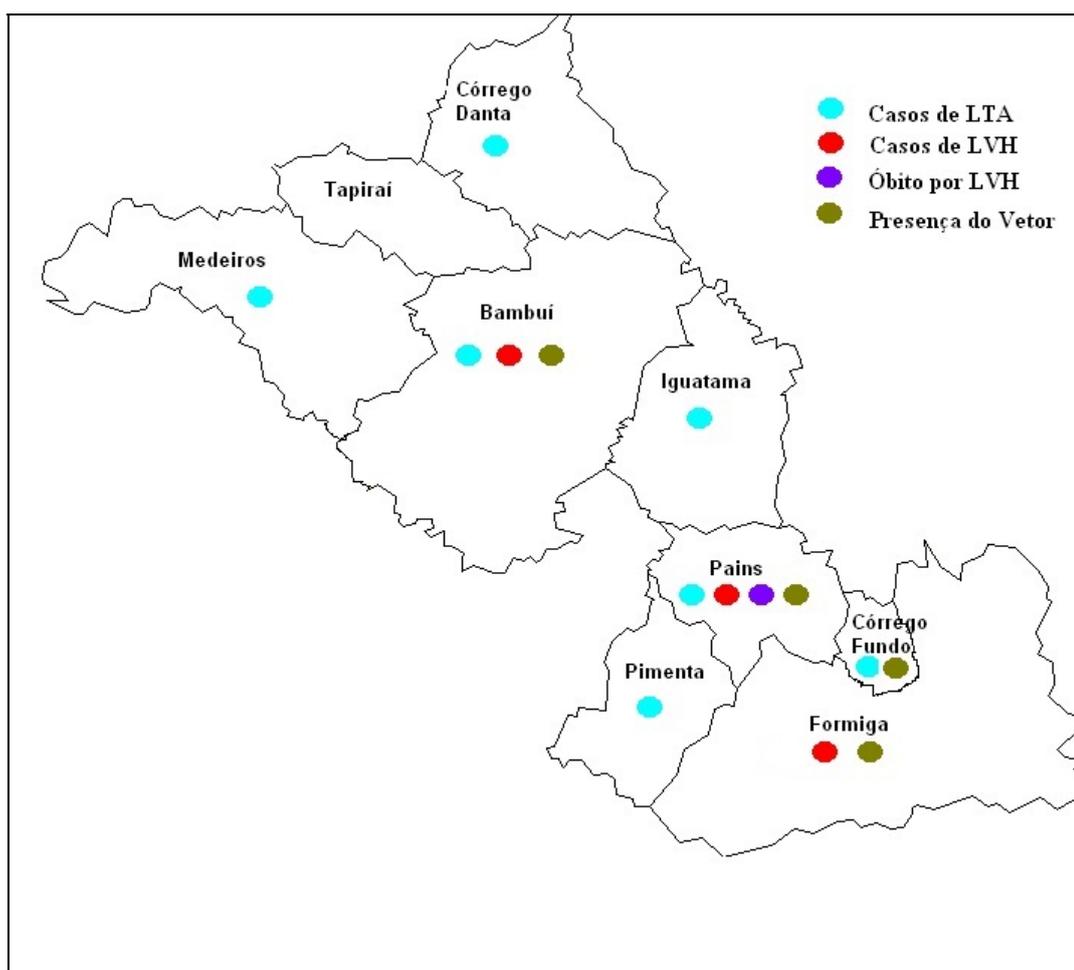


Figura 1. Situação da leishmaniose visceral humana (LVH) e da leishmaniose tegumentar americana (LTA) na região de saúde de Formiga, MG, de 2008 a 2013. Fonte: SINAN, SRS Divinópolis 2013.

Nesse contexto, fica evidente que o município necessita tomar conhecimento sobre as condições que favorecem a transmissão da doença na região. Para tanto, dois componentes essenciais da cadeia epidemiológica das leishmanioses, principalmente da visceral, foram estudados: a fauna flebotomínica local e a presença de cães infectados. Além disso, a distribuição de casos caninos, casos humanos e de flebotomíneos no município foi analisada espacialmente, a fim de verificar as regiões prioritárias no controle da enfermidade.

Para a complementação dos estudos sobre leishmaniose em Formiga, foi realizada uma pesquisa para saber o conhecimento básico da população com relação ao tema. Esses resultados são importantes para auxiliar na elaboração de materiais e ações educativas adequadas à realidade local.

Dessa forma, o presente trabalho poderá gerar subsídios necessários aos órgãos competentes do município de Formiga para trabalhar estratégias de controle e prevenção das leishmanioses pensadas exclusivamente para o município e que propiciem a melhoria da qualidade de vida e saúde da população.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento da epidemiologia das leishmanioses no município de Formiga, Minas Gerais, investigando seus principais determinantes.

3.2 Objetivos específicos

- 1- Investigar o conhecimento da população sobre as leishmanioses;
- 2- Fazer o levantamento da fauna flebotomínica de Formiga, Minas Gerais;
- 3- Analisar a flutuação sazonal das espécies mais importantes de flebotomíneos com relação à transmissão de LV e LTA;
- 4- Determinar a frequência da leishmaniose canina no município;
- 5- Identificar as espécies de *Leishmania* envolvidas na infecção canina;
- 6- Identificar as prováveis áreas críticas (regiões prioritárias) do município com relação às leishmanioses.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Perspectivas gerais das leishmanioses

As leishmanioses são um espectro de doenças infecciosas, crônicas, causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). As cerca de 30 espécies conhecidas por parasitar mamíferos são agrupadas em dois subgêneros principais, de acordo com o tipo de desenvolvimento dos flagelados no trato digestório do vetor: o subgênero *Leishmania* que se desenvolve no intestino médio e posterior; e o *Viannia*, que se desenvolve no intestino posterior (Lainson & Shaw 1987). A transmissão ocorre quando fêmeas de flebotomíneos infectadas inoculam as formas promastigotas flageladas do parasito na pele do hospedeiro ao realizarem o repasto sanguíneo.

A relação complexa estabelecida entre o parasito, o vetor e o hospedeiro garante a ocorrência de variadas manifestações clínico-epidemiológicas da doença (Murray et al. 2005, Sakthianandeswaren et al. 2009, Nieves et al. 2013). No Velho Mundo, são reconhecidas as formas antroponóticas, em que o homem assume o papel de principal reservatório da leishmaniose, enquanto no Novo Mundo a ecoepidemiologia da doença está intimamente relacionada aos reservatórios animais como principais fontes de parasitas (Desjeux 2001).

As leishmanioses podem acometer tanto a pele quanto os órgãos internos e apresentam graus variados de morbi-mortalidade. A LTA ocorre de maneira espectral nas formas cutânea, mucocutânea e difusa. Essas são causadas por espécies dermatrópicas de *Leishmania*, sendo que no Brasil ocorrem, principalmente, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) lainsoni*.

A manifestação cutânea é a forma mais branda da doença, de baixa gravidade, em que se formam pápulas no local onde ocorreu a picada do flebotomíneo. As pápulas evoluem então para um nódulo ou úlcera aberta, muitas vezes característica, que pode ou não se curar de maneira espontânea. A leishmaniose mucocutânea se apresenta como uma complicação da forma cutânea, em que os parasitos se disseminam através do sistema linfático para as mucosas. Como consequência, surgem lesões mutilantes na face que não se curam espontaneamente e que podem levar a complicações respiratórias ou infecções bacterianas secundárias (Murray et al. 2005, Sakthianandeswaren et al. 2009). Por fim, a leishmaniose difusa se caracteriza por uma resposta deficitária da defesa celular aos antígenos de *Leishmania* em que o paciente não responde ao tratamento, sendo considerada incurável

(Lainson & Shaw 1978). Apesar de apresentarem pouca gravidade, as formas tegumentares da leishmaniose exibem uma morbidade associada às lesões desfigurantes e ao estigma social resultante dessas lesões, trazendo repercussões na qualidade de vida e na saúde mental dos pacientes (Stockdale & Newton 2013).

A leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença, se manifestando de maneira sistêmica devido à invasão das células do sistema retículoendotelial dos órgãos internos pelo parasita (Stauch et al. 2011). Os principais agentes etiológicos da LV apresentam distribuição geográfica característica: *L. (L.) infantum* no Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia Central, China e Américas do Sul e Central; e *L. (L.) donovani* na Índia e leste da África (Gil & Beeching 2009). Afeta os linfonodos, baço, fígado e medula óssea levando à manifestação de sintomas inespecíficos, como hepatoesplenomegalia, emagrecimento e anemia, o que dificulta o diagnóstico precoce (Stauch et al. 2011). Apresenta altos índices de letalidade se não tratada adequadamente e pode ser devastadora quando atinge populações que ainda não tiveram contato com o parasita, sendo capaz de produzir consequências graves também em áreas endêmicas (Boelaert et al. 2010). Contudo, a LV pode se apresentar muitas vezes de forma grave e assintomática, exibindo elevada letalidade principalmente em crianças, idosos e pacientes co-infectados pelo vírus HIV (Guerin et al. 2002, Sakthianandeswaren et al. 2009).

A existência de infecções assintomáticas pode ser comum entre populações humanas, principalmente em áreas endêmicas devido às características de resistência inata do hospedeiro. Estima-se que nesses locais, até 90% das lesões cutâneas se curem espontaneamente e que existam entre 4 e 18 pessoas assintomáticas para cada pessoa acometida pela LV (Costa et al. 1990, Moreno et al. 2002, Murray et al. 2005, Chappuis et al. 2007, Sakthianandeswaren et al. 2009). As infecções assintomáticas estão entre as razões pelas quais a verdadeira prevalência das leishmanioses é subestimada, porém, podem ser citados outros aspectos importantes como detecção passiva dos casos, diagnóstico incorreto ou não realizado e a própria inexistência de notificação compulsória em muitos países (Desjeux 1996, Stockdale & Newton 2013).

Embora sejam consideradas endêmicas em 98 países, causando a nona maior carga de doença entre as moléstias infecciosas e parasitárias, as leishmanioses continuam a ser subnotificadas por 1/3 das nações (Alvar et al. 2012). Estimativas calculam que se os casos fossem corretamente reportados, entre 200 e 400 mil novos casos de LV e entre 700 mil e 1,2 milhão de casos novos de LTA seriam notificados a cada ano no mundo (Alvar et al. 2012). Mesmo no Brasil, país de notificação compulsória para leishmaniose, a taxa de subnotificação pode chegar a 1,7 vezes (Maia-Elkhoury et al. 2007). Segundo o Ministério da Saúde (MS), cerca de 30.000 casos de LTA são registrados por ano no Brasil, porém, as estimativas anuais

de incidência podem ser superiores a 119 mil casos (Brasil 2007, Alvar et al. 2012, Jirmanus et al. 2012). Para a LV o cenário é semelhante, são cerca de 3.400 novos casos por ano com estimativas de incidência maiores, de até 6.300 casos anuais, se consideradas as taxas de subnotificação (Alvar et al. 2012).

4.2 Mudanças no perfil ecoepidemiológico das leishmanioses no Brasil

Inicialmente de caráter silvestre e rural, as leishmanioses se mantinham entre animais selvagens, domésticos e flebotomíneos de florestas tropicais densas. Os principais hospedeiros primários eram roedores, marsupiais, edentados, procionídeos, ungulados e primatas (Shaw 2003). O homem era acidentalmente envolvido no ciclo de transmissão quando invadia o ambiente florestal ou colonizava áreas próximas a focos silvestres (Lainson & Shaw 1978). Por isso, a doença foi por muitos anos associada a fatores laborais, principalmente à agricultura, pecuária e à caça em regiões florestadas, condições que podem ser observadas ainda nos dias atuais (Sosa-Estani et al. 2001, França et al. 2009, Jirmanus et al. 2012). Porém, o desaparecimento das florestas revelou a capacidade adaptativa dos flebotomíneos aos locais antropizados, onde passaram a colonizar os ambientes doméstico e peridoméstico. Dessa forma, as condições que expunham o homem ao parasito se modificaram, permitindo que a doença surgisse entre pessoas de áreas urbanizadas onde outras fontes de infecção surgiram, como gatos e cães domésticos, esse último com relevante importância epidemiológica (Lainson & Shaw 1978, Quinell & Courtenay 2009).

A LV foi a que apresentou as mudanças mais significativas em seu padrão de ocorrência nos últimos anos, deixando de ser uma antropozoonose rural e peri-urbana para colonizar as áreas urbanas do Brasil (Costa et al. 2005). Sua expansão geográfica foi favorecida pelas modificações socioambientais das últimas décadas, caracterizadas principalmente pelo aumento do desmatamento, crescimento desordenado das cidades e migração de pessoas e animais de regiões endêmicas (Barata et al. 2005, Costa 2005). A exploração econômica das áreas silvestres obrigou flebotomíneos e reservatórios a migrarem em busca de novas fontes alimentares, favorecendo a instalação da doença na periferia dos grandes centros urbanos (Barata et al. 2005). Soma-se a isso o fato do principal vetor da doença no Brasil, *Lutzomyia longipalpis*, se mostrar adaptado aos novos nichos, sendo capaz de colonizar o peridomicílio e se alimentar em uma diversidade de animais domésticos e sinantrópicos. A grande expansão desse vetor é considerada um fator de risco para transmissão da doença em áreas urbanas. O mesmo foi descrito nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do país (Gontijo &

Melo 2004, Costa 2005, Oliveira et al. 2006, Maia-Elkhoury et al. 2008, Almeida et al. 2010). Dessa forma, a LV invadiu os ambientes urbanos e peridomésticos, sendo relatada em cidades como Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Natal, Corumbá, Fortaleza, Palmas, dentre outras (Brasil 2003, Margonari et al. 2006).

A LTA também apresentou intenso processo de expansão, gerando perfis epidemiológicos distintos entre as regiões geográficas do Brasil: passou de uma zoonose essencialmente silvestre, onde o homem era hospedeiro acidental, para uma doença ocupacional de zonas rurais desmatadas e regiões periurbanas (Barreto et al. 1981, Costa 2005). Atualmente, pode ser encontrada em todas as regiões do Brasil, sendo mais prevalente nos estados do Norte, Nordeste e Centro-Oeste do país, apresentando variados comportamentos de transmissão (Gomes 1992; Marzochi 1992). A LTA pode ser estritamente silvestre, atingindo principalmente a região amazônica devido à exploração econômica da floresta; apresentar o perfil silvestre modificado, em que ocorrem surtos epidêmicos sazonais em áreas de mata primária residual como observado em regiões de Minas Gerais, Bahia e Espírito Santo; e por fim, se comportar de maneira periurbana, onde ocorre de forma endêmico-epidêmica com o possível envolvimento de animais domésticos em áreas de colonização antiga, como no Rio de Janeiro (Silva et al. 1979, Araújo 1981, Sessa et al. 1985, Kawa & Sabroza 2002, Costa 2005).

Devido a esse mosaico de padrões epidemiológicos de transmissão em que podem coexistir diferentes espécies de vetores, reservatórios e agentes etiológicos, além das ações humanas modificadoras do ambiente, o planejamento de ações efetivas de controle para LTA e LV se constituiu um desafio às políticas públicas de saúde no Brasil (Costa 2005, Marzochi 1989).

4.3 A população e as leishmanioses no contexto da saúde pública

As doenças tropicais negligenciadas, muitas delas endêmicas no Brasil como esquistossomose, leishmanioses e doença de Chagas, acometem principalmente as populações mais pobres dos países subdesenvolvidos, contribuindo de maneira substancial para a carga de doença nos trópicos (Holveck et al. 2007, Boelaert et al. 2010). No caso das leishmanioses esse aspecto é mais evidente, pois mais de 90% dos casos de LV ocorrem em apenas quatro países – Índia, Bangladesh, Sudão e Brasil (Desjeux 1996).

O impacto econômico das leishmanioses sobre as comunidades afetadas ainda é pouco reconhecido, porém é indubitável que a doença está sistematicamente relacionada à pobreza e

à marginalização social (Adhikari et al. 2009). A situação pode ainda se agravar ao ser levado em conta que a perda de produtividade ocasionada pelo acometimento pela doença pode se somar aos custos do tratamento e afastar as crianças da escola, empurrando as famílias ainda mais para a pobreza extrema (Adhikari et al. 2009, Boelaert et al. 2010). É válido ressaltar que no caso das doenças negligenciadas o conceito de pobreza é algo ampliado, multidimensional, em que a pobreza vai além da ausência de renda. Ela compreende também aspectos sociais e governamentais, em que os acometidos carecem de renda e de oportunidades, seja de trabalho, de educação ou de saúde (Holveck et al. 2007).

Nesse contexto, o êxito de estratégias dependerá em grande parte da aceitação e participação efetivas da população nas ações profiláticas propostas (Santos et al. 2000). É reconhecido que as ações de vigilância das grandes endemias no Brasil podem ser consolidadas com a participação popular ativa e permanente (Dias et al 1998). Para tanto, estratégias de controle integrado podem ser pensadas associando o que é proposto pelo programa de controle das leishmanioses às práticas educativas para a população no Brasil (França et al. 2013). No caso das leishmanioses, diversos estudos demonstram que as populações afetadas desconhecem importantes conceitos sobre a doença, como transmissão, tratamento e prevenção (Weigel et al. 1994, Gama et al. 1998, Borges et al. 2008, Margonari et al., 2012). Apesar disso, a educação em saúde ainda não recebe os incentivos necessários para mobilizar ações preventivas no Brasil, sejam elas individuais ou coletivas (Schall 1998).

Esse cenário permite que as populações comumente afetadas, como os moradores das periferias dos grandes centros urbanos e favelas, grupos indígenas e trabalhadores rurais e migratórios sejam constantemente marginalizados pelo setor de saúde (Holveck et al. 2007). Soma-se a isso o senso comum, presente ainda nos dias atuais na área médica, de que os leigos, principalmente dos estratos socioeconômicos mais baixos, são desconhecedores das questões de saúde (Carandina & Magaldi 1989). Tais condicionantes impedem que a população negligenciada exerça seus direitos e liberdades fundamentais no que diz respeito à sua saúde física e mental, o que poderia ser modificado com práticas de saúde locais que contribuíssem para quebrar o ciclo de doença e pobreza que prevalece em muitas localidades (Holveck et al. 2007).

No contexto brasileiro, que conta com um programa de saúde universal como o Sistema Único de Saúde (SUS), as atitudes médica e social deveriam privilegiar as práticas preventivas, a participação ativa da sociedade e contribuir para envolver as classes sociais excluídas na atenção à saúde no país (Dias et al. 1998). Isso porque a saúde e a doença não são questões isoladas, mas sim coletivas e que sofrem influência de inúmeros aspectos –

condições de moradia, alimentação, trabalho, poder aquisitivo – que irão determinar a participação comunitária na resolução de problemas (Gama et al. 1998).

Porém, o aspecto social das populações afetadas é muitas vezes ignorado pelas políticas públicas de controle das endemias no Brasil, que ainda são verticalizadas e pouco participativas. Dessa forma, a desinformação da população pode dificultar a implantação das estratégias de controle, como no caso das leishmanioses, em que o pouco conhecimento observado em áreas endêmicas do Brasil e do Equador se mostrou restrito às pessoas ou às famílias que já haviam apresentado casos da doença (Weigel et al. 1994, Gama et al. 1998).

A educação em saúde surge então como uma ferramenta valiosa para programar medidas educativas e sanitárias contextualizadas e capazes de melhorar a qualidade de vida da população. Em um modelo ideal, as autoridades em saúde deveriam trabalhar em conjunto com as associações e líderes comunitários para garantir que as informações fossem disseminadas entre a população de forma correta e permanente (Ribeiro et al. 2013). A incorporação de escolas e residências contribuiria sobremaneira para essa perspectiva de saúde inclusiva e menos verticalizada. Isso permitiria a ação de atores fundamentais - alunos, professores e profissionais de saúde – no combate à doença ao esclarecê-los sobre assuntos como posse animal responsável, transmissão e prevenção da doença em humanos e cães (Ribeiro et al. 2013).

Entretanto, estudos sobre o conhecimento da população quanto às leishmanioses são escassos na literatura científica (Magalhães et al. 1990, Gama et al. 1998, Margonari et al. 2012). Dada a importância desse fator para o êxito dos programas de controle, se faz necessário investigar o conhecimento da população sobre as leishmanioses na área de estudo, aspecto ainda desconhecido para a cidade de Formiga.

4.4 Características gerais e importância médica dos flebotomíneos

Os flebotomíneos de importância médica são distribuídos em dois gêneros, *Phlebotomus* Rondani & Berté no Velho Mundo e *Lutzomyia* França no Novo Mundo (Young & Duncan 1994). Esses insetos são, além de vetores comprovados de *Leishmania* spp., também responsáveis pela veiculação de bactérias (*Bartonella bacilliformis*) e inúmeras arboviroses. Pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Foram agrupados separadamente por apresentarem corpo delgado, com pernas longas, as fêmeas necessitarem de sangue para a maturação dos ovos e por não apresentarem fase evolutiva na água, diferentemente das demais espécies da ordem Diptera (Malafaia 2009). O

caráter anatómico da espécie obriga as fêmeas a saírem dos abrigos em busca de alimentos, o que ocorre preferencialmente entre o entardecer e o nascer do sol, sendo que algumas espécies podem requerer mais de um repasto sanguíneo para maturar os ovos (Ready 2013). Por esse motivo, são as fêmeas as responsáveis por veicular patógenos para animais e humanos. Outros componentes da dieta dos flebotomíneos são seiva vegetal, soluções açucaradas e néctar de flores, consumidos por ambos os sexos.

Os flebotomíneos apresentam corpo diminuto (2,5mm de comprimento), piloso, são amarelos ou castanhos e voam de forma saltatória, mantendo as asas eretas quando em repouso (Aguilar & Medeiros 2003). São holometábolos, passando pelos estágios de ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto. As formas imaturas permanecem no solo ou em matéria orgânica, principalmente de origem vegetal, apresentando intensa mobilidade, sendo dificilmente encontradas nesses locais (Feliciangeli 2004). Por isso, as medidas de controle atualmente adotadas se destinam apenas à eliminação das formas adultas, as quais podem apresentar flutuações sazonais que facilitam seu controle (Shellock 2003).

Os locais de repouso dos insetos adultos são muitas vezes coincidentes com os criadouros das formas imaturas nos ambientes florestais e rurais, como tocas de animais e epífitas (Feliciangeli 2004, Rangel & Lainson 2009, Ready 2013). A reprodução ocorre pela liberação de feromônios e cantos de corte, podendo gerar formações específicas que geram barreiras reprodutivas entre as espécies (Ready et al. 2013).

Até o momento, existem cerca de 900 espécies de flebotomíneos registradas com aproximadamente 70 sendo incriminadas na transmissão das leishmanioses no mundo. No Brasil existem mais de 220 espécies conhecidas e 40 comprovadas ou suspeitas de transmitir *Leishmania* spp., sendo por isso seu estudo voltado para a compreensão da epidemiologia das leishmanioses no país (Castellon et al. 1989, Brandão-Filho 2003, Galati 2003, Ready 2013).

Para que um flebotomíneo seja incriminado como vetor, devem ser considerados alguns critérios para determinar sua competência vetorial. Dentre eles estão: observação de formas infectivas no intestino médio ou válvula estomodal de fêmeas naturalmente infectadas; atração e tendência a picar o homem e outros reservatórios; e sobreposição espacial coincidente entre os casos humanos e o vetor (Killick-Kendrick 1990, Rangel & Vilela 2008). Recentemente, Ready (2013) propôs a modificação de alguns critérios clássicos de Killick-Kendrick (1990) e a incorporação de modelagem matemática para demonstrar se o provável vetor é essencial na manutenção da transmissão e se há diminuição significativa da doença após redução populacional da espécie estudada.

4.5 O cão doméstico no cenário das leishmanioses

As sociedades modernas, principalmente no meio urbano, passaram por transformações demográficas e de moradia que modificaram significativamente seu comportamento em relação aos animais domésticos, os quais se tornaram um componente familiar. Evidências científicas apontam para a importância desses animais na saúde e bem estar das pessoas, principalmente no que se refere a cães e gatos (Raina et al. 1999, McConnell et al. 2011, Esch & Petersen 2013). Entretanto, os animais de companhia podem albergar e transmitir uma infinidade de doenças, como toxoplasmose e leishmaniose, permanecendo no ambiente familiar, muitas vezes, de forma assintomática.

Dentre as 15 espécies de *Leishmania* causadoras de doença, 13 apresentam algum grau de comportamento zoonótico de transmissão (Esch & Petersen 2013). No caso da *L. (L.) infantum*, agente etiológico da LV no Brasil, os cães são considerados o principal reservatório em meio urbano e capazes de funcionar como um elo entre os ciclos silvestres e doméstico/peridoméstico de transmissão (Braga et al. 1986, Gramiccia & Gradoni 2005). Apesar de no Velho Mundo a LV apresentar-se como uma antroponose, em que o homem é a principal fonte de parasitas, pesquisadores relataram infecções animais por *L. (L.) donovani* e aventaram a possibilidade do cão atuar como reservatório do parasito no Sudão (Dereure et al. 2003).

Alguns fatores podem ajudar a explicar a relevância epidemiológica que o cão apresenta no contexto das leishmanioses: funciona como uma fonte alimentar para o vetor, é susceptível à infecção por *L. (L.) infantum*, tem estreita relação com o homem e ainda apresenta parasitismo cutâneo mesmo quando assintomático (Rangel et al. 1986, Killick-Kendrick et al. 1997, Queiroz et al. 2011). Esses fatores, aliados à presença do vetor *L. longipalpis* em diversos estados brasileiros, permitiram a expansão da leishmaniose visceral canina (LVC) pelo país, onde a prevalência entre esses animais é elevada, principalmente em áreas endêmicas. Em regiões do nordeste foram relatadas taxas de prevalência de 32,5% e no sudeste a doença canina apresentou números ainda maiores nas áreas rurais, até 57% (Falqueto et al. 2009, Margonari et al., 2012; Lima et al. 2012). Porém, as áreas urbanas também podem apresentar elevada prevalência da LVC, como observado em Governador Valadares, Minas Gerais, no distrito de Carapina, onde a taxa de prevalência foi mais elevada (53,4%) que a do município como um todo (30,2%) (Barata et al. 2013). Esses números evidenciam que a LVC costuma ser mais prevalente no cão, além de preceder a doença em humanos, o que permite que as leishmanioses humana e canina coexistam em vários focos

conhecidos no país (Alencar et al. 1959, Mestre & Fontes 2007, Barata et al. 2013, Freitas et al. 2013).

O período de incubação da doença pode variar de 3 meses a vários anos e nem sempre ocorre a manifestação de sintomas, podendo se manter clinicamente inaparente. Os sintomas podem variar de acordo com as características genéticas e imunológicas do animal, virulência do protozoário, dentre outros, sendo os mais comuns: emagrecimento, febre, alopecia, onicogribose e ulcerações no focinho, orelhas, patas e cauda (Alencar 1959, Ferrer 1999). Como a LVC constitui uma doença sistêmica grave, muitas vezes o animal gravemente afetado não sobrevive à doença. Porém, em áreas endêmicas estima-se que até 70% dos cães positivos sejam assintomáticos, existindo um contingente considerável de animais que permanece no ambiente funcionando como reservatório da doença (Madeira et al. 2004).

Diversos estudos demonstraram que cães assintomáticos positivos são capazes de transmitir o parasito para o vetor, embora em alguns casos em taxas muito pequenas (Travi et al. 2001, Michalsky et al. 2007, Verçosa et al. 2008, Laurenti et al. 2013). Contudo, do ponto de vista da saúde pública, achados como esse não devem ser ignorados, recaindo sobre os inquéritos caninos o papel de detectar os possíveis reservatórios caninos, antecipando as soluções profiláticas voltadas para o controle do reservatório (Sanguinette 2011).

O cão também parece ter importância como reservatório de *Leishmania* spp. dermatópicas, embora sua participação ainda não tenha sido confirmada. No Velho Mundo, a leishmaniose tegumentar (LT) causada por *L. (L.) tropica* é considerada antroponose, mas esse protozoário foi encontrado parasitando raposas, chacais e cães, apontando-os como possíveis reservatórios na região (Guessous-Idrissi et al. 1997, Talmi-Frank et al. 2010, Esch & Petersen 2013). Entretanto, no Brasil, outros autores a consideram uma antropozoonose urbana associada frequentemente ao cão (Marzochi & Marzochi 1994).

No Novo Mundo a transmissão zoonótica de LTA vem ocorrendo comprovadamente a partir de animais de estimação, principalmente o cão (Esch & Petersen 2013). Porém, diversos autores sugerem a participação do animal em ciclos domésticos da doença funcionando como fonte de infecção de *L. (V.) braziliensis* no domicílio e peridomicílio, inclusive associados a casos humanos de LTA (Falqueto et al. 1986, Pirmez et al. 1988, Marzochi & Marzochi 1994; Volpini et al. 2004, Cunha et al. 2006). Na leishmaniose tegumentar causada por *L. (V.) peruviana*, o cão é como reservatório, embora ainda não existam provas contundentes de transmissão do parasito para os flebotômíneos (Llanhos-Cuentas et al. 1999). Por outro lado, apesar desse animal ser susceptível à infecção e apresentar a doença clínica, poucas são as evidências que permitem colocá-lo como um reservatório comprovado da doença na região (Esch & Petersen 2013).

4.6 Ferramentas para o diagnóstico da leishmaniose canina

O programa de controle da leishmaniose visceral no Brasil tem como uma das medidas de controle recomendadas a eutanásia dos cães positivos para LV. O procedimento se baseia na confirmação da infecção por métodos sorológicos, permitindo a eliminação dos animais e a vigilância epidemiológica de uma localidade. Devido ao papel relevante assumido pelo cão no ciclo de transmissão da doença e da presença massiva de animais assintomáticos, o diagnóstico deve ser acurado e precoce, contribuindo para a resolutividade do programa (Madeira et al. 2004).

Para tanto, os métodos utilizados devem ser confiáveis, de baixo custo e preferencialmente pouco invasivos (Gomes et al. 2008, Faria & Andrade 2012). Apesar de serem considerados métodos confiáveis para o diagnóstico da LVC, os testes sorológicos podem apresentar alguns problemas, devido à: propensão a reações-cruzadas, soroconversão não permanente dos animais, subjetividade na interpretação dos resultados, inconstância no fornecimento de kits e demora na liberação dos resultados, permitindo que cães positivos permaneçam no ambiente (Vexenat et al. 1996, Quinell et al. 2001, Manna et al. 2004, Schubach 2011).

Uma forma de minimizar esse viés é o emprego de técnicas diagnósticas distintas e simultâneas que, em conjunto, forneçam resultados mais seguros (Gramiccia & Gradoni 2005, Lira 2005, Carvalho 2009). Técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR) ganharam notoriedade nos últimos anos devido à sua capacidade de detectar infecções por *Leishmania* spp. mesmo com poucas quantidades de DNA (Fu et al. 1998; Oliveira-Pereira et al. 2006). Porém o elevado custo da técnica, dentre outras desvantagens, restringe sua utilização à pesquisa científica, sendo, por isso, o diagnóstico sorológico o método recomendado pelo MS, que atualmente preconiza a triagem dos animais através do Dual Path Plataform (DPP[®]) e a confirmação da infecção pelo ELISA.

4.6.1 Métodos sorológicos preconizados pelo ministério da saúde

O DPP[®] é um teste rápido qualitativo que emprega os antígenos recombinantes rK26 e rK39 de *L. (L.) infantum*. Apresenta como vantagens a maior precisão, interpretação simples dos resultados, uso de pequenos volumes de amostra e fácil aplicação em campo (Schubach 2011, Grimaldi et al. 2012). A presença de anticorpos anti-rK39 e anti-rK26 é indicativo de infecção, não tendo sido relatada reatividade com outros tripanossomatídeos (Burns-Jr et al. 1993, Bisugo et al. 2007, Silva et al. 2013). O teste rápido se apresenta como uma alternativa vantajosa, pois além de apresentar resultados similares aos do ELISA quanto à sensibilidade/especificidade, seu custo-benefício é maior, não necessitando de equipamentos e apurada perícia do manipulador. Além disso, pode ser usado, tanto em campo com amostras de sangue total, quanto na bancada, com soro (Schubach 2011, Silva et al. 2013).

O ELISA é um teste quantitativo bastante versátil, podendo ser adaptado para diversos antígenos, sejam brutos, sintéticos ou recombinantes, comportando inegotáveis possibilidades de variação (Maia & Campino 2008; Faria & Andrade 2012). É considerado de fácil execução e possui leitura objetiva dos resultados, sendo capaz de detectar baixos títulos de anticorpos (Cardoso 2013). Possui alta sensibilidade, porém, especificidade variável dependendo do antígeno utilizado. No Brasil, o kit distribuído pelo MS usa a cepa *L. major-like*, que não é o agente etiológico da LV no país. Estudos mostram que seu desempenho pode variar de acordo com o antígeno e com o estado clínico dos cães, podendo ocorrer a redução da sensibilidade do teste em cães assintomáticos (Mettler et al. 2005, Faria & Andrade 2012).

4.6.2 Aplicação de métodos moleculares na detecção de *Leishmania* spp.

Nos últimos anos, a PCR tem sido intensamente utilizada para detecção de DNA de *Leishmania* spp., para o diagnóstico da leishmaniose e para a caracterização das espécies do parasito (Antinori et al. 2007). Diversas técnicas baseadas na PCR surgiram como alternativas precisas para a identificação das espécies de *Leishmania* em uma diversidade de amostras biológicas: pele, sangue periférico, soro, aspirados de medula, de baço, de fígado, de linfonodo, urina, dentre outros (Fisa et al. 2008, Queiroz et al. 2011, Cardoso 2013). Por apresentar elevadas taxas de sensibilidade e especificidade, podem ser usadas como complemento aos demais testes sorológico e parasitológico.

Inúmeras aplicações da PCR com diferentes alvos para *Leishmania* spp. foram relatados: para o minicírculo do cinetoplasto (kDNA), mini-exon do RNA e genes das subunidades ribossômicas (rRNA) (Antinori et al. 2007; Rocha et al. 2010). A PCR dirigida ao kDNA é capaz de identificar isolados de *Leishmania* ao nível de subgênero ou complexos, responsáveis pelas leishmanioses no Novo Mundo, como descrito por Bruijn & Barker (1992) para o complexo *L. (V.) braziliensis* e Eresh e colaboradores (1994) para o *L. (L.) mexicana* (Ferreira 2010).

O DNA ribossômico (rDNA) possui unidades repetidas ou em *tandem* dentro da região nuclear, existindo de 100 a 500 cópias desse gene no genoma (Silva et al. 2010). O rDNA tem sido um dos alvos mais explorados na identificação de espécies de *Leishmania*, sendo os genes codificantes da subunidade menor do ribossomo (SSUrRNA) bem conservados entre as espécies desse gênero (Silva et al. 2010). Além disso, esse alvo permite discriminar o segmento variável através do sequenciamento, independente da linhagem, grupo ou espécie estudada (Floeter-Winter 2010, Silva et al. 2010). Os iniciadores R221, R332, R223 e R333, desenvolvidos por Van Eys e colaboradores (1992), são os mais descritos na amplificação de regiões do SSUrRNA, não exigindo o isolamento do parasito (Silva et al. 2010).

A Nested PCR (LnPCR) é uma técnica altamente sensível e específica quando conduzida com aspirados de medula e linfonodo, bem como com sangue periférico (Fisa et al. 2001). A metodologia, adaptada e modificada de Cruz e colaboradores (2002), permite a amplificação inicial de um fragmento de aproximadamente 603 pb pela utilização dos iniciadores R1: 5' GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG 3' e R2: 5' GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG 3', seguida da amplificação de um fragmento de aproximadamente 353 pb a partir do produto amplificado da primeira reação, pela utilização dos iniciadores R3: 5' TCC CAT CGC AACCTC GGT T 3' e R4: 5' AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3'. Uma desvantagem está na possibilidade de se amplificar sequências alvo de outros tripanossomatídeos com tamanho similar às de *Leishmania* spp., como observado por Silva e colaboradores (2010) ao usar tanto os iniciadores R221, R332, R223 e R333 quanto outros desenhados para o SSUrRNA. Logo, seu uso deve ser empregado com ressalvas nas áreas endêmicas para ambas as doenças. Nesse trabalho, optamos por utilizar essa técnica devido à sua maior especificidade, além de seu posterior sequenciamento.

4.7 Ferramentas de geoprocessamento e sua contribuição às políticas públicas de saúde

As doenças transmitidas por vetores muitas vezes apresentam um perfil endêmico-epidêmico em que a dinâmica ambiental afeta sua disseminação e repercute no comportamento biológico dos vetores. Por isso é importante reconhecer os padrões espaço-temporais de transmissão dessas doenças, os quais podem ser elucidados através de técnicas de geoprocessamento.

O geoprocessamento é uma combinação de técnicas matemáticas e computacionais para o tratamento de informações geográficas que se baseia em um sistema automatizado para captar, armazenar, recuperar, analisar e visualizar os dados espaciais, o sistema de informação geográfica (SIG) (Clarke et al. 1996, Gurgel 2003). O SIG surgiu na década de 1970 como um campo multidisciplinar baseado na cartografia e na matemática com aplicação no planejamento urbano, geografia e ciência da computação, mas que com o passar dos anos não apenas sofreu influência como também influenciou diversas áreas como planejamento de desastres naturais, arqueologia e transporte (Clarke et al. 1996).

Embora no início muitos questionassem a validade do SIG para as ciências da saúde, é indubitável que atualmente esse sistema pode trazer excelentes contribuições para a compreensão da epidemiologia das doenças infecciosas, principalmente das negligenciadas (Clarke et al. 1996). Essas ferramentas permitem elucidar, por exemplo, os fatores associados com as doenças e suas características de transmissão, além de formar um banco de dados georreferenciado que pode ser constantemente atualizado, possibilitando o monitoramento da doença ao longo do tempo. As análises espaciais geradas podem contribuir também para a determinação de áreas de risco e para a visualização de agrupamentos (clustering) e/ou heterogeneidade espacial da doença, permitindo esclarecer como os eventos geográficos, ambientais e ecológicos concorrem para o surgimento de novos casos ou manutenção do perfil da doença em um determinado local (Bhunja et al. 2013).

No Brasil, o programa de vigilância e controle da leishmaniose criado pelo MS apresenta diretrizes que além de almejarem o controle efetivo da doença também buscam reduzir os riscos associados a ela, embora a incidência da doença, principalmente da LV, não tenha diminuído no Brasil (Romero & Boelaert 2010, Barbosa et al. 2013). Para alcançar esse objetivo, o MS recomenda que os municípios identifiquem as áreas prioritárias para a implantação das medidas de controle e vigilância contempladas no programa, principalmente nas cidades consideradas áreas de transmissão intensa para a leishmaniose. Nesse sentido, o SIG pode ser usado na compreensão da epidemiologia das doenças infecciosas, contribuindo

para determinar onde os recursos devem ser alocados e as medidas de controle aplicadas (Barbosa et al. 2013).

É reconhecido que as doenças infecciosas podem sofrer uma variação sazonal e temporal devido à heterogeneidade da exposição aos fatores de risco, em que os determinantes da doença operam de maneira interligada em níveis variados, sejam eles locais ou individuais (Werneck et al. 2007). Alguns dos fatores podem ser: condições de moradia, variações climáticas, políticas de uso da terra, idade e estado nutricional, dentre outros (Dye & Williams 1993, Quinnell & Dye 1994, Tesh 1995). Esses fatores podem determinar que a doença se apresente de maneira heterogênea dentro da mesma localidade ou fazer com que os focos surjam, porém permaneçam inalterados ao longo do tempo como observado no Maranhão e em Sergipe (Tavares & Tavares 1999, Oliveira et al. 2001, Werneck et al. 2002, Silva et al. 2008). Nesse último caso, o programa de controle poderia ser efetivado com a utilização de ferramentas de análises espaciais e suas inúmeras possibilidades de análises das variáveis que envolvem a leishmaniose.

Porém, mesmo com sua aplicação em epidemiologia e saúde pública já bem desenvolvida e com inúmeros benefícios, as tecnologias advindas do SIG parecem ser subutilizadas ou até mesmo ignoradas pelas secretarias de saúde em muitos municípios brasileiros (Shaw 2012). É válido ressaltar que em muitos casos o SIG é visto apenas como uma ferramenta de mapeamento, dessa forma, todas as suas potencialidades ficam pouco compreendidas (McLafferty 2003). De fato alguns obstáculos, muitos deles difíceis de superar nos países em desenvolvimento, impedem a utilização do SIG na esfera pública: preço elevado dos softwares, ausência de microdados (espaciais ou de saúde), restrições de privacidade/confidencialidade dos dados e escassez de pessoal treinado (McLafferty 2003, Joshua et al. 2012). Entretanto, algumas barreiras vêm sendo quebradas, como por exemplo, a disponibilização de softwares gratuitos com interface intuitiva que facilitam a utilização desse tipo de ferramenta (Shaw 2012). Apesar das ressalvas, o SIG pode ser visto como uma ferramenta capaz de trazer benefícios importantes para a saúde pública, principalmente quanto ao monitoramento da dinâmica das doenças infecciosas, fato pelo qual sua utilização merece receber maior destaque na formulação de estratégias e políticas públicas de saúde no Brasil.

Com base no que foi exposto, o presente trabalho teve como objetivo conhecer alguns aspectos epidemiológicos das leishmanioses no município de Formiga, Minas Gerais. Para atingir esses objetivos, o trabalho utilizou diversas metodologias entomológicas, de diagnóstico, moleculares e de georeferenciamento.

5 METODOLOGIA

5.1 Área de estudo

O município de Formiga pertence à mesorregião Centro-Oeste de Minas Gerais, à microrregião de Formiga e às Bacias Hidrográficas do Rio São Francisco e do Rio Grande. Os municípios limítrofes de Formiga são: Santo Antônio do Monte, Arcos, Córrego Fundo, Pains, Pimenta, Guapé, Cristais, Candeias, Itapeçerica, Pedra do Indaiá e Camacho (Fig. 2).

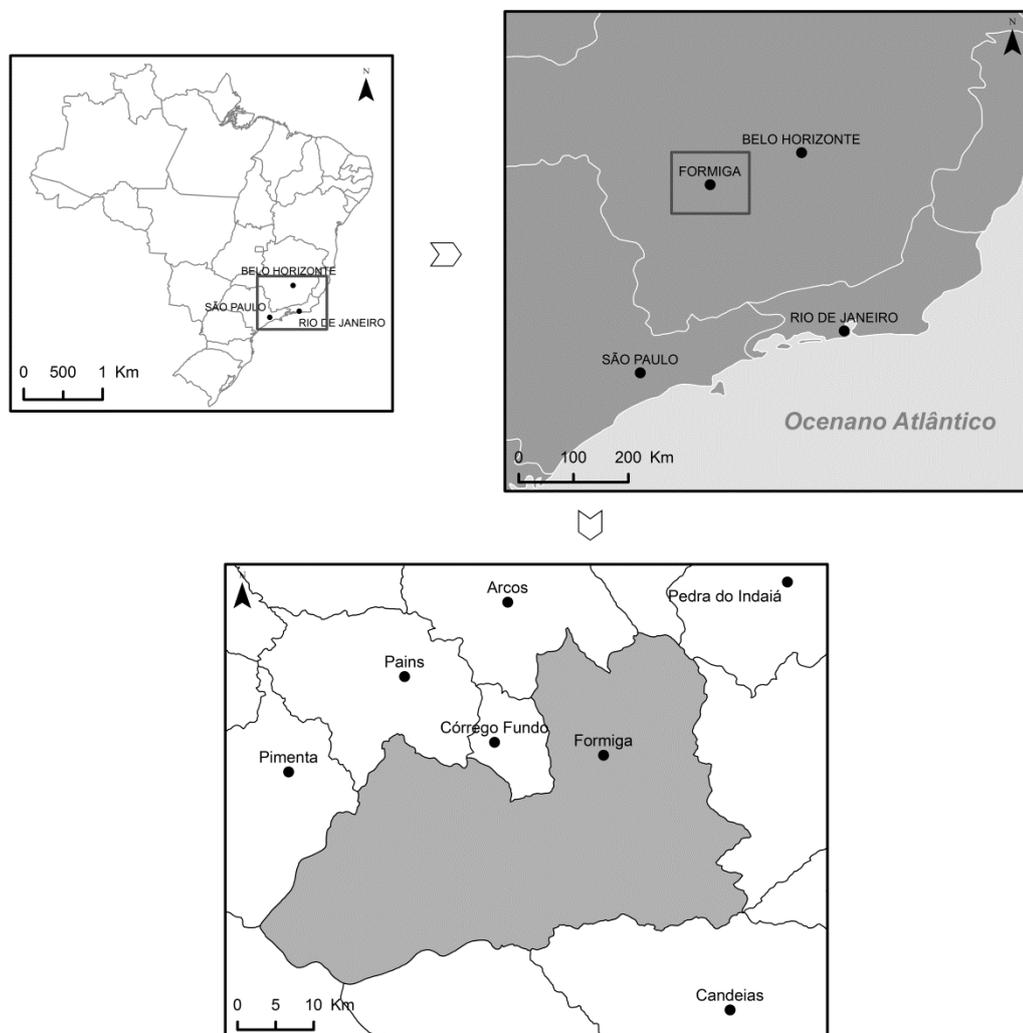


Figura 2. Localização do município de Formiga no estado de Minas Gerais, Brasil.

Está localizada a 196 km da capital do estado (Belo Horizonte) e possui 65.128 habitantes em uma área total de 1502 km² (IBGE 2013). A altitude máxima é de 1125m na serra Capão da Mata e mínima de 785m na represa de Furnas, alcançando 841,45m no ponto central da cidade. A vegetação do município é de transição entre cerrado e mata atlântica. O clima predominante é o tropical de altitude, com temperatura média anual de 21,3°C - máxima anual de 28,7°C e a média mínima anual é de 15,8°C - e precipitação média anual de 1400 mm.

O município conta com uma extensa rede hídrica, sendo os principais rios o Rio Formiga, Rio Mata Cavalo e Rio Pouso Alegre – além de 10 lagoas (Pinto 2012). A cidade também é banhada pelo lago artificial de Furnas, situado a 20 km do município. Este compreende um reservatório com 23 bilhões de m³ de água, superfície de 1457 km² de área inundada e 3,7 mil km de perímetro, sendo considerada a maior extensão de água do estado e um dos maiores lagos artificiais do mundo (Martins 2010). A principal atividade de Formiga está no setor terciário, seguido da indústria (IBGE 2013). Apesar de apresentar alguns locais de mata preservada, o crescimento urbano tem demandando intensamente o uso e ocupação do solo nestes locais (Pinto, 2012).

5.2 Estudo do conhecimento da população

5.2.1 Cálculo da amostra da população de Formiga

A amostra foi calculada utilizando o método de probabilística do tipo estratificada proporcional segundo o sexo e a idade. A informação utilizada para estimar o tamanho de cada estrato foi o Censo Demográfico 2010, do IBGE. O número de entrevistados mínimo foi de 398 indivíduos (Tab. 1). Os critérios de inclusão estabelecidos para o estudo foram: ter mais de 15 anos, ser residente dos bairros Novo Horizonte, Centro (bairros com maiores números de casos caninos segundo a SMS de Formiga), Nossa Senhora de Lourdes ou Lajinha (bairros com menores números de casos caninos). A amostra mínima foi calculada de modo que o erro máximo de estimativa fosse de ±5% (ou 0,05) com 95% de confiança.

Tabela 1. Especificação do tamanho dos estratos de acordo com o que foi estipulado para compor a amostra e o que foi realizado, segundo o sexo e idade, no município de Formiga.

Idade	Sexo		Total	
	Masculino	Feminino	Estipulado	Realizado
15 a 20	20	20	40	43
21 a 24	22	19	41	43
25 a 34	40	40	80	88
35 a 44	36	38	74	82
45 ou mais	76	87	163	171
Total	194	204	398	427

5.2.2 Delineamento do estudo e construção do questionário

Foi realizado um estudo descritivo que integra a abordagem quantitativa para a coleta e análise dos dados. Para a formulação das perguntas do questionário foram utilizados conceitos relevantes sobre a leishmaniose baseados em trabalhos semelhantes descritos na literatura (Sosa-Estani 2001, Aparicio & Bitencourt 2004, Ampuero et al. 2005, Luz et al. 2005, Borges et al. 2008, Silva-Nunes et al. 2008). O questionário formulado foi então previamente validado e aplicado em estudo publicado por Margonari e colaboradores em 2012 (Anexo 1).

5.2.3 Construção dos indicadores (variáveis dependentes)

5.2.3.1 Determinação do nível de conhecimento das leishmanioses

As leishmanioses apresentam ciclo epidemiológico complexo em que diversos fatores se conjugam para determinar a transmissão da doença. Por isso, a estimativa do conhecimento que um indivíduo possui sobre a enfermidade deve ser multidimensional, abordando conceitos que vão desde os sintomas até as medidas de controle, como mostrado por Luz e colaboradores (2005).

Dessa forma, foi construído o indicador “conhecimento das leishmanioses” para determinar se a população de Formiga sabe ou não de maneira satisfatória sobre as leishmanioses. O indicador foi obtido através da análise das respostas das perguntas 10, 11, 12 e 13 do questionário (Anexo 1). A pergunta 10 “*Você sabe como ela é transmitida?*”

apresentou as opções: a) *flebotomíneo*, b) *cão doente*, c) *não sabe* e d) *outros*, sendo considerada como resposta adequada, apenas a primeira opção. A pergunta 11 “*Você sabe qual animal pode pegar leishmaniose?*” apresentou as opções: a) *cão*, b) *gato*, c) *rato*, d) *galinha*, e) *não sabe* e f) *outros*; tendo sido consideradas corretas as opções de a, b e/ou c. A questão 12 “*Você sabe como prevenir a doença?*” apresentou as opções a) *limpar o terreno*, b) *sacrificar cães doentes*, c) *uso de repelentes*, d) *evitar água empoçada*, e) *evitar o doente com leishmaniose*, f) *não sabe* e g) *outros*, sendo consideradas corretas as opções de a, b e/ou c. Por fim, a pergunta “*Qual atitude você tomaria diante de um ser humano suspeito de leishmaniose?*” (questão 13) apresentou as opções: a) *levaria para um hospital*, b) *procuraria um agente da prefeitura*, c) *nada*, d) *não sabe* e e) *outro*, onde foi considerada correta apenas a opção a. Baseado na combinação das quatro perguntas descritas foi construído um indicador para calcular o conhecimento das leishmanioses. O banco de dados foi construído a partir da categorização das respostas em: “sabe” (1) para os que responderam corretamente a todas essas perguntas e “não sabe” (0) para as respostas consideradas erradas.

5.2.3.2 Determinação dos fatores de risco

Para determinar se a população de estudo apresentava algum fator de risco peridomiciliar para leishmaniose, foram analisadas as perguntas 15 a 27 do questionário, que abordavam as condições do peridomicílio (presença de curso d’água, áreas verdes, dentre outros) Para todas as perguntas, as opções eram *sim* ou *não* (Anexo 1). A média e a mediana dos fatores de risco foi igual a 3, tendo sido utilizada para definir o indicador dicotômico “fator de risco e peridomiciliar”. Com base nesse valor, o indicador foi estabelecido como 0 (até 3 fatores –) ou 1 (mais de 4 fatores –).

5.2.4 Análise dos dados

Os dados foram analisados por meio de estatísticas descritivas com estimativas de médias, frequências e percentuais.

Primeiramente a população foi descrita quanto às suas características socioeconômicas e demográficas e com relação ao conhecimento de alguns aspectos relativos ao ciclo epidemiológico das leishmanioses. Posteriormente, foram construídos os indicadores

“conhecimento das leishmanioses” e “riscos peridomiciliares para as leishmanioses” a que a população está exposta de acordo com as respostas obtidas.

Os entrevistados foram subdivididos em dois grupos de acordo com o indicador “conhecimento das leishmanioses” (0 = não; 1 = sim) e comparados, de forma a verificar diferenças entre ambos quanto às características socioeconômicas e demográficas. Em seguida, os entrevistados foram subdivididos em dois grupos de acordo com o indicador “riscos peridomiciliares para as leishmanioses” (0 = até 3 riscos e 1 = 4 ou mais) e também foram comparados quanto às características socioeconômicas e demográficas.

Foram estimadas as razões de chance bruta e ajustada e os respectivos intervalos de confiança a um nível de 95%. Para as análises bruta e ajustada do conhecimento da população em relação às características socioeconômicas e fator de risco peridomiciliar, foi calculada a razão de chances (*odds ratio*). A razão de chances é uma medida de associação usada para comparar as probabilidades de ocorrência do desfecho de interesse devido à exposição a uma variável de interesse. No presente estudo, o odds ratio foi usado para determinar se uma exposição (característica socioeconômica e fator de risco) é capaz de influenciar o resultado (conhecimento da população). Para tanto, os valores são estabelecidos em O.R = 1 ausência de resultado, O.R > 1 exposição associada ao resultado e O.R < 1 exposição relacionada a menores chances de ocorrer o resultado. Por fim, o intervalo de confiança (IC) é usado para estimar a precisão do O.R.: grandes intervalos indicam pouca precisão do O.R. e intervalos curtos significam maior precisão. Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o pacote estatístico SPSS 13.0 para Windows (IBM Corporation, USA).

5.3 Estudo entomológico

5.3.1 Escolha dos domicílios

O trabalho de capturas sistemáticas de flebotomíneos se iniciou em maio de 2012 após avaliação minuciosa dos bairros que constituíam o município de Formiga. Vários fatores ecológicos e ambientais foram observados para permitir a escolha dos domicílios que fariam parte do estudo.

O local de instalação das armadilhas foi determinado por conveniência de acordo com as características da residência que propiciassem a ocorrência dos flebotomíneos: grandes quintais, presença de pomares e plantas ornamentais, presença de animais domésticos (cães,

galinhas, pássaros, dentre outros), proximidade de lotes vagos e áreas verdes. A distribuição das armadilhas se baseou também em informações fornecidas pela Secretaria Municipal de Saúde de Formiga sobre a localização dos casos caninos e humanos de leishmaniose, compreendendo 22 bairros.

Os moradores dos domicílios selecionados foram informados sobre o teor e objetivos do presente trabalho e posteriormente, assinaram um termo de colaboração com o projeto.

5.3.2 Capturas sistemáticas

Em cada região pré-estabelecida foram escolhidos dois domicílios, onde foi disposta uma armadilha luminosa do tipo HP no peridomicílio de cada um deles.

As capturas foram realizadas nos quatro primeiros dias de cada mês durante um ano, de maio de 2012 a abril de 2013, totalizando 24 armadilhas. As armadilhas foram colocadas às 17 horas e retiradas às 7 horas do dia seguinte. Os insetos coletados em cada noite foram mortos em câmaras contendo éter P.A. e colocados em tubos de hemólise contendo álcool 70%, sendo posteriormente rotulados e levados para o Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos (CRNIF - CPqRR). Os insetos foram então submetidos à triagem e sexagem, seguido de preparação, montagem e identificação conforme técnicas modificadas por Langeron (1949) e adotadas pelo CRNIF - CPqRR. Todos os espécimes capturados foram identificados através de características morfológicas, conforme a chave de identificação proposta por Young & Duncan (1994).

5.3.3 Dados climáticos e sazonalidade

Os dados bioclimáticos foram obtidos através do Instituto Nacional de Meteorologia – INMET – e posteriormente correlacionados com a densidade flebotomínica encontrada mensalmente no estudo. Foram recuperados dados sobre umidade relativa do ar, precipitação e temperatura a partir da Estação Meteorológica Automática de Formiga (A524), compreendendo todos os meses de captura entomológica - maio de 2012 a abril de 2013.

5.3.4 Análise estatística

As análises foram feitas utilizando o software estatístico GraphPad Prism 5.0 (Graph Prism Inc., San Diego, CA). O teste de normalidade qui-quadrado de D'Agostino & Pearson foi conduzido para testar a hipótese nula de que os dados seguem uma distribuição Gaussiana (D'Agostino, 1986). Quando os dados não desviaram desta distribuição ($p > 0.05$), eles foram analisados através do coeficiente de correlação de Pearson. O teste foi realizado no nível de significância de 0,05.

5.4 Investigação da leishmaniose canina

5.4.1 Amostragem canina

O cálculo do número de cães a serem amostrados foi realizado com base nos dados obtidos pelo senso canino anual realizado pela prefeitura de Formiga para a campanha de vacinação anti-rábica. Para calcular a amostra foram considerados os seguintes parâmetros de acordo com o “Cálculo de amostra para determinar prevalência” (WHO 1995): 1- prevalência esperada da infecção canina na área de estudo de 50% (este valor foi estimado uma vez que não se dispõe de dados de prevalência e porque com 50% se obtém o maior “n” possível); 2- número total de cães (estimado através da última campanha de vacinação contra a raiva); 3- intervalo de confiança a 95% com precisão de 0,1.

A partir destes dados foi definido o número mínimo de 500 cães a ser trabalhado na área. A coleta do material biológico foi realizada por veterinários indicados pela Secretaria Municipal de Saúde (SMS) do município. Neste trabalho, foram utilizados 570 cães. Os animais receberam um número de identificação de acordo com a ordem de entrada no estudo. Os mesmos números foram utilizados para a identificação das amostras coletadas.

5.4.2 Coleta de amostras biológicas

A coleta de material biológico de cães ocorreu no Centro de Defesa da Vida Animal (CODEVIDA) e em 5 clínicas veterinárias colaboradoras do projeto. No CODEVIDA, órgão

municipal, foram coletadas amostras de sangue total periférico de cães durante os procedimentos de esterilização organizados pela prefeitura, os quais ocorriam quinzenalmente. Um médico veterinário realizava as coletas necessárias após o procedimento cirúrgico, quando os animais ainda se encontravam anestesiados. Estes animais eram de rua recolhidos pela prefeitura ou domiciliados encaminhados pelos donos.

Nas clínicas um médico veterinário coletava o material biológico dos animais que compareciam ao estabelecimento. Para garantir a participação da população, a SMS divulgou em jornais e em programas de rádio os locais que estariam colhendo as amostras para os exames de detecção da leishmaniose.

O material foi coletado utilizando seringas e agulhas descartáveis para punção venocefálica, obtendo-se de 3 a 5ml de sangue por animal. Posteriormente, foram feitas duas alíquotas do sangue - uma para o diagnóstico molecular em tubos Vacutainer[®] EDTA e outra para o sorológico em tubos Vacutainer[®] seco. Após a coleta, os tubos foram armazenados em geladeira ou caixa térmica com gelo até o término dos procedimentos. Em seguida, os tubos para sorologia foram centrifugados a 6000rpm e o soro separado em tubos eppendorf de 1,5 ml. Estas amostras foram então congeladas juntamente com as amostras destinadas ao exame molecular no freezer da SMS até poderem ser armazenadas no Laboratório de Educação em Saúde e Ambiente do Centro de Pesquisas René Rachou.

5.4.3 Exame clínico

No momento da coleta do material, o veterinário responsável avaliou o estado clínico dos cães individualmente. Foi preenchida uma ficha onde constava o número do cão, dados pessoais do proprietário, as características físicas do animal e sinais clínicos sugestivos da doença, como linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, dermatite, onicogribose, dentre outros. Essas informações foram utilizadas para a classificação do cão como assintomático ou sintomático para a leishmaniose após os exames sorológicos e moleculares (Anexo 3).

5.4.4 Métodos sorológicos

5.4.4.1 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

O teste foi realizado no LEPI/ UFOP seguindo as instruções do kit EIE Leishmaniose Visceral Canina do Instituto Bio-Manguinhos seguindo protocolo da FUNED (Fundação Ezequiel Dias).

O soro e controles foram diluídos em microplacas. A primeira placa continha 5µL soro/controle e 250µL diluente (1:50). A segunda placa continha 100µL do diluente em cada poço, aos quais foram adicionados 100µL da diluição da primeira placa (1:100). Foram então transferidos 100µL da diluição dessa segunda placa para a placa sensibilizada fornecida pelo kit. Os strips foram selados com folha adesiva e incubados a 37°C (+/- 1° C) por 30 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas manualmente 6 vezes com tampão de lavagem (200µL/orifício). Distribuíram-se, então, 100µL do conjugado em cada poço e se procedeu a incubação e lavagem como mencionados anteriormente. Posteriormente, foram adicionados 100µL do substrato em cada orifício e a placa incubada em temperatura ambiente por 30 minutos, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com a adição de 50µL de ácido sulfúrico 2M em todos os poços. A leitura foi realizada em leitora de microplacas Tp-READER (Termo Plate) com filtro de 450nm. A validade do teste se deu a partir do cálculo do cut-off de cada placa (média dos controles negativos multiplicado por 2), sendo consideradas positivas as amostras que se encontravam iguais ou acima do valor de “cut-off” e negativas as amostras com densidade óptica abaixo do valor de “cut-off”. Os resultados indeterminados compreendem os valores de densidade óptica entre o valor do “cut-off” e o valor deste multiplicado por 1,2.

5.4.4.2 Teste de imunocromatografia rápida de duplo percurso (Dual Path Platform – DPP®)

O kit diagnóstico DPP é composto por 1 lanceta, 1 alça coletora de amostra, 1 frasco de solução tampão e uma plataforma de teste com 2 poços. O poço 1, denominado “Amostra + Tampão” é onde se coloca a gota de sangue obtida com a lanceta. Em seguida, são adicionadas 2 gotas do tampão, o que faz a solução obtida correr por uma fita condutora (S1).

Posteriormente são adicionadas outras 4 gotas do tampão no poço 2 intitulado “Tampão”, onde se encontra a fita S2. O processo ocorre da seguinte forma: caso existam anticorpos anti-*Leishmania* na amostra coletada, os mesmos migram pela fita S1 até atingirem a linha teste (T) localizada na fita S2, ali o anticorpo se liga ao antígeno específico imobilizado. Em seguida, o conjugado aplicado migra pela fita S2 e é capturado pelo complexo antígeno-anticorpo já formado na linha teste, produzindo uma coloração rosada. O restante do conjugado que não foi capturado continua migrando pela fita S2 até alcançar a linha controle (C), produzindo também uma linha de coloração rosada. A leitura é feita visualmente na própria plataforma, onde uma linha rosada indica resultado negativo (apenas linha controle) e duas, amostra reagente (linha teste e linha controle).

Para realização do teste DPP[®] nas amostras obtidas nesse trabalho, foram adicionados 5µL de sangue total ao poço “Amostra + Tampão” e colocadas 2 gotas de tampão. Após 5 minutos, foram adicionadas outras 4 gotas do tampão no poço “Tampão”. Entre 10 e 15 minutos depois foi realizada a leitura: o aparecimento de uma linha indicava resultado negativo e o surgimento de duas, resultado positivo.

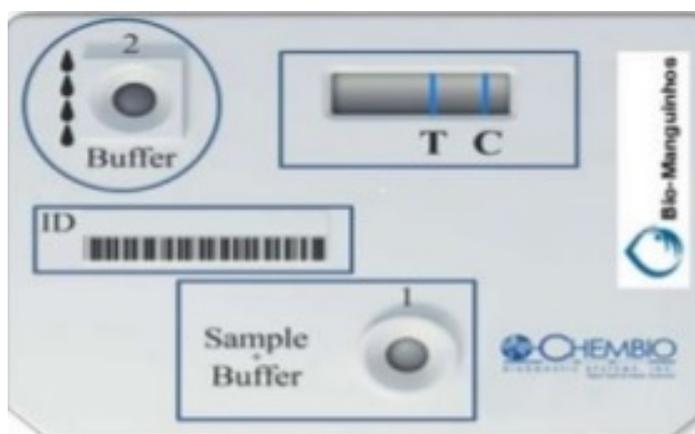


Figura 3. Plataforma de teste rápido imunocromatográfico (DPP[®]) mostrando o local de aplicação da amostra e do tampão. O local onde é feita a leitura do resultado a partir das linhas teste (T) e controle (C) é mostrado na parte superior da plataforma (Fonte: Júnior EMQ 2011).

5.4.5 Métodos moleculares

5.4.5.1 Extração de DNA

Foram aliqüotados 300µl de cada amostra em tubos de 1,5ml e a eles foram adicionados 400µl de tampão NET10, 40µl SDS 10% e 4µl de proteinase K (20mg/ml). Os tubos foram misturados por inversão e incubados “overnight” a 56°C. Após a incubação, foram acrescentados 500µl de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico aos tubos incubados, os quais foram novamente misturados por inversão 10 vezes. Após centrifugação por 6 minutos a 13.000rpm, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5ml, contendo 500µl de clorofórmio/álcool isoamílico misturados 10 vezes por inversão. Foi realizada outra centrifugação por 6 minutos a 13.000rpm. O sobrenadante foi recuperado para novo tubo de 1,5ml contendo 700µl de etanol absoluto e 30µl de acetato de sódio 3M e misturado 10 vezes por inversão. Após incubação de 20 minutos a -70 °C, o conteúdo foi centrifugado por 6 minutos a 13 000rpm. O sobrenadante foi descartado e no mesmo tubo foram acrescentados 1000µl de etanol 70% e misturado 10 vezes por inversão, seguido de outra centrifugação por 6 minutos a 13.000rpm. O sobrenadante foi descartado, o tubo seco por exposição ao ambiente e o DNA ressuspendido em 100µl de água destilada estéril. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop®-1000 a partir das leituras a 260nm para estimar a concentração e a razão 260/280nm foi usada para qualificar quanto à pureza – a razão entre 1,4 e 1,8 é aceita como pura.

5.4.5.2 Nested PCR para o gene SSUrRNA de *Leishmania* (LnPCR)

A LnPCR – SSUrRNA amplifica um fragmento do gene SSUrRNA que é uma região conservada entre todas as espécies de *Leishmania*. Esta técnica foi utilizada para a detecção direta, sem a necessidade de isolamento do parasito, a partir de diferentes amostras biológicas, conforme Van Eys et al. 1992 e Cruz et al. 2002, 2006. Todos os procedimentos relacionados a essa técnica foram conduzidos no LEPI/UFOP.

Foi realizada uma amplificação inicial a partir de 5µl de DNA previamente diluído em 100µl de água destilada estéril, que resultou em um fragmento de 603 pb nas amostras

positivas, pela utilização dos seguintes iniciadores: R1: 5' GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG 3' e R2: 5' GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG 3. Para esta reação foi feita uma mistura de 5µl da amostra de DNA, 33,75µl de água destilada estéril, 5µl de tampão (10x), 3µl de MgCl₂ (15mM), 1µl de dNTP (10mM), 1µl de cada primer a 15pmol cada (R1/ R2) e 0,25µl de Tth DNA polimerase (5U/µl) (Platinum[®] Life Technologies), totalizando 50µl. A reação no termociclador Veriti[®] 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos seguido de anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos com extensão final a 72°C por 5 minutos. Posteriormente, foi obtido um segundo fragmento de aproximadamente 353 pb a partir do produto amplificado da primeira reação. Para tanto, dilui-se 25µl do produto amplificado em 1ml de água destilada estéril, do qual se utilizou 10 µl. Os iniciadores R3: 5' TCC CAT CGC AAC CTC GGT T 3' e R4: 5' AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3' foram usados em uma segunda reação composta por: 9,37µl de água destilada estéril, 2,5µl de tampão (10x), 1,5µl de MgCl₂ (15mM), 0,5µl de dNTP (10mM), 0,5µl de cada primer a 15 pmol cada (R3/ R4) e 0,13µl de Tth DNA polimerase (5U/µl) (Platinum[®] Life Technologies). A reação ocorreu no mesmo termociclador e se deu da seguinte forma: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos seguido de anelamento a 65°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 5 minutos.

Em todas as reações foi utilizado como controle positivo 20ng de DNA extraído de cultura de *L. (L.) infantum* (cepa JPC), e como controle negativo água destilada estéril. Para evitar contaminações com amplicons, os procedimentos de preparação das amostras e amplificação foram conduzidos em locais separados, usando materiais exclusivos de cada área e adotando meios de descontaminação, como exposição à luz ultravioleta (UV).

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

5.4.5.3 Identificação das espécies de *Leishmania*

5.4.5.3.1 Sequenciamento

A técnica de sequenciamento foi usada para determinar as espécies de *Leishmania* presentes nas amostras com resultado positivo na segunda reação da LnPCR (fragmento de 353pb). As bandas de maior intensidade à luz UV foram cortadas e purificadas usando o kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN) de acordo com as especificações do fabricante. O produto obtido foi então usado como molde para uma nova amplificação e posterior sequenciamento usando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing. A mistura para reação foi preparada da seguinte forma: 1 µl do PREMIX (BigDye), 1µl de tampão (5x), 1µl de cada iniciador (senso ou anti-senso) em tubos separados na concentração de 3,2 pmol, 1µl de água destilada estéril e 5µl do material purificado, totalizando volume final de 10µl. O programa empregado foi: 35 ciclos de 96°C por 15 segundos alternando para 65°C por 15 segundos. As sequências foram determinadas pelo sequenciador de DNA ABI3730 (Life Technologies) e analisadas pelo programa BioEdit para edição e alinhamento. As sequências obtidas foram então comparadas às existentes do GenBank para identificação de 3 espécies de interesse na área de estudo: *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* (Fig. 4).

5.4.5.3.2 PCR- RFLP dirigida ao minicírculo do kDNA

A técnica de PCR kDNA seguida de RFLP foi utilizada para esclarecer dúvidas referentes ao sequenciamento de amostras que apresentaram resultado duvidoso ou insatisfatório.

A técnica de PCR-kDNA empregada amplificou um fragmento de 120pb referente à região conservada do minicírculo do cinetoplasto de *Leishmania*, segundo Degraeve et al. 1994. Os iniciadores empregados foram 5'(C/G)(C/G)(G/C) CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3' e 5'GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3'. A reação foi preparada para um volume final de 50 µl, composta por 5 µl de solução tampão (10x), 5 µl de DNA a ser testado, 1,5 de MgCl₂ (50mM), 0,5 µl de dNTP (25mM), 2 µl de cada primer a 10 pmol, 0,2 µl de Tth DNA polimerase (5U/µl) e 33,8 µl de água destilada estéril para completar a reação.

```

          10      20      30      40      50
Le_braziliensis (M80292) R3R4.seq  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Le_amazonensis (M80293) R3R4.seq  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Le_chagasi (M81430) R3R4.seq      .....C.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          60      70      80      90     100
Le_braziliensis (M80292) R3R4.seq  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Le_amazonensis (M80293) R3R4.seq  .....A.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Le_chagasi (M81430) R3R4.seq      .....A.A.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          110     120     130     140     150
Le_braziliensis (M80292) R3R4.seq  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Le_amazonensis (M80293) R3R4.seq  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Le_chagasi (M81430) R3R4.seq      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          160     170     180     190     200
Le_braziliensis (M80292) R3R4.seq  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Le_amazonensis (M80293) R3R4.seq  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Le_chagasi (M81430) R3R4.seq      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          210     220     230     240     250
Le_braziliensis (M80292) R3R4.seq  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Le_amazonensis (M80293) R3R4.seq  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Le_chagasi (M81430) R3R4.seq      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          260     270     280     290     300
Le_braziliensis (M80292) R3R4.seq  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Le_amazonensis (M80293) R3R4.seq  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Le_chagasi (M81430) R3R4.seq      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          310     320     330     340     350
Le_braziliensis (M80292) R3R4.seq  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Le_amazonensis (M80293) R3R4.seq  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Le_chagasi (M81430) R3R4.seq      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          360
Le_braziliensis (M80292) R3R4.seq  ....|....|
Le_amazonensis (M80293) R3R4.seq  .....|
Le_chagasi (M81430) R3R4.seq      .....|

```

Figura 4. Alinhamento das seqüências do fragmento do gene SSUrRNA das espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum* (sin. *L. chagasi*) depositadas no GenBank.

A amplificação se deu no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação inicial por 4 minutos a 94 C seguida de outra desnaturação por 35 ciclos a 94 C por 30 segundos, anelamento a 60 C por 30 segundos e extensão por 30 segundos a 72 C, seguida de uma extensão final de 72 C por 10 minutos.

Em seguida foi empregado o método RFLP com enzima de restrição *Hae* III para identificar as espécies *L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*. Para tanto, preparou-se uma reação de digestão como descrito: 1,8  l de água destilada estéril, 2  l de solução tampão (10x), 0,2  l de BSA, 1  l de *Hae* III (10U/ l) e 5  l de produto da PCR por tubo, totalizando 10  l. As amostras foram incubadas a 37 C por 4 horas e o perfil de restrição

analisado em gel de agarose a 4%, corado com brometo de etídeo, a partir das cepas referência de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75), *L.(V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8).

5.4.6 Análise estatística dos testes diagnósticos

Foi realizado o teste Exato de Fisher para verificar a associação entre os testes diagnósticos, dois a dois, com um índice de significância de 5%. Foi realizado ainda o teste de coeficiente de kappa, segundo Siegel e Castellan (1988) e Fleiss (1981), para verificar a concordância entre os testes. Os valores encontrados seguiram a classificação de Landis & Koch (1977).

5.5 Análises de geoprocessamento

5.5.1 Construção dos mapas de densidade flebotomínica e canina

Para a elaboração do mapa de densidade de ocorrência de espécies de flebotomíneos foi necessária a espacialização dos pontos de coleta de armadilhas com o valores obtidos quanto ao número de espécies total, *L. longipalpis* e *L. whitmani*. Os pontos foram georreferenciados a partir das coordenadas obtidas em UTM SAD69 Fuso 23 através de aparelhos GPS (N3 Elgin). Os cães soropositivos foram georreferenciados a partir do endereço de residência do proprietário utilizando as mesmas coordenadas e aparelho GPS supracitados.

A elaboração do mapa de Densidade de Kernel foi realizada a partir da ferramenta Spatial Analyst do software ArcGis 10. Essa metodologia calcula a razão entre o número de ocorrência de espécies de flebotomíneos/ cães em uma unidade de área além de calcular a média das ocorrências de flebotomíneos e cães, separadamente, por unidade de área. Para este estudo, a unidade de área foi definida em m² uma vez que o sistema de projeção do mapeamento é em metros. Foi definida uma área de influencia de 1 km de distância para o mapa de densidade de flebotomíneos e 200 m para os cães. Posteriormente, os dados foram classificados da seguinte forma:

- a) para o mapa de flebotomíneos - classe 1: ente 0 e 10 flebotomíneos por m², classe 2: entre 10,1 e 19 flebototomíneos por m², classe 3: entre 19,1 e 29 flebototomíneos por

m², classe 4: entre 29,1 e 39 flebototomíneos por m², classe 5: entre 39,1 e 47,85 flebototomíneos por m²;

- b) para o mapa de cães- classe 1: Baixa (0 a 0,000000004 cães por 100 m²), classe 2: Média (0 a 0,000000009 cães por 100 m²) e classe 3: Alta (0 a 0,000000013 cães por 100 m²).

O resultado da densidade foi armazenado em um arquivo do tipo raster, no formato GRID, padrão nativo do software ArcGis. Como resolução espacial foi definido um pixel de 10 metros, valor abaixo do erro aceitável para mapeamentos na escala de 1:100.000 definidas para elaboração dos mapas deste trabalho.

5.5.2 Mapa das características ambientais

Os mapas temáticos de vegetação (Fig. 5), altimetria (Fig. 6) e rede hidrográfica (Fig. 7) foram gentilmente cedidos pelo Msc. Christian Rezende Freitas (Coffey International Limited, Belo Horizonte).

5.5.3 Análise de Assinatura

Para identificar as possíveis correlações entre características ambientais do espaço e a ocorrência dos vetores da doença e cães infectados, foi utilizado o método de assinatura. Esse método consiste na definição de uma variável de interesse e o posterior cruzamento desta com as demais variáveis em análise no estudo. Para realização deste procedimento todas as informações devem ser modeladas em formato raster, tendo extensão e tamanhos de pixel compatíveis entre si (10 m²). O cruzamento consiste na identificação da maior ocorrência ou predominância das classes temáticas existentes, em cada variável escolhida, para a análise em relação à cada variável ambiental. A ferramenta utilizada para este procedimento é denominada “tabulate area” do software Arcview. No presente trabalho foram realizados os cruzamentos entre as variáveis: densidade de flebotomíneos total, densidade de *L. longipalpis*, densidade de *L. whitmani*, densidade de cães infectados e altimetria, rede hidrográfica e vegetação do município de Formiga.

5.6 Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da FUNEDI/ UEMG (Fundação Educacional de Divinópolis/ Universidade Estadual de Minas Gerais) sob o número 10/2011.

Antes das entrevistas, os indivíduos entrevistados foram esclarecidos sobre os objetivos do presente estudo. Somente após a leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido se procedeu à aplicação do questionário (Anexo 2). No mesmo sentido, todos os proprietários que tiveram seu cão incluído na pesquisa, tanto no CODEVIDA quanto nas clínicas veterinárias, foram esclarecidos sobre os objetivos do estudo.

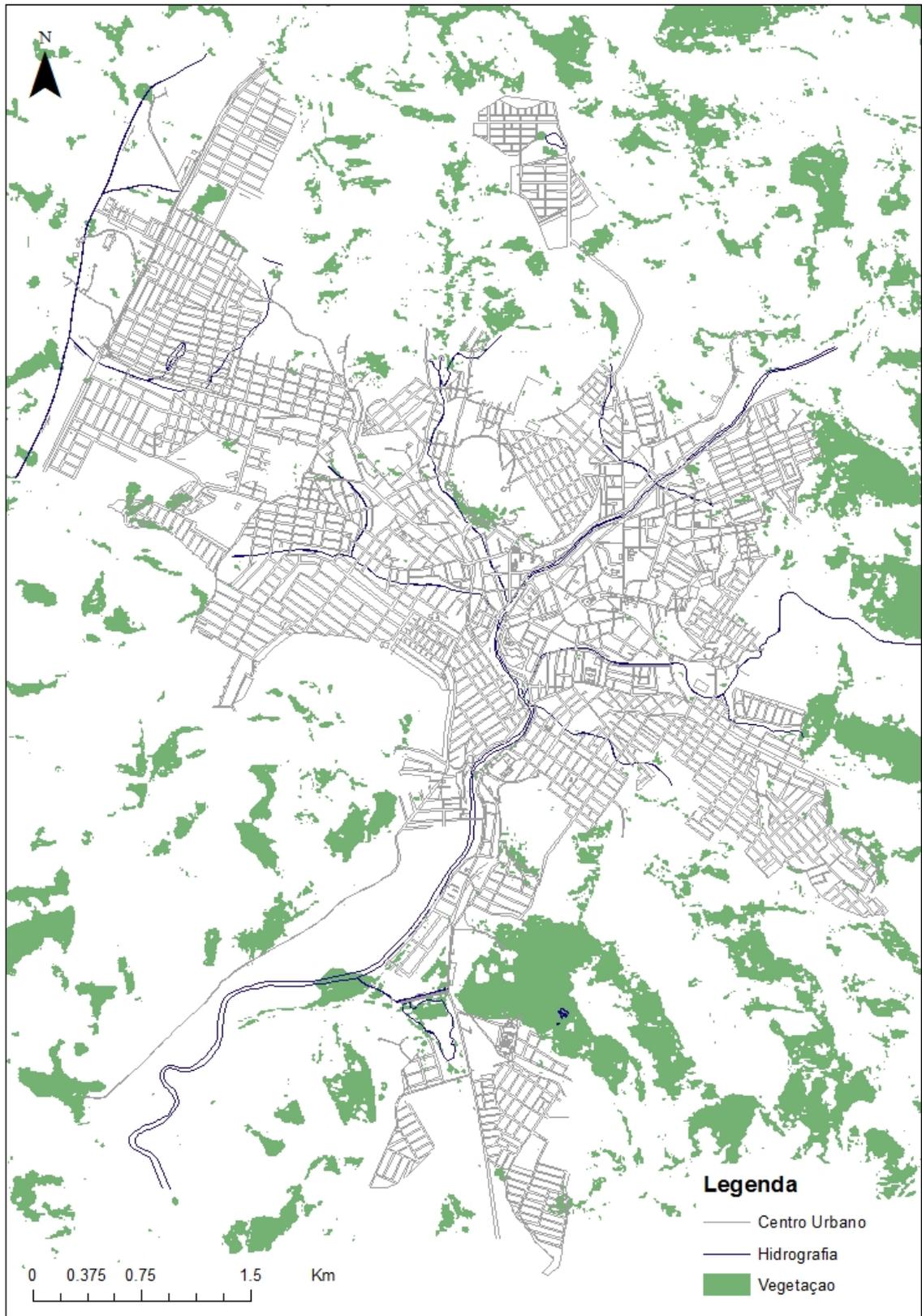


Figura 5. Mapa temático da vegetação do município de Formiga, Minas Gerais.

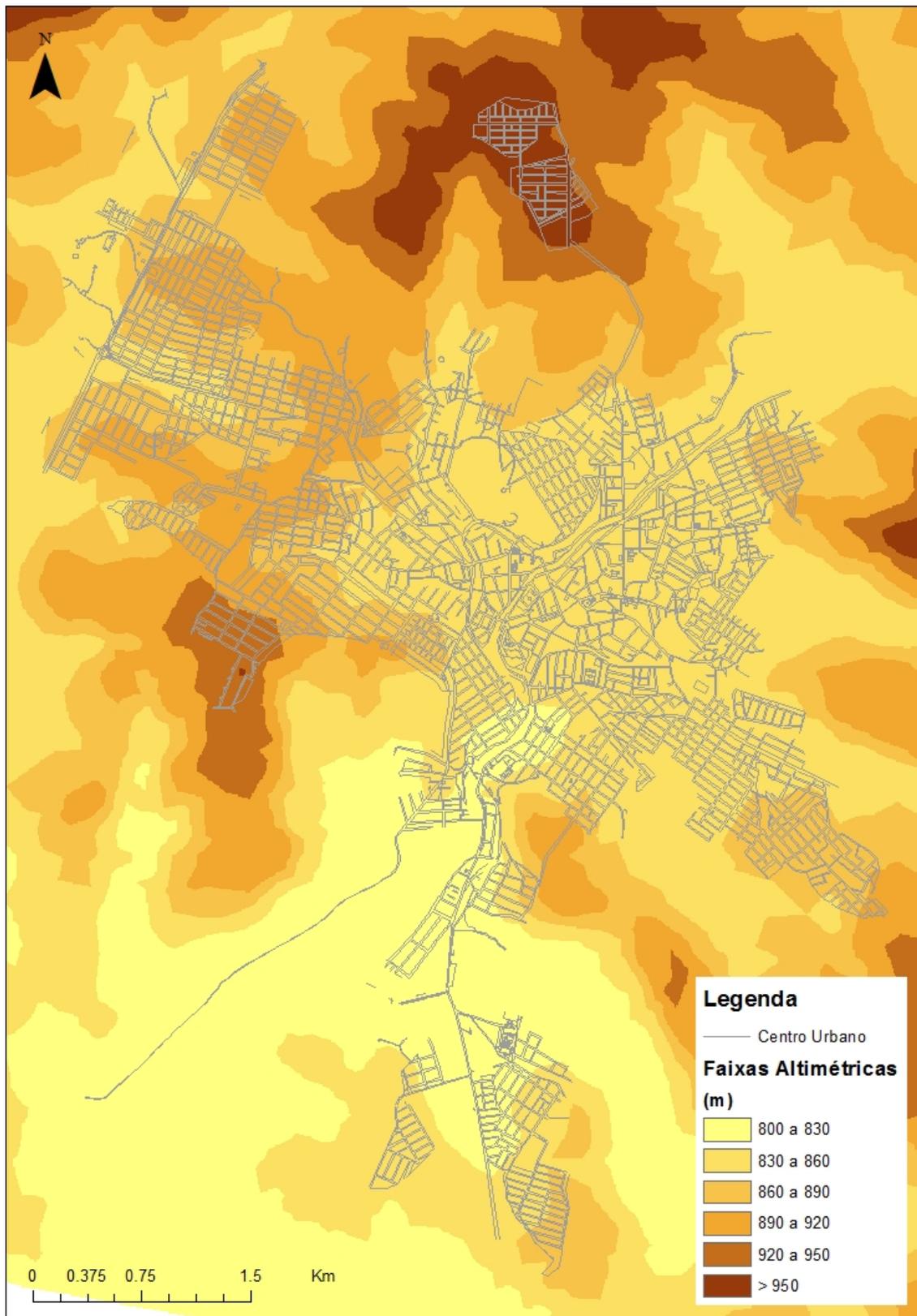


Figura 6. Mapa temático da altimetria do município de Formiga, Minas Gerais.

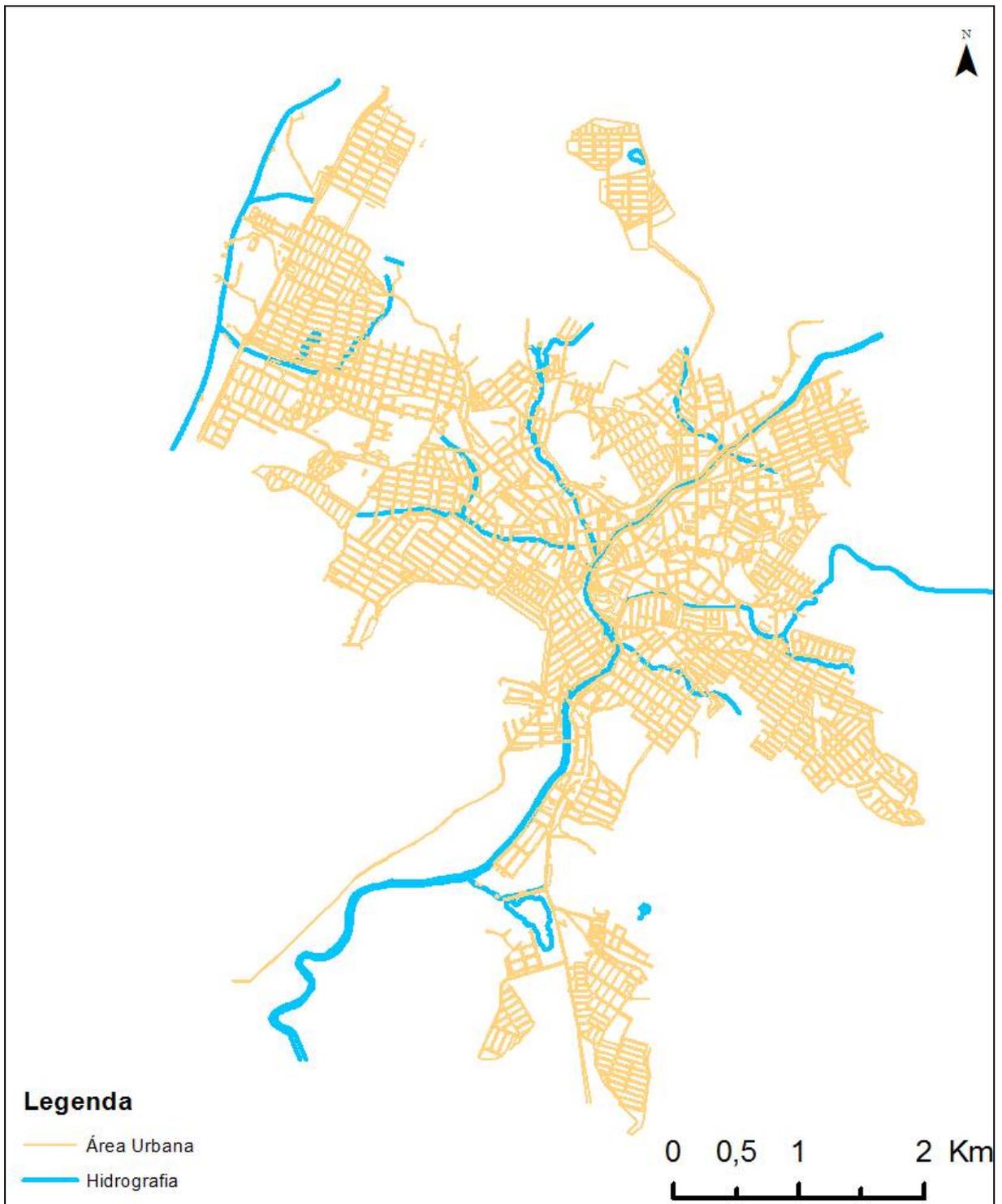


Figura 7. Mapa temático da rede hidrográfica do município de Formiga, Minas Gerais.

6 RESULTADOS

6.1 O conhecimento da população sobre as leishmanioses

Foram entrevistados 427 indivíduos residentes no município de Formiga. A tabela 2 mostra o perfil da população amostrada na área de estudo. A maioria dos entrevistados era do sexo feminino (54,6%), jovens entre 15 e 39 anos (50,1%) e com escolaridade até o primário (46,8%). A renda média situava-se entre 1-3 salários mínimos (65,5%) e número de moradores no domicílio era de até 4 moradores (75,1%) para a maioria dos entrevistados.

Tabela 2. Características socioeconômicas da população do município de Formiga, Minas Gerais.

Características sócioeconômicas da população de Formiga	n (%)
Sexo	
Masculino	194 (45,4)
Feminino	233 (54,6)
Idade	
15-39	213 (50,1)
40 e +	212 (49,9)
Escolaridade (anos completos)	
Nenhum até primário	198 (46,8)
Ensino médio	151 (35,7)
Superior	74 (17,5)
Renda (em salários mínimos)	
Menor do que 1,0	15 (3,5)
Entre 1,0 e 2,99	275 (65,5)
Entre 3 e 4,99	88 (21,0)
Mais que 5	42 (10,0)
Número de moradores no domicílio	
Até 4 moradores	314 (75,1)
5 e +	104 (24,9)

Foi observado que apenas 29 pessoas (6,8%) responderam adequadamente às perguntas relativas à transmissão, prevenção e atitude diante de caso humano. As respostas referentes a essas perguntas são mostradas de forma detalhada na tabela 3.

Tabela 3. Respostas dos entrevistados para as perguntas mais relevantes quanto ao ciclo epidemiológico das leishmanioses presentes no questionário aplicado à população do município de Formiga, Minas Gerais.

Conhecimento da população	n (%)
Como a leishmaniose é transmitida?	
Flebotomíneo	85 (20,0)
Resposta incorretas	340 (80,0)
Qual animal pode pegar a doença?	
Cão/Gato/Rato	207 (48,5)
Resposta incorretas	220 (51,5)
Como se previne?	
Limpar terreno/Sacrificar cães doentes/Usos de repelentes	200 (47,1)
Não sabe informar/respostas incorretas	225 (52,9)
Atitude diante de um caso humano suspeito?	
Respostas incorretas	39 (9,2)
Procuraria um agente de saúde	67 (15,7)
Levaria para o hospital	320 (75,1)

A tabela 4 mostra o resultado da análise bruta e ajustada da associação entre o conhecimento das leishmanioses e as características da população. A única variável que influenciou de forma significativa o conhecimento da população sobre a leishmaniose foi o sexo: no município de Formiga, as mulheres apresentaram chance 3,3 vezes maior de saber sobre a doença quando comparadas com os homens.

Apesar de não ter alcançado significância estatística, as seguintes variáveis mostraram associação com o conhecimento das leishmanioses: bairro de moradia e número de moradores por domicílio. As pessoas que moram na região central da cidade apresentaram chance de conhecer a doença duas vezes maior em comparação aos moradores dos outros bairros analisados. Da mesma forma, os entrevistados dos domicílios com 5 ou mais moradores apresentaram chance de ter um conhecimento sobre a doença quase duas vezes maior do que residentes em domicílios com até 4 moradores.

Tabela 4. Análise bruta e ajustada entre o conhecimento das leishmanioses e as características da população de estudo no município de Formiga, Minas Gerais.

Características	Conhecimento das leishmanioses		OR (IC 95%)*	
	Sim n (%)	Não n (%)	BRUTA	AJUSTADA
Sexo				
Masculino	6 (3,1)	188 (96,9)	1,00	1,00
Feminino	23 (9,9)	210 (90,1)	3,43 (1,37- 8,61)	3,31 (1,29-8,51)
Idade				
15-39	15 (7,0)	198 (93,0)	1,00	1,00
40 e +	14 (6,6)	198 (93,4)	0,93 (0,44-1,98)	0,82 (0,34-1,96)
Escolaridade (anos completos)				
Nenhum até primário	13 (6,6)	185 (93,4)	1,00	1,00
≥ Ensino médio	15 (6,4)	219 (93,6)	1,02 (0,47- 2,19)	0,61 (0,22-1,73)
Renda (em salários mínimos)				
Até 4,99	20 (6,9)	270 (93,1)	1,00	1,00
Maior do que 5	8 (6,2)	122 (93,8)	0,89 (0,38- 2,07)	0,64 (0,24-1,70)
Número de moradores no domicílio				
Até 4 moradores	18 (5,7)	296 (94,3)	1,00	1,00
5 e +	11 (10,6)	93 (89,4)	1,94 (0,89-4,27)	1,95 (0,83-4,59)
Região de moradia				
Não Central	18 (5,7)	296 (94,3)	1,00	1,00
Central	11 (9,8)	101 (90,2)	1,80 (0,82-3,93)	2,83 (0,97-8,22)

*OR- *odds ratio* e IC- intervalo de confiança

Em relação aos fatores de risco peridomiciliares, 258 (60,4%) apresentaram até 3 fatores de risco, enquanto que 169 (39,6%) apresentaram mais de 4 fatores.

A tabela 5 mostra o resultado das análises bruta e ajustada da associação entre os fatores de risco peridomiciliares e as características da população. Foi observado que possuir no mínimo o ensino médio está associado a 44% menos chance de morar em uma residência com muitos fatores de risco para as leishmanioses (OR = 0,56; IC: 0,34-0,94) . Entretanto, as demais características não parecem influenciar o nível de exposição aos fatores de risco investigados.

De forma complementar analisou-se a associação entre o conhecimento sobre as leishmanioses e a presença de fatores de risco peridomiciliares, não tendo sido encontrada associação (p= 0,837), dado não mostrado na tabela.

Tabela 5. Análise bruta e ajustada entre fatores de risco peridomiciliares e as características da população de Formiga, Minas Gerais.

Características	Fatores de risco peridomiciliares		OR (IC 95%)*	
	0 a 3 n (%)	≥ 4 n (%)	BRUTA	AJUSTADA
Sexo				
Masculino	113 (58,2)	81 (41,8)	1,00	1,00
Feminino	145 (62,2)	88 (37,8)	0.85 (0,57-1,25)	0.87 (0,58-1,30)
Idade				
15-39	130 (61,0)	83 (39,0)	1,00	1,00
40 e +	127 (59,9)	85 (40,1)	1.01 (0,71-1,55)	0.86 (0,55-1,36)
Escolaridade (anos completos)				
Nenhum até primário	105 (53,0)	93 (47,0)	1,00	1,00
≥ Ensino médio	151 (67,1)	74 (32,9)	0.55 (0,37-0,82)	0.56 (0,34-0,94)
Renda (em salários mínimos)				
Até 4,99	166 (57,2)	124 (42,8)	1,00	1,00
Maior do que 5	88 (67,7)	42 (32,3)	0.84 (0,43-1,62)	1.23 (0,59-2,56)
Número de moradores no domicílio				
Até 4 moradores	188 (59,9)	126 (40,1)	1,00	1,00
5 e +	63 (60,6)	41 (39,4)	0.97 (0,62- 1,53)	0.89 (0,55-1,44)
Região de moradia				
Não Central	183 (58,1)	132 (41,9)	1,00	1,00
Central	75 (67,0)	36 (33,0)	0.68 (0,43-1,08)	0.91 (0,52-1,61)

*OR- *odds ratio* e IC- intervalo de confiança

6.2 O estudo da fauna flebotomínica de Formiga

Foram coletados 224 espécimes de 10 espécies: *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva 1912), *Lutzomyia cortelezzii* (Brethés 1923), *Lutzomyia whitmani* (Antunes & Coutinho 1939), *Lutzomyia lenti* (Mangabeira 1938), *Lutzomyia sordelli* (Shannon & Del Ponte 1927), *Lutzomyia monticola* (Costa Lima 1932), *Lutzomyia lutziana* (Costa Lima 1932), *Lutzomyia bacula* (Martins, Falcão e Silva, 1965), *Lutzomyia brasiliensis* (Costa Lima 1932) e *Lutzomyia termitophila* (Martins, Falcao & Silva, 1964). A quantidade de machos capturados (151) foi maior que de fêmeas (73), representando uma razão de 2,06 (Tab. 6). Entre as espécies, *L. longipalpis* apresentou razão de 3,94 machos para cada fêmea, enquanto para *L. whitmani* foi encontrada a maior proporção de machos, 7,2:1.

A tabela 6 mostra a proporção das principais espécies capturadas: *L. longipalpis* (35,27%), *L. cortelezzii* (33,48%), *L. whitmani* (18,3%) e *L. lenti* (8,04%).

Tabela 6. Número de flebotomíneos capturados por espécie e sexo (Macho e Fêmea), através de armadilhas HP no município de Formiga, Minas Gerais, Brasil.

Espécie	Sexo		Total (%)
	M	F	
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	63	16	79 (35,3)
<i>Lutzomyia cortelezzii</i>	38	37	75 (33,5)
<i>Lutzomyia whitmani</i>	36	5	41 (18,3)
<i>Lutzomyia lenti</i>	11	7	18 (8)
<i>Lutzomyia sordellii</i>	1	3	4 (1,8)
<i>Lutzomyia monticola</i>	1	2	3 (1,3)
<i>Lutzomyia lutziana</i>	0	1	1 (0,4)
<i>Lutzomyia bacula</i>	0	1	1 (0,4)
<i>Lutzomyia brasiliensis</i>	1	0	1 (0,4)
<i>Lutzomyia termitophila</i>	0	1	1 (0,4)
Total (%)	151 (67,4)	73 (32,6)	224 (100,0)

Lutzomyia longipalpis foi a única espécie capturada em todos os meses de coleta. Três armadilhas (4, 12 e 23) representaram 49,6% do total de flebotomíneos capturados durante o ano, sendo que a armadilha 23 apresentou o número mais expressivo de flebotomíneos coletados (n=50; Tab. 7). Essa mesma armadilha concentrou o maior número de *L. longipalpis* capturados no presente trabalho. Nas localidades onde foram dispostas as

armadilhas 12 e 23 foi encontrada, ao longo do estudo, a maior riqueza de espécies (6 espécies por localidade).

Lutzomyia cortelezzii e *L. longipalpis* são as espécies mais dispersas pelo município – foram encontradas, respectivamente, em 22 e 18 dos 24 pontos de coleta. Por outro lado, *L. whitmani* apresenta-se de forma localizada em apenas 4 pontos, sendo que as armadilhas 12 e 23 capturaram 90% dos espécimes de *L. whitmani* encontrados no município (Tab. 7).

Observou-se correlação significativa entre as condições ambientais e a abundância de flebotomíneos. Foi obtida uma elevada correlação ($r=0,72$; $p=0,008$; $r^2=0,52$) entre os flebotomíneos e precipitação e uma correlação moderada com a temperatura ($r=0,60$; $p=0,039$; $r^2=0,36$). Não foi observada correlação significativa com a umidade ($r=0,09$; $p=0,77$). Assim, pelo teste qui-quadrado, 52% e 36% da variação dos flebotomíneos no município de Formiga podem ser explicadas, respectivamente, pela variação na precipitação e na temperatura (Fig. 8). Também através da figura 8 é possível perceber que os meses de janeiro e fevereiro foram os mais propícios para a ocorrência dos flebotomíneos, apresentando condições climáticas favoráveis que permitiram, no período mencionado, a coleta de 37,5% dos espécimes encontrados nesse estudo.

Tabela 7. Número de flebotomíneos coletados no peridomicílio de 24 domicílios de Formiga, Minas Gerais, separados por espécie e armadilha, utilizando armadilha HP entre maio de 2012 e abril de 2013.

Número da armadilha	<i>L. longipalpis</i>	<i>L. cortezezii</i>	<i>L. whitmani</i>	<i>L. monticola</i>	<i>L. lenti</i>	<i>L. sordellii</i>	<i>L. lutziana</i>	<i>L. bacula</i>	<i>L. brasiliensis</i>	<i>L. termitophila</i>	Total
Armadilha 1	1	1	0	0	3	0	0	0	0	0	5
Armadilha 2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Armadilha 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Armadilha 4	9	19	0	0	0	0	0	0	0	0	28
Armadilha 5	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	6
Armadilha 6	5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	7
Armadilha 7	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Armadilha 8	8	4	0	0	0	0	0	0	0	0	12
Armadilha 9	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Armadilha 10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Armadilha 11	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2
Armadilha 12	0	3	22	0	5	1	1	0	0	1	33
Armadilha 13	9	3	3	0	0	0	0	0	0	0	15
Armadilha 14	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	8
Armadilha 15	4	0	0	1	0	0	0	0	1	0	6
Armadilha 16	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Armadilha 17	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	3
Armadilha 18	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	7
Armadilha 19	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Armadilha 20	10	0	3	0	0	0	0	0	0	0	13
Armadilha 21	2	4	0	0	2	0	0	0	0	0	8
Armadilha 22	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Armadilha 23	18	5	15	2	8	2	0	0	0	0	50
Armadilha 24	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Total	79	75	41	3	18	4	1	1	1	1	224

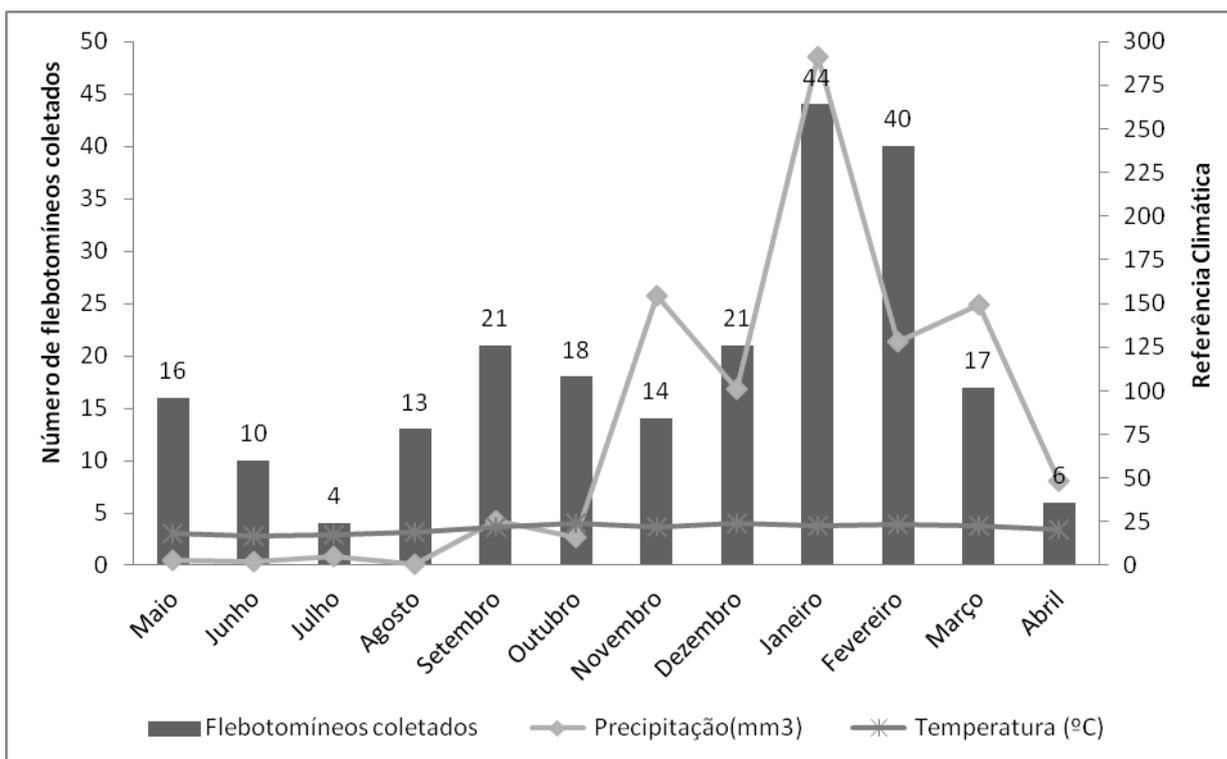


Figura 8. Precipitação (mm³), temperatura (°C) e densidade de flebotomíneos capturados mensalmente com armadilha luminosa de HP entre maio de 2012 e abril de 2013 em 24 domicílios do município de Formiga, Minas Gerais, Brasil.

6.3 O estudo da infecção canina

Foram analisados 570 cães domiciliados e de rua do município de Formiga. Cento e nove (19,1%) foram positivos em pelo menos um dos testes sorológico/ molecular. Na associação dos testes em paralelo (positivo para qualquer um), 11 amostras se mostraram reagentes no DPP[®], 33 no ELISA e 26 foram positivas na LnPCR (Fig. 9). Analisando os testes em série (positivo simultaneamente), 17 foram reagentes no grupo DPP[®]/ ELISA, 12 positivos no grupo DPP[®]/ ELISA/ LnPCR, 3 no grupo DPP[®]/ LnPCR e 2 no grupo ELISA/ LnPCR (Fig. 9). As demais 5 amostras foram indeterminadas no ELISA.

A figura 9 mostra a distribuição dos resultados positivos entre os testes aplicados. Se for levado em consideração todos os cães que apresentaram resultado positivo em pelo menos um teste sorológico (n=82), a taxa de infecção canina observada foi de 14%. Contudo, considerando o protocolo do MS que se baseia nos resultados de DPP[®] e ELISA (n=29), essa taxa é de 5%.

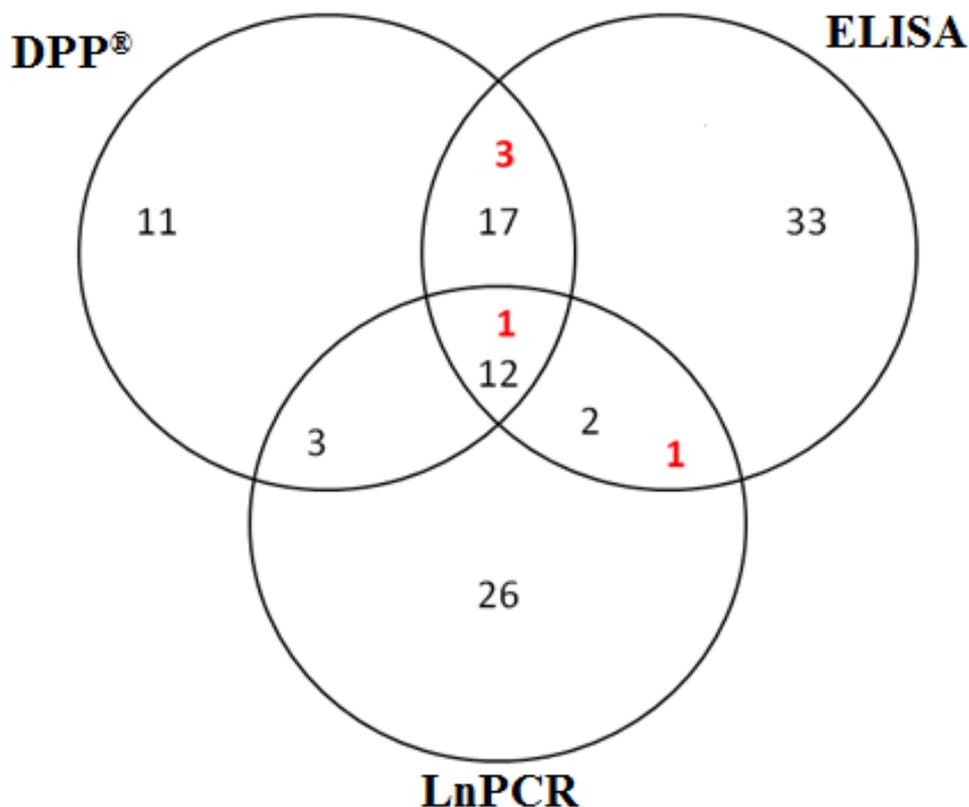


Figura 9. Frequência dos resultados positivos e indeterminados nos testes sorológicos DPP[®] e ELISA e no método molecular LnPcR.*Os números em vermelho indicam resultado indeterminado no teste de ELISA.

No geral, 27 cães apresentaram resultado indeterminado no teste de ELISA. Destes, 22 foram negativos nos demais métodos (sorológico ou molecular) e 5 positivaram no DPP[®] e na LnPcR. Como não é possível saber se os cães com resultado indeterminado estão ou não infectados, optou-se por analisar a concordância e a associação entre os testes tomando os resultados indeterminados ora como negativos, ora como positivos. Considerando os resultados indeterminados como negativos, o teste Exato de Fisher mostrou uma associação significativa entre os testes diagnósticos, dois a dois ($p < 0,0001$). Porém, os valores encontrados no teste do coeficiente de kappa mostraram uma concordância entre os testes variando de pobre (0-0,19) a moderada (0,40-0,59), de acordo com a classificação de Landis & Koch (1977), como mostrado na tabela 8.

Tabela 8. Coeficiente Kappa obtido na análise de correlação entre os diagnósticos de DPP® x ELISA, DPP® x LnPCR, e ELISA x LnPCR, considerando os resultados indeterminados no ELISA como negativos.

		DPP®	
		Negativo	Positivo
ELISA	Negativo	489	17
	Positivo	35	29
	Kappa=0,48	IC _{95%} =0,36-0,60	p<0,0001*
PCR	Negativo	495	30
	Positivo	29	16
	Kappa=0,29	IC _{95%} =0,16-0,43	p<0,0001*
		ELISA	
		Negativo	Positivo
PCR	Negativo	475	50
	Positivo	31	14
	Kappa=0,18	IC _{95%} =0,07-0,29	p<0,0001*

* Teste Exato de Fisher

Os resultados da concordância e da associação entre os testes considerando os resultados indeterminados como positivos no ELISA são mostrados na tabela 9. Nesse caso, o teste Exato de Fisher também mostrou uma associação significativa entre os testes diagnósticos, dois a dois (p<0,0009). Da mesma forma, a concordância entre os testes permaneceu variando de pobre (0-0,19) a moderada (0,40-0,59).

Tabela 9. Coeficiente Kappa obtido entre os diagnósticos de DPP®x ELISA, DPP® x LnPCR, e ELISA x LnPCR, considerando os resultados indeterminados no ELISA como positivos.

		DPP®	
		Negativo	Positivo
ELISA	Negativo	465	14
	Positivo	59	32
	Kappa=0,40	IC _{95%} =0,29-0,51	p<0,0001
PCR	Negativo	495	30
	Positivo	29	16
	Kappa=0,29	IC _{95%} =0,16-0,43	p<0,0001
		ELISA	
		Negativo	Positivo
PCR	Negativo	450	75
	Positivo	29	16
	Kappa=0,14	IC _{95%} =0,05-0,24	p=0,0009

* Teste Exato de Fisher

A tabela 10 mostra os cães positivos em relação à presença de sintomas. A maioria se mostrou assintomático (n=78; 72%). Quando foi analisada a sintomatologia por teste realizado, a maioria dos cães positivos não apresentou nenhum sintoma. Porém, quando foram avaliados simultaneamente os testes DPP[®]/ELISA e DPP[®]/ELISA/LnPCR foi observado que a maior parte dos cães positivos nos ensaios apresentavam sintomas. Os principais sinais clínicos apresentados foram: dermatite, linfadenomegalia, onicogrifose, ulcerações e emagrecimento.

Tabela 10. Número de cães sintomáticos e assintomáticos soropositivos ou indeterminados nos testes sorológico (ELISA e DPP[®]) e molecular (LnPCR).

Teste Diagnóstico	Estado Clínico		Total
	Sintomático	Assintomático	
DPP [®]	1	10	11
ELISA	5	28	33
DPP [®] e ELISA	10	7	17
DPP [®] e ID*	0	3	3
LnPCR	3	23	26
LnPCR e ID*	0	1	1
LnPCR e DPP [®]	2	1	3
LnPCR e ELISA	1	1	2
LnPCR, DPP [®] e ID*	1	0	1
LnPCR, DPP [®] e ELISA	8	4	12
Total	31	78	109

*ID = indeterminado

Para identificação da espécie de *Leishmania* foi usada a técnica de sequenciamento de um fragmento do gene SSUrRNA, anteriormente amplificado pela técnica de LnPCR. Foram analisadas 32 amostras dentre as 45 que apresentaram resultado positivo na LnPCR. Estas foram escolhidas por apresentarem melhor amplificação. Treze (40,6%) foram caracterizadas como *L. (L.) infantum*. Nove amostras apresentaram sequências sugestivas para *L. (V.) braziliensis* (n=4; 12,5%) ou *L. (L.) amazonensis* (n=5; 15,6%). Nas demais 10 amostras, 6 apresentaram perfil duvidoso para *L. (L.) infantum* e em 4 não foi possível determinar a espécie devido à qualidade das sequências produzidas.

Para tentar confirmar a espécie presente nas 9 amostras com perfil sugestivo de *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis* e ainda determinar a espécie existente nas 10 amostras cujas sequências não produziram bons resultados foi realizado o PCR do kDNA seguido de RFLP com a enzima *Hae* III. Dentre as 9 amostras sugestivas para *L. (V.) braziliensis* ou *L.*

(L.) amazonensis, a PCR-RFLP apontou 7 compatíveis com o perfil de *L. (V.) braziliensis* e 2 não puderam ser identificadas porque não amplificaram na PCR do kDNA. Nas 6 amostras com perfil duvidoso para *L. (L.) infantum* no sequenciamento, 3 foram confirmadas para a espécie, 1 apresentou perfil de restrição de *L. (V.) braziliensis* e 2 não apresentaram perfis visíveis no gel. Entre as 4 amostras com sequenciamento ruim, 3 não amplificaram na técnica de PCR-kDNA e 1 foi identificada como *L. (V.) braziliensis*. A tabela 11 mostra o perfil de restrição das espécies obtido pela técnica PCR-RFLP em comparação com o obtido no sequenciamento para as amostras supracitadas. Conforme é possível observar nestes resultados é a dificuldade em se identificar com exatidão amostras em várias condições experimentais.

Tabela 11. Identificação das espécies de *Leishmania*, de acordo com as técnicas de sequenciamento e PCR-RFLP, das amostras que não haviam produzido resultado definitivo no sequenciamento.

Amostra	Resultado	
	Sequenciamento	RFLP
713	<i>L. braziliensis?</i>	<i>L. braziliensis</i>
721	<i>L. braziliensis?</i>	<i>L. braziliensis</i>
772	<i>L. amazonensis?</i>	<i>L. braziliensis</i>
800	<i>L. amazonensis?</i>	<i>L. braziliensis</i>
855	<i>L. amazonensis?</i>	<i>L. braziliensis</i>
914	<i>L. amazonensis?</i>	<i>L. braziliensis</i>
1035	<i>L. braziliensis?</i>	<i>L. braziliensis</i>
149	<i>L. infantum?</i>	<i>L. infantum</i>
154	<i>L. infantum?</i>	<i>L. infantum</i>
453	<i>L. infantum?</i>	<i>L. infantum</i>
859	<i>L. infantum?</i>	<i>L. braziliensis</i>
916	Bad Seq	<i>L. braziliensis</i>

Em suma, dentre as 32 amostras que foram submetidas a exames moleculares para definição da espécie de *Leishmania*, 10 foram identificadas como *L. infantum* e 3 identificadas como *L. braziliensis* por apresentarem perfil compatível com essas espécies no sequenciamento e na PCR-RFLP.

6.4 Análises espaciais e geoprocessamento

Os mapas de densidade para flebotomíneos (todas as espécies) e cães são mostrados nas figuras 10 e 11, respectivamente. Em relação à densidade de flebotomíneos, os mapas mostraram a maior concentração desses insetos nas regiões sul, sudeste e nordeste do município. Através dessa análise também foi possível perceber que a área de influência de *L. longipalpis* é maior que a de *L. whitmani*, abrangendo grande parte do município de Formiga (Fig. 12 e fig. 13). Por outro lado, quando foi observada a densidade de cães positivos, notou-se que esses se encontram distribuídos de forma pontual pelo município, gerando pequenas áreas de aglomerações (Fig. 11).

Quando a densidade de flebotomíneos total foi analisada em relação à presença de vegetação, foi observado maiores densidades flebotomínicas nas regiões distantes até 200m de uma área verde (98,8%). Esse fato foi mais pronunciado para *L. whitmani*, pois 99,8% dos espécimes foram capturados nessa mesma distância da vegetação. Além disso, foi observado que essa espécie está associada aos locais que contêm as duas maiores extensões de cobertura vegetal do município (Fig. 13). Para *L. longipalpis*, a maior densidade (94,2%) também se deu na distância de 200m. Porém, ao contrário de *L. whitmani*, foi registrada uma densidade significativa (19,4%) nas áreas um pouco mais afastadas - até 400m de uma área verde (Fig. 12). Em relação aos cães, a densidade mais elevada de animais positivos ocorreu em um raio de 200m da vegetação (91,8%) (Fig. 11).

Quando foi analisada a densidade de flebotomíneos total e a presença de um curso d'água, não foi encontrada uma relação significativa entre esses insetos e as diversas faixas de distância dessa variável. Porém, foi observado que *L. longipalpis* foi capturado nas armadilhas distantes até 600m de um curso d'água, com maior concentração nas faixas com intervalo máximo de 400m (Fig. 12). Esta relação não foi observada para *L. whitmani* (Fig. 13). A análise de assinatura entre os cães e a rede hidrográfica demonstrou que a alta densidade dos cães infectados (99,1%) se concentrou em áreas distantes até 200m de um curso d'água (Fig. 11).

A sobreposição dos mapas de densidade flebotomínica total e da densidade canina mostrou que os mesmos estão relacionados geograficamente – 39,5% dos cães positivos estão em áreas com presença elevada de flebotomíneos (Fig. 14). Entretanto, a maior densidade de cães (60,6%) ocorreu nos locais com baixa ou média densidade de vetores. Ao analisar os mapas de densidade de *L. longipalpis* e cães foi observado um padrão semelhante: a maior densidade canina (60,5%) não foi coincidente com a maior densidade desse díptero, embora

exista sobreposição de suas áreas de ocorrência (Fig. 12). A análise de assinatura não mostrou relação entre *L. whitmani* e cães na cidade de Formiga, fato que pode ser também visualizado no mapa da figura 13.

Em relação aos casos humanos de LV, foi observado que estes ocorreram em áreas com baixa densidade de *L. longipalpis* (entre 0 e 4 insetos por m²) (Fig. 12). O mesmo padrão pode ser visto para a presença de cães positivos, que se apresentaram em baixa densidade nos locais onde foram registrados os casos humanos (Fig. 11). Entretanto, o mapa 14 e a análise de assinatura mostram uma proximidade entre os casos humanos e a ocorrência de flebotômíneos e cães infectados, existindo uma leve sobreposição dessas variáveis nas áreas de baixa densidade vetorial e canina. Quanto às variáveis vegetação e curso d'água, os dois casos humanos ocorreram a uma distância de até 200m de uma área verde e entre 200m e 600m de um rio.

Através da análise dos mapas, é possível apontar as regiões nordeste, sul e noroeste do município como prioritárias para a implantação das ações previstas no programa nacional de controle das leishmanioses (Fig. 14). Nessas áreas são observadas variadas densidades flebotômínicas, presença de caso humano e alguns pontos de maior concentração de cães positivos para leishmaniose, demandando ações imediatas de vigilância em saúde para evitar a dispersão da doença no município.

O mapa de altimetria do município demonstrou não haver relação entre a altitude, cães infectados e a ocorrência dos flebotômíneos para a região. Isso porque a maior parte da malha urbana localiza-se na faixa entre 800m e 890m. Sendo assim, o município apresenta-se muito homogêneo quanto a essa variável (Fig. 6).

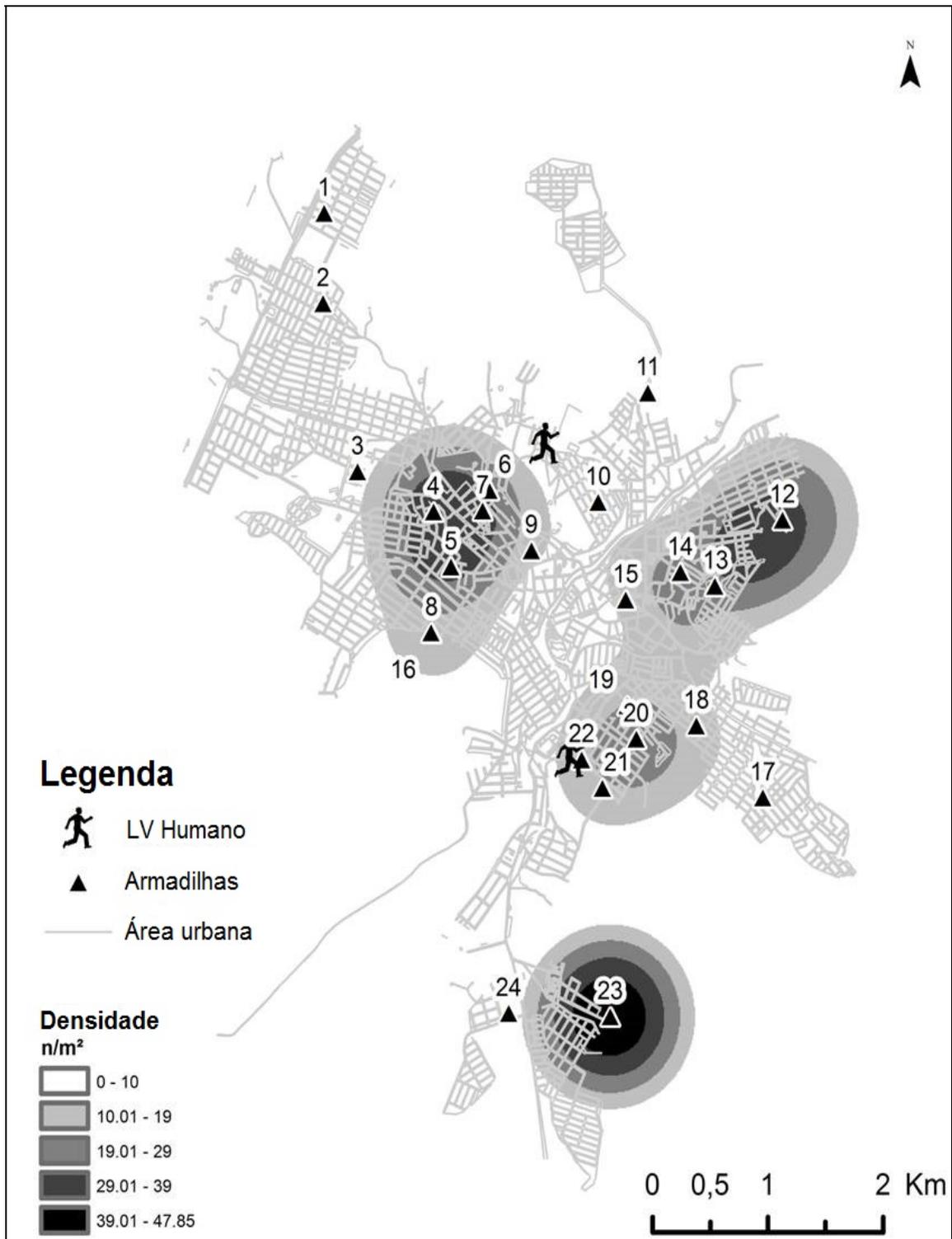


Figura 10. Representação da localização das armadilhas luminosas tipo HP, dos casos humanos de leishmaniose visceral (ícone humano) e da densidade de Kernel dos flebotomíneos (todas as espécies) sobre a malha urbana de Formiga, Minas Gerais.



Figura 11. Densidade de Kernel dos cães positivos em pelos menos um teste diagnóstico (sorológico ou molecular) e as variáveis vegetação e hidrografia representados sobre a malha urbana do município de Formiga, Minas Gerais. O ícone humano representa os casos de leishmaniose visceral.

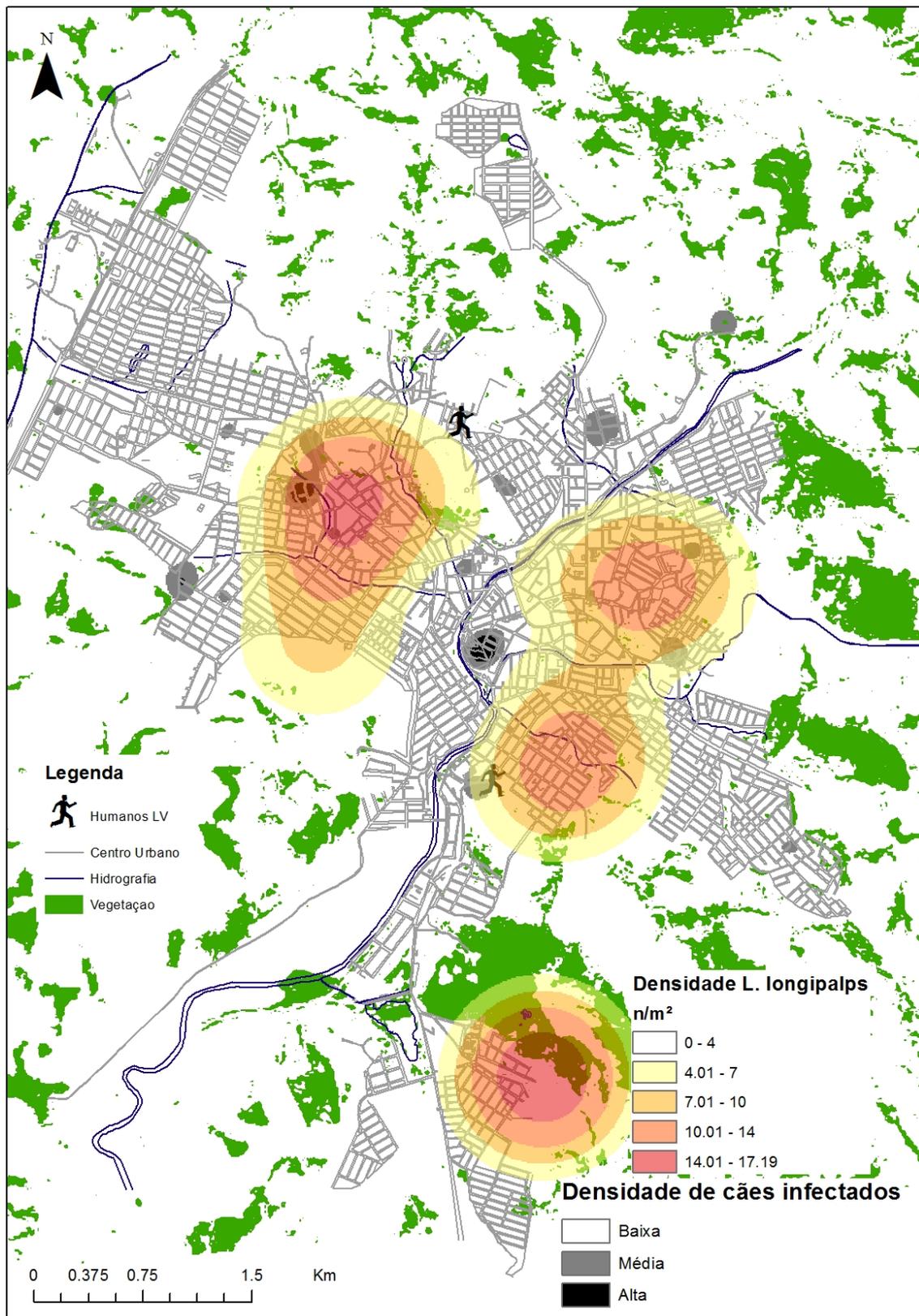


Figura 12. Densidade de Kernel de *Lutzomyia longipalpis* e de cães positivos em pelo menos um teste diagnóstico (sorológico ou molecular), localização dos casos humanos de LV (ícone humano) e representação das variáveis vegetação e hidrografia sobre a malha urbana do município de Formiga, Minas Gerais.

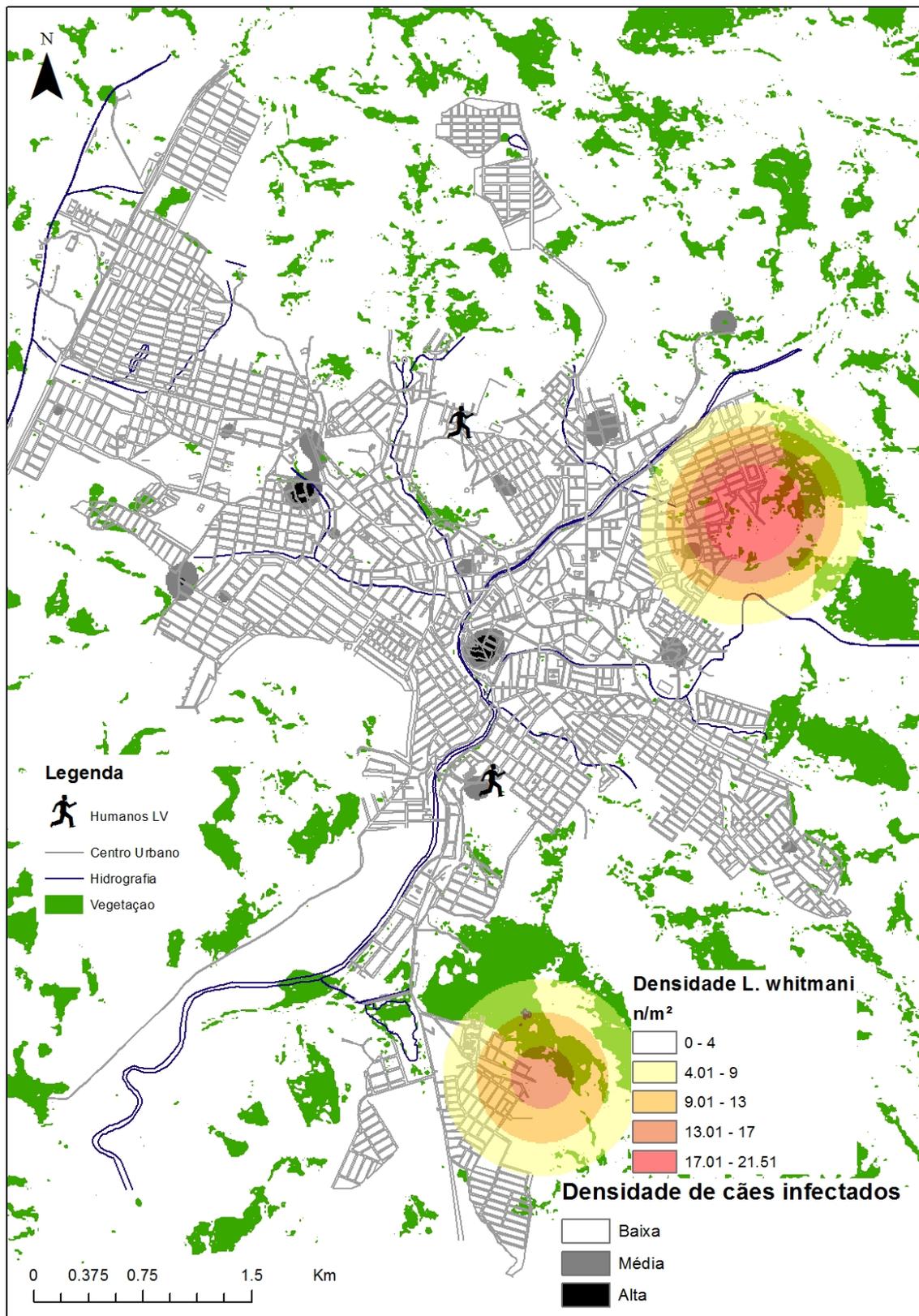


Figura 13. Densidade de Kernel de *Lutzomyia whitmani* e de cães positivos em pelo menos um teste diagnóstico (sorológico ou molecular), localização dos casos humanos de LV (ícone humano) e representação das variáveis vegetação e hidrografia sobre a malha urbana do município de Formiga, Minas Gerais.

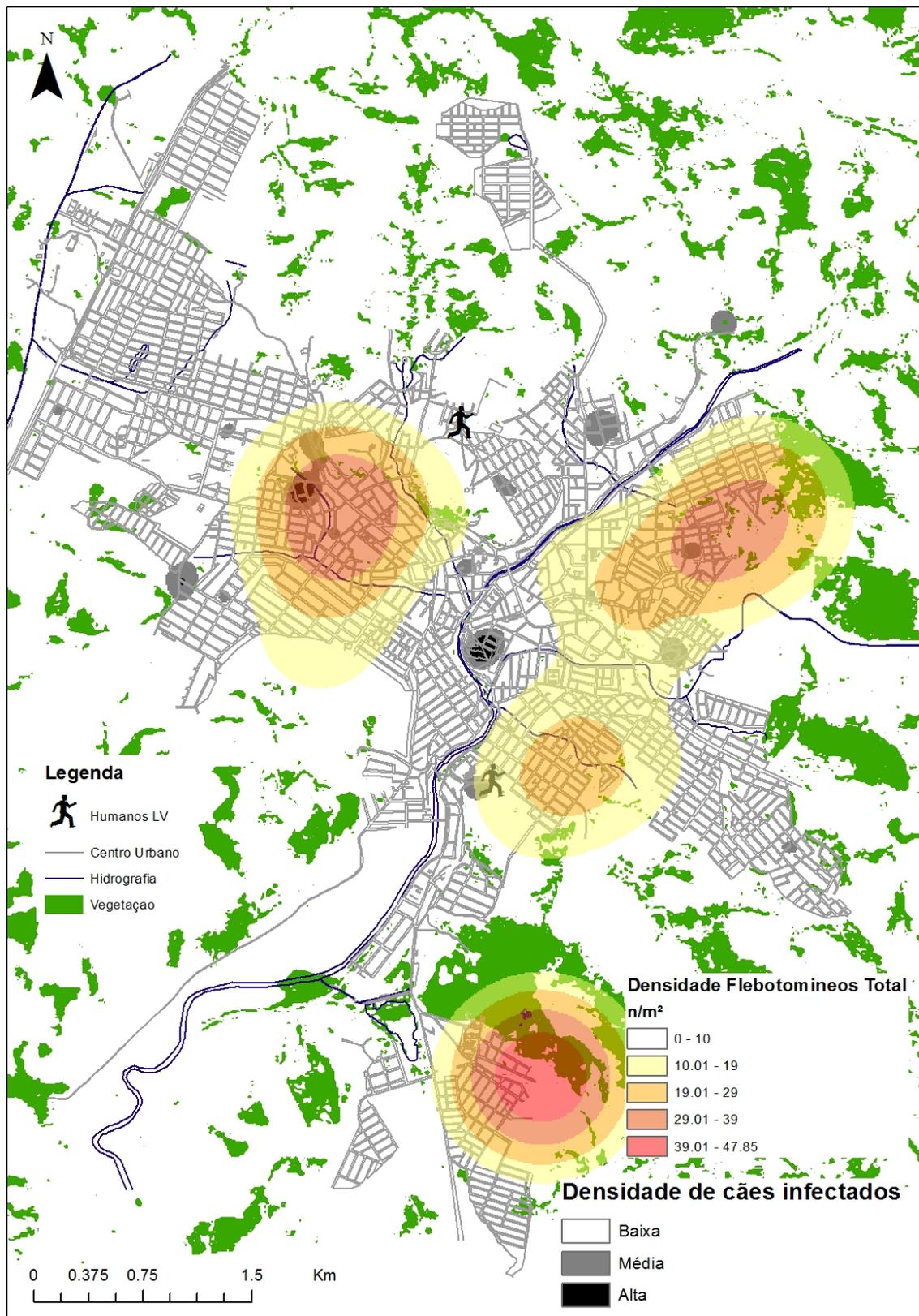


Figura 14. Densidade de Kernel de flebotomíneos total (todas as espécies) e de cães positivos em pelo menos um teste diagnóstico (sorológico ou molecular), localização dos casos humanos de LV (ícone humano) e representação das variáveis vegetação e hidrografia sobre a malha urbana do município de Formiga, Minas Gerais.

7 DISCUSSÃO

7.1 O conhecimento da população de Formiga

No Brasil, o programa de controle da leishmaniose contempla a atuação da população nas ações de controle da doença. Segundo o manual de controle da LV (Brasil 2006), as unidades de saúde devem realizar atividades de educação em saúde voltadas para a participação ativa da comunidade, permitindo que a mesma seja capaz de buscar o atendimento precoce e participar ativamente das medidas de controle. Para tanto, as práticas educativas devem conjugar os conhecimentos sobre as leishmanioses de forma geral, sintomatologia das zoonoses com os hábitos e as atitudes da população. Isso porque as percepções e o conhecimento popular são pontos cruciais para a aplicação eficaz de ações de caráter preventivo (Borges et. al. 2009). Entretanto, o que se observa é que os usuários dos serviços de saúde possuem um conhecimento incipiente sobre diversas doenças endêmicas no país, inclusive sobre as leishmanioses (Gama et al. 1998, Luz et al. 2005, Boaretto et al. 2010, Margonari et al. 2012, Ferreira et al. 2013, Lobo et al. 2013). Esse desconhecimento impede que a população se aproprie do saber necessário às práticas preventivas, dificultando as ações de controle. No mesmo sentido, fatores ambientais e socioeconômicos também são capazes de influenciar as práticas adotadas por uma comunidade, motivo pelo qual esses aspectos devem ser considerados no planejamento das ações de forma que se adaptem à realidade local (Launiala & Honkasalo 2007).

Foi observado nesse estudo que a população de Formiga possui uma baixa renda (65,5% ganhavam até 3 salários mínimos) e baixa escolaridade (46,8% com ensino até o primário) (Tab. 2). De fato, esses dois aspectos parecem caminhar juntos, dado que a expansão educacional é essencial para incentivar o crescimento econômico e reduzir as desigualdades e a pobreza (Barros et al. 2002). Segundo dados da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio, a taxa de escolarização se mostrou nitidamente associada ao nível de rendimento mensal per capita do domicílio na pesquisa de 2004 (IBGE 2006). Os resultados mostraram que, quanto maior era o nível desse rendimento, menor era a proporção de crianças e adolescentes que não freqüentavam escola ou creche. De maneira geral, no Brasil, a renda domiciliar per capita de até $\frac{1}{4}$ do salário mínimo é a classe de rendimento que concentra a maior proporção de crianças e adolescentes que não frequentam a escola no país (IBGE,

2006). Segundo Boltanski (1979), a classe social e o nível de instrução são fatores capazes de limitar a difusão do saber médico, influenciando na frequência e na qualidade do diálogo médico-paciente.

No contexto das leishmanioses, foi observado que a escolaridade está associada ao risco de acometimento tanto pela LV quanto pela LTA, principalmente em áreas endêmicas (Passos et al. 2001, Queiroz et al. 2004, Borges et al. 2008, Silva & Muniz 2009). Borges e colaboradores (2008), avaliando o conhecimento e as atitudes preventivas da população em Belo Horizonte, identificaram que um indivíduo analfabeto pode apresentar até oito vezes mais chance de ser afetado pela doença do que um indivíduo alfabetizado. Esse fato reflete a importância da educação em saúde desde a fase escolar, fazendo das crianças importantes ferramentas na difusão do conhecimento sobre as doenças em comunidades desassistidas. A participação comunitária é essencial visto que as medidas de controle adotadas para as leishmanioses esbarram em dificuldades operacionais (condições ambientais, diagnóstico precoce, dentre outros) que têm inviabilizado seu sucesso (Santos et al. 2000, Uchôa et al. 2004).

Entretanto, o saber e as percepções da comunidade são quase sempre ignorados diante das ações de prevenção e controle no Brasil. No caso da área de estudo, esse aspecto fica evidente, pois apenas 6,8% dos entrevistados tinham algum conhecimento sobre as leishmanioses. Esse fato não é condizente com uma das principais premissas do programa de controle das leishmanioses: manter a população informada sobre a doença e participativa no seu controle. Ainda, do ponto de vista da saúde pública do município, esse desconhecimento se mostra preocupante devido à notificação de casos humanos de LV com óbito na cidade. Estudos demonstraram que deter algum conhecimento sobre as leishmanioses pode minimizar o risco de ocorrência da enfermidade (Dias 1998, Cabrera et al. 1999, Borges et al. 2008). Porém, no presente estudo, 39,3% não sabiam informar como ocorre a transmissão e 51,3% não souberam apontar qual animal é susceptível à doença (Tab. 3).

Dentre as características da população, o sexo feminino mostrou ser conhecedor da enfermidade em questão ($OR=3,31$ – Tab. 4). Uma explicação para esse achado pode estar no fato das mulheres serem reconhecidamente mais atentas às questões de saúde, manifestando seus cuidados no âmbito familiar, em situações diversas com os filhos, companheiros, pais e avós (Vilella & Monteiro 2005). Esses cuidados muitas vezes se baseiam na experiência acumulada (consulta aos serviços de saúde) ou no aprendizado dessa experiência com outras mulheres da família, os quais são colocados em prática para prevenir a doença e garantir a saúde da família (Tezoquipa et al. 2001, Vilella & Monteiro 2005).

Dois outros aspectos que merecem ser discutidos são o maior conhecimento da doença pelos moradores da área central ou que residem com mais de cinco pessoas no domicílio (Tab. 4). O primeiro fato pode estar relacionado à condição socioeconômica da região central. Nessa área, residem pessoas de melhor poder aquisitivo e instrução – 28% recebem mais de 5 salários mínimos e 81% tinham pelo menos o ensino médio completo – números superiores aos dos demais bairros pesquisados (1% e 19% para Lajinha, 2% e 24% para Novo Horizonte e 11% e 36,5% para Nossa Senhora de Lourdes).

O fato do número de moradores por domicílio estar associado ao nível de conhecimento sobre a enfermidade pode se dever à troca de informações entre os residentes. Essas informações podem ser adquiridas em diferentes locais através de inúmeras fontes, facilitando seu intercâmbio entre os moradores. Castellucci e colaboradores (2000) observaram que a troca de informações entre moradores colabora para difundir o conhecimento de plantas utilizadas medicinalmente. Esse intercâmbio de conhecimentos entre vizinhos e parentes reforça os laços sociais e contribui para fortalecer o consenso cultural que é repassado aos descendentes (Marinho et al. 2011). A troca de conhecimentos é considerada ferramenta importante na construção do conhecimento em saúde. Essa construção pode se basear tanto no saber técnico quanto no popular, de forma que os saberes não sejam vistos como hierarquizados, mas apenas como diferentes (Acioli 2007).

O nível de instrução pode refletir na qualidade do diálogo e da informação trocada entre os residentes. Esse fator se mostrou diretamente associado aos fatores de risco observados entre a população pesquisada, uma vez que possuir pelo menos o ensino médio garantiu 44% de proteção contra as leishmanioses (Tab. 5). O presente estudo demonstrou que quase 95% dos entrevistados residiam em locais com a presença de pelo menos 1 fator de risco e 39,6% deles reportaram a presença de mais de 4 fatores. A influência das características do peridomicílio e o relacionamento destas com o risco de ocorrência das leishmanioses são bem demonstradas e estudadas – presença de animal doméstico, galinheiro, árvores frutíferas, matas remanescentes, dentre outros (Sherlock 1969, Forattini et al. 1976, Marzochi & Marzochi 1997, Gontijo & Carvalho 2003, Rondon et al. 2008). Esses fatores podem funcionar como atrativos para o vetor e favorecer sua reprodução nas proximidades da residência. A matéria orgânica que pode se acumular nesses locais é essencial para o desenvolvimento das larvas dos flebotomíneos, representando papel importante na sobrevivência desses insetos no peridomicílio (Felicangeli 2004, Coura-Vital et al. 2013). Por isso, é de grande importância que tanto a residência quanto seus anexos (quintal, canil, galinheiro) sejam mantidos limpos a fim de evitar a proliferação dos flebotomíneos. Coura-Vital e colaboradores (2013), estudando fatores de risco para soroconversão canina em Belo

Horizonte observaram que a presença de adubo ou folhas secas acumuladas aumentava em aproximadamente três vezes a chance de um cão se tornar positivo.

No presente estudo, a associação do conhecimento da população sobre as leishmanioses à presença de fatores de risco não apresentou resultados estatisticamente significativos. Provavelmente, a população estudada não tem consciência de que o controle da doença também parte da redução do fator de risco no ambiente peridomiciliar. Esse fato fica mais notório quando se observa que 94,8% dos moradores possuem algum fator de risco no peridomicílio de suas casas. Porém, o fato de não ter sido possível correlacionar o conhecimento da população à presença desses fatores indica que os moradores desconhecem o risco a que estão sujeitos. Visto que há um baixo conhecimento sobre o assunto – 6,8% dos entrevistados conhecem a leishmaniose - é possível que este seja tão incipiente que não provoque mudanças de comportamento na população.

A educação pode ser um caminho para reverter esse cenário, dado que possuir pelo menos o ensino médio conferiu quase 44% de proteção contra as leishmanioses (Tab. 5). Contudo, para que o saber apropriado se reflita em práticas preventivas adequadas e eficazes, o conhecimento – reprodução correta de um conteúdo; a atitude – opinião do indivíduo sobre o conteúdo, e a prática – ação executada – devem caminhar juntos na realidade popular (Reis et al. 2013). Logo, a educação em saúde deve ser concebida como uma medida sanitária concreta que pode levar ao fracasso ou ao sucesso de um programa de controle e conseqüentemente, influenciar o risco de exposição da população (Gama et al. 1998).

Nesse contexto, a capacitação dos profissionais de saúde deve ser considerada. São eles os responsáveis por difundir o conhecimento científico e torná-lo acessível ao público, portanto, esses profissionais necessitam de uma educação permanente a fim de serem capazes de acompanhar a evolução das endemias (Luz et al. 2005). Falhas conceituais ou defasagens no conhecimento sobre as leishmanioses pelos profissionais de saúde podem refletir na qualidade das informações que chegam à população. Essas falhas foram observadas por vários autores com relação à transmissão da enfermidade (Weigel et. al. 1994, Menezes comunicação pessoal), nome popular da leishmaniose (Luz et al. 2005) e características morfológicas do vetor (Fabris 2009). Outros autores demonstraram que uma porcentagem muito pequena da população recebe informações sobre a LTA e a LV desses profissionais (Boraschi et al. 2008; Moreira et. al. 2002). Outro profissional de extrema importância na disseminação correta de informações são os professores da educação básica, que mantem contato estreito com crianças e adolescentes, que podem ser excelentes disseminadores das informações recebidas em sala de aula. Estudo conduzido em Divinópolis, Minas Gerais, sobre a percepção dos professores quanto às leishmanioses demonstrou que esses

profissionais desconhecem a doença. Entretanto, os mesmos se dizem dispostos a conscientizar seus alunos, destacando a escola como um espaço propício para a divulgação desse conhecimento (França et al. 2013).

Portanto, processos de educação permanente que sensibilizem a população para participar do combate às leishmanioses devem também passar a capacitação dos profissionais da saúde e da educação. Dessa forma, é possível construir e fortalecer os saberes sobre as doenças que afetam uma região, permitindo a troca de experiências. Tais processos devem ser contínuos e periodicamente divulgados. Por um lado porque representam, muitas vezes, as únicas fontes de informação popular e por outro porque foi comprovado que as informações adquiridas durante ações de promoção da saúde são rapidamente esquecidas pela população (Luz et al. 2005, Lobo et al. 2013). Com a participação ativa da comunidade, é possível reduzir os condicionantes que facilitam a transmissão das leishmanioses na região. Além disso, a questão da doença pode ser trabalhada sob uma perspectiva de promoção da saúde, em que as políticas públicas favorecem as habilidades pessoais e coletivas focadas na melhoria de sua qualidade de vida e saúde.

7.2 A fauna flebotomínica

A captura entomológica utilizando armadilhas do tipo HP ocorreu mensalmente durante um ano, tendo sido identificada uma rica fauna flebotomínica em Formiga, cidade considerada de transmissão moderada para leishmaniose (SRS 2013) (Tab. 6). Do total de espécimes capturados, mais da metade pertencia às espécies *L. longipalpis* (35,3%) e *L. whitmani* (18,3%), vetores comprovados de LV e LTA, respectivamente (Lainson & Rangel 2005, Andrade Filho et al. 2007) (Tab. 6).

O número total de flebotomíneos encontrados não foi elevado (224), contudo, uma baixa densidade populacional não implica ausência de transmissão vetorial. Essa baixa densidade de flebotomíneos pode ajudar a explicar a quantidade reduzida de casos humanos de LV registrados na área de estudo. Em locais de baixa densidade vetorial, acredita-se que o potencial da espécie como vetor e seu envolvimento comprovado na transmissão da doença garantem a ocorrência de um ciclo de transmissão (Carvalho et al. 2010). Os resultados do presente trabalho sugerem que *L. longipalpis* seja a espécie responsável pelo surgimento dos casos humanos de LV no município, uma vez que foi a segunda espécie mais abundante.

Neste estudo, a razão total de machos/ fêmeas (2,06:1) corrobora com outros estudos que observaram maior frequência de machos em capturas noturnas com diferentes armadilhas

(Lima et al. 1998, Alves 2007, Almeida et al. 2010) (Tab. 6). A maior proporção de machos pode ser explicada pelo seu comportamento natural em acompanhar as fêmeas durante o deslocamento, formando agregados com o objetivo da fecundação (Feliciangeli 1987, Domingos et al. 1998, Dias et al. 2007). Porém, outros autores apontam que a armadilha luminosa pode atrair de maneira diferente ambos os sexos, favorecendo a captura de machos (Barretto 1943, Aguiar et al. 1985). É válido ressaltar que a maior razão macho/ fêmea foi observada para *L. whitmani* (7,2:1), uma espécie encontrada em apenas 4 pontos de coleta, todos próximos de uma área verde extensa. É sabido que os machos eclodem antes das fêmeas, sendo possível que as áreas de mata próximas das armadilhas estejam funcionando como criadouros, o que favoreceu a captura de maior quantidade de machos em relação às fêmeas dessa espécie (Feliciangeli 1987). *Lutzomyia longipalpis* também apresentou maior proporção de machos, como descrito em outras regiões do país como Campo Grande, Porteirinha e Belo Horizonte (Oliveira et al. 2003, Barata et al. 2004, Souza et al. 2004). Essa espécie possui caráter urbano e apresentou grande dispersão no município - foi capturada em 18 pontos de coleta. Como as armadilhas foram colocadas no peridomicílio, inclusive nas regiões centrais da cidade onde há apenas resquícios de vegetação, a hipótese mais provável para a predominância de machos pode estar nas condições do peridomicílio, como higiene e presença de animais domésticos.

A literatura científica demonstra a associação de *L. longipalpis* aos abrigos de animais no peridomicílio, fato que exerce particular influência sobre a sua densidade (Forattini 1960, Sherlock & Guitton 1969, Quinnell & Dye 1994, Camargo-Neves et al 2001). A proximidade com o ambiente peridoméstico permite que as fêmeas de *L. longipalpis* se alimentem em animais domésticos e sinantrópicos nesses locais. Esse fato aliado à sua antropofilia e capacidade de colonizar o intradomicílio, favorecem sua adaptação a ambientes modificados (Lainson & Rangel 2005, Rangel & Vilela 2008).

A microregião de Formiga é endêmica em LTA, porém a área de estudo ainda não apresenta nenhum caso notificado dessa forma da doença. Contudo, no município de Formiga, foram capturados 18,3% de *L. whitmani* - considerado o vetor primário da LTA (Tab. 6). Na região sudeste do Brasil, esta espécie é encontrada em ambiente peridomiciliário e no perímetro urbano de grandes cidades, como Belo Horizonte e Maringá, participando dos ciclos enzoóticos e peridomésticos (Teodoro et al. 1998, Souza et al. 2004, Saraiva et al. 2011, Silva FS et al. 2012).

Estudos sugerem que a densidade de *L. whitmani* pode estar relacionada com modificações na cobertura vegetal e adaptação a novas condições ambientais, sendo que as pressões ecológicas afetam sua distribuição (Azevedo et al. 2002, Gil et al. 2003). É altamente

antropofílica, sendo responsável pela transmissão de *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *Leishmania (V.) shawi* nas regiões amazônica, sul, central e nordeste do Brasil (Freitas et al. 2002, Souza et al. 2002, Costa et al. 2007, Brito et al. 2009, Rangel & Lainson 2009). Peterson e Shaw (2003), ao desenvolver modelagens de nicho ecológico de vetores do gênero *Lutzomyia* considerando as mudanças climáticas, apontaram *L. whitmani* como espécie capaz de se expandir do sudeste para regiões mais ao sul do Brasil. Por outro lado, essa espécie foi encontrada infectada por *L. (L.) infantum* em Divinópolis, Minas Gerais, sendo, portanto necessário aprofundar os estudos de interações biológicas para determinar um possível papel desse vetor na transmissão da LV (Margonari et al. 2010).

Lutzomyia cortelezzii representou 33% da fauna capturada em Formiga e também foi encontrado naturalmente infectado por *L. (L.) infantum* em Minas Gerais (Carvalho et al. 2008) (Tab. 6). Contudo, no Brasil, o possível papel de *L. cortelezzii* como vetor da LV ainda está sendo estudado, embora possa ser encontrado em áreas urbanas e endêmicas para a doença (Oliveira AG et al. 2006, Nascimento et al. 2007, Nascimento et al. 2013). Na Argentina, essa espécie parece estar associada ao surgimento de casos humanos de LTA devido a, dentre outros fatores, ter distribuição coincidente com a dos casos humanos, se alimentar de sangue humano em ambiente domiciliar e de ter sido encontrada naturalmente infectada por *L. (V.) braziliensis* (Rosa et al. 2012).

As demais espécies encontradas não apresentam importância médica até o momento ou ainda são consideradas suspeitas de envolvimento no ciclo de transmissão das leishmanioses. Alguns critérios clássicos para se incriminar uma espécie como vetor são: antropofilia; distribuição espacial em concordância com casos humanos e infecção natural por espécie de *Leishmania* idêntica à que infecta o homem (Killick-Kendrick 1990). Esses critérios foram recentemente atualizados por Ready (2013), sendo que o uso de modelos matemáticos foi sugerido como forma de se demonstrar a real importância da espécie em focos específicos da doença.

Lutzomyia lenti foi encontrado naturalmente infectado na Bahia e considerado suspeito da transmissão canina de *L. (L.) infantum* por Sherlock (1996), mas se mostrou refratário à infecção por *Leishmania* em laboratório (Brazil et al. 1997). Entretanto, Margonari e colaboradores (2010), estudando a fauna flebomínica de área endêmica do estado de Minas Gerais, encontraram pela primeira vez esta espécie naturalmente infectada por *L. (V.) braziliensis*, o mesmo ocorrendo em Campo Grande (Paiva et al. 2010). Sanguinette, estudando a epidemiologia das leishmanioses em Várzea da Palma, Minas Gerais, relatou a infecção natural dessa espécie tanto por *L. (L.) infantum* quanto por *L. (V.) braziliensis*. *Lutzomyia lenti* é comumente encontrada em áreas de transmissão de LV e LTA no Brasil, se

apresentando associada a abrigos de animais e ao peridomicílio (Galati et al. 1996, Martins et al. 2002, Oliveira et al. 2003, Jeraldo et al. 2012).

Lutzomyia sordellii também pode ser encontrado no peridomicílio - galinheiros, chiqueiros, currais - bem como em cavernas em diferentes regiões brasileiras como Pernambuco e Mato Grosso do Sul (Galati et al. 1997, Brandão-Filho et al. 2011, Carvalho et al. 2013). Guimarães e colaboradores (2012) observaram que *L. sordellii* foi uma das espécies mais predominantes em resquícios de mata primária em Pernambuco, embora também tenha sido capturado nos ambientes intra e peridomiciliar. Silva & Vasconcelos (2005) encontraram a espécie em resquícios de mata atlântica na região metropolitana do Recife, enquanto Oliveira e colaboradores (2003) a observaram na região central da cidade de Campo Grande, que apresenta casos de LV e LTA. Apesar de até o momento não existirem dados suficientes sobre sua participação no ciclo das leishmanioses, *L. sordellii* se distribui por todas as regiões do Brasil (Rangel & Lainson 2003).

Lutzomyia monticola é antropofílica, tendo sido a espécie mais capturada picando humanos no Parque Nacional do Itatiaia, Rio de Janeiro (Afonso et al. 2007). A espécie é suspeita de envolvimento na transmissão de *Leishmania enriettii*, pois já foi infectada experimentalmente pelo parasito ao se alimentar em lesões de cobaias (Luz et al. 1967, Lainson 1997). Apresenta caráter silvestre, sendo encontrada em áreas florestadas e em perímetros de mata próximos a área urbana, como observado nas cidades de Belo Horizonte e Divinópolis - nesta última alguns espécimes apresentavam infecção por *L. (V.) braziliensis* - sugerindo adaptação a áreas antropofizadas (Souza et al. 2004, Afonso et al. 2007, Margonari et al. 2010, Cutolo et al. 2013). Estudos mostram que mudanças em áreas de mata podem influenciar a composição e o comportamento da fauna flebotomínica local, uma vez que ações antrópicas alteram o habitat dos flebotomíneos, favorecendo a adaptação de algumas espécies ao ambiente modificado (Arias & Freitas 1982, Ready et al. 1983, Castellón et al. 2000, Silva et al. 2007).

As espécies *L. lutziana*, *L. brasiliensis*, *L. bacula* e *L. termitophila* não estão envolvidas na transmissão de agentes patogênicos para humanos ou animais, não sendo incriminadas como vetores de *Leishmania* spp. (Andrade et al. 2007). A primeira é encontrada no Brasil, Colômbia, Venezuela, Guiana Francesa, Peru, Paraguai e Suriname e a segunda, de maneira mais restrita, ocorre no Brasil, Peru e Guiana Francesa (Young & Duncan 1994, Bejarano et al. 2007). *Lutzomyia bacula* se distribui pelas regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, se restringindo às áreas verdes, não urbanas (Carvalho et al. 1993, Almeida et al. 2010, Souza et al. 2010, Vilela et al. 2011, Nascimento et al. 2013). Por fim, *L. termitophila*, espécie descrita em Minas Gerais associada a ninho de térmitas é frequentemente citada em

estudos entomológicos na região (Martins et al. 1977, Saraiva et al. 2010). Apesar de não possuir importância epidemiológica, esse flebotomíneo foi encontrado infectado por *L. (L.) infantum* em Belo Horizonte e por *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* em Várzea da Palma (Sanguinette 2011).

Três armadilhas (4, 12 e 23) concentraram 49.6% do total de flebotomíneos capturados, sendo que a armadilha 23 capturou 22% desse total (Tab. 7). Nos locais onde foram dispostas essas armadilhas, foram observados ambientes favoráveis à reprodução dos flebotomíneos, como galinheiro, animais domésticos, lotes vagos e extensas áreas verdes, fato que poderia explicar o maior número de insetos coletados nessas áreas. Nascimento e colaboradores (2013) observaram que dentre as 15 residências amostradas, em uma especificamente foi coletado quase 85% dos *L. longipalpis* do município de Divinópolis, Minas Gerais, em um galinheiro. Apesar dessas aves em questão não serem susceptíveis à infecção por *Leishmania* spp., elas exercem atração alimentar sobre os flebotomíneos, constituindo importante elo epidemiológico (Afonso et al. 2012, Silva et al. 2012).

As variáveis precipitação e temperatura apresentaram resultados estatisticamente significativos em relação à densidade de flebotomíneos, tendo sido observada maior frequência de espécimes na estação chuvosa (Fig. 8). Esses dados corroboram com resultados de outros autores que demonstraram a influência de fatores climáticos na abundância de flebotomíneos, sendo mais comum encontrá-los nos meses quentes e úmidos (Deane 1956, Feliciangeli 1987, Barata et al. 2004, Margonari et al. 2006, Ready 2008). Moschin e colaboradores (2013) inferiram que altas temperatura e umidade (50 a 60%) poderiam acelerar o desenvolvimento dos estágios imaturos de flebotomíneos na Serra da Cantareira, São Paulo. Isso resultaria em maior frequência de formas aladas nas estações quentes e moderadamente úmidas como a primavera, dado que a umidade média registrada nos 15 dias anteriores à captura se correlacionou positivamente com algumas espécies capturadas no estudo (Moschin et al. 2013).

As barreiras físicas e ambientais – precipitação, presença de vegetação e hospedeiros vertebrados - podem influenciar a distribuição geográfica das espécies de flebotomíneos (Arias et al. 1985, Chamailhè et al. 2010). Kesari e colaboradores (2011) observaram que na Índia, a temperatura e a umidade eram os melhores preditores da distribuição de *Phlebotomus argentipes*. É possível que para o município de Formiga, as características da fitofisionomia predominante – floresta estacional semidecidual com transição para o cerrado - influenciem as populações de flebotomíneos: os meses secos com pouca chuva implicam uma redução drástica da cobertura vegetal, ocasionando alterações climáticas e ambientais ao longo do ano com impactos diretos sobre o microclima da região. Dessa forma, as condições ambientais

poderiam favorecer ora uma espécie, ora outra, trazendo implicações importantes para a vigilância entomológica necessária ao controle da doença na região.

7.3 A infecção canina no município de Formiga

No Brasil, a leishmaniose visceral é considerada uma zoonose que tem o cão doméstico como o principal reservatório em meio urbano. Segundo o MS, áreas com taxas de prevalência canina superiores a 2% são consideradas prioritárias para implantação das medidas de controle, sendo recomendado o inquérito canino censitário anual (Brasil 2006). Seguindo o que é preconizado pelo MS, que considera a prevalência detectada pelos testes sorológicos DPP[®] e ELISA, para o município de Formiga a taxa de infecção canina observada foi de 5%. Entretanto, o presente trabalho considerou como cão infectado aquele que apresentou pelo menos um resultado positivo, em qualquer teste sorológico ou molecular, o que gerou uma taxa de infecção canina mais elevada: 19% (Fig. 9). Como é possível notar, qualquer que seja a taxa de infecção adotada, ambas se encontram acima do limite estipulado pelo MS.

As ações contempladas no programa de controle da leishmaniose aliadas a uma vigilância epidemiológica contundente são determinantes para conter a expansão da doença. Em Governador Valadares, a adoção do programa de controle da LV se provou eficaz no combate à doença, tornando o município uma área endêmica controlada. Contudo, a descontinuidade das ações favoreceu o surgimento de novos casos humanos de LV a partir de 2008 e, atualmente, a cidade apresenta elevada prevalência canina, alta taxa de letalidade e *L. longipalpis* no peridomicílio (Barata et al. 2013). Esses fatos demonstram o quanto é necessário para o município de Formiga implantar as ações previstas no programa de controle das leishmanioses no momento atual. Apesar da situação epidemiológica da cidade ser propícia para o surgimento de novos casos humanos (presença de *L. whitmani*, de *L. longipalpis* e elevada taxa de infecção canina), Formiga ainda é considerada área de transmissão moderada e capaz de responder de forma positiva caso as ações de combate sejam colocadas em prática. O inquérito canino censitário anual, medida prevista pelo programa, pode contribuir para o monitoramento dos focos mais importantes de leishmaniose canina (LC) e as áreas prioritárias identificadas no presente trabalho.

De fato, os inquéritos sorológicos caninos constituem importantes ferramentas para detectar focos silenciosos da doença e delimitar as regiões prioritárias para execução de medidas de controle, a partir da identificação dos locais de maior prevalência canina (Julião et

al. 2007). Como uma medida preconizada pelo programa de controle, a remoção dos cães positivos se mostrou eficaz para diminuir a carga da doença canina, o que influenciou a incidência dos casos humanos de LV na Bahia e em Minas Gerais (Ashford et al. 1998, Palatnik-de-Sousa et al. 2001). Uma ressalva consiste no fato da medida apresentar efeito temporário, sendo insuficiente quando considerada de forma isolada na erradicação da LC (Ashford et al. 1998, Grimaldi Jr. et al. 2012). Entretanto, foi demonstrado que as principais diretrizes recomendadas pelo MS - tratamento dos casos humanos, controle vetorial e remoção dos cães soropositivos – podem ser eficazes no combate à doença em áreas endêmicas, quando usadas em conjunto (Magalhães et al. 1980, Palatnik-de-Sousa et al. 2001). Por outro lado, alguns estudos não conseguiram comprovar o êxito dessas estratégias em várias localidades brasileiras (Moreira et al. 2004, Costa et al. 2007, Souza et al. 2008).

A remoção dos animais infectados ocorre mediante o resultado positivo em testes sorológicos, devido à intensa resposta humoral observada na leishmaniose visceral canina (LVC) (Alvar et al. 2004). Por isso, esforços têm sido feitos para desenvolver métodos mais sensíveis e específicos para detecção da LVC nesses animais. O diagnóstico canino correto associado a outras medidas de controle contempladas no programa da LV pode contribuir para a prevenção e controle efetivos da doença, evitando a eliminação de cães negativos e a permanência dos positivos no local (Schubach 2011). Atualmente, o protocolo de diagnóstico da LVC no Brasil se baseia na triagem dos animais pelo teste de imunocromatografia rápida de duplo percurso DPP[®] e na confirmação pelo ELISA.

O DPP[®] é um teste rápido qualitativo que emprega os antígenos recombinantes rK26 e rK39. A técnica substituiu a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), se mostrando mais sensível do que a RIFI. Esta última apresenta menor sensibilidade (72% a 100%) e especificidade (52% a 100%) quando comparada a outras técnicas sorológicas, além de necessitar de corpo técnico treinado e apresentar subjetividade na leitura (Paranhos-Silva et al. 1996, Silva et al. 2006, Ferreira et al. 2007). Silva e colaboradores (2013), avaliando o desempenho de diversos testes, dentre eles DPP[®] e RIFI *L. major*-like, encontraram uma maior sensibilidade para o primeiro teste, além da ausência de reações cruzadas nos cães infectados com *L. (V.) braziliensis* e *Trypanosoma caninum*. Costa e colaboradores (2003), ao padronizar um teste usando as proteínas recombinantes rK26 e rK39, obtiveram sensibilidade de 83-96% e especificidade de 100%. Outros autores, trabalhando com testes imunocromatográficos baseados em rK39, observaram uma sensibilidade de 72% a 97,1% e especificidade de 61% (Reithinger et al. 2002, Otranto et al. 2005). De acordo com Romero & Boelaert (2010), a sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos podem variar de acordo com a definição dos casos e controles de um estudo.

Para o teste ELISA, diversos trabalhos demonstraram uma sensibilidade, em alguns casos, baixa, variando de 30% a 100% e especificidade de 64% a 100% (Paranhos-Silva et al. 1996, Ferreira et al. 2007, Porrozzi et al. 2007, Pedras et al. 2008, Camargo et al. 2010, Schubach 2011). Contudo, Figueiredo e colaboradores (2010) observaram melhor sensibilidade (100%) e especificidade (96,6%) para o mesmo teste. No Brasil, o kit distribuído pelo MS usa *L. major*-like como antígeno, que não é o agente etiológico circulante no país. O fato gera discussões sobre a substituição por um antígeno homólogo de *L. (L.) infantum*, uma vez que este pode ser capaz de produzir melhores performances, podendo aumentar a especificidade dos testes sorológicos (Silva et al. 2013). Estudo avaliando diferentes testes sorológicos para LVC em área endêmica do Rio de Janeiro demonstrou maior especificidade do teste ELISA *L. (L.) infantum* quando comparado ao ELISA *L. major*-like (Silva et al. 2013). Por outro lado, Arruda e colaboradores (2013) obtiveram acurácia e confiabilidade semelhantes para ambos os antígenos no teste ELISA, sugerindo não haver evidências suficientes que suportem a substituição do antígeno nos testes atualmente utilizados no Brasil. Outro ponto problemático do ELISA é a possibilidade de ocorrer reações-cruzadas com outras doenças, fato que diminui sua especificidade (Bolaert et al. 1999, Ferreira et al. 2007). Ferreira e colaboradores (2007) perceberam uma redução na especificidade tanto do RIFI quanto do ELISA após considerar os resultados de cães infectados por outros tripanossomatídeos e bactérias - *Trypanosoma cruzi* e *Ehrlichia canis* – como positivos nesses testes.

Mais recentemente, a PCR tem sido empregada na detecção da LC. A PCR é eficaz na detecção de baixas cargas parasitárias e apresenta elevadas sensibilidade e especificidade tanto para LV quanto para LTA (Andresen et al. 1997, Aviles et al. 1999, Lachaud et al. 2002, Cortes et al. 2004, Ordeix et al. 2005). Estudos encontraram sensibilidade variando de 64% a 100% e especificidade de 87% a 100% para a técnica (Wu et al. 1997, Reithinger et al. 2002, Disch et al. 2003, Ikonopoulou et al. 2003, Manna et al. 2004, Maurya et al., 2005). Alguns trabalhos observaram baixa sensibilidade da PCR quando foram utilizadas amostras sanguíneas, tendo como principal causa a possível interferência de inibidores da *Taq polimerase* (Al-Soud et al. 1998, Santos et al. 2010, Faria et al. 2012). A técnica parece ser mais sensível quando são utilizados outros tipos de amostras biológicas, como linfonodos e pele (Manna et al. 2004, Reale et al. 1999). Entretanto, muitos estudos sugerem que amostras sanguíneas constituem material confiável para o diagnóstico da LC, apresentando coleta simples e pouco invasiva (Reale et al. 1999, Ikonopoulou et al. 2003, Manna et al. 2004).

A técnica de PCR pode ser uma alternativa para identificação de infecção, quando os resultados são indeterminados ou negativos em outros testes, visto que foi encontrada uma

excelente correlação entre os resultados da PCR e os testes sorológico e parasitológico (Cruz et al. 2006, Antinori et al. 2007, Alam et al. 2009, Silva MAL 2012). Porém, o alto custo desse ensaio aliado à necessidade de profissionais treinados para sua execução, além de exigir infra-estrutura laboratorial, restringem seu uso à pesquisa científica. A utilização rotineira dessa técnica encontra barreiras principalmente nos países subdesenvolvidos, onde a aplicação do procedimento depende da diminuição dos custos operacionais e da simplificação da metodologia (Gontijo & Melo 2004).

Os resultados sorológicos do presente estudo mostraram que 17 (3%) cães foram positivos em ambos os testes (DPP[®]/ ELISA), 33 (6%) apenas no ELISA e 11 (2%) apenas no DPP[®] (Fig. 9). Ao todo, 82 (14%) cães foram positivos em pelo menos um desses testes, tendo sido a concordância observada entre eles moderada ($k= 0,48$) (Tab. 8). De fato, o método ELISA detectou mais animais positivos. Essa discrepância pode ser explicada pela resposta imune heterogênea que os cães infectados por *L. (L.) infantum* desenvolvem devido à participação de diversos antígenos, os quais são reconhecidos de maneiras distintas nos diferentes indivíduos e estágios da doença (Falqueto et al. 2009). Por isso, é recomendável a utilização de testes em paralelo ou com múltiplos antígenos para identificar um maior número de animais infectados (Falqueto et al. 2009, Domingos 2012).

A técnica de LnPCR apontou 45 (7,9%) cães como positivos (Fig. 9). Esse método é capaz de detectar baixas cargas parasitárias e, por isso, recomendado para detecção de alvos em amostras biológicas que apresentem pequenas quantidades de DNA (Dupin et al. 2002). Fisa e colaboradores (2001) demonstraram a elevada sensibilidade da técnica ao utilizar células mononucleares de sangue periférico. Além disso, relataram resultados positivos para LnPCR em cães cujos níveis específicos de imunoglobulinas eram muito próximos aos do cut-off no ELISA, indicando ser a LnPCR uma ferramenta sensível e específica para o diagnóstico da LC (Fisa et al. 2001). Uma das desvantagens é a necessidade de transferir os aplicoms da primeira reação para novos tubos, onde servirão de template para a segunda reação, o que favorece a ocorrência de contaminação, gerando resultados falso-positivos (Silva 2012).

Quando foi observada a presença de sintomas entre os cães infectados, a maioria se mostrou assintomática (78) (Tab. 10). Em áreas endêmicas, acredita-se que entre 60% e 80% dos animais soropositivos não apresentem sintomas da doença, a qual pode permanecer inaparente por longos períodos (Queiroz et al. 2010). Apesar de não existirem sinais clássicos para LVC, alguns se apresentam mais comuns, como emagrecimento, onicogribose, apatia, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia e alterações cutâneas (Maia & Campino 2008).

Dentre os sintomas citados, a maior parte foi observada entre os animais infectados identificados no presente estudo, principalmente dermatite, linfadenomegalia e onicogrifose.

Os cães assintomáticos podem constituir importante elo epidemiológico, uma vez que permanecem no ambiente e são capazes de transmitir o parasito para o vetor, ainda que em menor proporção do que os animais sintomáticos (Courtenay et al. 2002; Costa-Val et al. 2007; Michalsky et al. 2007; Amorim et al. 2011; Soares et al. 2011). Queiroz e colaboradores (2011) encontraram amastigotas intactas em amostras de pele saudável de cães assintomáticos através da técnica de imunohistoquímica confirmada por PCR, mostrando a importância desses animais na epidemiologia da LVC. Outros trabalhos também demonstraram ser a pele uma fonte de parasitos importante nos cães a partir da detecção pela técnica de PCR (Manna et al. 2004, Quaresma et al. 2009, Queiroz et al. 2010, Sanguinette 2011). Estudo de Laurenti e colaboradores (2013) demonstrou que tanto os cães sintomáticos quanto assintomáticos foram potencialmente infectivos para o vetor, porém, os assintomáticos foram mais competentes. Por outro lado, diversos trabalhos mostram a ausência ou baixa infectividade dos animais assintomáticos para os flebotômios (Michalsky et al. 2007, Travi et al. 2001, Verçosa et al. 2008).

A literatura científica relata que a ocorrência de cães assintomáticos pode influenciar o desempenho dos testes sorológicos (Quinnell et al. 2001, Reis et al. 2001, Quaresma et al. 2009). Realmente, a LVC é considerada uma doença crônica sistêmica e com importante componente imunológico em que os animais infectados podem apresentar respostas imunes distintas (Moreno et al. 1999). Em geral, os cães assintomáticos apresentam, predominantemente, uma resposta tipo Th1 que se relaciona à defesa mediada por células (Bárbieri 2006). Nesse tipo de resposta há produção de citocinas (INF- γ e TNF- α) que ativam macrófagos e participam da formação de células citotóxicas. São essas substâncias que conduzem, aparentemente, à resistência do cão à LVC, onde a resposta imune individual não está associada à produção de anticorpos, permitindo que o mesmo permaneça soronegativo (Bárbieri 2006, Otranto et al. 2005). Por isso, estas ferramentas podem não ser adequadas para o diagnóstico da LVC antes da soroconversão e do aparecimento dos sintomas.

No presente estudo, 27 cães tiveram resultado indeterminado no ELISA. Menezes (2011), ao acompanhar animais com resultado indeterminado em Belo Horizonte, observou que 81,7% deles apresentaram resultado reagente em alguma das coletas subsequentes, sendo que 80,5% deles soroconverteram na segunda coleta (até 3 meses após a primeira). Lopes e colaboradores (2009) também verificaram em Belo Horizonte, mas em menor proporção, a soroconversão dos animais com resultado indeterminado (38,5%). Amostras com valores de absorbância muito próximos aos do “cut-off” no ELISA e com baixos níveis de anticorpos

específicos são indicativos de que o animal se encontra em fase inicial da doença (Aisa et al. 1998). Assim, o acompanhamento dos cães indeterminados se torna necessário, uma vez que a sua permanência no ambiente pode funcionar como foco mantenedor da LC no município de Formiga.

Ainda entre os animais indeterminados, 3 cães foram positivos para DPP® e 2 foram positivos para LnPCR (Fig. 9; Tab.10). Esse fato demonstra que esses animais, especificamente, podem ser tornar positivos em alguns meses. No caso do exame molecular, o resultado positivo indica que o cão está infectado com o parasita, porém, ainda sem apresentar anticorpos suficientes para serem detectados pelos testes sorológicos (Quinell et al. 2001, Coura-Vital et al. 2013). Courtenay e colaboradores (2002) observaram que, antes da soroconversão, os cães não apresentavam número suficiente de formas amastigotas para infectar os flebotomíneos através da pele e a detecção do parasita, nessa fase, só foi possível pela PCR. Contudo, Coura-Vital e colaboradores (2013) sugerem que o exame molecular positivo pode ser considerado um fator associado à soroconversão, por isso a importância do monitoramento desses cães através de técnicas sorológicas.

A combinação de diferentes técnicas diagnósticas diminui a possibilidade de resultados incorretos (falso-positivos e falso-negativos), aumentando as chances de um diagnóstico preciso para a LVC. Diversos estudos demonstraram que a associação de testes distintos concorre para a obtenção de resultados mais seguros (Gramiccia & Gradoni 2005, Lira 2005, Carvalho 2009, Queiroz et al. 2010). No presente estudo, o número de cães positivos apenas na LnPCR (n=26) demonstra que é possível existir um coeficiente considerável de cães infectados que não são detectados nos exames sorológicos na área de estudo. A prevalência canina de uma área endêmica pode se revelar maior quando são combinadas técnicas sorológicas e moleculares no diagnóstico (Alvar et al. 2004). Uma prevalência subestimada permite que um contingente substancial de animais infectados permaneça no ambiente. No contexto brasileiro, esse fato é mais preocupante, pois a retirada do cão só ocorre se o mesmo for reagente em ambos os testes DPP® e ELISA. Porém, no presente trabalho, sete animais foram positivos na LnPCR e também em apenas um dos testes sorológicos, o que não implicaria na eutanásia dos animais.

Nesse trabalho, o ensaio LnPCR foi aplicado com o intuito principal de identificar a espécie de *Leishmania* circulante no município, uma vez que o alvo (fragmento do gene SSUrRNA) constitui uma região conservada entre todas as espécies desse gênero. Para tanto, foi utilizada a técnica de sequenciamento, que permitiu caracterizar 13 amostras positivas pertencentes à espécie *L. (L.) infantum*. O achado, inédito para o município, traz importantes considerações para a vigilância epidemiológica local. Ficou comprovada a existência da *L.*

(L.) infantum entre os cães de Formiga, os quais são considerados o principal reservatório da LV em meio urbano. Essa espécie de *Leishmania* constitui o agente etiológico da doença em seres humanos e é causadora da forma mais grave e de alta letalidade se não tratada (Desjeux 2004, Dujardin 2005). Ainda que este trabalho não tenha identificado a espécie causadora da enfermidade em humanos, estudos quanto à estrutura genética de populações de *L. (L.) infantum* no Brasil mostraram que espécimes isolados de cães e humanos possuíam o mesmo perfil genético (Ferreira et al. 2012, Segatto et al. 2012). Assim, a confirmação da existência da espécie no município aliado ao fato de terem sido registrados casos de LV com óbito, reforçam a hipótese de participação da *L. (L.) infantum* no surgimento dos casos caninos e humanos no município de Formiga. Outro achado que fortalece essa suposição é o fato dos locais de ocorrência dos casos caninos se sobreporem aos locais de captura de *L. longipalpis* (Fig.12).

É de grande relevância também o fato de ter sido detectada a *L. (V.) braziliensis* infectando os cães da região (Tab. 11). O papel do cão como reservatório de espécies dermatópicas de *Leishmania* ainda não foi completamente elucidado, sendo a leishmaniose tegumentar canina (LTC) considerada uma forma menos comum da doença em cães (Vélez et al. 2012). Até o momento as seguintes espécies foram identificadas parasitando cães nas Américas: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) colombiensis* e *L. (L.) amazonensis* (Herrer 1951, Herrer & Christensen 1976, Mayrink et al. 1979, Delgado et al. 1993, Tolezano et al. 2007). Contudo, muitos autores assumem a ocorrência da LTC, sendo *L. (V.) braziliensis* o principal agente etiológico no Brasil (Reithinger & Davies 1999; Dantas-Torres 2009, 2010; Figueiredo et al. 2012; Oliveira et al. 2013). Quando manifesta a doença, os animais apresentam lesões ulceradas em locais como orelha, patas e focinho, as quais podem se curar espontaneamente e não comprometem o estado de saúde geral do animal (Pirmez et al. 1988; Madeira et al. 2003, Oliveira et al. 2013). Dessa forma, em Formiga, a presença de *L. (V.) braziliensis* e *L. whitmani* no município indica que casos humanos de LTA podem surgir a qualquer momento.

Embora tenha sido observada discordância na tipagem de 5 isolados dos 12 analisados entre a PCR-RFLP e o sequenciamento, está bastante claro que as espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* estão circulando no município (Tab. 11). Condições técnicas referentes à extração, de termociclagem e do sequenciamento podem ter contribuído para estas discordâncias.

Cabe ressaltar que a técnica de LnPCR seguida de sequenciamento permitiu identificar 3 gatos (2,8%) infectados com *L. (L.) infantum* na área de estudo (3/106). A literatura científica relata o encontro de *Leishmania* spp. em gatos através de técnicas sorológicas e

moleculares em Portugal, Jerusalém, Grécia e Irã (Maia et al. 2008, Nasereddin et al. 2008, Diakou et al. 2009, Hatam et al. 2010). No Brasil, foram encontrados gatos parasitados por *L. (L.) infantum*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (Savani et al. 2004, Schubach et al. 2004, Souza et al. 2005, Serrano et al. 2008). Casos felinos foram registrados em diferentes cidades do estado de São Paulo, Mato Grosso e em Belo Horizonte (Passos et al. 1996, Savani et al. 2004, Souza et al. 2009, Coelho et al. 2010). Em zonas endêmicas do Velho Mundo, o gato é considerado um reservatório da doença, uma vez que se mostrou infectante para *Phlebotomus perniciosus*, importante vetor da doença na região mediterrânea (Maroli et al. 2007). Além disso, os felinos são susceptíveis à infecção por *Leishmania* spp. e podem apresentar a doença (Rosa 2009). Aparentemente, esses animais representam bons hospedeiros/ reservatórios para o parasita, não funcionando apenas como reservatórios acidentais (Martín-Sánchez et al. 2007, Maia et al. 2008). Por isso, o papel epidemiológico desse animal na transmissão da LV não deve ser ignorado, reforçando a necessidade de se aprofundar os conhecimentos sobre o gato como reservatório no município de Formiga.

Ainda que o município de estudo seja considerado área de transmissão recente para LV, a taxa de infecção canina encontrada foi considerada elevada (19%), com 109 cães positivos em pelo menos um exame (molecular ou sorológico). Esse resultado, pioneiro para o município de Formiga, traz novas perspectivas para a saúde pública municipal, uma vez que os determinantes da doença no local eram desconhecidos. Ficou demonstrado que os cães estão parasitados e apresentam alta prevalência da doença, além de existir uma porcentagem considerável de animais indeterminados (4,7%). O fato suscita a hipótese de, em um futuro próximo, ocorrer um substancial aumento na taxa de infecção canina no município.

Outro ponto importante é a localização limítrofe da cidade de Formiga com outras cidades que registram a presença de vetores comprovados, casos caninos de leishmaniose e casos humanos de LTA (Fig. 1). Vista sob a perspectiva do apelo turístico que o município exerce sobre a região, atraindo centenas de turistas o ano todo, essa situação pode se tornar um grave problema de saúde pública. Estudos inferem sobre a importância da livre circulação de animais e pessoas na disseminação da *Leishmania* spp. entre as regiões do Brasil (Marcondes et al. 2003, Almeida et al. 2010, Carranza-Tamayo et al. 2010). Esses aspectos demonstram o quanto o município de Formiga está vulnerável ao estabelecimento da LTA e ao agravamento da LV, o que torna necessário que tanto os serviços de saúde quanto a população estejam preparados para enfrentar o problema das leishmanioses na cidade.

Um passo importante nesse sentido está nas contribuições que podem ser retiradas deste estudo. Através dele, foi possível identificar um determinante das leishmanioses ainda desconhecido para a região – a presença de cães positivos e os agentes etiológicos causadores.

Espera-se que os resultados encontrados aqui contribuam para a formulação de políticas públicas de combate à doença que sejam adequadas para o município e que objetivem a manutenção da qualidade de vida e saúde da população.

7.4 Análise espacial das leishmanioses e o meio ambiente

O avanço das técnicas de geoprocessamento tem sido usado para entender os padrões de transmissão das doenças infecciosas e analisar os fatores ambientais que afetam sua distribuição espacial e temporal (Elnaiem et al. 2003, Margonari et al. 2006, Tsegaw et al. 2013). Alguns fatores são atribuídos à emergência e re-emergência de determinadas doenças transmitidas por vetores, como construção de rodovias, hidrelétricas e expansão agropecuária, os quais afetam a paisagem e podem influenciar a dinâmica populacional da fauna e os ciclos das doenças (Confalonieri 2005, 2013; Barros et al. 2011). No caso das leishmanioses, o SIG e o sensoriamento remoto (SR) são utilizados para gerar mapas de ocorrência da doença e seus vetores, como também modelos preditivos (Peterson & Shaw 2003, Shimabukuro et al. 2010).

No presente trabalho, essas técnicas foram utilizadas para gerar diversos mapas que mostram a distribuição de vetores e cães infectados no município de Formiga. Além disso, essas ferramentas permitiram elucidar se algum dos fatores ambientais descritos na literatura científica – umidade, cobertura vegetal, altitude (Forattini 1973, Elnaiem et al. 2003, Margonari et al. 2006, Tsegaw et al. 2013) – se relacionam com a ocorrência dos casos humanos, caninos e vetores na área estudada.

Algumas variáveis ambientais parecem ter influenciado de forma significativa a ocorrência dos flebotomíneos nesse estudo. A vegetação existente no município esteve mais associada à captura de *L. whitmani*, pois o mapa de densidade para essa espécie mostra sua ocorrência nas duas regiões de vegetação extensa (Fig. 13). A análise de assinatura confirmou a presença de 99,8% dessa espécie nas armadilhas distantes até 200m de uma área verde. Para *L. longipalpis* também foi observada associação entre a densidade e a distância da vegetação, porém em faixas mais amplas de até 400m (Fig. 12). Diversos estudos mostram que a presença de vegetação pode ser considerada um fator de risco tanto para a LV quanto para a LTA (Elnaeim et al. 2003, Aparicio & Bitencourt 2004, Sudhakar et al. 2006, Negrão & Ferreira 2009). Essa relação, principalmente no caso de *L. whitmani*, pode estar associada ao fato das áreas de mata apresentarem maior complexidade ambiental, disponibilizando numerosos nichos ecológicos. Esse fato propicia a ocorrência de grande quantidade de

espécies animais e conseqüentemente, variadas fontes alimentares para os flebotômíneos (Oliveira et al. 2012).

Costa e colaboradores (2007), ao fazer uma revisão sobre a distribuição geográfica de *L. whitmani* e a epidemiologia da LTA no Brasil, observaram que essa espécie pode ser encontrada em diversos tipos de vegetação (florestas tropicais, cerrado e caatinga) e está associada às áreas de transmissão da doença, sendo sugerido como principal vetor nesses circuitos. No município de Formiga, a vegetação original era constituída por floresta estacional semidecidual com transição para o cerrado, restando hoje pequenos remanescentes no interior do espaço urbano ou ao redor da cidade que somam 29,8% da área do município (Rios 2012). No estado do Paraná, foi observado que o caráter endêmico da LTA está intimamente associado com as florestas residuais modificadas e que a incidência dos casos se intensifica nas áreas onde a hidrografia era acompanhada, originalmente, por floresta estacional (Teodoro et al. 2010, Negrão & Ferreira 2009).

Por outro lado, ainda que a distribuição de *L. longipalpis* possa ser influenciada pela disponibilidade de água (chuva, evapotranspiração) e pela existência de vegetação abundante, fatores observados em habitats complexos, essa espécie se apresenta totalmente adaptada ao peridomicílio e a espaços urbanizados (Lainson & Rangel 2005, Nieto et al. 2006, Rangel & Vilela 2008, Oliveira et al. 2012). Esse perfil urbano pode explicar porque *L. longipalpis* se apresentou menos associada à vegetação no município de Formiga. Além disso, esse díptero foi o que melhor se distribuiu pelas áreas centrais da cidade, onde a existência de áreas verdes é menor. Estudos mostram a dispersão e urbanização de *L. longipalpis* por grandes centros brasileiros, transformando cidades como Campo Grande (MS), Belo Horizonte (MG), Aracaju (SE) e Teresina (PI) em áreas endêmicas para LV (Costa 1993, Souza et al. 2004, Margonari et al. 2006; Rangel & Vilela 2008, Brazuna et al. 2012, Jeraldo et al. 2012).

Outro fator que pode ter influenciado a presença de flebotômíneos, mais notadamente *L. whitmani*, à presença de mata é a autonomia média de vôo desses dípteros - 250m (Gomes 1994, Pearson et al. 2000, Aparico & Bitencourt 2004, Negrão & Ferreira 2009). Aparicio & Bitencourt (2004), modelando zonas de risco para LTA em Itapira, São Paulo, observaram que 50% dos casos notificados haviam ocorrido a menos de 250m da borda de um fragmento de mata. Entretanto, outros estudos demonstram um alcance de vôo para os flebotômíneos entre 50m e 960m, o que permite que a transmissão ocorra além dos limites anteriormente citados (Forattini 1973, Alexander & Young 1992, Casanova et al. 2005, Galati et al. 2009). No presente trabalho essa capacidade de dispersão poderia explicar o fato dos casos humanos não terem coincidido perfeitamente com as áreas de maior densidade de *L. longipalpis*. A autonomia de vôo desse díptero pode ter permitido que a transmissão da doença ocorresse em

outra região da cidade, distante dos locais onde foram detectadas as maiores densidades flebotomínicas. Os animais, vetores e seres humanos estão em movimento constante e isso reforça o fato da transmissão poder ocorrer em qualquer local, não sendo passível de previsão através de análises sistemáticas, espaciais ou mapas.

A localização dos cães infectados também se mostrou relacionada à distância da vegetação, pois a análise de assinatura revelou que as maiores densidades de animais positivos (91,8%) se encontravam nas faixas distantes até 200m de uma área verde (Fig. 11). Esses dados são semelhantes aos encontrados por Santos e colaboradores (2005), que ao estudar a prevalência da LTA em município do Rio de Janeiro observaram, em uma das localidades pesquisadas, que 84,2% dos cães positivos se situavam em domicílios a até 200m da mata. Apesar da importância do cão como reservatório da LTA ser controverso, diversos estudos apontam para o provável envolvimento desse animal no ciclo epidemiológico da doença. Vários autores demonstraram a relação entre a presença de cães infectados por *L.(V.) braziliensis* e o surgimento dos casos humanos, além da possibilidade da infecção acontecer em áreas de mata remanescente (Falqueto et al. 1986, Maywald et al. 1996, Santos et al. 2005). Entretanto, Tolezano (1998) sugere que esses animais atuem amplificando a disseminação da LTA e não como reservatórios naturais de fato.

Em relação aos cães com LV associados à vegetação, estudo conduzido em Barra do Guaratiba, Rio de Janeiro, mostrou uma relação direta entre a incidência dos casos caninos de LV e a proximidade da mata, pois 84% dos animais positivos residiam nesses locais (Silva et al. 2005). Outros autores também encontraram maiores títulos sorológicos para LVC e maiores densidades de cães infectados em áreas próximas à vegetação preservada no Brasil (Silva et al. 2011, Paulan et al. 2012). A existência de reservatórios silvestres infectados nas áreas de vegetação remanescente, os quais muitas vezes possuem hábitos sinantrópicos, pode aumentar o risco de infecção canina e funcionar como um elo entre os ciclos doméstico e silvestre. É possível que as características ecológicas do provável vetor em uma região determinem se a presença de vegetação constitui ou não um fator de risco para a doença canina. Essa relação foi observada por Chamailè e colaboradores (2010), na França, ao perceber que o risco ambiental para a doença canina estava associado às características ecológicas locais, que influenciavam de maneira distinta a ocorrência de *Phlebotomus ariasi* e de *Phlebotomus perniciosus*.

A presença de um curso d'água foi outro fator que parece ter influenciado especialmente a distribuição de *L. longipalpis* e cães positivos. A análise de assinatura mostrou que a maior densidade de *L. longipalpis* (34,5%) capturados se encontra, principalmente, nas áreas distantes até 400m de um curso d'água (Fig. 12). O fato do

município de Formiga apresentar uma extensa rede hidrográfica o torna bastante homogêneo quanto a essa variável, fato que pode explicar a distribuição de *L. longipalpis* associada à presença dos rios. Apesar dessa espécie não ser considerada comum em lugares úmidos, foi demonstrado que a disponibilidade de água é capaz de influenciar a distribuição e a presença de *L. longipalpis* em área de transmissão de LV na Bahia (Nieto et al. 2006). Outros autores demonstraram que áreas com solos úmidos e presença de matéria orgânica favorecem o surgimento de criadouros de flebotomíneos no peridomicílio (Forattini 1953, Rebêlo et al. 1999, Casanova 2001). Saraiva e colaboradores (2011) também encontraram maior número de flebotomíneos nas áreas sob influência de um curso d'água em Belo Horizonte.

Pouco é mencionado na literatura científica sobre a relação entre casos caninos e/ou humanos de leishmaniose e a hidrografia. Porém, alguns estudos demonstram haver uma relação estreita entre os prováveis locais de infecção humana e corpos de água (El-Safi et al. 2002, Teodoro et al. 2010). No presente estudo, foi observada uma alta taxa de casos caninos associados à rede hidrográfica (99,1%) (Fig. 11). Esse achado pode constituir um importante determinante ambiental para as leishmanioses no município, o que é reforçado pela associação de *L. longipalpis* e rios também detectada no presente trabalho. Contudo, pesquisas complementares são necessárias para avaliar se os cães positivos e a hidrografia estão diretamente relacionados e influenciando a dinâmica das leishmanioses no município. Andrade (2010), estudando as condições ambientais associadas aos casos de LTA em São Paulo, apontou que na região os eventos se concentraram principalmente ao longo do curso dos rios Jundiá e Capivari, de seus afluentes e fragmentos florestais, sugerindo que os casos se distribuem no espaço em contextos sócio-ambientais semelhantes. Fatores ambientais e ecológicos como presença de corpos de água, tipo de solo, vegetação e plantações, quando atuando em conjunto com áreas de alta densidade vetorial, são apontados como essenciais para a ocorrência e dispersão da doença em áreas endêmicas (Moreno et al. 2005, Oliveira CL et al. 2006, Sudhakar et al. 2006). No geral, cursos d'água e vegetação se associam gerando condições ecológicas complementares entre si que favorecem a ocorrência dos flebotomíneos e o surgimento de novos casos (Andrade 2010, Silva et al. 2011). O primeiro provê a umidade necessária para a formação dos criadouros e propagação dos estágios imaturos, enquanto o segundo fornece alimento e abrigo, afetando diretamente a densidade vetorial (Sudhakar et al. 2006).

No presente estudo, a distribuição dos casos caninos se concentrou nas áreas com baixa ou média densidade vetorial (Fig. 12, 13 e 14). Em Belo Horizonte, Saraiva e colaboradores (2011) encontraram maior incidência de casos caninos em locais com pequenas populações de *L. longipalpis*. Foi verificado também que os cães infectados, vetores

comprovados de *Leishmania* spp. e casos humanos de LV estão localizados em áreas próximas dentro do município de Formiga. (Fig. 12, 13 e 14).

Os resultados obtidos a partir das análises de geoprocessamento esclarecem, de forma pioneira, como importantes fatores relacionados à epidemiologia das leishmanioses se conjugam no município de Formiga. Ainda que não tenha sido possível confirmar se a espécie de *Leishmania* que infecta o vetor e o ser humano é a mesma que infecta o cão, a sobreposição das áreas de ocorrência dessas três vertentes demonstra que o ciclo de transmissão da LV está acontecendo no município.

Também ficaram demonstradas, através do presente trabalho, as áreas prioritárias para vigilância entomológica e para intervenção contra a leishmaniose canina na cidade. As regiões nordeste, sul e noroeste precisam de ações profiláticas e de monitoramento da doença urgentes para conter uma possível expansão da enfermidade e evitar o adoecimento da população. Essas ações devem contemplar também a população, através de campanhas de conscientização, preparando os moradores dessas áreas para enfrentar a doença e assumirem um comportamento preventivo.

As regiões prioritárias determinadas nos mapas (Fig. 12, 13 e 14) constituem áreas de início do programa de controle das leishmanioses no município, pois apontam quais são os locais mais vulneráveis ao acometimento pela LV e ao surgimento dos casos humanos de LTA. Para tanto, as ações de controle devem ser implantadas em curto prazo, pois os resultados demonstram claramente que a situação da leishmaniose em Formiga apresenta aspectos preocupantes. Ações nesse sentido podem evitar que o município se transforme em área de transmissão com impactos negativos para a saúde pública e para o turismo, expondo populações susceptíveis a um foco ativo de transmissão das leishmanioses e trazendo consequências econômicas importantes para a região.

8 CONCLUSÕES

1. Em relação à população de Formiga o que se observou foi: as pessoas desconhecem conceitos importantes sobre a doença (transmissão, prevenção e o que fazer diante de um caso humano suspeito); ser do sexo feminino e possuir pelo menos o ensino médio podem influenciar o conhecimento e o risco para a doença; e 95% dos moradores entrevistados relataram a presença de pelo menos um fator de risco no peridomicílio.
2. Quanto à pesquisa entomológica, se destacou a diversificada fauna flebotomínica de Formiga, sendo as espécies *L. longipalpis* (35,3%), *L. cortelezzii* (33,5%) e *L. whitmani* (18,3%) as mais abundantes e também o fato da precipitação e temperatura se relacionarem de forma significativa com a densidade de flebotomíneos.
3. No que se refere à leishmaniose em cães, foi encontrada uma taxa de infecção canina variando de 5% a 19,1% pelos testes sorológicos e moleculares - caracterizando o município como área de transmissão moderada - e foram identificados cães parasitados por espécies causadoras de LV e LTA: *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*.
4. Em Formiga, *L. whitmani* se apresenta associado a áreas de mata estando distantes até 200m dessas localidades e *Lutzomyia longipalpis* se relacionou de forma significativa com a hidrografia do município, embora Formiga apresente uma extensa rede hídrica.
5. O mapa da densidade canina mostra que os animais positivos se distribuíram de forma pontual e em locais específicos do município.
6. Os cães se apresentaram relacionados à hidrografia do município de Formiga - as densidades mais elevadas foram encontradas em faixas distantes até 200m de um rio (99,1%).
7. Houve uma sobreposição leve entre os casos humanos de LV, *L. longipalpis* e cães positivos, indicando que pode estar ocorrendo transmissão nos locais visualizados nos mapas.
8. A existência de cães infectados com *L. (V.) braziliensis* e a captura de *L. whitmani*, vetor comprovado de LTA, formam um cenário propício para o surgimento de casos humanos da doença no município.
9. Os mapas construídos no presente trabalho indicam que as regiões nordeste, sul e noroeste do município precisam receber maior atenção dos órgãos competentes de Formiga no que diz respeito à implantação de medidas de combate ao vetor e ao reservatório.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É inquestionável que o município de Formiga se encontra em uma situação delicada no tocante às leishmanioses. Embora não apresente surtos da doença, casos humanos vêm sendo registrados, inclusive com óbito, além de co-existirem vetores, reservatórios e parasitos na área urbana. Pela primeira vez, foram esclarecidos os prováveis componentes epidemiológicos da transmissão no município e as áreas críticas para intervenção foram mapeadas. De posse dessas informações, se tornou mais factível a construção de um programa de controle e vigilância das leishmanioses pelos órgãos competentes que agora possuem, em mãos, o cenário atual da enfermidade no município. O momento é propício para iniciar as ações preventivas, pois as leishmanioses são capazes de se disseminar rapidamente, fato que dificulta seu controle, convertendo rapidamente regiões indenes em focos importantes para a doença. Dessa forma, espera-se que as forças políticas do município continuem buscando parcerias com centros de pesquisa, universidades e lideranças populares a fim de prevenir agravos e promover a saúde da população.

10 ANEXOS

10.1 Anexo 1 - Questionário quantitativo

PERGUNTAS GERAIS

1- Nome:

2- Idade:

3- Sexo:

4- Endereço completo:

5- Qual seu grau de instrução?

- Nenhum estudo Primário incompleto Primário completo
 Médio Médio completo Superior incompleto
 Superior completo Outro.....

6- Quantas pessoas moram na residência?.....

7- Qual a renda da família?

- Menor que 1 salário Entre 1 e 3 salários Entre 3 e 5 salários
 Mais de 5 salários

PERGUNTAS SOBRE O CONHECIMENTO DA DOENÇA

8- Você sabe o que é leishmaniose?

- sim Não

9- Em relação a Leishmaniose você:

- Não conhece nada Conhece muito pouco Conhece pouco
 Conhece bem Conhece muito bem Não sabe responder

10- Você sabe como ela é transmitida?

- Flebotomíneo (inseto) cão doente não sabe
 Outros.....

11- Você sabe qual animal pode pegar Leishmaniose?

- Cão gato rato
 galinha não sabe outro.....

12- Você sabe como prevenir a doença?

- Não sabe Limpar o terreno sacrificar cães doentes

- Evitar água empoçada uso de repelentes outro.....
- Evitar o doente com Leishmaniose

13- Qual atitude você tomaria diante de um ser humano suspeito de Leishmaniose?

- Nada levaria para hospital
- não sabe procuraria um agente de saúde da prefeitura
- outro.....

14- O que você usaria para tratar a Leishmaniose?

- Não usaria nada Glucantime Antibiótico
- Injeção Não sabe outro.....

PERGUNTAS SOBRE O RISCO DA DOENÇA

15- Alguém na sua casa já teve Leishmaniose? (caso a resposta seja sim passar para a questão

16, se a resposta for não passe para a questão 17)

- sim não

16- Quantas pessoas já adoeceram?Quantos anos elas possuem?.....

17- Possui algum animal doméstico? (caso a resposta seja sim passar para a questão 18, se a resposta for não passe para a questão 21.)

- sim não

18- Quais?

- Cão gato rato
- galinha cavalo outro.....

19- Algum cão adoeceu recentemente? (caso a resposta seja sim passar para a questão 20, se a resposta for não passe para a questão 21)

- sim não

20- Foi diagnosticado Leishmaniose?

- sim não não sabe

21- Você percebeu presença de mosquitos (sugam sangue) na residência?

- sim não

22- Tem-se observado a presença de roedores ao redor de casa?

- sim não

Se sim com que frequência?

- raramente poucas vezes frequentemente

23- Existe lote baldio ao redor da residência em questão?

sim não

24- Existe curso d'água próximo?

sim não

25- Existe área verde próxima a residência?

sim não

26- A coleta de lixo é feita regularmente?

sim não

27- Sua casa possui quintal com plantações?

sim não

28- Você limpa seu quintal regularmente?

sim não

10.2 Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

A Leishmaniose é uma doença presente em todas as partes do mundo e que, atualmente, taxas crescentes de disseminação têm sido diagnosticadas entre a população humana. A presente pesquisa visa investigar o nível de conhecimento da população do município de Formiga para posterior elaboração de campanhas de controle e prevenção da enfermidade.

Por isso, você está sendo convidado (a) a participar do estudo “Leishmanioses: estudos epidemiológicos e investigação dos conhecimentos por parte da população do município de Formiga, Minas Gerais”. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. Caso você participe, será necessário que responda a um questionário relativo ao conhecimento da doença e as condições de moradia.

Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Será garantido que seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo.

Termo de Consentimento Livre, após Esclarecimento

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo.

Eu concordo em participar do estudo.

Formiga, _____ de _____ de 20__.

Assinatura do sujeito de pesquisa

Assinatura da testemunha

Pesquisador responsável

Eu, Dra. Carina Margonari de Souza, responsável pelo projeto “Leishmanioses: estudos epidemiológicos e investigação dos conhecimentos por parte da população do município de Formiga, Minas Gerais” declaro que obtive espontaneamente o consentimento deste sujeito de pesquisa (ou do seu representante legal) para realizar este estudo.

Assinatura _____ / _____ / _____

10.3 Anexo 3 - Ficha de avaliação física e identificação do cão

DATA: __/__/__

NÚMERO: _____

TEL: _____

ENDEREÇO: _____

PROPRIETÁRIO: _____

1) DADOS DO ANIMAL

NOME DO CÃO: _____

RAÇA: _____

SEXO: () macho () fêmea

IDADE: _____ COR: _____

O CÃO VIAJOU NOS ÚLTIMOS SEIS MESES? _____

PARA ONDE?

OUTRAS LOCALIDADES ONDE RESIDIU: _____

TEMPO: _____

O CÃO RECEBEU ALGUMA VACINA PARA LEISHMANIOSE?

() SIM () NÃO

QUAL? () LEISHMUNE () LEISHTEC

2) SINAIS CLÍNICOS

Diagnóstico clínico da Leishmaniose:

() assintomático () sintomático

Presença de Sintomas:

() hepatomegalia;

() esplenomegalia;

() onocogribose;

() linfadenomegalia;

() dermatite;

() diarreia;

() presença de ulcerações;

LOCALIZAÇÃO DAS ÚLCERAS:

() febre: _____

() emagrecimento;

() prostração;

() alopecia;

() nódulos subcutâneos;

() conjuntivites;

() sinais neurológicos;

() hemorragias.

OUTROS: _____

Resultado do (s) exame (s):

EXAME	MATERIAL BIOLÓGICO		Observação
	SANGUE	MEDULA ÓSSEA	
RIFI			
ELISA			
PCR genérico			
RFLP			
ESFREGAÇO			
CULTURA			

(-) NEGATIVO, (+) POSITIVO, (X) NÃO SE APLICA.

OBSERVAÇÕES.: _____

11 REFERÊNCIAS

Acioli S. A prática educativa como expressão do cuidado em Saúde Pública. Rev Bras Enferm 2008. 61 (1): 117-21.

Adhikari SR, Maskay NM, Sharma BP. Paying for hospital-based care of kala-azar in Nepal: assessing catastrophic, impoverishment and economic consequences. Health Policy Plan 2009; 24 (2): 129–139.

Afonso MMDS, Duarte R, Miranda JC, Caranha L, Rangel EF. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. J Trop Med 2012; 2012:

Afonso MMS, Costa WA, Azevedo ACR, Costa SM, Vilela ML, Rangel EF. Data on sand fly fauna (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Itatiaia National Park, Rio de Janeiro State, Brazil. Cad Saúde Pública 2007; 23 (3): 725-730.

Aguiar GM & Medeiros WM. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In Rangel EF & Lainson R (org.). Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: editora FIOCRUZ; 2003. p.207- 255.

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 (4):465-482.

Aisa MJ, Castillejo S, Gállego M, Fisa R, Riera MC, de Colmenares M et al. Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. Am J Trop Med Hyg 1998; 58, 154–159.

Alam MZ, Khair A, Shamsuzzaman M, Kuhls K., Schönian G. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. Trop Med Int Health 2009; 14 (5): 499–503.

Alencar JE. Calazar canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. Fortaleza, 1959. Doutorado [Tese] - Universidade Federal do Ceará.

Alexander B & Young DG. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87 (3): 397-403.

Almeida ABPF, Mendonça AJ, Sousa VRF. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. Ciência Rural 2010; 40 (7): 1610-1615.

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

Al-Soud WA & Radstrom P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 3748-3753.

Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. Adv Parasitol. 2004; 57:1-88.

Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. Trends Parasitol 2006; 22: 552–557.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One 2012; 7 (5): e35671. Disponível em <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0035671>>.

Alves JRC. Espécies de *Lutzomyia França* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) em área de Leishmaniose Tegumentar no município de Carmo, RJ. Neotrop Entomol 2007; 36: 593–96.

Amorim IFG, Silva SM, Figueiredo MM, Moura EP, Castro RS, Lima TKS et al. Toll receptors type-2 and CR3 expression of canine monocytes and its correlation with immunohistochemistry and xenodiagnosis in visceral leishmaniasis. PLoS One 2011; 6: e27679.

Ampuero J, Urdaneta M, Macêdo VO. Factores de riesgo para la transmisión de leishmaniasis cutânea em niños de 0 a 5 años en un área endêmica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Cad. Saúde Pública 2005; 21 (1): 161-170

Andrade AJ, Andrade MR, Barata RA., Pinto MC, Dias ES, Eiras AE. Four new records of the phlebotomine fauna of the Genus I França (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) of the rural district of Brejo do Mutambal, Varzelândia, State of Minas Gerais, Brazil. Neotrop Entomol 2007; 36 (6): 980-983.

Andrade Filho JD, Galati EAB, Falcão AL. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102 (4): 481–487.

Andrade JSC. Estudo da distribuição da leishmaniose tegumentar americana (LTA), utilizando técnicas de geoprocessamento e sensoriamento remoto em municípios do estado de São Paulo. Campinas; 2010. Mestrado [Dissertação em Epidemiologia] – Universidade Estadual Paulista.

Andresen K, Gasim S, Elhassan AM, Khalil EA, Barker DC et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by the polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymph node samples from patients from the Sudan. Trop Med Int Health 1997; 2 (5): 440-444.

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. Clin Infect Dis 2007; 44: 1602–10.

Aparicio C & Bitencourt MD. Modelagem espacial de zonas de risco da leishmaniose tegumentar americana. Rev. Saúde Pública 2004; 38 (4): 511-516

Araújo Filho NA. Leishmaniose Tegumentar Americana e o desmatamento na Amazônia. Acta Amazônica 1981; 11:187- 189.

Arias JR & Freitas RA. On the vectors of cutaneous leishmaniasis in Central Amazon of Brasil. 3. Phlebotomine sandfly stratification in a terra firme forest. Acta Amaz. 1982; 12: 599–608.

Arias JR, Miles MA, Naiff RD, Povoá MM, de Freitas RA, Biancardi CB et al. Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. Am J Trop Med Hyg. 1985; 34 (6): 1098-1108.

Arruda MM, Figueiredo FB, Cardoso FA, Hiamamoto RM, Brazuna JCM et al. Validity and reliability of enzyme immunoassays Using *Leishmania major* or *L. infantum* antigens for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. PLoS ONE 2013; 8 (7): e69988. Disponível em <10.1371/journal.pone.0069988>.

Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulalio MDC et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59 (1): 53-57.

Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J Parasitol* 1999; 85 (2):181-187.

Azevedo ACR, Souza NA, Meneses CRV, Costa WA, Costa SM, Lima JB et al. Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the North of the state of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97 (4): 459–464.

Barata RA., França-Silva JC, Costa RT, Fortes-Dias CL., Silva JC, Paula EV et al. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American Visceral Leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99 (5): 481–487.

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):421-425.

Barata RA, Peixoto JC, Tanure A, Gomes ME, Apolinário EC, Bodevan EC et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 405083. Disponível em <doi: 10.1155/2013/405083>.

Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2006; 28 (7): 329-37.

Barbosa DS, Belo VS, Rangel ME, Werneck GL. Spatial analysis for identification of priority areas for surveillance and control in a visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. *Acta Trop* 2013, Dec 14; 131 C :56-62.

Barreto AC, Cuba CC, Marsden PD, Vexenat JA, De Belder M. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do estado da Bahia, Brasil. I. Leishmaniose humana. *Boletim de la Oficina Panamericana de Salud* 1981; 90:415-424.

Barretto MP. Observações sobre a biologia, em condições naturais, dos flebotomos do Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae). São Paulo, 1943. Doutorado [Tese de Livre-Docência em Medicina] – Universidade Federal de São Paulo.

Barros FSM, Arruda ME, Gurgel HC. Spatial clustering and longitudinal variation of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larval in a river of the Amazon: the importance of

forest fringe and obstructions to flow in frontier malaria. Bull Entomol Res 2011; 101 (6): 643–658.

Barros RP, Henriques R, Mendonça R. Pelo fim das décadas perdidas: educação e desenvolvimento sustentado no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério do planejamento, orçamento e gestão. Instituto de pesquisa econômica aplicada. 2002.

Bejarano EE, Duque P, Vélez ID. Confirmation of the presence of *Lutzomyia lutziana* (Diptera: Psychodidae) in Colombia.. Caldasia 2007; 29 (1):153-157.

Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis 2008; 2 (10): e313.

Bhunia GS, Kesari S, Chatterjee N, Kumar V, Das P. Spatial and temporal variation and hotspot detection of kala-azar disease in Vaishali district (Bihar), India. BMC Infectious Diseases 2013; 13: 64.

Bisugo MC, Araújo MFL, Taniguchi HH, Acunha E, Santos AA, Pessoto-Junior M et al. Assessment of canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of a rapid test using recombinant antigen K39 in endemic regions of São Paulo state, Brazil. Rev Inst Adolfo Lutz 2007; 66 (2): 185-193.

Boaretto MC, Guimarães MTC, Natal S, Castelo Branco AC, Mondarto P, Fernandes MJ et al. The knowledge of the Brazilian population on tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2010; 14 (11): S196.

Boelaert M, Meheus F, Robays J, Lutumba P. Socio-economic aspects of neglected diseases: sleeping sickness and visceral leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol 2010; 104 (7): 535–542.

Boltanski L. A relação médico-paciente. As classes sociais e o corpo. Rio de Janeiro: Graal, 1979.

Boraschi CSS, Perri SHV, Nunes CM. Leishmaniose Visceral: o que a população de Três Lagoas, MS, Brasil, sabe sobre essa enfermidade. Vet. e Zootec 2008; 15 (3):.478-485

Borges BKA, Silva JA, Haddad JPA, Moreira EC, Magalhães DF, Ribeiro LML et al. Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Cad Saúde Pública 2008; 24 (4):777-784.

Borges BKA, Silva JA, Haddad JPA, Moreira EC, Magalhães DF, Ribeiro LML et al. Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2009; 61 (5): 1035-1043.

Braga RR, Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Silveira FT. Leishmaniasis in Brazil. XXII: Characterization of *Leishmania* from man, dogs and the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) isolated during an outbreak of visceral leishmaniasis in Santarem, Para State. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80: 143–145.

Brandão-Filho SP, Valença HF, Almeida ÉL, Brito MEF, Almeida FA, Ishikawa E et al. Infecção natural de *Lutzomyia whitmani* por *Leishmania braziliensis* na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. In: XXXIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belém, Pará. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36: 396-396.

Brandão-Filho SP, Donalisio MR, Silva FJ, Valença HF, Costa PL, Shaw JJ et al. Spatial and temporal patterns of occurrence of *Lutzomyia* sand fly species in an endemic area for cutaneous leishmaniasis in the Atlantic Forest region of northeast Brazil. *J Vector Ecol* 2011; 36 Supl 1: 71-76.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Brasília: 2007; 182 p.

Brazil RP, Carneiro VL, Andrade-Filho JD, Alves JCM, Falcão AL. Biology of *Lutzomyia lenti* (Mangabeira) (Diptera: Pychodidae). *An Soc Entomol Brasil* 1997; 21: 191–193.

Brazuna JCM., Silva EA, Brazuna J M, Domingos IH, Chaves N, Honer MR et al. Profile and geographic distribution of reported cases of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil, from 2002 to 2009. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45: 601–606.

Brito MEF, Andrade MS, Mendonça MG, Silva CJ, Almeida EL, Lima BS et al. Diversidad de especies de parásitos de *Leishmania* (*Viannia*) en áreas endémicas para leishmaniasis cutánea localizadas en la región del bosque pluvial Atlántico en la región nordeste de Brasil. *Trop Med Int Health* 2009; 14: 1278–1286.

Bruijn MH & Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop* 1992; 52 (1): 45-58.

Burns-Jr JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90 (2): 775–779.

Cabrera GP, Silva VO, Costa RT, Reis AB, Mayrink W, Genaro O et al. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognoses of canine visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg 1999; 61:296-301.

Camargo JB, Langoni H, Troncarelli MZ, Machado JG, Lucheis SB, Padovani CR. Performance of IFAT, ELISA, direct parasitological examination and PCR on lymph node aspirates for canine visceral leishmaniasis diagnosis. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2010;16 (3): 414-420.

Camargo-Neves VLF, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spínola RMF et al. Use of spatial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, Sao Paulo, Brazil, 1998-1999. Cad Saúde Pública 2001; 17(5): 1263-1267.

Carandina L & Magaldi C. Análise das condições de saúde e de vida da população urbana de Botucatu, SP (BRASIL). II - Conhecimentos e opiniões da população sobre sintomas de doenças, 1983. Rev Saúde Publ São Paulo 1989; 23 (3): 196-206.

Cardoso FA. Desenvolvimento e validação de um ensaio de PCR-ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana em amostras de sangue periférico. Belo Horizonte; 2013. Mestrado [Dissertação em Doenças Infecciosas e Parasitárias] – Centro de Pesquisas René Rachou.

Carranza-Tamayo CO, Carvalho MSL, Bredt A, Bofil MIR, Rodrigues RMB, Silva AD et al. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2010; 43 (4): 396-399.

Carvalho GML, Andrade-Filho JD, Falcão AL, Lima ACVM, Gontijo CMF. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a leishmania-endemic area of Brazil. Vector-Borne Zoonot Dis 2008; 8 (3): 407–414

Carvalho GML, Brazil RP, Ramos MCNF, Serra PCLM, Zenóbio APLA et al. Ecological Aspects of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from a cave of the speleological province of Bambuí, Brazil. PLoS One 2013; 8 (10): e77158.

Carvalho JKMR. Leishmaniose visceral canina: aspectos clínicos e de diagnóstico. Campo Grande; 2009. Mestrado [Dissertação em Ciência Animal] - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Carvalho MESD, Naves HAM, Costa JA. Outras espécies de *Lutzomyia* (França, 1924) (Diptera: Psychodidae) em Goiânia-Goiás. Rev Pat Trop 1993; 22 (1): 105.

Carvalho SMS, Santos PRB, Lanza H, Brandão Filho SP. Diversidade de flebotomíneos no Município de Ilhéus, Bahia. Epidemiol Serv Saúde 2010; 19 (3): 239–244.

Casanova C, Costa AI, Natal D. Dispersal pattern of the sand fly *Lutzomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural area in Southeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100 (7): 719-724.

Casanova C. A soil emergence trap for collections of phlebotomine sand flies. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96 (2): 273-275.

Castellón EG, Araújo Filho NA, Fé NF, Alves JMC. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no estado de Roraima, Brasil. I. Espécies coletadas nas regiões Sul e Central. Mem Inst Oswaldo Cruz 1989; 84: 95-99.

Castellón EG, Fé NF, Buhrnheim PF, Fé FA. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) na Amazônia. II. Listagem das espécies coletadas na Bacia Petrolífera no Rio Urucu, Amazonas, Brasil, utilizando diferentes armadilhas e iscas. Rev Bras Zool 2000; 17: 455–462.

Castellucci S, Lima MIS; Nordi N, Marques JGW. Plantas medicinais relatadas pela comunidade residente na Estação Ecológica de Jataí, município de Luís Antonio/SP: uma abordagem etnobotânica. Rev Bras Plantas Med 2000; 3 (1): 51-60.

Chamaillé L, Tran A, Meunier A, Bourdoiseau G, Ready P, Dedet J P. Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France. Parasit Vectors 2010; 3 (31): 5.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S., Peeling RW et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nat Rev Microbiol 2007; 5 (11): 873-882.

Clarke KC, McLafferty SL, Tempalski BJ. On epidemiology and geographic information systems: a review and discussion of future directions. Emerg Infect Dis 1996; 2: 85–92.

Coelho WMD, Lima VMF, Amarante AFT, Langoni Helio, Pereira VBR, Abdelnour A et al. Occurrence of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. Rev Bras Parasitol Vet 2010; 19 (4): 256-258.

Confalonieri UEC. Saúde na Amazônia: um modelo conceitual de paisagens e doenças. *Estudos Avançados* 2005; 19 (53): 221-236, 2005.

Confalonieri UEC, Margonari C, Quintão AF. Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. *Acta Trop* 2013; 129:33-41.

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*. L. Specific kinetoplastid primers. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 2004; 98 (1): 12–17.

Costa CHN. Urbanization of kala-azar in Brazil: kala-azar in Teresina, Piauí, Brazil, 1993, 109-124. *In* Research and control of Leishmaniasis in Brazil, Proceedings of a national workshop. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Costa CHN, Tapety CM, Werneck GL. Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40: 415–419.

Costa JML. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. *Gaz Med Bahia* 2005; 75 (1): 3-17.

Costa JML, Vale KC, França F, Saldanha ACR, Silva JO, Lago EL et al. Cura espontânea da leishmaniose causada por *Leishmania Viánnia braziliensis* em lesões cutâneas. *Revista da Soc Bras Med Trop* 1990; 23: 205- 208.

Costa RT, França JC, Mayrink W, Nascimento E, Genaro O, Campos-Neto A. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 97 (6): 678–82.

Costa SM, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R & Rangel EF. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l . (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. Mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102 (2): 149–153.

Costa-Val AP, Cavalcanti RR, Gontigo NF, Michalik MSM, Alexander B, Williams P et al. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet J* 2007; 174 (3): 636–643.

Coura-Vital W, Reis AB, Fausto MA, Leal GG, Marques MJ, Veloso VM et al. Risk factors for seroconversion by *Leishmania infantum* in a cohort of dogs from an endemic area of Brazil. *PLoS One* 2013; 22; 8 (8):e71833.

Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* 2002; 186 (9): 1314–1320.

Cruz CFR, Cruz MFR, Galati EAB. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in rural and urban environments in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; 108 (3): 303-311.

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

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

Cunha JCL, Lima JWO, Pompeu MML. Transmissão domiciliar de leishmaniose tegumentar e associação entre leishmaniose humana e canina, durante uma epidemia na Serra de Baturité, no estado do Ceará, Brasil. *Rev Bras Epidemiol* 2006; 9 (4): 425-35.

Cutolo AA, Galati EAB, Zuben CJ. Sandflies (Diptera, Psychodidae) from forest areas in Botucatu municipality, central western São Paulo State, Brazil. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2013;19 (1): 15.

D'Agostino RB. Tests for Normal distribution. In: D'Agostino RB & Stepenes MA, eds. *Goodness-Of-Fit Techniques*, Nova Iorque: Macel Decker, 1986.

Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasit Vectors* 2009; 2 Supl 1: 1-8.

Dantas-Torres F, Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Melo MF, Silva FJ, Silva AL et al. Cutaneous and visceral leishmaniasis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. *Vet Parasitol* 2010; 170 (3-4): 313-317.

Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. São Paulo; 1956. Doutorado [Tese de Livre Docência. Faculdade de Medicina] – Universidade de São Paulo.

Delgado O, Castes M, White Jr AC, Kreutzer RD. *Leishmania colombiensis* in Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48. 145–147.

Dereure J, El-Safi SH, Bucheton B, Boni M, Kheir MM, Davoust B et al. Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host-parasite relationships. *Microbes Infect* 2003; 5: 1103–1108.

Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol* 1996; 14 (5): 417–423.

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95 (3): 239–243.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27: 305–318.

Diakou A, Papadopoulos E, Lazarides K. Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. *J Feline Med Surg* 2009; 11 (8): 728-730.

Dias JCP. Problemas e possibilidades de participação comunitária no controle das grandes endemias do Brasil. *Cad Saúde Pública* 1998; 14 Supl. 2:19-37.

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

Disch J, Maciel FC, de Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. *Trans R Trop Med Hyg* 2003; 97 (4): 391–395.

Domingos IH. Teste rápido TR-DPP no contexto do diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina. Campo Grande; 2012. Mestrado [Dissertação em Ciência Animal]. – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Domingos MF, Carreri-Bruno GC, Ciaravolo RMC, Galati EAB, Wanderley DMV, Corrêa FMA. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão, no município de Pedro de Toledo, região sul do estado de São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31 (5): 425-432.

Dujardin JC. Risk factors in the spread of leishmaniases: towards integrated monitoring? *Trends Parasitol* 2005; 22 (1): 4–6.

Dupin N, Buffet M, Marcelin AG, Lamotte C, Gorin I, Ait-Arkoub Z et al. HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV- infected patients with lipodystrophy. *AIDS* 2002; 16 (18): 2419-2424.

Dye C & Williams BG. Malnutrition, age and the risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited. *Proc Biol Sci* 1993; 254 (1339): 33-9.

Elnaiem DE, Schorscher J, Bendall A, Obsomer V, Osman ME et al. Risk mapping of visceral leishmaniasis: the role of local variation in rainfall and altitude on the presence and incidence of kala-azar in Eastern Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68 (1): 10–17.

EL-Safi SH, Bucheton B, Kheir MM, Musa HA, EL-Obaid M, Hammad A. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Atbara River area, eastern Sudan: the outbreak of Barbar El Fugara village (1996-1997). *Microbes Infect* 2002; 4 (14): 1439-47.

Eresh S, McCallum M, Barker DC. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology* 1994; 109: 423-433.

Esch KJ & Petersen CA. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26 (1): 58-85.

Fabris LR. Caracterização dos componentes sociais na dinâmica da Leishmaniose em Campo Grande. Campo Grande, 2009. Mestrado [Dissertação em Saúde e desenvolvimento da região Centro-Oeste] - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi Filho G, Sessa PA, Carias VRD et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986; 81(2): 155-163.

Falqueto A, Ferreira AL, Santos CB, Porrozzi R, Costa MV, Teva A et al. Cross-sectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80:559–565.

Faria AR & Andrade HM. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Rev Pan-Amaz Saude* 2012; 3 (2):47-57.

Feliciangeli MD. Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in northern Venezuela, I. Description of the study area, catching methods and species composition. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; 82 (1): 119-124.

Feliciangeli MD. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* 2004; 18: 71–80.

Ferreira EC. Estudo dos hospedeiros de *Leishmania* em área de ocorrência das leishmanioses no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Belo Horizonte; 2010. Tese (Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Centro de Pesquisas René Rachou.

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

Ferreira GEM, Santos BN, Dorval MEC, Ramos TPB, Porrozzi R et al. The genetic structure of *Leishmania infantum* populations in Brazil and its possible association with the transmission cycle of visceral leishmaniasis. *PLoS One* 2012; 7 (5): e36242.

Ferreira JS, Oliveira HB, Marin-Léon L. Conhecimento, atitudes e práticas sobre tuberculose em prisões e no serviço público de saúde. *Rev Bras Epidemiol* 2013; 16 (1): 100-113.

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

Figueiredo FB, Madeira MF, Nascimento LD, Abrantes TR, Mouta-confort E, Passos SRL et al. Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 2010; 52 (4): 193-196.

Figueredo LA, Paiva-Cavalcanti M, Almeida EL, Brandão-Filho SP, Dantas-Torres F. Clinical and hematological findings in *Leishmania braziliensis*-infected dogs from Pernambuco, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012; 21 (4): 418-420.

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

Fisa R, Riera C, López-Chejade P, Molina I, Gállego M, Falcó V, et al. *Leishmania infantum* DNA detection in urine from patients with visceral leishmaniasis and after treatment control. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78: 741-4.

Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions. New York: John Wiley, 1981.

Floeter-Winter LM. Descrição e utilização de alvos moleculares para identificação de *Leishmania* por PCR. BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista 2010; 7 (73): 21-27.

Forattini OP, Rabello EX, Galati EAB. Novos encontros de flebotomíneos no estado de São Paulo, Brasil, com especial referência a *Lutzomyia longipalpis*. Rev Saúde Pú 1976; 10:125-8, 1976.

Forattini OP. Entomologia Médica IV. *Psychodidae*. *Phlebotominae*, Leishmaniose e Bartonelose. Ed. Edgard Blucher Ltda 1973; São Paulo. VIII: 658pp.

Forattini OP. Nota sobre criadouros naturais de flebótomos em dependências peridomiciliares, no Estado de São Paulo. Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública 1953; 7: 158-167.

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

França EL, Mandarori ML, França JL, Botelho ACF, Ferrari CKB, Honório-França AC. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Juína, Mato Grosso, Brasil. Scientia Medica 2009; 19 (3): 103-107.

França VH, Margonari C, Schall VT. Percepção de professores do ensino básico em relação as suas práticas educativas sobre leishmanioses: um estudo em área endêmica de Minas Gerais. Revista Ensaio 2013; 15 (3): 35-51.

Freitas JCC, Filho APS, Santos GJL, Lima AL, Nunes-Pinheiro DCS. Analysis of seasonality, tendencies and correlations in human and canine visceral leishmaniasis. Acta Scientiae Veterinariae 2013; 41: 1151.

Freitas RA, Naiff RD, Barrett TV. Species diversity and flagellate infections in the sandfly fauna near Porto Grande, State of Amapá, Brazil (Diptera: Psychodidae Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97 (1): 53–59.

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

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

Galati EAB, Nunes VLB, Rego Jr FA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Saude Publica 1997; 37 (4), 378-90.

Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In EF Rangel & R Lainson (org). Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: editora Fiocruz; 2003. p 23-51.

Galati EAB, Fonseca MB, Marassá AM, Bueno EF M. Dispersal and survival of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the speleological province of the Ribeira Valley, state of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104 (8): 1148-1158.

Gama MEA, Barbosa JS, Pires B, Cunha AKB, Freitas AR, Ribeiro IR, et al. Avaliação do nível de conhecimento que populações residentes em áreas endêmicas têm sobre leishmaniose visceral, estado do Maranhão, Brasil. Cad Saúde Pública 1998; 14:381-90.

Gill G & Beeching N. Visceral Leishmaniasis, 6th Edition; 2009. pp. 74–79. Tropical Medicine.

Gil LHS, Basano SA, Souza AA, Silva MGS, Barata I, Ishikawa EA et al. Recent observations on the sandfly (Diptera: Psychodidae) fauna of the State of Rondônia, western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisi* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98 (6): 751–755.

Gomes AC, Yoshimi IY, Capinzaiki AN, Amaral NMM, Guimarães AJG. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana nº 9. Prevalência/incidência da infecção humana nos Municípios de Pedro de Toledo e Miracatu, São Paulo, Brasil. Rev Inst Med Trop 1992; 34: 149-158.

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

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 B & Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36 (1): 71-80

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

Gramiccia M & Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. Int. J. Parasitol. 2005; 35:1169–1180.

Grimaldi G Jr, Teva A, Ferreira AL, Santos CB, Pinto Id, Azevedo CT et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path-Platform technology (DPP CVL

rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012; 106 (1): 54-9.

Grimaldi Jr. G, Teva A, Santos CB, Ferreira AL, Falqueto A. The Effect of removing potentially infectious dogs on the numbers of canine *Leishmania infantum* infections in an endemic area with high transmission rates. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86 (6): 966–971.

Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2002; 2 (8): 494–501.

Guessous-Idrissi N, Berrag B, Riyad M, Sahibi H, Bichichi M, Rhalem A. *Leishmania tropica*: etiologic agent of a case of canine visceral leishmaniasis in northern Morocco. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57: 172–173.

Guimarães VCFV, Costa PL, Silva FJ, Silva KT, Silva KG, Araújo AIF et al. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Férrer, a sympatric area to cutaneous and visceral leishmaniasis in the state of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45 (1): 66-70.

Gurgel HC. A utilização das geotecnologias em estudos epidemiológicos: o exemplo da relação entre a malária e o NDVI em Roraima. *Anais do XI SBSR*; 2003. Belo Horizonte 05 a 10 abril. p 1303-1310. Disponível em <http://marte.dpi.inpe.br/col/ltid.inpe.br/sbsr/2002/11.18.14.31/doc/12_308.pdf>

Hatam GR, Adnani SJ, Asgari Q, Fallah E, Motazedian MH, Sadjjadi SM et al. First report of natural infection in cats with *Leishmania infantum* in Iran. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010; 10 (3): 313-316.

Herrer A. Estudios sobre leishmaniasis tegumentaria en el Perú. V Leishmaniasis natural en perros procedentes de localidades utígenas. *Rev Med Exp Lima* 1951; 8: 87–117.

Herrer A, Christensen HA. Natural cutaneous leishmaniasis among dogs in Panama. *Am J Trop Med Hyg* 1976; 25 (1): 59–63.

Holveck JC, Ehrenberg, JP, Ault SK, Rojas R, Vasquez J, Cerqueira MT et al. Prevention, control and elimination of neglected diseases in the Americas: pathways to integrated, inter-programmatic, inter-sectoral action for health and development. *BMC Public Health* 2007; 7: 6.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa nacional por amostra de domicílio (PNAD). Aspectos complementares de educação e acesso a transferências de renda de programas sociais 2004. Rio de Janeiro 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades@: Minas Gerais – Belo Horizonte. Brasília: IBGE, 2013. Disponível em <<http://cod.ibge.gov.br/3m6>> Acesso: 4 nov. 2013.

Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet Parasitol* 2003;113 (2): 99-113.

Jeraldo VLS, Góes MAL, Casanova C, Melo CM, Araújo ED, Brandão Filho SP et al. Sandfly fauna in an area endemic for visceral leishmaniasis in Aracaju, State of Sergipe, Northeast Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45 (3): 318–322.

Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR et al. Epidemiological and clinical changes in american tegumentary leishmaniasis in na area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86 (3): 426–433.

Joshua V, Elangovan A, Selvaraj V, Ahluwalia TP, Mehendale S. Public health & GIS: Views & opinions of Indian users. *Indian J Med Res* 2012; 136 (2): 299-300.

Julião FS, Souza BMPS, Freitas DS, Oliveira LS, Laranjeira DF, Dias-Lima AG et al. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2007; 27 (8): 319-324.

Júnior EMG. Validação do teste imunocromatográfico rápido *Dual Path Platform* para o diagnóstico da leishmaníase visceral canina. Fortaleza 2011. Mestrado [Dissertação em Ciências Veterinárias] – Universidade Estadual do Ceará.

Kawa H & Sabroza PC. Espacialização da Leishmaniose Tegumentar na cidade do Rio de Janeiro. *Cad Saúde Pública* 2002; 18 (3): 853-865:

Kesari S, Bhunia GS, Kumar V, Jeyaram A, Ranjan A, Das P. A comparative evaluation of endemic and non-endemic region of visceral leishmaniasis (Kala-azar) in India with ground survey and space technology. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106 (5): 515-523.

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

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Foucheaux C, Delure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1997; 11: 105-111.

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.

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

Lainson R & Shaw JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature* 1978; 273 (5664): 595-600.

Lainson R & Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, eds. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine* 1987; 1: 1-120.

Lainson R. On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the neotropics. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92 (3): 377-387.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33: 159-174.

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

Launiala A & Honkasalo ML. Ethnographic study of factors influencing compliance to intermittent preventive treatment of malaria during pregnancy among Yao women in rural Malawi. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101 (10): 980-9.

Laurenti MD, Rossi CN, Matta VRL, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol* 2013; 196 (3-4): 296-300.

Lima ID, Queiroz JW, Lacerda HG, Queiroz PV, Pontes NN, Barbosa JD et al. *Leishmania infantum chagasi* in northeastern Brazil: asymptomatic infection at the urban perimeter. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86: 99–107.

Lima LC, Marzochi MCA, Sobroza PC, Souza MA. Observações sobre a Leishmaniose Tegumentar, cinco anos após profilaxia. Rev Saúde Pùb 1998; 22 (1): 73–77.

Lira RA. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: avaliação do desempenho dos kits EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos. Recife; 2005. Mestrado [Dissertação em Saúde Pública] - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

Llanos-Cuentas EA, Roncal N, Villaseca P, Paz L, Ogasuku E, Perez JE et al. Natural infections of *Leishmania peruviana* in animals in the Peruvian Andes. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999; 93: 15–20.

Lobo KS, Bezerra JMT, Brito LMO, Silva JS, Pinheiro VCS. Conhecimentos de estudantes sobre Leishmaniose Visceral em escolas públicas de Caxias, Maranhão, Brasil. Ciênc Saúde Coletiva 2013; 18 (8): 2295-2300.

Lopes EGP. Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte-MG, 1993 a 2007. Belo Horizonte; 2009. Mestrado [Dissertação] - Universidade Federal de Minas Gerais.

Luz E, Giovannoni M, Borba AM. Infecção de *Lutzomyia monticola* por *Leishmania enriettii*. Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná 1967; 9: 121–128.

Luz ZMP, Schall V, Rabello A. Evaluation of a pamphlet on visceral leishmaniasis as a tool for providing disease information to healthcare professionals and laypersons. Cad. Saúde Pública 2005; 21 (2): 608-621.

Madeira MF, Uchôa CM, Leal CA, Macedo Silva RM, Duarte R, Magalhães CM et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in naturally infected dogs. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36 (5): 551-555.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Leal CA, Marzochi MCA. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. Brazilian Journal Infectious Diseases 2004; 8:440-444.

Magalhães HMTV, Costa JML, Costa RM, França F, Vale KC, Marsden P et al. Mudança do componente cognitivo da atitude de uma população de região endêmica do sul da Bahia diante da leishmaniose tegumentar. Rev Soc Bras Med Trop 1990; 23 (1): 49-52.

Magalhaes PA, Mayrink W, da Costa CA, Melo MN, Dias M, et al. Kala-azar in the Rio Doce, Minas Gerais area. Results of prophylactic measures. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1980, 22: 197–202.

Maia C & Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 2008; 158 (4): 274-87.

Maia C, Nunes M, Campino L. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 8 (4): 555-559.

Maia-Elkhoury AN, Carmo EH, Sousa-Gomes ML, Mota E. Analysis of visceral leishmaniasis reports by the capture-recapture method. *Rev Saude Publica* 2007; 41: 931–937.

Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saúde Pública* 2008; 24 (12): 2941-2947.

Malafaia G. Leishmaniose visceral no Estado de Minas Gerais: panorama, desafios e perspectivas. *Rev Saúde Bio* 2009; 4 (1).

Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD et al. Comparison of different sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2004; 125 (3): 251-262.

Marcondes CB, Pirmez C, Silva ES, Laurentino-Silva V, Steindel M, Santos AJ et al. Levantamento de leishmaniose visceral em cães de Santa Maria e municípios próximos, Estado do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36 (4) :499-501.

Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 31–38.

Margonari C, Soares RP, Andrade-Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. *J Med Entomol* 2010; 47 (6): 1212–1219.

Margonari C; Menezes JA, Rocha MN, Maia KN, Oliveira ME, Fonseca AL et al. Public knowledge about and detection of canine visceral leishmaniasis in urban Divinópolis, Brazil. *J Trop Med* 2012; 2012: 1-8.

Marinho MGV, Silva CC, Andrade LHC. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de caatinga no município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil. Rev Bras Plantas Med 2011; 13 (2): 170-182.

Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Grandoni L, Gramiccia M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. Vet Parasitol 2007; 145:357-360.

Martins AV, Silva J, Falcão AL. Estudos sobre os flebótomos do estado de Minas Gerais. XIII: descrição do macho e redescrição de fêmea de *Lutzomyia misionensis* (Castro,1960) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Rev Bras Biol 1977; 96: 75.

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

Martins M. Olhares sobre o “Mar de Minas”: percepções dos moradores de Alfenas e Fama relativas ao lago de Furnas (1963-1999). Ambiente e Sociedade 2010; 13 (2): 347-363.

Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. Vet Parasitol 2007; 145 (3-4): 267-73.

Marzochi MCA & Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmanioses in Brazil – emerging anthroponosis and possibilities for their control. Cad Saude Publica 1994; 10: 359-375.

Marzochi MCA & Marzochi KBF. Leishmanioses em áreas urbanas. Rev Soc Bras Med Trop 1997; 30:162-164.

Marzochi MCA. A leishmaniose tegumentar no Brasil. In Grandes Endemias Brasileiras Universidade de Brasília, Brasília.1989.

Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. Jorn Bras Medicina 1992; 63: 82-104.

Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. PLoS Negl Trop Dis 2007; 1 (2): e114. Disponível em <doi:10.1371/journal.pntd.0000114>.

Maurya R, Singh RK, Kumar B, Salotra P, Rai M, Sundar S. Evaluation of PCR for diagnosis of Indian kala-azar and assesment of cure. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (7): 3038-41.

Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA et al. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 1979; 73: 123–137.

Maywald PG, Machado MI, Costa-Cruz JM, Gonçalves-Pires MRF. Leishmaniose tegumentar, visceral e Doença de Chagas caninas em municípios do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Pública* 1996; 12 (3): 321-328.

McConnell AR, Brown CM, Shoda TM, Stayton LE, Martin CE. Friends with benefits: on the positive consequences of pet ownership. *J Pers Soc Psychol* 2011; 101:1239–1252.

McLafferty SL. Review GIS and health care. *Annu Rev Public Health* 2003; 24: 25-42.

Menezes FC. Sistema de informação de Leishmaniose Visceral (LV) em Belo Horizonte - Minas Gerais: avaliação do subcomponente Inquérito Canino no período de 2006 a 2010. Belo Horizonte; 2011. Mestrado [Dissertação em Doenças Infecciosas e Parasitárias] – Centro de Pesquisas René Rachou.

Mestre GLC & Fontes CJF. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998-2005. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40 (1): 42-48.

Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and assymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol*. 2005; 43 (11): 5515-9.

Michalsky EM, Rocha MF, Rocha Lima AC, 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 (1-2), 67–76.

Moreira ED Jr, Mendes de Souza VM, Sreenivasan M, Nascimento EG, Pontes de CL. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Vet Parasitol* 2004; 122: 245–252.

Moreira RCR, Rebêlo JMM, Gama MEA, Costa JML. Nível de conhecimentos sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Cad Saúde Pública* 2002;18 (1): 187-195.

Moreno E, Melo MN, Antunes CMF, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade-Ribeiro AS et al. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Humana assintomática em área urbana, Sabará, Minas Gerais, 1998-1999. Informe Epidemiológico do SUS 2002; 11: 37-9.

Moreno EC, Melo MN, Genaro O, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade ASR et al. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38: 456–463.

Moreno J, Nieto J, Chamizo C, González F, Blanco F, Barker DC, et al. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. Vet Immunol Immunopathol 1999; 71 (3-4): 181-195.

Moschin JC, Ovallos FG, Sei IA, Galati EAB. Ecological aspects of phlebotomine fauna (Diptera, Psychodidae) of Serra da Cantareira, Greater São Paulo Metropolitan region, state of São Paulo, Brazil. Rev Bras Epidemiol 2013; 16 (1): 190-201.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet 2005; 366 (9496): 1561–1577.

Nakagawa CK. Promoção da saúde nas ações de controle e combate ao dengue nas escolas de Ceilândia. Brasília, 2013. Graduação [Trabalho de conclusão de curso em Saúde Coletiva]. - Universidade de Brasília.

Nascimento BWL, Saraiva L, Neto RGT, Meira PCLSE, Sanguinette CC., Tonelli GB et al. Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in Visceral and Cutaneous Leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state - Brazil. Acta Trop 2013; 125 (3): 262–8.

Nascimento JC, Paiva BR, Malafronte RS, Fernandes WD, Galati EAB. Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a visceral-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo 2007; 49 (2): 119-122.

Nasereddin A, Salant H, Abdeen Z. Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation. Vet Parasitol 2008; 158 (4):364-9.

Negrão GN & Ferreira MEMC. Considerações sobre a dispersão da leishmaniose tegumentar americana nas Américas. Revista Percorso - NEMO Maringá, v. 1, n. 1 , p. 85-103, 2009.

Nieves E, Sánchez M, Rondón M. Las proteínas salivales de los flebotominos en la transmisión de *Leishmania* y su impacto epidemiológico. Avan Biomed 2013; 2 (1): 23–31.

Nieto P, Malone JB, Bavia ME. Ecological niche modeling for visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, using genetic algorithm for rule-set prediction and growing degree day-water budget analysis. *Geospat Health* 2006; 1 (1): 115-26.

Oliveira AG, Andrade-Filho JD, Falcão AL, Brazil RP. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da Cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. *Cad. Saúde Pública* 2003; 19 (4): 933–944.

Oliveira AG, Galati EAB, Oliveira O, Oliveira GR, Espindola IAC, Dorval MEC et al. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101 (8): 869-874.

Oliveira CDL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994–1997. *Cad. Saúde Pública* 2001; 17: 1231–1239.

Oliveira CL, Diez-Roux A, César CC, Proietti AF. A case-control study of microenvironmental risk factors for urban visceral leishmaniasis in a large city in Brazil, 1999–2000. *Rev. Panam. Salud Publica* 2006; 20: 369–376.

Oliveira EF, Silva EA, Fernandes CE, Paranhos Filho AC, Gamarra RM, Ribeiro AA. Biotic factors and occurrence of *Lutzomyia longipalpis* in endemic área of visceral leishmaniasis, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107 (3): 396-401.

Oliveira GM, Madeira MF, Oliveira FS, Pires MQ, Pacheco RS. Canine cutaneous leishmaniasis: dissemination and tissue tropism of genetically distinct *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* populations. *Vet Med Int* 2013; 2013: 982183.

Oliveira SF & Albuquerque FJB. Family health program: an analysis from the beliefs of their service providers. *Psicol. Soc* 2008; 20 (2): 237-246.

Oliveira-Pereira YN, Rebelo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF. Molecular diagnosis of the natural infection rate due to *Leishmania* sp in sandflies (Psychodidae, *Lutzomyia*) in the Amazon region of Maranhão, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39(6): 540-543.

Ordeix L, Solano-Galleg, LAIA, Fondevila D, Ferrer L, Fondati A. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. *Vet Dermatol* 2005; 16 (3): 187-191.

Otranto D; Paradies P; Sasanelli M; Leone N; Caprariis D; Chirico J et al. Recombinant k39 dipstick immunocromatographic test: new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17(1): 32-37.

Paiva BR, Oliveira AG, Dorval MEMC, Galati EAB, Malafronte RS. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Acta Trop* 2010; 115 (1-2): 126-130.

Palatnik-de-Sousa CB, Santos WR, França-Silva JC, Costa RT, Barbosa Reis A, Palatnik M et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 510–517.

Paranhos-Silva M, Freitas LA, Santos WC, Grimaldi GJ, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveirados-Santos AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*. 1996; 55 (1): 39-44.

Passos VMA, Lasmar EB, Gontijo CMF, Fernandes O, Degraive W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with leishmania (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91 (1):19-20.

Passos VMA, Barreto SM, Romanha AJ, Krettii AU, Volpini AC, Gontijo CMF et al. Leishmaniose tegumentar na região metropolitana de Belo Horizonte: aspectos clínicos, laboratoriais, terapêuticos e evolutivos (1989-1995). *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34:5-12.

Paulan SC, Silva HR, Lima EACF, Flores EF, Tachibana VM, Kanda CZ et al. Spatial distribution of canine visceral leishmaniasis in Ilha Solteira, São Paulo, Brazil. *Eng Agríc* 2012; 32 (4): 765-774.

Pearson RD, Souza AQ, Jeronimo SMB. Leishmania species: visceral, cutaneous and mucosal leishmaniasis. In: Mandell D, Bennett S (org.). *Principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia/ London: W. B. Saunders; 2000. v. 1.

Pedras MJ, Viana LG, Oliveira EJ de, Rabello A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rk39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102 (2): 172-8.

Peterson AT & Shaw J: *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *Int J Parasitol* 2003, 33 (9): 919-931.

Pinto RCA. Percepção de Impactos Ambientais: o caso da Lagoa do Fundão no Município de Formiga - Minas Gerais. Belo Horizonte, 2012. Graduação [Trabalho de conclusão de curso em Geografia]. – Universidade Federal de Minas Gerais.

Pirmez C, Coutinho SG, Marzochi MC, Nunes MP, Grimaldi Junior G. Canine American cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. Am J Trop Med Hyg 1988; 38 (1):52-58

Porrozzi R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. Clin Vaccine Immunol. 2007;14 (5):544-8.

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

Queiroz MJA, Alves JGB, Correia JB. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. J Pediatr 2004; 80 (2): 141-146.

Queiroz NM, Assis J, Oliveira TM, Machado RZ, Nunes CM, Starke-Buzetti WA. Canine visceral leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with IFAT and ELISA test. Rev Bras Parasitol Vet 2010; 19 (1): 32-8.

Queiroz NM, Silveira RC, Noronha AC, Oliveira TM, Machado RZ, Starke-Buzetti WA. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. Vet Parasitol 2011; 178 (1-2): 1–8.

Quinnell RJ & Dye C. Correlates of the peridomestic abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Amazonian Brazil. Med Vet Entomol 1994; 8 (3): 219-24.

Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P et al. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. Parasitology 2001; 122 (3): 253-261, 2001.

Quinnell RJ & Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Parasitology 2009; 136: 1915–1934.

Raina P, Waltner-Toews D, Bonnett B, Woodward C, Abernathy T. Influence of companion animals on the physical and psychological health of older people: an analysis of a one-year longitudinal study. J Am Geriatr Soc 1999; 47:323–329.

Rangel EF & Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. 1ed. Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz; 2003.

Rangel EF & Lainson R. Proven and putative vectors of american cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104: 937–54.

Rangel EF & Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) e urbanização da leishmaniose visceral no Brasil. Cad. Saúde Pública 2008; 24: 2948–52.

Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF, Andrade CA. Biologia de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 e *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Phychodidae), em condições experimentais. I. aspectos da alimentação de larvas e adultos. Mem Inst Oswaldo Cruz 1986; 81(4): 431-438.

Ready PD, Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: XX. Prevalence of “enzootic rodent leishmaniasis” (*Leishmania mexicana amazonensis*) and apparent absence of “pian bois” (*Le. braziliensis guyanensis*), in plantations of introduced tree species and in other non-climax forests in eastern Amazônia. Trans R Soc Trop Med Hyg 1983; 77: 775–785.

Ready PD. Leishmaniasis emergence and climate change. Rev Sci Tech. Off Int Epiz 2008; 27 (2): 399–412.

Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. Annu Rev Entomol 2013; 58: 227–50.

Reale S, Maxia L, Vitale F, Glosriosos NS, Caracappa S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. J Clin Microbiol 1999; 37 (9): 2931-2935.

Rebêlo JMM, Araújo JAC, Carvalho ML, Barros VLL., Silva FS, Oliveira ST. Flebótomos (Diptera, Phlebotominae) da ilha de São Luis, zona do Golfão Maranhense, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 1999; 32 (3): 247-253.

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

Reis CB, Andrade SMO, Cunha RV. Responsabilização do outro: discursos de enfermeiros da Estratégia Saúde da Família sobre ocorrência de dengue. Rev Bras Enferm 2013; 66 (1): 74-78.

Reithinger R & Davies CR 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 (4): 530–541.

Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (7): 2352-2356.

Ribeiro VM, Silva SM, Menz I, Tabanez P, Nogueira FS, Werkhäuser M et al. Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brasileish. *Parasit Vectors* 2013; 6 (1): 8.

Rios HF. Estudo de viabilidade do uso de imagens de satélites para a detecção das atividades econômicas do município de Formiga-MG. Belo Horizonte; 2012. Mestrado [Dissetação em Modelagem Matemática e Computacional] – Centro Federal de Educação Tecnológica.

Rocha MN, Margonari C, Presot IM, Soares RP. Evaluation of 4 polymerase chain reaction protocols for cultured *Leishmania* spp. typing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68 (4): 401-9.

Romero GA & Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 19; 4 (1): e584. Disponível em <doi: 10.1371/journal.pntd.0000584>.

Rondon FC, Bevilaqua CM, Franke CR, Barros RS, Oliveira FR, et al. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceara state, Brazil. *Vet Parasitol* 2008; 155: 24–31.

Rosa J, Pereira DP, Brazil RP, Filho JDA, Salomón O et al. Natural infection of *Cortelezzii* complex (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) with *Leishmania braziliensis* in Chaco, Argentina. *Acta Trop* 2012, 123 (2): 128–131.

Rosa NJGC. Rastreio de dirofilariose e de leishmaniose em gatos da área metropolitana de Lisboa. Lisboa; 2009. Mestrado [Dissertação em Medicina Veterinária] - Universidade Técnica de Lisboa.

Sakthianandeswaren A, Foote SJ, Handman E. The role of host genetics in leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2009; 25 (8): 383-91.

Sanguinette CC. Leishmanioses no município de Várzea da Palma, Minas Gerais, Brasil: estudo dos flebotomíneos e da leishmaniose canina. Belo Horizonte; 2011. Mestrado [Dissertação em Doenças Infecciosas e Parasitárias] – Centro de Pesquisas René Rachou.

Santos GP, Sanavria A, Marzochi MC, Santos EG, Silva VL, Pacheco RS et al. Prevalência de infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38, 161-166.

Santos JB, Lauand L, Souza GS, Macêdo VO. Fatores sócio-econômicos e atitudes em relação à prevenção domiciliar da leishmaniose tegumentar americana, em uma área endêmica do sul da Bahia, Brasil. Cad Saúde Pública 2000; 16(3):701-708.

Santos JMLD, Dantas-Torres F, Mattos MRF, Lino FRL, Andrade LSS, Souza RCAD et al. Prevalence of anti-*Leishmania* spp antibodies in dogs from Garanhuns, in the middle scrub zone (Agreste) of Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop 2010; 43 (1): 41-45.

Saraiva L, Andrade-Filho JD, Silva SO, Andrade ASR, Melo MN. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105: 1033–1039.

Saraiva L, Andrade-Filho JD, Falcão AL, Carvalho DAA, Souza CM, Freitas CR et al. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: Characterization of favored locations as determined by spatial analysis. Acta Trop 2011; 117 (2): 137–145.

Savani ES, Oliveira Camargo MC, Carvalho MR, Zampieri RA, Santos MG, D'Auria SR et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, Sao Paulo State, Brazil. Vet Parasitol 2004; 120 (3): 229–233.

Schall VT. An interactive perspective of health education for the tropical disease control: the schistosomiasis case. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998; 93 Supl. I: 51-58.

Schubach EYP. Validação da técnica de imunocromatografia rápida de duplo percurso para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em amostras de sangue total e soro. Brasília; 2011. Mestrado [Dissertação em Medicina Tropical] – Universidade de Brasília.

Schubach T, Figueiredo F, Pereira S, Madeira M, Santos I, Andrade V et al. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Trans R Soc Trop Med Hyg 2004; 98 (3): 165-167.

Secretaria Regional de Saúde. Prefeitura de Divinópolis. Registro de casos de leishmaniose. 2013.

Segatto M, Ribeiro LS, Costa DL, Costa CHN, Oliveira MR, Carvalho SFG et al . Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2012; 107 (1): 39-47.

Serrano A., Nunes C, Savani, E., D'Auria S., Bonello F., Vasconcelos R et al. Feline leishmaniosis within the urban zone of Araçatuba, SP, Brazil – case report. Clínica Veterinária 2008; 76: 36-40.

Sessa PA, Barros GC, Mattos EA, Carias VRD, Alencar JTA, Delmaestro D et al. Distribuição geográfica da leishmaniose tegumentar americana no estado do Espírito Santo-Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 1985; 18:237-241.

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

Shaw NT. Geographical information systems and health: current state and future directions. Health Inform Res 2012; 18 (2): 88-96.

Sherlock IA. Observações sobre calazar em Jacobina - I- Histórico e dados preliminares. Rev Bras Malariol Doenças Trop 1969; 21:523-534.

Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91 (6): 671–83.

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

Sherlock IA. A importância dos flebotomíneos. In: Rangel EF & Lainson R (org). Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: editora Fiocruz; 2003.p. 15-21.

Shimabukuro PH, Silva TR, Ribeiro FO, Baton LA, Galati EA. Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of São Paulo, Brazil. Parasit Vectors 2010; 20 (3):121.

Siegel S & Castellan N. Nonparametric statistics for the behavioral sciences.2 ed. New York: McGraw-Hill, 1988.

Silva AR, Martins G, Melo JEM, Araújo, JP, Mendes, JR, Mendes, MG. Surto epidêmico de leishmaniose tegumentar americana ocorrido na colonização agrícola de Buriticupu (estado do Maranhão), Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo 1979; 21: 43-50.

Silva AR, Tauil PL, Cavalcante MNS, Medeiros MN, Pires BN, Gonçalves EGR. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral, na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão. Rev Soc Bras Med Trop 2008; 41: 358–364.

Silva AVM, Paula AA, Cabrera MAA, Carreira JCA. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. Cad Saúde Pública 2005; 21 (1): 324-328.

Silva DA, Madeira MF, Abrantes TR, Barbosa Filho CJL, Figueiredo FB. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Vet J 2013; 195 (2): 252–253.

Silva DF & Vasconcelos SD. Flebotômíneo em fragmentos de Mata Atlântica na Região Metropolitana do Recife, PE. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38 (3), 264-6.

Silva EA, Andreotti R, Honer MR. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. Rev Soc Bras Med Trop 2007; 40 (4): 420-425.

Silva ES, van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CM, Schallig HD, Brazil RP. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. Vet Res Commun. 2006; 30 (6): 637-43.

Silva FS, Carvalho LPC & Souza JM. Flebotômíneos (Diptera: Psychodidae) associados a abrigos de animais domésticos em área rural do nordeste do estado do Maranhão, Brasil. Rev Patol Trop 2012; 41: 337–347.

Silva MAL, Medeiros RA, Filho SB, Melo LF, Medeiros Z. Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. Rev Eletrôn Farmácia 2010; 7 (3): 01-15.

Silva MAL. Desenvolvimento de sistemas baseados em Nested-PCR convencional e em único tubo para o diagnóstico de leishmaniose visceral. Recife; 2012. Doutorado [Tese em Saúde Pública]. – Centro de Pesquisas Agegeu Magalhães.

Silva NS & Muniz VD. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no estado do Acre. Amazônia brasileira. Cad Saúde Pública 2009; 25 (6): 1325-1336.

Silva AVM, Magalhães MAFM, Brazil RP, Carreira JCA. Ecological study and risk mapping of leishmaniasis in an endemic area of Brazil based on a geographical information systems approach. *Geospat Health* 2011; 6 (1): 33-40.

Silva-Nunes M, Cavasini CE, Silva NS, Galati EAB. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar e descrição das populações de flebotomíneos no município de Acrelândia, Acre, Brasil. *Rev Bras Epidemiol* 2008; 11: 241-251.

Soares MRA, Mendonça IL, Bonfim JM, Rodrigues JA, Wernek GL, Costa CHN et al. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Trop* 2011; 117 (1): 6–9.

Sosa-Estani S, Segura EL, Gomez A, Salomón OD, Peralta M, Couta V et al. Leishmaniose cutânea no norte da Argentina: fatores de risco identificados num estudo caso-coorte em três municípios de Salta. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34 (6): 511-7.

Souza A, Barros E, Ishikawa E, Ilha I, Marin G, Nunes V. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 128 (1-2). 41-45.

Souza A, Nunes V, Borralho V, Ishikawa E. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul state, Brazil: a case report. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2009; 15 (2): 359-365.

Souza AAA, Silveira, FT, Lainson, R, Barata IR, Silva MDGS., Lima JAN et al. The Phlebotominae fauna of Serra dos Carajás, Pará, Brazil, and its possible implication in the transmission of American tegumentary leishmaniasis. *Rev Pan-Amaz Saude* 2010; 1 (1):45-51.

Souza CM, Pessanha JE, Barata RA, Monteiro ÉM, Costa DC, Dias ES. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99 (8): 795-803.

Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97 (6): 759–765.

Souza VMM, Julião FS, Neves RCS, Magalhães PB, Bisinotto TV et al. Community assay for assessment of effectiveness of strategies for prevention and control of human visceral leishmaniasis in the municipality of Feira de Santana, State of Bahia, Brazil. *Epidemiol Serv Saude* 2008; 17: 97–106.

Stauch A, Sarkar RR, Picado A, Ostyn B, Sundar S, Rijal S et al. Visceral leishmaniasis in the Indian Subcontinent: modelling epidemiology and control. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5 (11): e1405. Disponível em <doi:10.1371/journal.pntd.0001405>.

Stockdale L & Newton R. A Review of preventative methods against human leishmaniasis infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7 (6): e2278. Disponível em <doi:10.1371/journal.pntd.0002278>.

Sudhakar S, Srinivas T, Palit A, Kar SK, Battacharya SK. Mapping of risk prone areas of kala-azar (Visceral leishmaniasis) in parts of Bihar state, India: an RS and GIS approach. *J Vect Borne Dis* 2006; 43 (3). 115–122.

Talmi-Frank D, Kedem-Vaanunu N, King R, Bar-Gal GK, EderyN, Jaffe CL et al. *Leishmania tropica* infection in golden jackals and red foxes, Israel. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 1973–1975.

Tavares LMSA & Tavares ED. Distribuição geográfica e aspectos ambientais das áreas endêmicas da leishmaniose visceral em Sergipe. *Informe Epidemiológico do SUS* 1999; 8: 47–52. Disponível em <<http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/iesus/v8n1/v8n1a06.pdf>>.

Teodoro U, Kühl JB, Rodrigues M, Santos ES, Santos DR, Maróstica LMF. Flebotomíneos coletados em matas remanescentes e abrigos de animais silvestres de zoológico no perímetro urbano de Maringá , sul do Brasil . Estudo preliminar. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31: 517–522.

Teodoro U, Santos DR, Silva AM, Massafera R, Imazu LE, Monteiro WM et al. Fauna de flebotomíneos em municípios do norte pioneiro do estado do Paraná, Brasil. *Rev Patol Trop* 2010; 39 (4): 322-330.

Tesh R. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52 (3): 287-92.

Tezoquipa HI, Monreal MLA, Santiago RV. El cuidado a la salud en el ámbito domestico: interacción social y vida cotidiana. *Rev Saude Pública* 2001; 35 (5): 443-50.

Tolezano JE, Taniguchi HH, Araujo MFL, Bisugo MC, Cunha EA, Elias CR et al. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no estado de São Paulo, Brasil: II Utilização de antígeno particulado de *Leishmania (V.) braziliensis* em inquérito canino em regiões endêmicas. *Rev Ins Adolfo Lutz* 1998; 57 (2): 65-71.

Tolezano JE, Uliana SRB, Taniguchi HH, Araújo MFL, Barbosa JAR, Barbosa JER et al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 2007; 149 (3–4): 280–284.

Travi BL, Tabares CJ, Cadena H., Ferro C., Osório Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitological status and infectivity for sand flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001; 64: 119–124.

Tsegaw T, Gadisa E, Seid A, Abera A, Teshome A, Mulugeta A et al. Identification of environmental parameters and risk mapping of visceral leishmaniasis in Ethiopia by using geographical information systems and a statistical approach. *Geospat Health* 2013; 7 (2): 299–308.

Uchôa CMA, Serra CMB, Magalhães CM, Silva RMM, Figliuolo Leticia Pinto, Leal CA et al. Educação em saúde: ensinando sobre a leishmaniose tegumentar americana. *Cad. Saúde Pública* 2004; 20 (4): 935–941.

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

Vélez ID, Carrillo LM, López L, Rodríguez E, Robledo SM. An Epidemic Outbreak of Canine Cutaneous Leishmaniasis in Colombia Caused by *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis*. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86 (5): 807–811.

Verçosa BL, Lemos CM, Mendonça IL, Silva SM, Carvalho SM, Goto H et al. Transmission potential, skin inflammatory response and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Vet. Res.* 2008; 6 (4): 45.

Vexenat AC, Santana JM, Teixeira ARL. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1996; 38: 177–185.

Vilela ML, Azevedo CG, Carvalho BM, Rangel EF. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and putative vectors of leishmaniasis in impacted area by hydroelectric plant, State of Tocantins, Brazil. *PLoS One* 2011; 6 (12): e27721.

Villela W & Monteiro S. Gênero e saúde: Programa Saúde da Família em questão. Rio de Janeiro: Abrasco, UNFPA; 2005.

Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GCO, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 2004, 90 (1): 31–37.

Weigel MM, Armijos RX., Racines RJ., Zurita C, Izurieta R., Herrera E. et al. Cutaneous leishmaniasis in subtropical Ecuador: popular perceptions, knowledge, and treatment. *Bull Pan Am Health Organ* 1994; 28 (2): 142-55.

Werneck GL, Costa CH, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. The urban spread of visceral leishmaniasis: clues from spatial analysis. *Epidemiology* 2002; 13: 364–367.

Werneck GL, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiol Infect* 2007; 135 (2): 195-201.

WHO - World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO - Technical Report Series, Geneva, v.854, p.1-452, 1995.

Wu Z, Bao Y, Yu M, Lu L, Zhang Y. An experimental study on application of PCR in detection of Kala-azar. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997; 28 (1): 167-72.

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