

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

**Eco-epidemiologia das leishmanioses em Jaboticatubas, Serra do Cipó,
um importante pólo turístico de Minas Gerais.**

por

Rosana Silva Lana

**Belo Horizonte
Março/ 2014**

DISSERTAÇÃO MDIP-CPqRR R.S. LANA 2014

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

**Eco-epidemiologia das leishmanioses em Jaboticatubas, Serra do Cipó,
um importante pólo turístico de Minas Gerais.**

por

Rosana Silva Lana

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

Orientação: Dr. Edelberto Santos Dias

**Belo Horizonte
Março/ 2014**

Catálogo-na-fonte

Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ

Biblioteca do CPqRR

Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

L243e Lana, Rosana Silva.

2014

Eco-epidemiologia das leishmanioses em Jaboticatubas, Serra do Cipó, um importante pólo turístico de Minas Gerais / Rosana Silva Lana. – Belo Horizonte, 2014.

XVIII, 112 f.: il.; 210 x 297mm

Bibliografia: f.: 106 - 130

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/prevenção & controle 2. *Leishmania*/parasitologia 3. Reação em Cadeia da Polimerase/utilização. III. Dias, Edelberto Santos (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

**Eco-epidemiologia das leishmanioses em Jaboticatubas, Serra do Cipó,
um importante pólo turístico de Minas Gerais.**

por

Rosana Silva Lana

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Edelberto Santos Dias (Presidente)

Prof. Dr. Ricardo Andrade Barata

Prof. Dr. Daniel Moreira de Avelar

Suplente: Prof. Dra. Érika Michalsky Monteiro

Dissertação defendida e aprovada em: 20/03/2014.

“Aprendi que crescer não significava só fazer aniversário
Que o silêncio é a melhor resposta quando se ouve uma bobagem
Que trabalhar não significa só ganhar dinheiro
Que a natureza é a coisa mais bela da vida
Que quando penso saber tudo, ainda não sei nada
Que sonhar é preciso
E finalmente aprendi... que não se pode morrer para aprender a viver.”

(Shakespeare)

Este trabalho é dedicado a todos que
contribuíram para sua realização

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus que me dá sabedoria e força para ser perseverante; pela oportunidade que me foi concedida em compartilhar tamanha experiência, me fazendo perceber e atentar para temas que não faziam parte da minha vida, e que hoje, têm grande importância.

Ao meu orientador Dr. Edelberto Santos Dias por me aceitar com carinho e competência como sua aluna. Muito obrigada pelo apoio, incentivo, ensinamentos, dedicação e atenção mais que especial nas revisões e sugestões para a realização deste trabalho. Foi um prazer tê-lo como orientador!

A amiga Fabiana Lara, pela participação ativa nas diversas atividades desenvolvidas, pelo apoio, paciência e carinho que sempre teve comigo.

A Dra. Érika Michalsky por todo conhecimento transmitido, pela ajuda, além das sugestões sempre oportunas e, conseqüentemente, pela colaboração na minha formação profissional.

Aos veterinários João Carlos e Juliana Martins, pela colaboração no inquérito canino que foi fundamental para realização deste trabalho. Sabemos o quanto foi trabalhoso!

Aos amigos de colaboração: Ailton Costa, Kelly Scofield, Fabiana Paixão, Thais Paiva, Eduarda Leão, Josiane Lopes, Maiara Alves, Lisiane Gomes, Ana Cristina Vianna, Daniel Moreira que de alguma forma me auxiliaram nos trabalhos de campo ou de laboratório.

Aos moradores de Jaboticatubas, por disponibilizarem suas casas e demais espaços particulares para a realização deste trabalho. Agradeço imensamente pela hospitalidade e espero que estes resultados possam beneficiá-los.

Agradeço aos Agentes de Saúde Élison, Gabriel e Adriano, por me conduzirem nas visitas e pela agradável companhia e convivência.

As Secretarias de Saúde e de Meio Ambiente por disponibilizarem os funcionários quando foi preciso para realização deste projeto.

A Jaqueline Nascimento e Marcelly Elisa pela colaboração na confecção dos mapas espaciais.

A Consuelo Latorre pelo auxílio na confecção dos gráficos.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, pela oportunidade concedida no curso de mestrado, apoio financeiro e logístico, durante a realização deste projeto.

Ao Curso de Pós Graduação em Ciências da Saúde – CPqRR/Fiocruz, pelo conhecimento transmitido.

Agradeço a minha mãe, Angela, e aos meus irmãos, Rejane e Rodrigo, pelo apoio, torcida incessante e confiança. Amo vocês!

Ao meu namorado, Bruno, que pacientemente se privou de minha companhia em prol dos meus estudos, me dando total apoio e me ouvindo nos momentos difíceis.

A todas as pessoas que torceram por mim e me incentivaram durante este período, em especial: Andiara, Vívian, grandes amigas de infância, e Mônica pelos gestos de carinho e incentivo para seguir adiante e pelo desejo da minha felicidade hoje e sempre.

Aos meus familiares e amigos queridos que me concederam o aconchego dos seus lares quando eu mais precisei, meus sinceros agradecimentos.

À instituição financiadora FAPEMIG (número do processo: CDS - APQ - 01390-11) agradeço imensamente pelo apoio financeiro e logístico, durante a realização deste projeto.

Sumário

| | |
|--|-------|
| LISTA DE FIGURAS | XII |
| LISTA DE TABELAS | XIV |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS..... | XV |
| RESUMO | XVII |
| ABSTRACT..... | XVIII |
| 1 INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 OBJETIVOS | 22 |
| 2.1 Objetivo geral | 22 |
| 2.2 Objetivos específicos | 22 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA | 23 |
| 3.1 Agentes etiológicos | 23 |
| 3.2 Ciclo Evolutivo..... | 24 |
| 3.3 Vetor | 25 |
| 3.4 Reservatórios | 27 |
| 3.5 Leishmaniose Tegumentar Americana..... | 28 |
| 3.6 Leishmaniose Visceral | 29 |
| 3.7 Influência dos fatores climáticos sobre as populações de flebotomíneos | 34 |
| 3.8 Epidemiologia e controle das leishmanioses | 35 |
| 4 MÉTODOS | 42 |
| 4.1 Área de estudo..... | 42 |
| 4.2 Estudo da fauna de flebotomíneos..... | 43 |
| 4.3 Dados climáticos | 45 |
| 4.4 Estudo da Infecção natural dos flebotomíneos | 45 |
| 4.4.1 Extração de DNA total das fêmeas de flebotomíneos capturadas..... | 45 |
| 4.4.2 Detecção da taxa de infecção natural dos flebotomíneos por <i>Leishmania</i> spp..... | 45 |
| 4.4.3 Análise dos produtos amplificados pela PCR | 47 |
| 4.4.4 Sequenciamento SSUrRNA para determinação da espécie de <i>Leishmania</i> | 47 |
| 4.4.5 Cálculo da taxa mínima de infecção natural | 48 |
| 4.5 Inquérito canino censitário | 48 |
| 4.5.1 Coleta de amostras de sangue | 48 |

| | |
|--|----|
| 4.6 Diagnóstico sorológico | 49 |
| 4.7 Diagnóstico parasitológico direto | 49 |
| 4.7.1 Cultura | 49 |
| 4.7.2 Aposições em lâminas de biópsias (“imprints”) obtidas de cães soropositivos | 50 |
| 4.7.3 PCR para <i>Leishmania</i> spp. em tecidos de cães soropositivos | 50 |
| 4.8 Georreferenciamento dos casos humanos, caninos e pontos de ... coletas entomológicas..... | 51 |
| 4.8.1 Cálculo da taxa de infecção canina | 51 |
| 5 RESULTADOS | 52 |
| 5.1 Flebotomíneos | 52 |
| 5.1.1 Fauna..... | 52 |
| 5.1.2 Influência das variáveis climáticas na população de flebotomíneos . | 58 |
| 5.1.3 Estudo da infecção natural de flebotomíneos | 62 |
| 5. 2 Inquérito canino censitário | 66 |
| 5.2.1 Coleta de amostras de sangue e análise do diagnóstico sorológico | 66 |
| 5.2.2 Prevalência da leishmaniose visceral canina em Jaboticatubas..... | 66 |
| 5.2.3 Retirada sistemática de cães com LV na cidade de Jaboticatubas .. | 67 |
| 5.3 Análise do diagnóstico parasitológico | 67 |
| 5.3.1 Cultura | 67 |
| 5.3.2 Detecção de <i>Leishmania</i> em aposições de biópsias de cães soropositivos em lâminas (“imprints”)..... | 67 |
| 5. 4 Análise do diagnóstico molecular..... | 67 |
| 5.4.1 Detecção de <i>Leishmania</i> através da PCR | 67 |
| 5.5 Georreferenciamento e Análise espacial | 69 |
| 5.5.1 Distribuição espacial dos domicílios com casos caninos de LVC na área urbana da cidade de Jaboticatubas..... | 69 |
| 5.5.2 Distribuição espacial dos domicílios com casos de leishmaniose visceral ou leishmaniose tegumentar humana na área urbana cidade de Jaboticatubas, entre 2008 e 2013..... | 69 |
| 6 DISCUSSÃO | 72 |
| 7 CONCLUSÕES | 87 |
| 8 Anexos | 89 |
| 8.1 Anexo 1 - Consentimento Livre e Esclarecido do Voluntário | 89 |
| 8.2 Anexo 2 - Ficha epidemiológica com os dados referentes ao cão..... | 90 |
| 8.3 Anexo 3 - Termo de cientificação de resultado de exame laboratorial de | |

| | |
|--|-----|
| leishmaniose visceral canina..... | 91 |
| 8.4 Anexo 4 - Alinhamento das amostras positivas para <i>Leishmania</i> spp..... | 92 |
| 9 Referências Bibliográficas..... | 106 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Município de Jaboticatubas/MG | 42 |
| Figura 2 – Distribuição espacial dos pontos de captura entomológica na cidade de Jaboticatubas/MG | 43 |
| Figura 3 – Exemplos de ecótopos peridomiciliares onde foram expostas as armadilhas entomológicas no município de Jaboticatubas/MG..... | 44 |
| Figura 4 – Desenho esquemático do resultado da LnPCR | 46 |
| Figura 5 – Gráfico da porcentagem das principais espécies de importância médica capturadas no município de Jaboticatubas/MG..... | 54 |
| Figura 6 – Gráfico do número mensal de flebotomíneos coletados em relação à temperatura e precipitação no município de Jaboticatubas/MG..... | 59 |
| Figura 7 – Gráfico do número mensal de flebotomíneos coletados em relação à umidade e precipitação no município de Jaboticatubas/MG | 59 |
| Figura 8 – Gráfico do número mensal de flebotomíneos coletados em relação à umidade e temperatura no município de Jaboticatubas/MG | 60 |
| Figura 9 – Gráfico do número mensal de flebotomíneos coletados em relação à precipitação no município de Jaboticatubas/MG..... | 61 |
| Figura 10 – Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio com exemplos das amostras de produtos amplificados na PCR de “pools” de fêmeas capturadas em Jaboticatubas/MG | 62 |
| Figura 11 – Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio com exemplos das amostras de produtos amplificados na PCR de amostras de cães sorologicamente positivos de Jaboticatubas/MG | 68 |
| Figura 12 – Mapa de Kernel para georreferenciamentos da distribuição espacial dos domicílios com casos de leishmaniose visceral canina, registrados na cidade de Jaboticatubas/MG | 71 |
| Figura 13 – Distribuição espacial dos domicílios com casos de leishmaniose humana e canina, registrados na cidade de Jaboticatubas/MG | 71 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Protocolo de preparação de flebotômíneos para montagem e identificação de machos | 44 |
| Tabela 2 – Espécies de flebotômíneos capturados no município de Jaboticatubas, utilizando armadilha luminosa HP | 53 |
| Tabela 3 – Número de flebotômíneos capturados no município de Jaboticatubas, por mês e bairro | 55 |
| Tabela 4 – Espécies de flebotômíneos capturados no município de Jaboticatubas, por mês | 56 |
| Tabela 5 – Espécies de flebotômíneos capturados no município de Jaboticatubas, por bairro | 57 |
| Tabela 6 – Variáveis climáticas mensais no município de Jaboticatubas, MG, entre os meses de maio de 2012 a abril de 2013..... | 58 |
| Tabela 7 – Normalização dos dados mensais de pluviometria e flebotômíneos capturados em Jaboticatubas, MG, no período de maio de 2012 a abril de 2013..... | 61 |
| Tabela 8 – Fêmeas de flebotômíneos capturadas, número de “pools”, número de “pools” positivos, taxa mínima de infecção natural | 63 |
| Tabela 9 – Amostras de “pools” positivos para <i>Leishmania chagasi</i> e <i>Le. braziliensis</i> de acordo com a espécie de flebotômíneo e bairro de captura no período de maio de 2012 a abril de 2013, no município de Jaboticatubas/MG..... | 65 |
| Tabela 10 – Inquérito canino realizado em cães domiciliados na área urbana do município de Jaboticatubas, entre julho de 2012 a junho de 2013..... | 66 |
| Tabela 11 – Detecção de positividade através da cultura, “imprints” e PCR de amostras de biópsias de cães soropositivos encontrados no município de Jaboticatubas/MG | 68 |
| Tabela 12 – Distribuição dos casos de leishmanioses humana, georreferenciados na área urbana do município de Jaboticatubas/MG | 70 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a.C: antes de Cristo

µL: microlitro

CCZ: Centro de Controle de Zoonoses

CE: Ceará

CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou

CV: coeficiente de variação

DMSO: Dimetil-sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPP: Dual Path Plataform

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

FML: ligante manose-fucose

FUNASA: Fundação Nacional de Saúde

FUNED: Fundação Ezequiel Dias

GPS: Sistemas de Posicionamento Global

Ha: hectares

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

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

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMET: Instituto Nacional de Meteorologia

KDNA: Kinetoplast DNA

Km²: Quilômetro quadrado

Le: *Leishmania*

LnNested: *Leishmania* Nested PCR

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

Lu: *Lutzomyia*

LV: Leishmaniose Visceral

LVC: Leishmaniose Visceral Canina

LVH: Leishmaniose Visceral Humana

MG: Minas Gerais

MS: Ministério da Saúde
MS: Mato Grosso do Sul
MT: Mato Grosso
OMS: Organização Mundial de Saúde
Pb: pares de bases
PCLV: Programa de Controle da Leishmaniose Visceral
PCR: *Polimerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)
PI: Piauí
PM: Peso molecular
pmol: pico mols
RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta
RJ: Rio de Janeiro
RMBH: Região Metropolitana de Belo Horizonte
SD: desvio-padrão
SIG: Sistema de Informação Geográfica
SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SMF: Sistema Mononuclear Fagocitário
SP: São Paulo
SRD: Sem raça definida
TMI: Taxa mínima de infecção natural
TO: Tocantins
SSUrRNA: *Small subunit Ribossomal RNA*
UF: Unidades da Federação
UV: ultra-violeta
WHO: World Health Organization

RESUMO

A proposta deste estudo foi avaliar a transmissão das leishmanioses no município de Jaboticatubas, Serra do Cipó, região turística de Minas Gerais. Para tal, foram realizados estudos entomológicos e de reservatórios urbanos da doença. Para os estudos entomológicos foram selecionados oito bairros, levando-se em consideração a ocorrência de casos humanos, e colocadas armadilhas luminosas do tipo HP, no peridomicílio de 10 residências, durante três noites consecutivas por mês, entre maio de 2012 a abril de 2013. A fauna flebotomínica estudada foi composta de 3.104 exemplares, sendo bastante diversificada com 17 espécies do gênero *Lutzomyia* e duas fêmeas do gênero *Brumptomyia*. Com relação às espécies de importância médica e também numerosas, ressaltamos o encontro de *Lu. whitmani* (33,80%), *Lu. intermedia* (14,60%) e *Lu. longipalpis* (7,96%). A taxa de infecção natural geral dos flebotomíneos por *Leishmania* foi de 3,40%. Foram analisados 249 “pools” de diferentes espécies de flebotomíneos, dentre estes 32 estavam positivos. Para o estudo da taxa de infecção canina, realizou-se inquérito censitário em cães domiciliados em área urbana do município. Foram coletadas 1.105 amostras de soros que foram testadas por meio do DPP® e as positivas confirmadas as infecções através do Ensaio Imunoenzimático ELISA, obtendo-se a taxa média de prevalência canina de 7,78%. Dos 86 cães positivos, foi escolhida uma amostra aleatória de 11 deles, que foram necropsiados e com as amostras de biópsia de tecidos obtidas foram realizados “imprints”, cultura de parasitos e PCR. Foi realizado o georreferenciamento na zona urbana de todos os casos caninos e humanos de leishmanioses dos últimos 6 anos, e construído um mapa mostrando a distribuição dos casos. A PCR de aspirado medular apresentou maior positividade (63,60%) em relação à pele (9,00%). Já nos “imprints”, a taxa de positividade da pele foi de 36,36% e de medula 0%. Quanto à cultura de aspirados de medula óssea, a positividade foi de 27,27%. Nossos resultados indicam a urbanização das leishmanioses no município, devido à alta densidade vetorial e infecção por *Leishmania*, expressiva taxa média de prevalência de infecção canina e recentes registros de casos humanos, Portanto, é importante intensificar as ações de controle a fim de evitar que o problema se agrave no município.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the transmission of leishmaniasis in Jaboticatubas, Serra do Cipó, tourist region of Minas Gerais. For this, entomological studies and urban reservoirs of the disease were conducted. To entomological studies eight districts were selected, taking into account the occurrence of human cases, and light traps HP type were placed in the outdoors in 10 homes for three consecutive nights per month from May 2012 to April 2013. The sand flies studied consisted of 3,104 specimens, quite diverse with 17 species of *Lutzomyia* and two females of the genus *Brumptomyia*. With regard to species of medical importance and also numerous, emphasize the meeting of *Lu. whitmani* (33.80 %), *Lu. intermedia* (14.60%) and *Lu. longipalpis* (7.96 %). The general rate of natural infection of sand flies by *Leishmania* was 3.40%. 249 "pools" of different sandfly species, among them 32 were positive. To study the rate of canine infection was held census survey among domestic dogs in urban area. 1,105 serum samples were tested by the DPP® and confirmed positive infections by ELISA immunoenzymatic assay, obtaining the average prevalence of canine 7.78%. Of the 86 positive dogs, was selected a random sample of 11 of them, which were necropsied and samples of biopsy tissue obtained were performed "imprints", culture of parasites and PCR. Georeferencing was conducted in urban areas of all canine and human leishmaniasis cases in the last 6 years, and built up a map showing the distribution of cases. The PCR of marrow aspirate showed a higher positivity (63.60%) compared to skin (9.00%) While the "imprints", the positivity rate of skin was 36.36 % and 0 % marrow. As for the culture of marrow aspirates, the positivity was 27.27%. Our results indicate the urbanization of leishmaniasis in the municipality due to high vector density and infection by *Leishmania*, expressive average rate of prevalence canine infection and recent records of human cases, therefore, is important to intensify control actions in order to prevent the problem from getting worse in the municipality.

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses que acometem os seres humanos e outras espécies de mamíferos através da picada de flebotomíneos infectados com parasitas do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Os flebotomíneos são dípteros da família Psychodidae; sub-família Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (Killick-Kendrick, 1991). Somente as fêmeas participam diretamente do processo de infecção, uma vez que são hematófagas (Brazil & Brazil, 2003). As leishmanioses são doenças infecciosas crônicas, cujos sintomas clínicos no homem variam consideravelmente, dependendo da espécie de *Leishmania*, da resposta individual, da distribuição geográfica, dos hospedeiros e vetores envolvidos, dentre outros fatores (Marzochi & Marsden, 1991; Ashford, 1992). No Novo Mundo, são descritas duas formas clínicas básicas: a leishmaniose tegumentar americana (LTA) e a leishmaniose visceral americana (LV), cada uma com um perfil epidemiológico distinto.

A LV, ou calazar, acomete os órgãos internos e é a forma mais grave da doença (WHO, 2010). Apresenta maior importância devido a sua ampla distribuição geográfica e alta letalidade, principalmente em crianças desnutridas, idosos, pacientes co-infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e em pacientes não tratados (Brasil, 2006).

A LTA ocorre sob as seguintes formas clínicas: cutânea isolada, cutâneo-mucosa, como complicação da primeira, lesões cutâneas e mucosas ocorrendo simultaneamente, e a forma cutânea disseminada e difusa. Podem existir outras formas, porém são menos frequentes do que as anteriormente citadas (Marzochi & Marzochi, 1994).

As leishmanioses são importantes não somente pela sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também pelo fato de poderem assumir formas graves, com altas taxas de mortalidade nos casos de LV não tratados e alta morbidade nos casos de LTA, que podem levar à lesões destrutivas e desfigurantes. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 350 milhões de indivíduos estejam expostos ao risco de contrair alguma das várias formas clínicas que as leishmanioses podem apresentar, e que cerca de 14 milhões de pessoas se encontram realmente infectados (WHO, 2010).

Ao contrário do que ocorre na Índia, onde a LV comporta-se como uma antroponose, nas Américas a LV é primariamente uma zoonose (Lainson *et al.*, 1990). O cão é apontado como o principal reservatório doméstico relacionado com os casos humanos da LV (Deane & Deane, 1955; Abranches *et al.*, 1991).

Os reservatórios incluem uma grande variedade de hospedeiros mamíferos, sendo a ocorrência comum em roedores e canídeos, mas também em edentados, marsupiais, ungulados, primatas, e entre estes, o homem que é atingido acidentalmente pela infecção (Deane & Deane 1954; Lainson *et al.* 1985).

Em Minas gerais, a primeira menção a LV foi registrada em 1953, no Vale do Rio Doce, em um paciente do distrito de Café, pertencente ao município de Itanhomi. Em Belo Horizonte, o primeiro relato de caso autóctone foi em 1958 (Rezende & Bastos, 1959). Somente na década de 90, novos registros de LV humana voltaram a ocorrer na capital. Nos últimos anos houve elevação de número de casos e expansão das áreas de transmissão com número significativo de casos registrados na Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) (Oliveira *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2008).

Com relação a LV, o município de Jaboticatubas, Minas Gerais, é considerado área de transmissão esporádica, apresentando quatro casos humanos de leishmaniose visceral nos últimos seis anos (Brasil, 2013). Apesar da implementação, no ano de 2006, do Programa de Controle de Leishmaniose Visceral (PCLV) no município, este ainda não funciona em sua integralidade, contando somente com demanda espontânea de casos caninos; e quanto aos casos humanos há uma varredura da área com borrifação de casas próximas a casa do morador acometido pela enfermidade (Epidemiologista da Secretaria de Saúde de Jaboticatubas – comunicação pessoal).

O município está inserido na Serra do Espinhaço e abriga 65% da área total do Parque Nacional da Serra do Cipó, que é um importante pólo turístico de Minas Gerais, recebendo centenas de visitantes nos feriados, finais de semana e período de férias. Alguns dos atrativos turísticos que a região oferece são trilhas abertas a visitação, cachoeiras e uma fantástica beleza natural com uma grande diversidade de flora e fauna. Esse potencial turístico da região também justifica o estudo epidemiológico no município, visando à proteção à saúde. O município também pertence à região RMBH e parece ilustrar o processo de expansão e urbanização das leishmanioses. A LV provavelmente surgiu no município a partir da região

endêmica de Belo Horizonte, já que o número de casos humanos e de cães vem aumentando nos últimos anos na região metropolitana (Menezes, 2011). Além disso, alterações antropogênicas, principalmente no entorno do Parque Nacional da Serra do Cipó, podem ter contribuído para emergência das leishmanioses em Jaboticatubas. A carência de dados epidemiológicos relacionados aos vetores e reservatórios domésticos e suas possíveis interações com a infecção por *Leishmania* revela a importância da realização desta pesquisa, visando compreender melhor a situação atual das leishmanioses no município de Jaboticatubas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a eco-epidemiologia das leishmanioses no município de Jaboticatubas, região da Serra do Cipó, MG.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar as espécies de flebotomíneos presentes na área de estudo através da taxonomia clássica;
- Estabelecer a flutuação mensal das espécies de flebotomíneos e correlacioná-la com algumas variáveis climáticas;
- Identificar possíveis flebotomíneos infectados por *Leishmania* spp., através de técnicas moleculares (“Nested PCR” para SSUrRNA);
- Caracterizar a(s) espécie(s) de *Leishmania* nos possíveis flebotomíneos infectados através da técnica de sequenciamento de DNA;
- Confirmar pelos métodos de diagnósticos DPP® e ELISA a infecção por *Leishmania* nos cães, de modo a estabelecer a prevalência da LVC na área urbana do município de Jaboticatubas;
- Demonstrar a distribuição espacial dos casos humanos e caninos de leishmaniose na cidade de Jaboticatubas;
- Apontar as principais áreas de risco para direcionar as ações de controle da LVC.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Agentes etiológicos

Os parasitos causadores das leishmanioses são protozoários do gênero *Leishmania*, e apresentam em seu citoplasma uma organela característica da ordem Kinetoplastida, o cinetoplasto, composto de uma rede de moléculas de DNA circulares (kDNA), que são divididos em maxicírculos e minicírculos (Simpson, 1987).

As principais espécies responsáveis pela LTA são classificadas dentro do subgênero *Viannia* e subgênero *Leishmania*. O subgênero *Viannia* compreende o complexo *braziliensis* com as espécies *Le. braziliensis* e *Le. peruviana* e o complexo *guyanensis* com as espécies *Le. guyanensis*, *Le. panamensis*, *Le. lainsoni* e *Le. naiffi*, enquanto o subgênero *Leishmania*, apresenta as espécies viscerotrópicas agrupadas no complexo *donovani* e os representantes dermatrópicos do Velho Mundo, em complexos (*Le. tropica*, *Le. major*, *Le. aethiopica*). As espécies do Novo Mundo, *Le. amazonensis* e *Le. mexicana*, formam um único complexo, o *mexicana* (Rioux *et al.*, 1990; Grimaldi & Tesh, 1993).

Atualmente nas Américas são reconhecidas 11 espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose tegumentar humana (Costa, 2005). No Brasil já foram identificadas sete espécies, seis destas do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *Le. (V.) braziliensis*, *Le. (V.) guyanensis* e *Le. (L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *Le. (V.) lainsoni*, *Le. (V.) naiffi*, *Le. (V.) lindenberg* e *Le. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste.

O agente etiológico responsável por causar a LV pertence ao subgênero *Leishmania*, apresentando três espécies principais: *Le. (Leishmania) donovani*, *Le. (L.) infantum* e *Le. (L.) chagasi* (Melo, 2004). Nas Américas a LV é causada pela *Le. chagasi*, espécie considerada sinonímia de *Le. infantum* (Mauricio *et al.*, 2001). Cunha e Chagas (1937) descreveram e incriminaram a *Le. chagasi* como uma nova espécie responsável pela doença nas Américas. Desde então, a posição taxonômica e a origem do agente etiológico da LV no Novo Mundo tem sido uma questão polêmica e muito discutida. Alguns autores separam *Le. infantum*, o agente etiológico da LV no Velho Mundo, e *Le. chagasi* no Novo Mundo, sendo as duas

espécies válidas (Lainson & Shaw, 1987; Gramiccia *et al.*, 1992, Shaw, 2002). Outros acreditam que estes parasitos são diferentes, mas decidiram separá-los em duas subespécies: *Le. (Leishmania) infantum chagasi* e *Le. (L.) infantum infantum* (Lainson & Rangel, 2005). E ainda, alguns pesquisadores que acreditam ser uma única espécie, *Le. infantum* importada da Europa no período da colonização portuguesa e espanhola (Rioux *et al.*, 1990; Dantas-Torres, 2006).

3.2 Ciclo Evolutivo

O parasito apresenta duas formas evolutivas básicas: promastigotas e amastigotas. As promastigotas estão presentes no trato digestivo dos insetos e a forma amastigota se multiplica dentro das células do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF) dos mamíferos (Pimenta *et al.*, 2003).

Durante o repasto sanguíneo, realizado apenas pelas fêmeas dos flebotomíneos, há a inoculação na pele do hospedeiro, juntamente com a saliva, de formas promastigotas do parasito. As células do SMF do hospedeiro endocitam estas formas, que se transformam em amastigotas e começam a se multiplicar no interior do fagolisossomo por divisão binária longitudinal, infectando novas células do SMF quando a célula hospedeira original se rompe.

Quando o flebotomíneo realiza repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, o vetor ingere os macrófagos contendo as formas amastigotas, que sofrem divisão binária no seu intestino, transformando-se em promastigotas. Estas formas se dividem por divisão binária longitudinal, passando por mudanças morfológicas e fisiológicas.

O primeiro estágio no vetor é chamado promastigota procíclica, que possui baixa motilidade e se replica no interior da matriz peritrófica, estrutura quitinosa que envolve o sangue ingerido, separando-o do epitélio intestinal (Secundino *et al.*, 2005). Após alguns dias, os parasitos se diferenciam em formas alongadas e com alta motilidade, chamadas nectomonas. Estas se dirigem para o exterior da matriz peritrófica e se aderem ao epitélio intestinal. As nectomonas se diferenciam em leptomonas, formas curtas que continuam a se replicar. A partir de então, alguns parasitos se diferenciam em formas haptomonas e outros em promastigotas metacíclicas (formas infectantes), que são formas longas com um longo flagelo, alta motilidade e não mais se dividem, então migram para a porção anterior do tubo

digestivo, alcançando a probóscide do inseto. Após cada novo repasto sanguíneo, o relaxamento dos músculos responsáveis pela sucção provoca o refluxo das promastigotas metacíclicas infectando o novo hospedeiro (Ashford, 2000; Choi & Lerner, 2001; Bates, 2007).

3.3 Vetor

Os flebotomíneos são insetos cor-de-palha ou castanho-claro, de pequeno porte (2 a 3 mm), os olhos são proeminentes, arredondados e bem separados, e as antenas são longas, formadas por 16 segmentos. O corpo é coberto de cerdas, sendo facilmente reconhecidos pela posição de pouso, as asas se mantêm divergentes em posição semi-ereta, conferindo-lhe característica peculiar (Forattini *et al.*, 1973). São conhecidos popularmente por “cangalha”, “tatuquira”, “asinha branca”, “mosquito-palha” e “birigui (Froés, 1935). Taxonomicamente pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. O gênero *Phlebotomus* é responsável pela transmissão no Velho Mundo enquanto o gênero *Lutzomyia* é quem transmite no Novo Mundo (Langohr *et al.*, 2000).

Existem duas classificações taxonômicas dos flebotomíneos das Américas. A primeira foi produzida por Young & Duncan (1994), intitulada “Guia para identificação e distribuição geográfica de *Lutzomyia* no México, América do Sul e Central e oeste da Índia”. Nesta proposta, o autor, subdivide o gênero *Lutzomyia* em 15 subgêneros e 11 grupos (Caceres, 1993). Esta classificação é bastante prática e prioriza a identificação a partir da observação de estruturas essenciais como: genitália masculina, genitália feminina e espermateca, cibário em fêmeas, presença ou não de espinhos femurais, tamanho dos segmentos da antena, entre outras.

Em 2003, Galati propôs uma nova abordagem para classificação de flebotomos do Novo Mundo. Nesta, a autora utiliza 88 caracteres morfológicos, priorizando o uso das cerdas ao longo do corpo do inseto, além das outras estruturas para uma melhor distribuição entre os grupos. Alguns grupos e subgêneros anteriores à classificação foram elevados a gênero, mas a maior mudança ficou na fragmentação do gênero antes conhecido como *Lutzomyia* (Beati *et al.*, 2004). Esta recente classificação publicada em “Flebotomíneos do Brasil” (Rangel & Lainson, 2003), traz alterações na classificação de quase todas as espécies em relação à publicação anterior.

Até 2003, o número de espécies de flebotomíneos descritas no mundo era

464, e destas, pelo menos 229 eram encontradas no Brasil (Galati, 2003), sendo 19 delas vetoras de leishmanioses no país (Santos *et al.*, 1998; Rangel & Lainson, 2003). Em apenas nove anos após esta publicação, o número de espécies descritas de flebotomíneos no mundo praticamente dobrou, atingindo o patamar de 927 espécies conhecidas, sendo que 260 delas ocorrem no Brasil (Shimabukuro & Galati, 2011).

O ciclo de vida é constituído de ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto. As larvas são terrestres e bastante ativas, movimentando-se com rapidez para buscar alimento, com isso, provavelmente, se dissemina em uma grande área (Sherlock, 2003). Os flebotomíneos se refugiam em locais com bom teor de umidade, pouca ou nenhuma luminosidade, movimentação de ar e com matéria orgânica em decomposição, o que dificulta seu combate e favorece sua adaptação no ambiente doméstico e peridoméstico (Aguiar & Medeiros, 2003). Em função de sua hematofagia para maturação dos ovários, as fêmeas possuem probóscide desenvolvida, do tipo picador-pungitivo, constituída de um labro e um par de mandíbulas, hipofaringe, um par de maxilas e um lábio. Já os machos possuem mandíbulas rudimentares.

A espécie *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) é considerada a principal vetora de *Le. chagasi* no Novo Mundo, embora as espécies *Lu. evansi* (Zulueta *et al.*, 1999; Travi *et al.*, 1990) e *Lu. cruzi* (Mangabeira, 1938) (Santos *et al.*, 1998) sejam implicadas como possíveis vetoras em áreas restritas.

Muitas espécies têm sido incriminadas na transmissão da LTA, em associação com leishmânias dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, porém somente algumas têm sido consideradas importantes vetoras, com base no grau de antropofilia, infecção natural por *Leishmania* e distribuição espacial coincidente com a da doença (Rangel & Lainson, 2003). Os principais flebotomíneos transmissores da LTA no Brasil são *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912); *Lu. migonei* (França, 1920); *Lu. (N.) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939); *Lu. (Pintomyia) fischeri* (Pinto, 1926); *Lu. (P.) pessoai* (Coutinho & Barreto, 1940); *Lu. (Nyssomyia) umbratilis* (Ward & Fraiha, 1977); *Lu. (Psychodopygus) wellcomei* (Fraiha, Shaw & Lainson, 1971); *Lu. (Trichophoromyia) ubiquitalis* (Mangabeira, 1942); *Lu. (P.) complexa* (Mangabeira 1941); *Lu. (P.) ayrozai* (Barreto & Coutinho, 1940); *Lu. (P.) paraensis* (Costa Lima, 1941); *Lu. (N.) flaviscutellata* (Mangabeira, 1942).

Os flebotomíneos apresentam importância médica como vetores naturais não só de *Leishmania*, mas também de outros agentes etiológicos, como protozoários tripanossomatídeos, bactérias do gênero *Bartonella* e vários arbovírus (Sherlock, 2003).

3.4 Reservatórios

Um animal considerado reservatório da doença tem seu sistema capaz de manter populações do parasito que consigam sobreviver indefinidamente, mantendo alta carga parasitária e podendo transmitir o parasito a um hospedeiro susceptível. Alguns fatores determinam a susceptibilidade de um hospedeiro ao parasito, como a densidade populacional do hospedeiro, a duração da infecção de acordo com a longevidade do hospedeiro, a localização do parasito no seu interior e o estado imunológico do hospedeiro após a cura. O hospedeiro alberga o parasito em seu corpo, mas não consegue transmiti-lo a outros animais (Ashford, 2000).

No ambiente silvestre, os reservatórios de LV são principalmente raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) (Deane, 1956; Lainson *et al.*, 1990) e marsupiais (*Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupiais*) (Sherlock, 1996; Corredor *et al.*, 1989).

Nas regiões rurais, periurbanas e urbanas, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é o principal reservatório da infecção para o homem (Ramiro *et al.*, 2003; Molano *et al.*, 2003). Segundo Caldas *et al.* (2001), os roedores constituem um dos grupos de animais sinantrópicos mais procurados pelos flebótomos, o que reforça a necessidade desses animais serem estudados como possíveis reservatórios de *Le. chagasi*. Um estudo em uma área endêmica de leishmaniose tegumentar e visceral mostrou que as espécies *Rattus rattus* e *Thrichomys apereoides* foram encontrados naturalmente infectados por espécies de *Leishmania* (Oliveira *et al.*, 2005). Evidências epidemiológicas indicam roedores em geral, como possíveis reservatórios peridomésticos de *Le. chagasi*, constituindo um importante elo entre o ambiente silvestre e o domiciliar (Corredor *et al.*, 1989).

Além de roedores também têm sido encontrados naturalmente infectados gatos (Figueiredo *et al.*, 2009), mas pouco se sabe sobre a importância epidemiológica destes animais como reservatórios da doença.

Forattini, na década de 50, no estado de São Paulo, em área endêmica para LTA, capturou 928 animais, a maioria roedores, e encontrou paca (*Cuniculus paca*), cutia (*Dasyprocta azarae*) e rato-da-taquara (*Kannabateomys amblyonyx*) positivos ao exame parasitológico de pele e hemocultura. Guimarães *et al.* (1968) encontraram resultado semelhante quando pesquisaram a infecção natural por *Leishmania* em roedores, na floresta de Utinga, município de Belém, Pará.

O envolvimento de animais domésticos na epidemiologia da LTA já é conhecido desde o início do século (Falqueto *et al.*, 1986; Brumpt & Pedroso, 1913). Entretanto, a discussão do papel do cão na epidemiologia da LTA é ainda controversa. Alguns autores consideram o cão apenas um hospedeiro acidental, assim como o homem (Lainson & Shaw, 1970). Outros acreditam no papel do cão como elo entre animais silvestres e homem no ciclo epidemiológico da doença (Coutinho *et al.*, 1985; Pirmez *et al.*, 1988). Falqueto *et al.* (1986) observaram no Espírito Santo nítida relação entre presença de cães infectados e surgimento de novos casos humanos da doença. Mas ainda, pouco se sabe sobre os aspectos clínicos, parasitológicos e imunológicos do curso da infecção pela *Le. braziliensis* em cães (Reithinger & Davies, 1999).

Em relação a LV, a cadeia epidemiológica inclui, numa área endêmica, a presença concomitante do vetor, do reservatório e do hospedeiro susceptível. Conforme supracitado, o hospedeiro doméstico (*Canis familiaris*) tem sido incriminado como o principal reservatório da LV para o homem em áreas próximas aos centros urbanos. O papel do cão na transmissão da doença no Brasil foi elucidado com os trabalhos de Deane & Deane (1954, 1955, 1956) em Sobral, Ceará, onde descreveram a leishmaniose visceral canina urbana e o papel definitivo do cão como reservatório doméstico.

3.5 Leishmaniose Tegumentar Americana

O primeiro a identificar a enfermidade e a suspeitar do papel dos flebotomíneos como vetores foi Alexandre Cerqueira, em 1885, na Bahia. Em 1911, Gaspar Vianna, propôs a denominação de *Le. braziliensis* para o agente etiológico da leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Brasil (Vianna, 1912).

O sintoma característico da LTA é o aparecimento de pequena lesão eritemato-papulosa no local da picada do vetor, onde há a multiplicação de

protozoários. Posteriormente há a formação de um nódulo que dá origem a uma úlcera, formando a úlcera leishmaniótica clássica, de formato arredondado, com bordas elevadas e infiltradas (Deane & Deane, 1954).

A LTA atinge o homem em qualquer idade, havendo prevalência do sexo masculino devido ao modo de vida, que oferece maior exposição ao contágio. Em algumas regiões do país, como São Paulo, intensas modificações do ambiente ocorreram devido à ação do homem, em sua atividade agrícola e pastoril, o que levou ao quase desaparecimento da leishmaniose tegumentar no final da década de 40. Entretanto, a partir das décadas de 70 e 80 a leishmaniose reaparece, nestas regiões, com aumento significativo no número de casos e com o surgimento de novas áreas endêmicas. Com a eliminação de predadores e o deslocamento das comunidades nativas, certas espécies passam a invadir e colonizar novos habitats. O quadro epidemiológico atual é representado por um complexo de espécies de *Leishmania*, animais reservatórios e insetos transmissores, compondo diferentes ciclos de transmissão (Negrão & Ferreira, 2009).

A presença de *Lu. whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. migonei* e *Lu. fischeri* em ambientes antrópicos tem sido observado no Estado de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (Teodoro *et al.*, 1991). *Lutzomyia whitmani* e *Lu. migonei* são considerados importantes vetores de LTA encontrados no peridomicílio de regiões do sudeste (Gomes & Galati, 1989; Rocha *et al.*, 2007) bem como região Nordeste (Brandão-Filho *et al.*, 2011) e Centro-Oeste (Missawa *et al.*, 2008). A espécie *Lu. whitmani* está entre os mais importantes vetores de LTA no Brasil (Rangel & Lainson, 2009).

3.6 Leishmaniose Visceral

A LV foi descrita primariamente na Grécia em 1835, quando então foi denominada “ponos” ou “hapoplinaikon”. Em 1869, na Índia, recebeu o nome de “kala-jwar” ou Kala-azar, em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele nos acometidos, sendo essa característica o tipo clássico da doença, denominada doença negra. A enfermidade ficou conhecida como uma doença de alta letalidade (Marzochi *et al.*, 1981). William Leishman (1900) identificou um protozoário no baço de um soldado que faleceu na Índia, em decorrência de uma febre local conhecida como febre “Dum-dum” ou “Kala-azar. Donovan (1903) encontrou o mesmo parasito

em outro paciente, e Laveran & Mesnil (1903) descreveram o protozoário com o nome de *Piroplasma donovani*, uma vez que as observações de Leishman não foram publicadas. Leonard Rogers foi o primeiro a cultivar o parasito e observou formas flageladas nas culturas. Patton (1907) observou as formas leishmânicas (amastigotas) em monócitos e as formas leptomonas (promastigotas) no intestino de insetos que se alimentavam em pacientes com calazar. Entretanto, a constatação da existência de um vetor e nomeado flebotomíneo só ocorreu em 1931. Em 1934, Penna relatou o primeiro caso de LV no Brasil quando foram observados cortes histológicos de fígado de pessoas que vieram a óbito com suspeita de febre amarela. Em 1955, Deane & Deane, publicaram um estudo clássico sobre a epidemiologia da doença no estado do Ceará, quando houve o primeiro surto da doença.

A LV é uma doença crônica grave, potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado (Gontijo & Melo, 2004).

No Brasil, a transmissão da LV se dá através da picada das fêmeas de *Lu. longipalpis* infectados pela espécie *Le. (L.) chagasi*. Entretanto, em 1998, *Lu. cruzi* foi considerada a espécie vetora de LV nos municípios de Ladário e Corumbá, (MS) (Santos *et al.*, 1998; Elkhoury, 2005; Lainson & Rangel, 2005).

Alguns autores acreditam na transmissão entre cães através de ectoparasitos, sugerindo a capacidade vetorial de pulgas e carrapatos (Coutinho & Linardi, 2007; Paz *et al.*, 2010). Outros autores sugerem que a transmissão possa ocorrer através de mordeduras, cópula ou transmissão vertical entre os cães, porém não existem evidências sobre a importância epidemiológica destes mecanismos de transmissão (SiLV *et al.*, 2009).

A urbanização da LV no Brasil, após a década de 80, se deve, possivelmente, a uma mudança de comportamento do homem, ocorrida em função de modificações sócio-ambientais, como o desmatamento que reduziu a disponibilidade de animais para servir de fonte de alimentação para o vetor. Dessa forma, o cão e o homem se tornaram alternativas mais acessíveis. Outro fator é o processo migratório, que levou para a periferia das cidades populações humana e canina, oriundas de áreas rurais onde a doença era endêmica (Barata *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2005; Missawa & Dias, 2007).

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica grave, de evolução lenta e início insidioso. Os sinais clínicos podem variar de cão para cão dependendo da resposta imunológica. Geralmente, os cães infectados apresentam um acentuado emagrecimento; por outro lado, algumas vezes, apresentam-se aparentemente normais, mas com alto grau de parasitismo na pele íntegra e vísceras (Deane & Deane, 1955).

Nicolle (1908) na Tunísia anunciou que havia conseguido infectar um cão jovem com o parasito da leishmaniose visceral infantil. O cão foi sacrificado 159 dias após o inóculo, apresentando numerosos parasitos na medula. Em seguida, foi realizado em Túnis um inquérito canino para verificar se a doença ocorria naturalmente entre estes animais. Foram examinados 145 cães através do exame de esfregaços da medula óssea, e encontrados três animais positivos, ficando assim evidenciado, o primeiro foco de leishmaniose visceral canino no mundo, fato este consolidado pelo encontro posterior de outros focos em outras regiões (Genaro, 1993).

Classicamente, a LVC inicialmente é acompanhada por febre, descamação e eczema, especialmente, no espelho nasal e na orelha. Muitas vezes apresentam pêlo opaco, pequenas úlceras rasas localizadas, frequentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações. Com a evolução da doença é comum ocorrer esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, onicogribose, ceratoconjutivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema das patas, vômito, além do aparecimento de áreas de hiperqueratose, especialmente na ponta do espelho nasal (Paz, 2010). Na fase final da infecção ocorre em geral, a paresia das patas posteriores, caquexia, inanição e morte (Deane & Deane, 1955; Brener, 1957; Marzochi *et al.*, 1985). Em função da variedade de sintomas, os animais podem ser classificados em assintomático (ausência de sinais e sintomas clínicos sugestivos de infecção por *Leishmania*), oligossintomático (com até três dos sinais clínicos característicos da infecção) e sintomático (mais de três sinais clínicos característicos da infecção) (Genaro, 1993).

Entretanto, para uma melhor classificação dos cães como oligossintomáticos ou sintomáticos é preciso haver a presença de um ou mais sinais patognomônicos da infecção, principalmente quando o animal se origina de regiões endêmicas estabelecidas. No entanto, é importante salientar, que diversos fatores podem estar associados, especialmente parasitos e desnutrição, modificando ou mascarando o

quadro clínico da LVC, principalmente em zonas rurais (Brener, 1957).

O papel do cão como reservatório tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores e conforme já descrito por Deane (1956), representa um importante elo de transmissão da leishmaniose visceral, sendo, em meio urbano, o principal reservatório do agente etiológico (Monteiro *et al.*, 2005; Dantas-Torres, 2007). Dentre as razões podem ser citadas a proximidade com o homem, é fácil fonte de repasto para o vetor, atraindo-o para perto do homem e a persistência desse parasitismo cutâneo depois do desaparecimento das leishmanias nas vísceras (Deane, 1956). Os cães infectados, mesmo assintomáticos, são fonte de infecção para os flebotômíneos e, conseqüentemente, têm papel ativo na transmissão de *Leishmania* (Michalsky *et al.*, 2007).

Do ponto de vista epidemiológico, a LVC é considerada, no Brasil, mais importante do que a doença humana. Normalmente antecede o acometimento de casos humanos (Madeira *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2010), sendo a infecção nos cães mais prevalente que nos humanos (Deane & Deane, 1955; Marzochi & Marzochi, 1994; Galimberti *et al.*, 1999). Estudos destacam o cão no ciclo de transmissão da LV para o homem associados a altas taxas de soropositividade canina e presença de LV humana, numa determinada área (Deane & Deane, 1955; Dye *et al.*, 1992).

A LVC vem aumentando sua prevalência no Brasil, não só em número de casos, mas também na dispersão geográfica. A alta prevalência de infecção canina em áreas endêmicas, a estreita convivência entre humanos e cães e a mesma identidade dos parasitos isolados de casos humanos e caninos, reforçam a participação destes animais como reservatórios da infecção (Oliveira *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2001).

O diagnóstico da LVC compreende a associação entre dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. Os testes laboratoriais são utilizados para evidenciar o parasita ou para detectar componentes da resposta imune, como anticorpos específicos ou reações de tipo celular. Os testes disponíveis incluem os métodos parasitológicos, sorológicos, imunocromatográficos, imunohistoquímicos e moleculares. Para o diagnóstico parasitológico de cães, obtêm-se espécimes clínicos a partir de aspirado de medula óssea, de baço, de fígado, de linfonodos, e em alguns casos, biópsias de pele íntegra. Entre os métodos sorológicos mais utilizados estão a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio

imunoenzimático (ELISA), muito utilizados em estudos epidemiológicos e inquéritos para medidas de controle da LV, devido a possibilidade de utilizar amostras de sangue em papel, algo que facilita a coleta e baixa o custo (Nunes *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2005). Um dos problemas desses métodos é a baixa sensibilidade, o que leva a taxas de infecções subestimadas e consequentemente permitindo a manutenção de animais infectados em área endêmica (De Paula *et al.*, 2003; Porrozzini *et al.*, 2007).

Novos métodos têm sido testados utilizando antígenos recombinantes de *Le. chagasi* (k9, k26 e k39) para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana (el Hassan *et al.*, 1998) e canina (Rosati *et al.*, 2003). O desempenho da sensibilidade e especificidade destes testes têm se mostrado mais elevada em relação aos testes sorológicos convencionais. Dessa forma, o Instituto de Biotecnológicos da Fiocruz (Biomanguinhos) vem desenvolvendo testes imunocromatográficos voltados para o diagnóstico da LVC. Inicialmente, foi desenvolvido o teste denominado “lateral flow” (LF), mas sua tecnologia tem sido substituída pela técnica de imunocromatografia rápida de duplo percurso TR DPP (Schubach, 2012), atualmente preconizada pelo Ministério da Saúde como técnica de triagem para diagnóstico de LVC. Em 2011 foram realizados trabalhos de validação desta técnica para diagnóstico da LVC (Schubach, 2012; Queiroz-Júnior, 2011).

Dual Path Platform (DPP®) é uma inovadora tecnologia de imunoensaio cromatográfico para testes de diagnóstico rápido, que foi desenvolvido pela empresa norte americana Chembio® e a empresa nacional Bio-Manguinhos®, Rio de Janeiro, Brasil (Queiroz-Júnior, 2011).

O DPP® é o único disponível no mercado atual que oferece resultado em 15 minutos. É de fácil manipulação, pois não necessita de pessoa especializada para a sua execução e pode ser realizado em campo, desonerando, desta forma, o laboratório. Possui uma tecnologia de alta sensibilidade, o que agrega precisão ao diagnóstico da LVC em sangue soro, plasma ou sangue total.

O teste DPP® utiliza a proteína recombinante K39 (rK39) como antígeno, uma sequência de 39 aminoácidos clonada da região quinase específica de *Le. chagasi* que tem sido largamente avaliada no diagnóstico da LVC (Burns-Júnior *et al.*, 1993). Já o ensaio imunoenzimático (ELISA) é bastante útil para análises de laboratório, possibilitando a análise de grande quantidade de amostras em pouco tempo (Maia & Campino, 2008), sendo, por isso, um teste mais rápido e de fácil execução

(Camargo & Langoni, 2006) quando comparado à RIFI. A técnica de ELISA permite detectar baixos títulos de anticorpos e é acurado na identificação de casos assintomáticos (Cândido *et al.*, 2008).

Em 2012, foi preconizado pelo Ministério da Saúde (MS) o uso do DPP® como método de triagem e do ELISA para confirmação do diagnóstico de leishmaniose visceral canina.

3.7 Influência dos fatores climáticos sobre as populações de flebotomíneos

A densidade populacional é passível de grande interferência pela variação das estações do ano (Oliveira *et al.*, 2003). Os locais de abrigo e criadouro dos flebotomíneos sofrem uma pequena variação na temperatura e umidade, característica esta que favorece a presença dos mesmos e pode alterar a dinâmica das populações destes insetos (Dias *et al.*, 2007). Geralmente, estes locais correspondem aqueles onde as fêmeas encontram os hospedeiros vertebrados e realizam seu repasto sanguíneo (Basimike *et al.*, 1991; Comer & Brown, 1993).

Em áreas tropicais, a densidade populacional de flebotomíneos aumenta durante ou após períodos chuvosos, pois é a alta umidade resultante das primeiras chuvas que proporciona a eclosão dos adultos, também há maior atividade destes insetos fora de seus abrigos nesse período (Almeida *et al.*, 2010). Em contrapartida, é comum haver uma redução populacional durante longos períodos secos (Tesh, 1988), o que configura um complexo dependente de fatores bióticos, físicos e ambientais (Lewis, 1974).

Barata *et al.* (2004) mostraram a interferência de fatores climáticos sobre a população de flebotomíneos na cidade de Porteirinha (MG). Observaram uma correlação significativa entre o número de flebotomíneos capturados e a umidade e pluviosidade. Outros autores observaram que há um aumento na densidade desses insetos após o período de chuvas (Missawa & Dias, 2007; Dias *et al.*, 2007; Michalsky *et al.*, 2009).

Segundo Dias-Lima *et al.* (2003), os flebotomíneos apresentam uma nítida variação sazonal, sendo que as chuvas em níveis moderados, a temperatura, insolação e evaporação mais baixos e a umidade alta, favorecem o aumento da densidade de flebotomíneos. Corroborando com esses resultados, em Sobral,

Ceará, os flebotomíneos apresentaram uma distribuição sazonal associada aos índices pluviométricos e de umidade, com aumento de densidade no período chuvoso (Macedo *et al.*, 2008). Em estudo realizado em uma floresta primária no Paraná, a temperatura média mensal, a pluviosidade e a temperatura nas noites de coleta influenciaram significativamente no número de determinadas espécies capturadas e em relação ao sexo dos flebotomíneos. Entretanto, a altitude não influenciou da mesma maneira (Marcondes *et al.*, 2001).

O estudo da variação sazonal da fauna flebotomínica se faz necessário para melhor compreensão da biologia do vetor e sua importância epidemiológica, da relação entre a espécie e seu habitat, visando estabelecer medidas de controle da leishmaniose que possam diminuir a densidade de flebotomíneos em determinados locais (Macedo *et al.*, 2008).

3.8 Epidemiologia e controle das leishmanioses

As leishmanioses manifestam-se nas populações tropicais e subtropicais da América Latina de forma endêmica. Os surtos são decorrentes de resposta imune precária por parte dos hospedeiros (Grimaldi & Tesh, 1993) ou de situações eco-epidemiológicas que favoreçam o aumento da quantidade de vetores infectados (Tesh & Papaevangelou, 1977).

As leishmanioses têm ampla distribuição nos cinco continentes e são consideradas endêmicas em 88 países, porém a notificação é obrigatória somente em 32 países (WHO, 2010). Colômbia, Bolívia, Equador, Peru, Venezuela e Brasil apresentam prevalência mais elevada (Aguillar *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 2000). Nas Américas, a LV ocorre desde o México até a Argentina, sendo 90% dos casos humanos descritos procedentes do Brasil, sendo que 24 de suas 27 Unidades Federativas apresentaram casos humanos e ainda não existe estratégia eficiente de controle (Queiroz *et al.*, 2012; Quaresma, 2011).

Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos notificados de LV ocorreram na Região Nordeste. À medida que a doença se expandiu para as outras regiões e atingiu áreas urbanas e periurbanas, esta situação se modificou e, no período de 2000 a 2002, a Região Nordeste apresentou uma redução para 77% dos casos do país (Brasil 2006a). A proporção dos casos confirmados de LV no país

aumentou nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Norte. A região Sul, embora com aumento, mantém um número pequeno de casos autóctones (Brasil, 2010). Surtos epidêmicos de LTA têm ocorrido nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste, Norte e, mais recentemente, na região Sul. Nos últimos anos, o Ministério da Saúde registrou média anual de 35 mil novos casos de LTA no país (Brasil, 2007).

Durante muitos anos, o impacto das leishmanioses na saúde pública foi subestimado. Atualmente há uma incidência de 2 milhões de casos por ano (1,5 milhões da forma tegumentar e 500 mil de forma visceral), com uma estimativa de 14 milhões de pessoas infectadas (WHO, 2010).

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

A eliminação do parasito no homem em estágios iniciais de instalação reduz a letalidade apesar de não diminuir a incidência da doença (Monteiro *et al.*, 1994). A epidemia devastadora do Sudão, onde populações deslocadas pela guerra civil tinham pouco acesso à medicação para LV (Seaman *et al.*, 1996), deixou claro que a ampla distribuição gratuita do tratamento específico é crucial para a prevenção da morte, particularmente entre os mais pobres, contingente que constitui a maioria das vítimas de LV.

No Brasil, até a década de 80, a LV apresentava um caráter eminentemente rural ou silvestre, mas atualmente a doença vem se expandindo alterando seu perfil epidemiológico, atingindo regiões urbanizadas (Gontijo & Melo, 2004; Maia-Elkhoury *et al.*, 2008). Isso é comprovado pela ocorrência de casos da doença em cidades de grande e médio porte como Araçatuba (SP), Corumbá (MT), Campo Grande (MS), Palmas (TO), Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG) (Brasil, 2006). Fortaleza (CE) apresentou grande número de casos em 2009 (309), contribuindo com a elevada letalidade da LV no estado (5,6% em 2008 e 5% em 2009) (Ceará, 2009; Ceará, 2011). Também nos últimos anos foram relatados casos de LV no Paraná (Thomaz-Soccol *et al.*, 2009) e no Rio Grande do Sul, áreas consideradas até então livres da

doença (Krauspenhar *et al.*, 2007; Ministério da Saúde, 2010).

A importância do cão como reservatório da *Le. chagasi* é por apresentar intenso parasitismo cutâneo e ser potencialmente capaz de transmitir o parasita ao vetor mesmo quando se apresenta assintomático, por isso, constitui-se elo fundamental da transmissão da LV. (Madeira *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2010).

O controle da LV no Brasil tem sido baseado em uma tríade de ações recomendado pela OMS associado à uma rigorosa vigilância epidemiológica, a saber: tratamento dos casos humanos; eliminação dos reservatórios domésticos (cães soropositivos) e combate ao vetor para reduzir a sua densidade populacional, utilizando-se inseticidas residuais aspergidos no domicílio e peridomicílio. Porém, estas medidas, aplicadas isoladamente, não se mostram efetivas para a redução da incidência da doença (Brasil, 2003).

O Ministério da Saúde em parceria com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento publicaram em 11 de julho de 2008 a Portaria Interministerial nº 1426 que "proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento" (Brasil, 2008; Brasil, 2009). Considerando isso, a vacina surge como uma alternativa para o controle (Gontijo & Melo, 2004). Atualmente existem algumas vacinas no mercado, uma utilizando o antígeno protéico A2; outra o antígeno glicoproteico FML (ligante de manose-fucose), mas ensaios clínicos e epidemiológicos ainda são necessários para provar a sua eficácia (Oliveira *et al.*, 2008).

Apesar de os cães portadores de *Leishmania* serem considerados, de uma forma geral, fonte de infecção para os flebotomíneos, e grandes responsáveis pela persistência da LV em diversas regiões (Abranches *et al.*, 1991), esta questão ainda necessita de maiores estudos. O impacto da remoção de cães infectados, durante campanhas de controle, na redução de casos humanos é controverso e tem sido questionado por vários autores (Dietze *et al.*, 1997). No Brasil, no município de Caratinga, Vale do Rio Doce (MG), uma ação controlada envolvendo o sacrifício de todos os cães soropositivos, culminou com o controle da LV, após 10 anos de intensivos trabalhos, além da rigorosa manutenção da vigilância epidemiológica (Magalhães *et al.*, 1980). Um resultado semelhante foi observado na Ásia e Europa com o decréscimo da incidência de LV, após a eliminação de cães infectados domiciliados nas áreas endêmicas (Ashford, 1996). Já Ashford *et al.* (1998), em trabalho na Bahia, relataram que eliminar cães positivos é insuficiente para o

controle da LVC, mas a força da infecção entre cães pode diminuir, bem como, a incidência de LVH, com esta estratégia. A transmissão continuada pode estar relacionada com a baixa aceitação da eutanásia dos cães pelos proprietários e o tempo que leva para remoção de cães sorologicamente positivos e pela viragem sorológica dos mesmos (Ashford *et al.*, 1998; Romero & Boelaert, 2010).

Teodoro *et al.* (2003) mostraram que, tanto a desinsetização quanto a reorganização do ambiente contribuem significativamente para reduzir a densidade de flebotomíneos no domicílio e peridomicílio. Assim, a limpeza de matéria orgânica acumulada no solo, representada por frutos e folhas em decomposição, corte de algumas árvores ao lado da residência do morador e a drenagem do solo com elevada umidade constituem medidas complementares que podem auxiliar no controle destes insetos. Tem sido demonstrado que nas áreas com solos úmidos e acúmulo de matéria orgânica de origem animal e vegetal há condições para a formação de criadouros e para a concentração de flebotomíneos no ambiente peridomiciliar (Forattini, 1953).

Apesar do grande esforço realizado na execução das medidas tradicionais de controle, não é possível a erradicação da doença. Estas ações sistematizadas apresentam resultados satisfatórios se mantidas durante longos períodos de tempo, e mesmo assim, é freqüente a reativação dos focos. Além disso, outras variáveis não estão sendo consideradas no processo de transmissão do parasita e conseqüentemente, no planejamento das ações de controle das leishmanioses.

A complexidade do controle é mais evidente quando consideramos que existem lacunas no conhecimento sobre cada aspecto estudado, incluindo a distribuição geográfica do parasita, insetos vetores, fontes de infecção, fatores históricos e socioeconômicos, integração dos serviços de saúde, técnicas utilizadas para o diagnóstico, tratamento e imunoprofilaxia (França-Silva, 1997). Desta forma, as características peculiares de cada elemento da cadeia de transmissão aliadas à variedade de situações epidemiológicas, têm mostrado que estratégias de controle devem ser flexíveis e designadas, especialmente, para cada área endêmica (Marzochi, 1992). Claramente, o conhecimento da história natural da doença forma uma base essencial para o controle das leishmanioses. Entretanto, o planejamento deve ser refinado, fornecendo informação quantitativa básica sobre a prevalência, a incidência e o índice de reprodução basal da doença (Dye *et al.*, 1992).

3.9 Geoprocessamento - distribuição de doenças parasitárias

A utilização de mapas relacionando-os com a distribuição geográfica de doenças têm início em um passado remoto. Hipócrates há 480 a.C no seu livro “Dos ares, dos mares e dos lugares” destacou a importância do modo de vida dos indivíduos, analisou a influência dos ventos, água, solo e localização das cidades em relação ao sol, na ocorrência de doenças (Medronho, 1995; Costa & Teixeira, 1999). Dr John Snow, em 1854, conseguiu controlar a epidemia de cólera em Londres, sem utilizar nenhum recurso tecnológico e tendo o espaço como a principal variável ao estudar a epidemiologia da doença.

Com o avanço tecnológico, a cartografia passa a ser dinâmica, a coleta de informações sobre distribuição geográfica deixa de ser analisada somente com documentos e mapas de papel, hoje ela conta com a ajuda de computadores, o que é promissor para setores de saúde pública.

Neste quadro de evolução da ciência geográfica, o geoprocessamento é uma tecnologia de grande significado para as pesquisas na área da saúde. Tal técnica pode ser destrinchada nos seguintes ramos: análise dos padrões de distribuição espacial e temporal das doenças; mapeamento das doenças; ecologia das doenças; e aplicação de conceitos geográficos ao planejamento para a localização e administração de serviços de saúde.

O geoprocessamento é um termo amplo, que envolve um conjunto de técnicas de coleta, tratamento de imagens e exibição de informações georreferenciadas que permitem identificar variáveis relacionadas às estruturas sociais, econômicas e ambientais que podem oferecer risco à saúde (Medronho & Perez, 2002; Barcellos & Bastos, 1996). Dentre essas tecnologias, se destacam: o sensoriamento remoto, a digitalização de dados, a automação de tarefas cartográficas, a utilização de Sistemas de Posicionamento Global – GPS, os Sistemas de Informações Geográficas – SIG e a utilização de modelos matemáticos inseridos na estatística espacial (Kitron, 1998; Umunbo *et al.*, 2002; Margonari *et al.*, 2006).

O conhecimento da variação espacial e temporal da incidência das doenças que ocorrem simultaneamente com situações ambientais especificadas é importante para o planejamento de ações de prevenção e controle das mesmas, mesmo não

sendo possível inferir diretamente fatores causais do ponto de vista etiológico (Margonari *et al.*, 2006).

Estudos revelam o potencial do geoprocessamento como importante ferramenta para análise epidemiológica, visando o planejamento de ações específicas para o controle de doenças (Godoy *et al.*, 2007).

Essa tecnologia permite aos pesquisadores o mapeamento de vetores e análises de fatores ambientais que afetam a distribuição espacial e temporal dos insetos. Estudos utilizando técnicas de geoprocessamento, foram realizados com mosca Tsé-tsé, *Glossina* spp. (Rogers, 1991), *Aedes* (Medronho 1995, Gleiser *et al.* 1997), *Anopheles gambiae* (Thomson *et al.* 1997), *Phlebotomus papatasi* (Cross *et al.* 1996), todos eles artrópodes de importância médica. Essas técnicas também têm sido utilizadas para monitorar doenças como malária, tripanossomíases e leishmanioses (Elnaiem *et al.*, 2003; Thomson & Connor, 2000; Umunbo *et al.*, 2002). No caso desta última, o geoprocessamento tem sido utilizado por vários pesquisadores.

Werneck & Maguire (2002) utilizaram análises espaciais ao estudar determinantes ambientais e sócio-econômicas da incidência de LV na cidade de Teresina, PI. Kawa & Sabroza (2002), em estudo no Rio de Janeiro, também utilizaram ferramentas espaciais e observaram que o movimento urbano favoreceu a intensificação da endemia em focos bem definidos, onde o processo de trabalho possibilitou maior contato entre indivíduos susceptíveis e vetores. Esta mesma abordagem mostrou a rota de dispersão da LV, bem como os fatores a ela relacionados em Mato Grosso (Antoniali *et al.*, 2007). França-Silva (2003), semelhantemente, utilizando ferramentas de análise espacial e temporal em Porteirinha (MG) encontrou um “cluster” bem definido de casos caninos coincidentes com casos humanos e percebeu que a maior parte dos casos humanos ocorreu nos sopés dos morros.

No Sudão, a partir de resultados de estudos que utilizaram técnicas de geoprocessamento relacionando LV, fatores ecológicos e pluviométricos, criaram um mapa de risco de se adquirir LV no país (Thomson *et al.*, 1999; Elnaiem *et al.*, 2003). Semelhantemente, no Brasil, Peterson & Shaw (2003) demonstraram a distribuição dos principais vetores de LTA em seu cenário geográfico e climático em um raio de 30 anos.

A partir de dados coletados pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) em

2002, foram realizadas análises de distribuição espaço-temporal da LTA no Brasil, através de técnicas de geoprocessamento e estatística. Oliveira *et al.* (2001) estudaram a distribuição espacial da LV em Belo Horizonte após o georreferenciamento de 11.048 cães positivos e 158 casos humanos no período entre 1994 e 1997. Ainda em Minas Gerais, Margonari *et al.* (2006) estudaram a epidemiologia da LV em Belo Horizonte, através da análise espacial no período de abril de 2001 a março de 2002. Observaram que 84% dos casos de leishmaniose humana se relacionam com casos caninos. Prado (2011) descreveu a distribuição espacial da LV humana e canina na área urbana do município de Montes Claros, no período de 2007 a 2009. Através de mapa de Kernel verificou-se a relação de casos humanos e caninos no período estudado. Estudo semelhante foi realizado, utilizando análise espacial, em Araçatuba, estado de São Paulo, entre 1998-1999. Os autores observaram que a transmissão da LV não foi homogênea no município: a transmissão humana ocorreu nas áreas com maiores taxas de prevalência canina (Camargos-Neves *et al.*, 2001).

Estudos epidemiológicos associados a fatores bioclimáticos vêm contribuindo para o monitoramento e identificação das prioridades e formas efetivas de utilização de tecnologias e conhecimento científico para a prevenção das doenças tropicais. Dessa forma, métodos geocomputacionais demonstram extrema relevância para análise de um grande volume de dados de saúde coletados (Margonari *et al.*, 2006).

4 MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O estudo foi realizado no município de Jaboticatubas, Serra do Cipó, Minas Gerais, que está localizado a 63 km de Belo Horizonte, na Cadeia do Espinhaço e apresenta uma população de 17.134 habitantes, com uma densidade demográfica de 15,37 hab/km² (IBGE, 2010) (Figura 1). O Parque Nacional da Serra do Cipó possui uma área aproximadamente de 33.800 ha em um perímetro de 154 km, enquanto Jaboticatubas apresenta uma área de 1.114 km². Além de Jaboticatubas, também circundam o Parque os municípios de Santana do Riacho, Morro do Pilar, Itambé do Mato Dentro. Segundo Curi (2006), a presença de habitações humanas e animais domésticos dentro do Parque é resultado da situação fundiária, somente 57% da área do total do Parque está regularizada.

O clima da Serra do Cipó é do tipo tropical de altitude com verões frescos e estação seca bem definida. As temperaturas médias anuais ficam em torno de 21, 2º C e apresenta precipitação média anual de 1.622 mm (IBAMA, 2006a). É uma região montanhosa, possui estrutura rochosa de natureza quartzítica e alguns afloramentos de calcário. O solo é predominantemente raso e arenoso permitindo o crescimento de formações vegetais como campos rupestres, matas ciliares e cerrado (Eterovick & Fernandes, 2001). A fauna da região é bastante rica, com alto grau de endemismo, destacando-se insetos e anfíbios, porém ainda é pouco conhecida (IBAMA, 2006b).

Os critérios de inclusão para exposição das armadilhas foram residências com ocorrência de casos humanos de LV ou LTA e residências que possuíam condições favoráveis para a presença do vetor. Com isso foram selecionadas 10 casas, localizadas em oito bairros do município de Jaboticatubas: Sagrada Família, São Tarcísio, Bom Jesus, Bosque dos Coqueiros, Santo Antônio, São Sebastião, Balneário Maré Mansa e Canto da Siriema (Figura 2). As capturas entomológicas foram realizadas no período de maio de 2012 a abril de 2013.



Figura 1: Município de Jaboticatubas, Minas Gerais. Fonte: Google

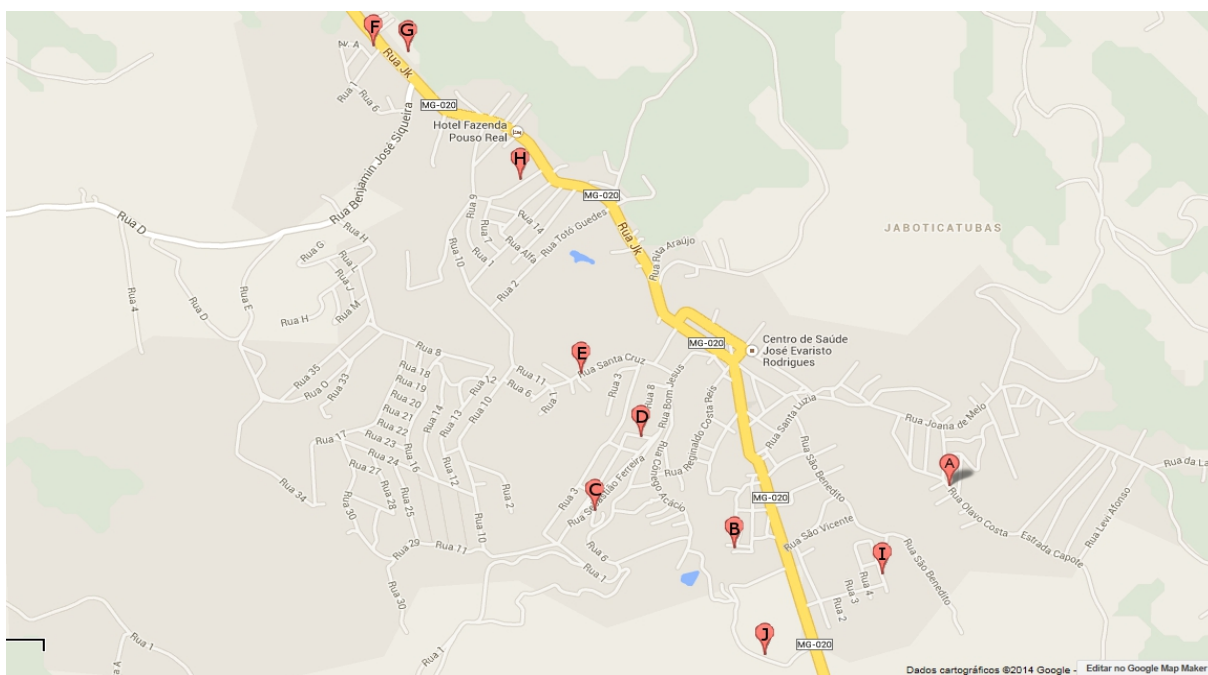


Figura 2: Distribuição espacial dos pontos de captura entomológicos na cidade de Jaboticatubas/MG (A- Sagrada família; B- São Tarcisio; C- Bom Jesus; D- Bosque dos Coqueiros; E- Bom Jesus; F- Santo Antônio; G-Balneário Maré Mansa; H-Santo Antônio; I-São Sebastião; J-Canto da Siriema). Créditos: Ailton Costa.

4.2 Estudo da fauna de flebotomíneos

As capturas entomológicas foram realizadas no peridomicílio com armadilhas luminosas do tipo HP (Pugedo *et al.*, 2005) durante três noites consecutivas por mês, pelo período de um ano, correspondendo a maio de 2012 a abril de 2013. As armadilhas foram colocadas em locais sombreados, próximos a galinheiros e a outros animais domésticos (Figura 3). Os moradores dessas residências estavam de acordo com a pesquisa e assinaram o TCLE (Termo de Consentimento Livre Esclarecido), conforme Anexo 1.

Os machos foram acondicionados em tubos de hemólise contendo álcool 70%, preparados e montados entre lâminas e lamínulas, enquanto as fêmeas foram acondicionadas em “ependorfs” de 1,5 ml contendo dimetil-sulfóxido (DMSO) a 6%, para posterior estudo de infecção natural.

A cabeça e os três últimos segmentos das fêmeas foram dissecados e montados entre lâminas e lamínulas para identificação taxonômica e o restante do corpo do inseto foi utilizado para extração de DNA (item 4.4.1).

Utilizou-se líquido de Berlese para montagem de machos e fêmeas de acordo

com a técnica de Langeron (1949) modificada (Tabela 1). Neste estudo, as fêmeas não passaram pelo processo de clarificação como os machos, uma vez que foram armazenadas com DMSO a 6%.

A identificação dos exemplares foi realizada de acordo com a classificação proposta por Young e Duncan (1994) e comparações com exemplares de referência depositados na Coleção do Laboratório de Leishmanioses/ CPqRR.

Parte do material não nos permitiu chegar à espécie, devido a não integridade de alguns exemplares, sendo então identificados apenas no âmbito genérico.



Figura 3: Exemplos dos ecótopos peridomiciliares onde foram expostas armadilhas entomológicas, no município de Jaboticatubas, Minas Gerais. Créditos: Rosana S. Lana.

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

| Flebotomíneos (machos) | |
|------------------------|--------|
| Potassa 10% | 3 h |
| Ácido acético 10% | 20 min |
| Água destilada | 15 min |
| Água destilada | 15 min |
| Água destilada | 15 min |
| Lactofenol | 24 h |

4.3 Dados climáticos

Para verificar a influência do clima sobre a densidade de flebotomíneos no município, foram utilizados os dados climáticos de temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e pluviosidade (mm³) referentes ao período de maio de 2012 a abril de 2013. As variáveis climáticas foram obtidas junto ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

Foi verificada a oscilação das variáveis climáticas ao longo do ano através do cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação (SDx100/média). Foram considerados os valores das médias mensais para cada uma delas.

4.4 Estudo da Infecção natural dos flebotomíneos

As fêmeas que foram acondicionadas em tubos contendo DMSO a 6% e congeladas a - 20° C, posteriormente foram dissecadas para montagem de “pools” com segmentos do abdômen (conforme supracitado). Cada “pool” foi formado por exemplares da mesma espécie, capturados na mesma residência e no mesmo mês.

4.4.1 Extração de DNA total das fêmeas de flebotomíneos capturadas

As fêmeas, depois de dissecadas e identificadas, foram agrupadas em “pools” de no máximo 10 indivíduos para extração de DNA total. Esta foi realizada através de kit de extração de tecido e células (GE HealthCare) e os DNAs extraídos foram armazenados a - 20° C até a realização de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.4.2 Detecção da taxa de infecção natural dos flebotomíneos por *Leishmania* spp.

As amostras de DNA extraídas dos “pools” de flebotomíneos foram analisadas através da técnica “Nested PCR” (LnPCR) dirigida ao gene SSUrRNA (pequena subunidade ribossomal RNA) de *Leishmania*, que amplifica um fragmento conservado em todas as espécies de *Leishmania* (Van Eys *et al.*,1992; Cruz *et al.*, 2002, 2006).

Inicialmente foi realizada a amplificação de um fragmento de aproximadamente 603pb, utilizando-se os iniciadores R1 (5´ GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG 3´) e R2 (5´ GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG 3´), seguida de amplificação de um fragmento de aproximadamente 353pb, a partir do produto amplificado da primeira reação, utilizando-se os iniciadores R3 (5´ TCC CAT CGC AAC CTC GGT T 3´) e R4 (5´ AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3´), como mostrado na Figura 4.

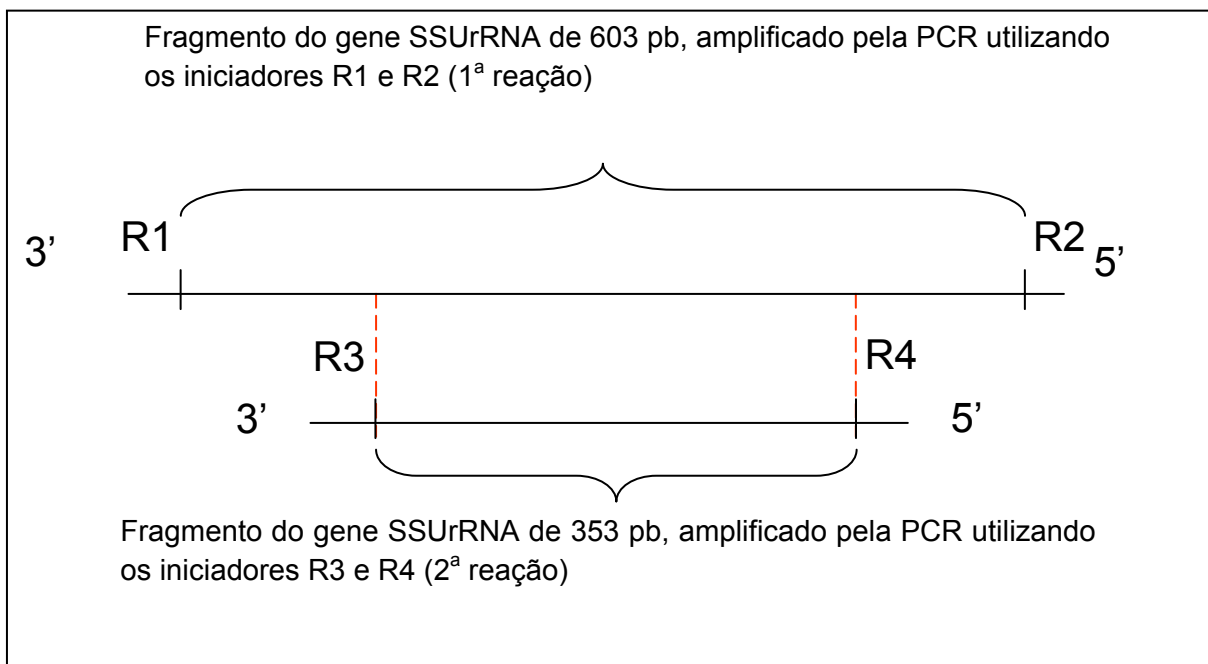


Figura 4: Desenho esquemático do resultado da LnPCR destinada a amplificar um fragmento do gene SSUrRNA de *Leishmania*.

A primeira reação foi preparada para um volume final de 25 µl contendo 10µl de DNA da amostra a ser testada. Em tubos contendo 1 ml de H₂O foram diluídos 25 µl de produto da primeira reação, para serem utilizados como molde na segunda PCR. Esta foi preparada para um volume final de 25 µl contendo 10µl do produto

amplificado diluído. As duas reações foram preparadas utilizando o kit PCR Beads (GE Healthcare).

A amplificação foi processada em termociclador automático, da seguinte forma: desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, para a primeira reação. Na segunda reação a temperatura de anelamento foi elevada para 65°C, mantendo-se as outras condições. A etapa de extensão final foi realizada a 72°C por cinco minutos, para ambas as reações.

Em todas as reações utilizou-se 20 ng de DNA extraído de cultura de *Le. chagasi* = *Le. infantum*, como controle positivo. Como controle negativo (sem DNA) a amostra de DNA foi substituída por volume equivalente de H₂O destilada estéril.

4.4.3 Análise dos produtos amplificados pela PCR

Os produtos amplificados na etapa anterior foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e examinado em exposição à luz ultravioleta (UV) (Sambrook, 1989).

4.4.4 Sequenciamento SSUrRNA para determinação da espécie de *Leishmania*

Para a identificação das espécies de *Leishmania* presentes no vetor foi realizado o seqüenciamento do produto de aproximadamente 353pb, amplificado na segunda reação da LnPCR. Para isso, todas as bandas correspondentes, com intensidade considerável, foram extraídas do gel e purificadas utilizando o kit comercial QIAquick PCR Purification (QIAGEN), de acordo com as especificações do fabricante. O produto purificado foi eluído em 20 µl de H₂O destilada estéril e utilizado como molde para amplificação anterior ao processo de seqüenciamento.

A reação de PCR para o sequenciamento foi preparada para um volume final de 10 µl, formados por 4 µl do PREMIX (BigDye® Terminator v3.1 Cycle), 1 µl do iniciador R3 e R4 na concentração de 3,2 pmol e 5 µl do produto purificado na etapa

anterior. A mistura foi amplificada em um termociclador Eppendorf Master Cycler Gradient® com o seguinte programa: 94°C por três minutos, seguido de 25 ciclos de 96°C por um segundo, 65°C por 5 segundos e 60°C por quatro minutos. O seqüenciamento propriamente dito foi realizado, posteriormente, em seqüenciador automatizado Megabace.

A análise bioinformática (edição e alinhamento) das seqüências obtidas foi realizada utilizando-se o programa computacional BIOEDIT. As seqüências editadas foram alinhadas com seqüências depositadas no GenBank para *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*.

4.4.5 Cálculo da taxa mínima de infecção natural

Por estarem acondicionados em “pools”, a taxa mínima de infecção natural (TMI) para a espécie de flebotomíneo foi calculada pela seguinte fórmula (Paiva *et al.*, 2006):

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

4.5 Inquérito canino censitário

4.5.1 Coleta de amostras de sangue

Foram avaliados todos os cães domiciliados pertencentes à área urbana de Jaboticatubas para levantamento da infecção canina do município. Foram visitadas todas as casas do município e aquelas que estavam fechadas, foram novamente visitadas em um segundo momento na tentativa de encontrar o cão para coleta de sangue. Se em duas tentativas ainda não se encontrasse o morador, a casa era descartada do inquérito.

Os cães foram submetidos a exames clínicos para coleta de amostras de sangue por veterinários da Universidade Federal de Minas Gerais e da Secretaria Municipal de Saúde de Jaboticatubas. O sangue foi obtido através de coleta de

sangue da veia radial do cão. Cada amostra foi devidamente identificada, e junto com ela foi preenchida uma ficha clínico-epidemiológica com informações referentes ao estado clínico do animal e os seguintes dados: proprietário, endereço, nome do cão, código da amostra, sexo, raça, idade, tamanho do pêlo, porte e se foi vacinado contra raiva (Anexo 2).

Após a coleta de sangue total, este foi acondicionado em caixa térmica para posterior centrifugação, e obtenção de soro, no laboratório da prefeitura de Jaboticatubas. Os soros obtidos foram encaminhados para o laboratório da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), onde foram realizados os testes sorológicos.

4.6 Diagnóstico sorológico

Foi utilizado o seguinte protocolo para o diagnóstico sorológico da LVC: 1) Teste de Triagem: TR DPP (Bio-Manguinhos) - Teste imunocromatográfico de uso único para detecção, em cães, de anticorpos específicos para *Leishmania*, em soro, plasma ou sangue total. 2) Teste Confirmatório: EIE® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (Bio-Manguinhos) - Ensaio imunoenzimático ELISA - utilizado na detecção de anticorpos contra *Leishmania major* like, em soros ou plasma de cães. O resultado foi obtido através da visualização da alteração de cor com o auxílio de equipamentos mensuradores de absorbância. A execução de ambos os testes foi realizada por profissionais devidamente qualificados.

Em seguida foi realizada a eutanásia de uma amostra aleatória de 11 cães sorologicamente reativos nos dois testes. Os proprietários dos cães assinaram um termo de autorização para eutanásia dos animais (Anexo 3).

4.7 Diagnóstico parasitológico direto

4.7.1 Cultura

Para o isolamento e manutenção das cepas de *Leishmania* foram semeadas amostras de liquor medular em meio de cultura ágar sangue de Novy & McNeal modificado por Nicolle - NNN/LIT, para o crescimento dos parasitos. As culturas foram examinadas a cada sete dias e feitos repiques para a manutenção das cepas.

4.7.2 Aposições em lâminas de biópsias (“imprints”) obtidas de cães soropositivos

Foram confeccionadas lâminas a partir de biópsia de pele e medula óssea dos cães soropositivos para análise em microscópio óptico, utilizando aumento de 100x. Para cada cão eutanasiado, foi realizado um esfregaço da medula sobre uma área equivalente a uma aposição da biópsia da lâmina, sendo esta operação repetida em mais duas áreas da lâmina. A área foi fixada com metanol e corada com Giemsa. O mesmo procedimento foi realizado com tecido de pele dos cães soropositivos. Em seguida, o material (medula e pele) foi transferido para tubos “ependorfs” devidamente etiquetado, para extração de DNA e diagnóstico molecular. As lâminas foram estocadas em uma caixa para posterior análise microscópica.

4.7.3 PCR para *Leishmania* spp. em tecidos de cães soropositivos

A PCR foi realizada com o objetivo de confirmar os resultados da sorologia. As amostras de DNA extraídas a partir de aposições de biópsias de pele e medula óssea dos cães soropositivos foram analisadas através da técnica “Nested PCR” (LnPCR) dirigida ao gene SSUrRNA de *Leishmania*, que amplifica um fragmento conservado em todas as espécies de *Leishmania* (Van Eys *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 2002, 2006). A mesma técnica utilizada para amplificação de DNA de flebotomíneos. Foi modificado apenas o kit de extração, nesse caso utilizado o kit de extração de sangue (GE HealthCare) e os DNAs extraídos foram armazenados a -20° C até a realização de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Em cada conjunto de reação de PCR foi incluído um controle negativo e um controle positivo. Como controle negativo da reação, foi utilizado um tubo que continha o mix (solução tampão, iniciadores, dNTPs, DNA polimerase, H₂O destilada estéril) exceto o DNA e no controle positivo, foi adicionado DNA purificado da cepa referência de *Le. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903).

Os produtos amplificados pelo LnPCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e examinado em

exposição à luz UV, da mesma forma realizada com DNA de flebotomíneos

Os resultados do diagnóstico foram transferidos para a ficha epidemiológica e remetidos para o Centro de Pesquisas René Rachou e inseridos em um banco de dados (Anexo 3).

4.8 Georreferenciamento dos casos humanos, caninos e pontos de coletas entomológicas

Todos os cães sorologicamente reagentes, nos dois testes, foram georreferenciados, bem como todos os pontos de capturas entomológicas, coincidentes com os casos humanos de LV e LTA ocorridos nos últimos seis anos (2008 a 2013) de acordo com dados da prefeitura de Jaboticatubas.

Os dados geoespaciais foram obtidos utilizando um GPS, modelo GARMIM-ETREX, e transferidos para o programa ArcGIS 9.3 (ESRI, Redlands, California, USA) juntamente com a extensão de Análise Espacial para produção dos mapas de densidade de infecção segundo estimador de Kernel.

4.8.1 Cálculo da taxa de infecção canina

Para a medida da frequência da leishmaniose visceral canina no município de Jaboticatubas foi calculada a taxa de prevalência, segundo a fórmula:

$$\text{Taxa de prevalência canina} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de casos existentes no período} \times 100}{\text{População no período}}$$

5 RESULTADOS

5.1 Flebotomíneos

5.1.1 Fauna

Durante o período de maio de 2012 a abril de 2013 foram coletados 3.104 espécimes distribuídas em dois gêneros (*Brumptomyia* e *Lutzomyia*), sendo 17 espécies do gênero *Lutzomyia*: *Lu. sallesi* (Galvão & Coutinho, 1939) e *Lu. cortelezzii* (Brèthes, 1923) que foram consideradas complexo *cortelezzii* (Galati *et al.*, 1989), *Lu. aragaoi* (Costa Lima, 1932), *Lu. evandroi* (Costa Lima & Antunes, 1936), *Lu. fischeri* (Pinto, 1926), *Lu. intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), *Lu. lenti* (Mangabeira, 1938), *Lu. lloydi* (Antunes, 1937), *Lu. longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *Lu. lutziana* (Costa Lima, 1932), *Lu. migonei* (França, 1920), *Lu. pessoai* (Coutinho & Barretto, 1940), *Lu. quinquefer* (Dyar, 1929), *Lu. renei* (Martins, Falcão & Silva, 1957), *Lu. sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927), *Lu. termitophila* (Martins, Falcão & Silva, 1964) e *Lu. whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) (Tabela 2). No complexo *cortelezzii* estão incluídas as espécies *Lu. sallesi* (Galvão & Coutinho, 1939) e *Lu. cortelezzii* (Brèthes, 1923), uma vez que as fêmeas dessas espécies são morfologicamente indistinguíveis e, portanto, foram consideradas como complexo. As espécies do gênero *Brumptomyia* (França e Parrot, 1921) também só foram identificadas no âmbito genérico devido a grande semelhança morfológica das fêmeas.

A Tabela 2 mostra a diversidade de espécies de flebotomíneos encontradas no município bem como a quantidade capturada por sexo, sendo que do total de 3.104 espécimes capturados 941 foram fêmeas (30,32%) e 2.163 machos (69,68%). As principais espécies de importância médica e mais numerosas capturadas foram *Lu. intermedia* (14,60%), *Lu. longipalpis* (7,96%) e *Lu. whitmani* (33,80%) e estão representadas na Figura 5. A espécie *Lu. pessoai* não foi considerada importante do ponto de vista médico porque ainda necessitam de mais estudos a respeito desta espécie como vetora de parasitos das leishmnioses.

Tabela 2: Espécies de flebotomíneos capturados no município de Jaboticatubas, no período de maio de 2012 a abril de 2013, utilizando armadilha luminosa HP.

| Espécies | Machos | Fêmeas | Total | % |
|-------------------------------|----------------------|--------------------|--------------|--------------|
| <i>Brumptomyia</i> sp. | - | 2 | 2 | 0,06% |
| Complexo <i>cortelezzii</i> | 76 | 105 | 181 | 5,80 |
| <i>Lutzomyia aragaoi</i> | 1 | 1 | 2 | 0,06 |
| <i>Lu. evandroi</i> | - | 1 | 1 | 0,03 |
| <i>Lu. fischeri</i> | 1 | 1 | 2 | 0,06 |
| <i>Lu. intermedia</i> | 376 | 77 | 453 | 14,60 |
| <i>Lu. lenti</i> | 482 | 260 | 742 | 23,90 |
| <i>Lu. lloydi</i> | - | 1 | 1 | 0,03 |
| <i>Lu. longipalpis</i> | 197 | 50 | 247 | 7,96 |
| <i>Lu. lutziana</i> | 2 | 4 | 6 | 0,19 |
| <i>L. migonei</i> | 31 | 5 | 36 | 1,16 |
| <i>Lu. pessoai</i> | 194 | 76 | 270 | 8,70 |
| <i>Lu. quinquefer</i> | 1 | - | 1 | 0,03 |
| <i>Lu. renei</i> | - | 2 | 2 | 0,06 |
| <i>Lu. sordellii</i> | 4 | 28 | 32 | 1,03 |
| <i>Lu. termitophila</i> | 1 | 7 | 8 | 0,26 |
| <i>Lu. whitmani</i> | 785 | 264 | 1049 | 33,80 |
| <i>Lutzomyia</i> spp. | 12 | 57 | 69 | 2,22 |
| Total (%) | 2163 (69,68%) | 941(30,32%) | 3104 | 100 |

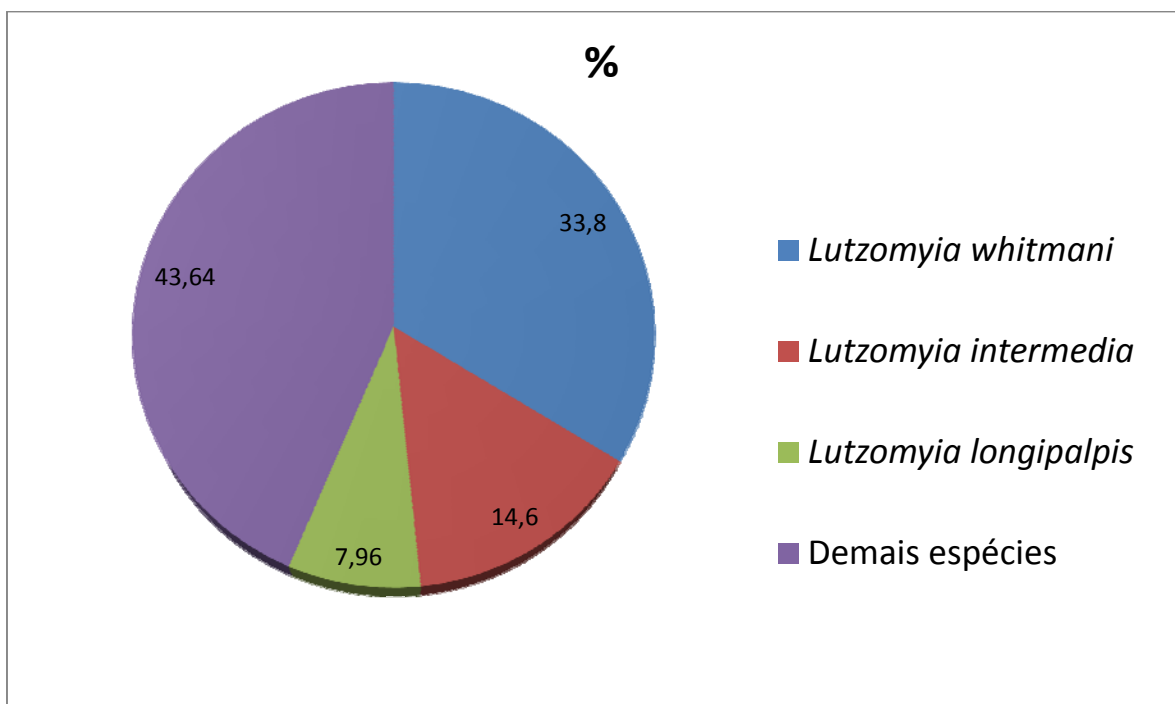


Figura 5: Porcentagem das principais espécies de importância médica e mais numerosas capturadas em relação às demais espécies capturadas no município de Jaboticatubas, no período de maio de 2012 a abril de 2013, utilizando armadilha luminosa HP.

O maior número de flebotomíneos capturados foi observado no mês de dezembro, com 1.118 exemplares (36,02%) e nos bairros Canto da Siriema, com 529 (47,32%) exemplares, Balneário Maré Mansa com 256 (22,90%) e Bosque dos Coqueiros, com 238 (21,29%), totalizando mais de 91% de espécimes capturados nesses três bairros (Tabela 3).

Considerando todo o período estudado, de modo geral, os bairros Balneário Maré Mansa e Canto da Siriema foram os que apresentaram o maior número de exemplares capturados, com 1.180 e 1.053 espécimes, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Número de flebotomíneos capturados no município de Jaboticatubas, porm mês e bairro no período de maio de 2012 a abril de 2013, utilizando armadilha luminosa HP.

| Ano | Mês | Balneário Maré Mansa | Bom Jesus | Bosque dos Coqueiros | Canto da Siriema | Sagrada Família | Santo Antônio | São Sebastião | São Tarcísio | Total |
|--------------|------------|----------------------------|--------------|----------------------------|------------------------|--------------------|------------------|------------------|-----------------|-------------|
| | Mai | 13 | - | 25 | 31 | - | 6 | - | - | 75 |
| | Jun | 51 | 1 | 5 | 21 | - | 13 | 1 | - | 92 |
| | Jul | 55 | - | 12 | 44 | - | 8 | 5 | - | 124 |
| | Ago | 18 | 4 | 21 | 16 | 1 | 7 | 3 | 1 | 71 |
| 2012 | Set | 87 | 2 | 20 | 5 | 8 | 1 | 1 | - | 124 |
| | Out | 148 | 4 | 11 | 22 | 13 | 12 | 7 | 4 | 221 |
| | Nov | 355 | 1 | 70 | 30 | 12 | 12 | 10 | 53 | 543 |
| | Dez | 256 | 11 | 238 | 529 | 17 | 19 | 7 | 41 | 1118 |
| | Jan | 61 | 8 | 7 | 51 | 9 | 10 | 6 | 8 | 160 |
| | Fev | - | 12 | 6 | 196 | 1 | 6 | 3 | 7 | 231 |
| 2013 | Mar | 115 | 16 | 3 | 69 | 7 | 11 | 1 | 11 | 233 |
| | Abr | 21 | 8 | 11 | 39 | 1 | 9 | - | 23 | 112 |
| Total | | 1180 | 67 | 429 | 1053 | 69 | 114 | 44 | 148 | 3104 |

A relação de flebotomíneos coletados mensalmente, de acordo com a espécie está representada na Tabela 4. As espécies consideradas de importância médica neste estudo foram capturadas em todos os meses de estudo, sendo *Lu. whitmani* a espécie predominante, totalizando 1.049 exemplares.

A relação de flebotomíneos capturados por bairros de acordo com a espécie pode ser visualizada na Tabela 5, onde mostra que em todos os bairros de estudo foram capturados *Lu. longipalpis* e *Lu. whitmani*. O único bairro que não foi capturado *Lu. intermedia* no período estudado foi o Sagrada Família.

Tabela 4: Espécies de flebotomíneos capturados por mês no período de maio de 2012 a abril de 2013, no município de Jaboticatubas, utilizando armadilha luminosa HP.

| Ano | Mês | <i>Brumptomyia</i> sp. | Complexo <i>cortezzii</i> | <i>Lutzomyia aragaoi</i> | <i>Lu. evandroi</i> | <i>Lu. fischeri</i> | <i>Lu. intermedia</i> | <i>Lu. lenti</i> | <i>Lu. lloydi</i> | <i>Lu. longipalpis</i> | <i>Lu. lutziana</i> | <i>Lu. migonei</i> | <i>Lu. pessoai</i> | <i>Lu. quinquefer</i> | <i>Lu. renei</i> | <i>Lu. sordellii</i> | <i>Lu. termitophila</i> | <i>Lu. whitmani</i> | <i>Lutzomyia</i> spp. | Total |
|-------|-----|------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|------------------|-------------------|------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|-------|
| | Mai | 1 | 2 | - | - | - | 7 | 3 | 1 | 5 | - | - | 1 | - | - | - | - | 51 | 4 | 75 |
| | Jun | - | 7 | - | - | - | 32 | - | - | 7 | 1 | 1 | 8 | - | - | - | - | 35 | 1 | 92 |
| | Jul | - | 7 | - | - | - | 46 | 1 | - | 13 | - | - | 2 | - | - | - | - | 52 | 3 | 124 |
| | Ago | - | 4 | - | - | - | 7 | 2 | - | 22 | 1 | - | 3 | - | 1 | - | - | 27 | 4 | 71 |
| 2012 | Set | - | 4 | - | - | - | 20 | 1 | - | 23 | 1 | - | 2 | - | 1 | 1 | - | 68 | 3 | 124 |
| | Out | - | 33 | - | - | - | 35 | 12 | - | 2 | 1 | 2 | 22 | - | - | 1 | 1 | 107 | 5 | 221 |
| | Nov | 1 | 50 | - | - | 2 | 120 | 21 | - | 53 | - | 9 | 79 | - | - | 3 | - | 199 | 6 | 543 |
| | Dez | - | 41 | - | 1 | - | 111 | 484 | - | 69 | 1 | 13 | 91 | 1 | - | 10 | 4 | 271 | 24 | 1118 |
| | Jan | - | 11 | 1 | - | - | 17 | 28 | - | 13 | - | 6 | 19 | - | - | 13 | 1 | 50 | 1 | 160 |
| | Fev | - | 4 | - | - | - | 3 | 122 | - | 20 | - | - | 6 | - | - | - | 1 | 69 | 6 | 231 |
| 2013 | Mar | - | 13 | - | - | - | 40 | 65 | - | 9 | - | 3 | 36 | - | - | 4 | 1 | 57 | 5 | 233 |
| | Abr | - | 5 | 1 | - | - | 15 | 3 | - | 15 | 1 | 2 | 1 | - | - | - | - | 63 | 6 | 112 |
| Total | | 2 | 181 | 2 | 1 | 2 | 453 | 742 | 1 | 247 | 6 | 36 | 270 | 1 | 2 | 32 | 8 | 1049 | 69 | 3104 |

Tabela 5: Espécies de flebotomíneos capturados por bairro, no período de maio de 2012 a abril de 2013, no município de Jaboticatubas, utilizando armadilha luminosa HP (B. Maré Mansa= Balneário Maré Mansa).

| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Espécies Bairros </div> | B. Maré Mansa | Bom Jesus | Bosque dos Coqueiros | Canto da Siriema | Sagrada Família | Santo Antônio | São Sebastião | São Tarcísio | Total |
|--|---------------|-----------|----------------------|------------------|-----------------|---------------|---------------|--------------|-------------|
| <i>Brumptomyia</i> sp. | - | - | 2 | - | - | - | - | - | 2 |
| complexo <i>cortelezzii</i> | 8 | 18 | 42 | 3 | 23 | 41 | 18 | 28 | 181 |
| <i>Lutzomyia aragaoi</i> | - | - | - | - | - | 1 | - | 1 | 2 |
| <i>Lu. evandroi</i> | - | - | - | 1 | - | - | - | - | 1 |
| <i>Lu. fischeri</i> | 2 | - | - | - | - | - | - | - | 2 |
| <i>Lu. intermedia</i> | 421 | 1 | 1 | 10 | - | 1 | 1 | 18 | 453 |
| <i>Lu. lenti</i> | 7 | 8 | 167 | 511 | 16 | 16 | 12 | 5 | 742 |
| <i>Lu. lloydi</i> | - | - | - | 1 | - | - | - | - | 1 |
| <i>Lu. longipalpis</i> | 5 | 20 | 163 | 17 | 9 | 12 | 9 | 12 | 247 |
| <i>Lu. lutziana</i> | 1 | - | - | 3 | 1 | 1 | - | - | 6 |
| <i>Lu. migonei</i> | 10 | - | 1 | - | - | - | - | 25 | 36 |
| <i>Lu. pessoai</i> | 235 | 1 | 1 | 22 | - | - | - | 11 | 270 |
| <i>Lu. quinquefer</i> | - | - | - | - | 1 | - | - | - | 1 |
| <i>Lu. renei</i> | 1 | - | - | - | - | 1 | - | - | 2 |
| <i>Lu. sordellii</i> | 4 | 6 | - | 4 | 12 | 3 | - | 3 | 32 |
| <i>L. termitophila</i> | - | - | - | 8 | - | - | - | - | 8 |
| <i>L. whitmani</i> | 468 | 11 | 41 | 444 | 4 | 36 | 3 | 42 | 1049 |
| <i>Lutzomyia</i> spp. | 18 | 2 | 11 | 29 | 3 | 2 | 1 | 3 | 69 |
| Total | 1180 | 67 | 429 | 1053 | 69 | 114 | 44 | 148 | 3104 |

5.1.2 Influência das variáveis climáticas na população de flebotomíneos

A oscilação das variáveis climáticas: precipitação, temperatura e umidade ao longo do ano bem como a média, desvio-padrão e coeficiente de variação estão representadas na Tabela 6.

Tabela 6: Variáveis climáticas mensais no município de Jaboticatubas, MG, entre os meses de maio de 2012 a abril de 2013.

| Mês | Precipitação total (mm) | Temp Compensada Média (°C) | Umidade Relativa Média (%) |
|------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| maio | 61,1 | 19,6 | 67,8 |
| junho | 17,0 | 20,6 | 64,7 |
| julho | 0,0 | 19,9 | 54,3 |
| agosto | 0,0 | 19,4 | 55,5 |
| setembro | 22,8 | 22,4 | 49,3 |
| outubro | 32,1 | 23,9 | 50,9 |
| novembro | 310,0 | 22,7 | 69,6 |
| dezembro | 143,0 | 25,2 | 60,4 |
| janeiro | 426,8 | 23,1 | 72,2 |
| fevereiro | 75,4 | 24,5 | 59,5 |
| março | 127,9 | 23,4 | 68,9 |
| abril | 99,4 | 21,3 | 67,8 |
| Média | 109,625 | 22,1 | 61,7 |
| SD | 132,1 | 1,9 | 7,5 |
| CV (%) | 120,5 | 8,6 | 12,2 |

A temperatura teve pouca oscilação, com coeficiente de variação (CV) inferior a 10%. Já a umidade teve CV em torno de 12%, que também é baixo e resulta diretamente da pluviometria.

Para facilitar a análise, foi feito um delineamento de estações (quente e seca, quente e úmida, fria e seca, e fria e úmida), utilizando-se quadrantes, tomando como referência as médias de cada variável (Figuras 6, 7 e 8).

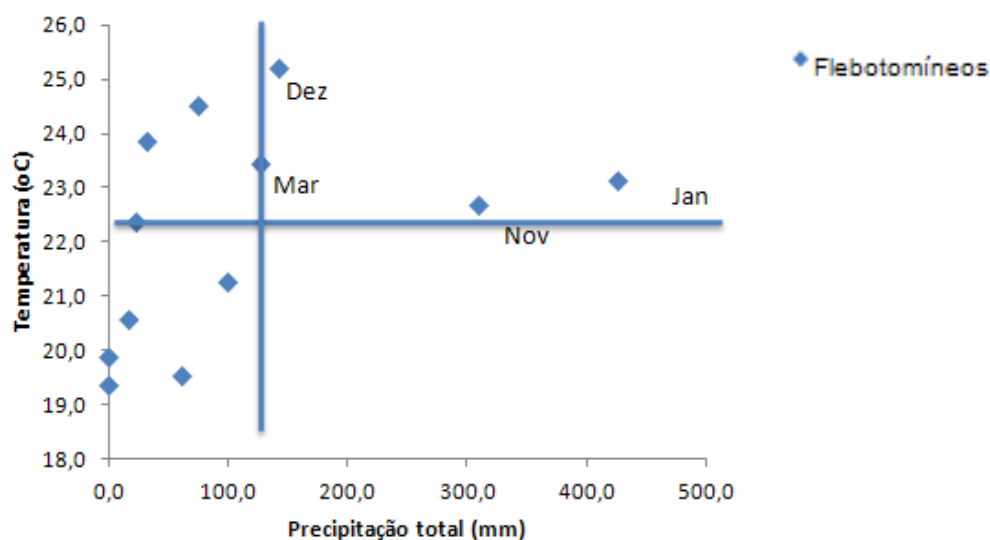


Figura 6: Número mensal de flebotomíneos coletados em relação às variáveis climáticas (temperatura e precipitação), no período de maio de 2012 a abril de 2013, no município de Jaboticatubas, MG.

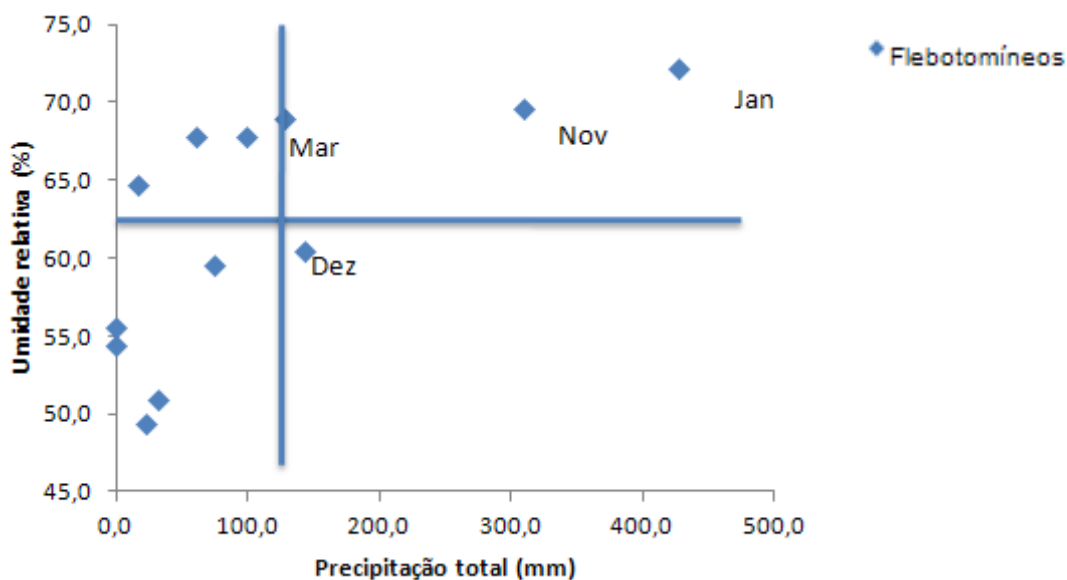


Figura 7: Número mensal de flebotomíneos coletados em relação às variáveis climáticas (umidade e precipitação), no período de maio de 2012 a abril de 2013, no município de Jaboticatubas, MG.

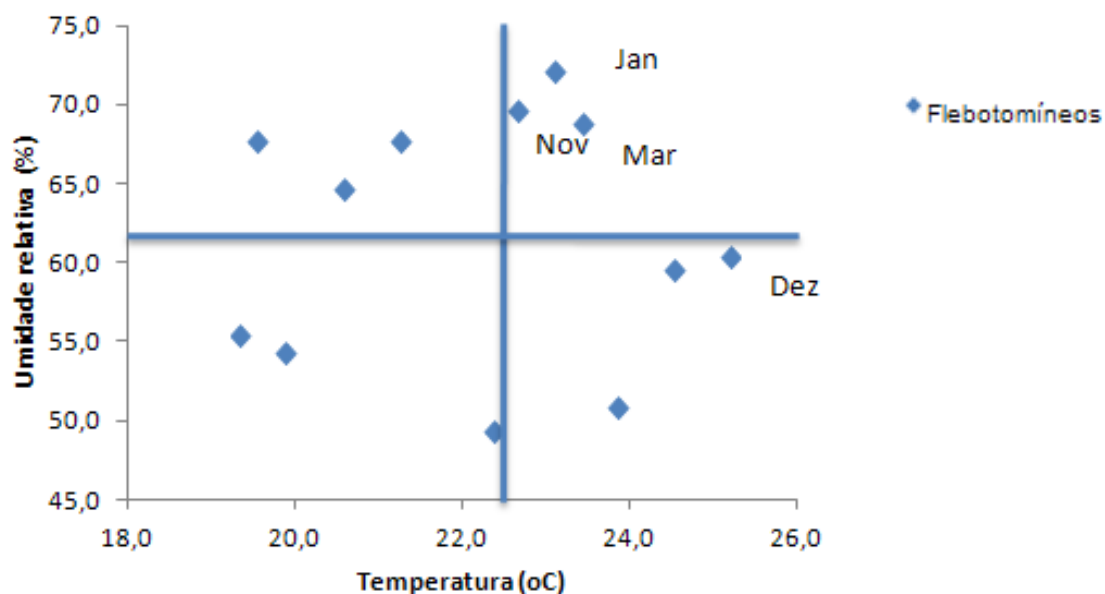


Figura 8: Número mensal de flebotomíneos coletados em relação às variáveis climáticas (umidade e temperatura), no período de maio de 2012 a abril de 2013, no município de Jaboticatubas, MG.

De uma forma geral, observa-se que os meses com captura de um maior número de flebotomíneos agrupam-se em um mesmo quadrante.

Já as chuvas tiveram grande variação ao longo do ano e, conhecendo que essa variável tem mesmo grande influência sobre a população de flebotomíneos, foi feita a análise mais detalhada dessa variável.

Para facilitar a comparação entre chuva e flebotomíneos, que tinham escalas numéricas diferentes, os dados foram normalizados, tomando o total anual tanto de chuva quanto de insetos como 100% (Tabela 7).

Tabela 7: Normalização dos dados mensais de pluviometria e flebotomíneos capturados em Jaboticatubas, MG, no período de maio de 2012 a abril de 2013.

| Mês | Precipitação | | Flebotomíneos | |
|-----------|--------------|------------------|------------------|------------------|
| | Total | % do total anual | Número capturado | % do total anual |
| maio | 61,1 | 4,6 | 75 | 2,4 |
| junho | 17,0 | 1,3 | 92 | 3,0 |
| julho | 0,0 | 0,0 | 124 | 4,0 |
| agosto | 0,0 | 0,0 | 71 | 2,3 |
| setembro | 22,8 | 1,7 | 124 | 4,0 |
| outubro | 32,1 | 2,4 | 221 | 7,1 |
| novembro | 310,0 | 23,6 | 543 | 17,5 |
| dezembro | 143,0 | 10,9 | 1118 | 36,0 |
| janeiro | 426,8 | 32,4 | 160 | 5,2 |
| fevereiro | 75,4 | 5,7 | 231 | 7,4 |
| março | 127,9 | 9,7 | 233 | 7,5 |
| abril | 99,4 | 7,6 | 112 | 3,6 |

Assim, o total de chuva no ano foi de 1315.5 mm³. No mês de maio, a precipitação correspondeu a 4,6% do total que choveu no ano (61.1 x100/1315.5). Da mesma forma nesse mês, o número de flebotomíneos correspondeu a 2.4 do total capturado no ano.

A associação entre a pluviometria e o número de flebotomíneos capturados, após normalização dos dados está mostrada na Figura 9.

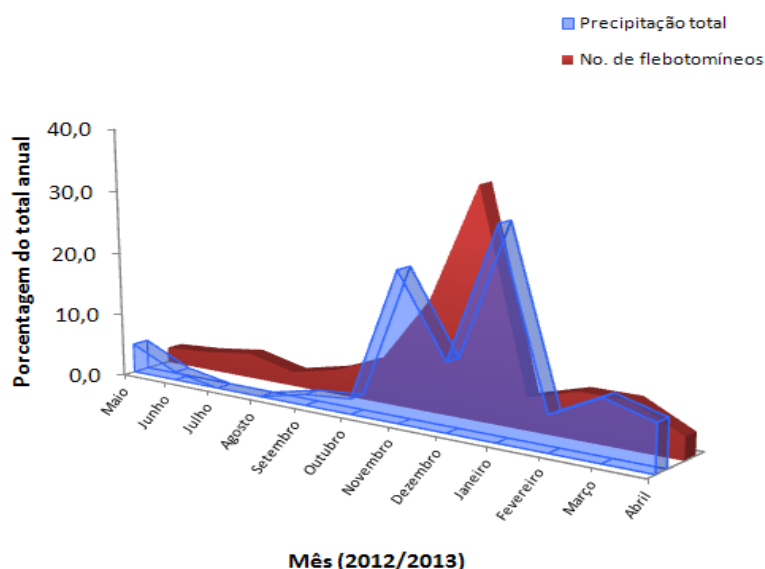


Figura 9: Número mensal de flebotomíneos coletados em relação à precipitação, no período de maio de 2012 a abril de 2013, no município de Jaboticatubas, MG.

No período estudado, a população de flebotomíneos se mostrou mais elevada durante a estação chuvosa, entre os meses de novembro a março, correspondendo a 73,61% dos espécimes capturados. O mês de dezembro correspondeu ao maior número de espécimes coletados, 36,02%.

5.1.3 Estudo da infecção natural de flebotomíneos

Para a verificação da infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* foram capturadas 941 fêmeas, sendo distribuídas em 249 “pools”. Os “pools” formados variaram de 1 a 10 espécimes (item 4.4).

As amostras foram analisadas através da PCR dirigida ao gene SSUrRNA de *Leishmania* para amplificação de um fragmento de aproximadamente 603pb, seguida da Nested PCR, que amplifica um fragmento de aproximadamente 353pb, característico do gênero *Leishmania* spp. a partir do produto amplificado da primeira reação. Amostras de produtos de amplificação de DNA de flebotomíneos em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo podem ser visualizadas na Figura 10.

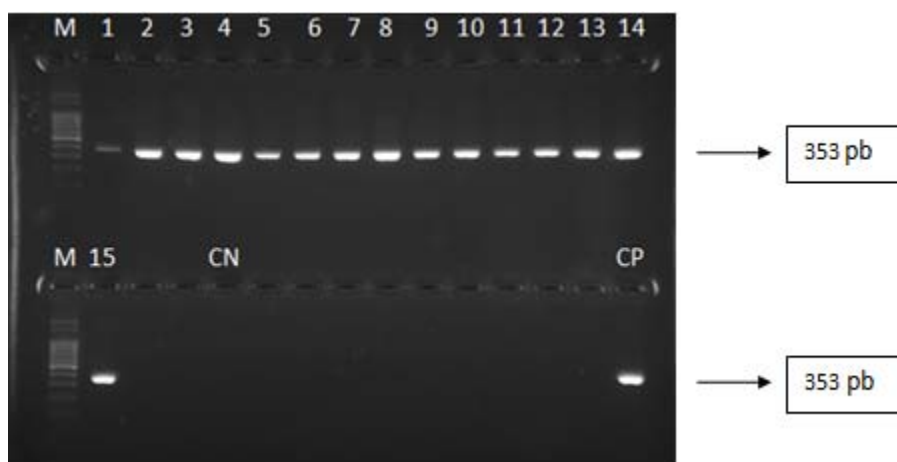


Figura 10: Exemplos de amostras de produtos de amplificação de DNA de flebotomíneos obtidos com iniciadores para o gene SSUrRNA da PCR R3R4 (353 pb) visualizados após gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídeo. Canaletas: M- marcador. **1 a 15-** Amostras positivas de DNA de *Leishmania* spp. **CN-** Controle negativo (sem DNA). **CP-** Controle positivo: *Leishmania chagasi*.

Foi detectada a infecção natural em 32 “pools” de flebotomíneos, correspondentes às espécies do Complexo *cortelezzii* (11), *Lu. intermedia* (2), *Lu. lenti* (4), *Lu. longipalpis* (6), *Lu. migonei* (1), *Lu. pessoai* (4), *Lu. sordellii* (1), *Lu. whitmani* (3). Desses, 12 “pools” correspondem a espécies já conhecidas de importância médica: *Lu. intermedia* com dois “pools”, *Lu. longipalpis* com seis, *Lu. migonei* com um “pool”, *Lu. whitmani* com três, ficando a taxa de infecção natural para *Leishmania* em 2,60%, 12,0%, 20%, 1,14%, respectivamente. A taxa de infecção geral ficou em 3,40% (Tabela 8).

Tabela 8: Fêmeas de flebotomíneos capturadas com armadilha luminosa tipo HP, nos meses de maio de 2012 a abril de 2013 (fêmeas capturadas, número de “pools” e número de “pools” positivos, taxa mínima de infecção natural - TMI) no município de Jaboticatubas, MG.

| Espécies | Nº fêmeas | Nº "pools" | Nº "pools" positivos | TMI(%) |
|-----------------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|---------------|
| <i>Brumptomyia</i> sp. | 2 | 2 | 0 | 0 |
| complexo <i>cortelezzii</i> | 105 | 52 | 11 | 10,48 |
| <i>Lutzomyia aragaoi</i> | 1 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Lu. evandroi</i> | 1 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Lu. fisheri</i> | 1 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Lu. intermedia</i> | 77 | 20 | 2 | 2,6 |
| <i>Lu. lenti</i> | 260 | 43 | 4 | 1,54 |
| <i>Lu. longipalpis</i> | 50 | 25 | 6 | 12 |
| <i>Lu. lloydi</i> | 1 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Lu. lutziana</i> | 4 | 4 | 0 | 0 |
| <i>Lu. migonei</i> | 5 | 5 | 1 | 20 |
| <i>Lu. pessoai</i> | 76 | 19 | 4 | 5,26 |
| <i>Lu. renei</i> | 2 | 2 | 0 | 0 |
| <i>Lu. sordellii</i> | 28 | 15 | 1 | 3,57 |
| <i>Lu. termitophila</i> | 7 | 4 | 0 | 0 |
| <i>Lu. whitmani</i> | 264 | 54 | 3 | 1,14 |
| <i>Lutzomyia</i> spp. | 57 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 941 | 249 | 32 | 3,40 |

Através do alinhamento das sequências de DNA encontradas nas amostras positivas para *Leishmania* spp. de flebotomíneos foi realizada a caracterização da espécie de *Leishmania* spp.. No Anexo 4 pode ser visualizado o alinhamento de todas as sequências de DNA.

A espécie *Le. chagasi* estava presente em sete “pools”, sendo dois deles do complexo *cortelezzii*; e em um “pool” de cada uma das seguintes espécies: *Lu. lenti*, *Lu. longipalpis*, *Lu. migonei*, *Lu. pessoai*, *Lu. whitmani*. Já a espécie *Le. braziliensis* esteve presente em 21 “pools”, divididos entre as espécies do complexo *cortelezzii*, *Lu. intermedia*, *Lu. lenti*, *Lu. longipalpis*, *Lu. pessoai*, *Lu. sordellii* e *Lu. whitmani*. A espécie do Complexo *cortelezzii* foi a que apresentou maior número de “pools” apresentando *Le. braziliensis* (8). Não foi possível realizar a caracterização da espécie de *Leishmania* spp. em quatro “pools”, provavelmente no processo de purificação de DNA obteve-se pouca quantidade de DNA dessas amostras ou houve degradação de DNA. O encontro de flebotomíneos infectados foi observado em todos os bairros estudados (Tabela 9).

Tabela 9: Amostras de “pools” positivos para *Leishmania chagasi* e *Le. braziliensis* de acordo com a espécie de flebotômíneo e bairro de captura no período de maio de 2012 a abril de 2013, no município de Jaboticatubas, MG.

| Amostras | Vetores | Agentes etiológicos | Bairros |
|-----------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------|
| 52 | <i>Lu. pessoai</i> | <i>Le. chagasi</i> | Balneário Maré Mansa |
| 104 | Complexo <i>cortelezzii</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Sagrada Família |
| 106 | <i>Lu. intermedia</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Balneário Maré Mansa |
| 107 | Complexo <i>cortelezzii</i> | <i>Le. chagasi</i> | Santo Antônio |
| 108 | <i>Lu. pessoai</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Balneário Maré Mansa |
| 109 | <i>Lu. migonei</i> | <i>Le. chagasi</i> | Bosque dos Coqueiros |
| 110 | Complexo <i>cortelezzii</i> | <i>Le. braziliensis</i> | São Sebastião |
| 111 | <i>Lu. whitmani</i> | <i>Le. chagasi</i> | São Tarcísio |
| 112 | <i>Lu. lenti</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Canto da Siriema |
| 113 | <i>Lu. intermedia</i> | <i>Le. braziliensis</i> | São Tarcísio |
| 114 | <i>Lu. longipalpis</i> | <i>Le. chagasi</i> | Bom Jesus |
| 115 | Complexo <i>cortelezzii</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Santo Antônio |
| 117 | Complexo <i>cortelezzii</i> | <i>Le. chagasi</i> | Bom Jesus |
| 125 | <i>Lu. lenti</i> | <i>Le. chagasi</i> | Canto da Siriema |
| 126 | <i>Lu. lenti</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Canto da Siriema |
| 128 | <i>Lu. lenti</i> | Não seqüenciado | Bosque dos Coqueiros |
| 135 | <i>Lu. longipalpis</i> | Não seqüenciado | Bosque dos Coqueiros |
| 137 | <i>Lu. whitmani</i> | Não seqüenciado | Bosque dos Coqueiros |
| 138 | Complexo <i>cortelezzii</i> | Não seqüenciado | Bom Jesus |
| 211 | <i>Lu. whitmani</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Canto da Siriema |
| 214 | <i>Lu. longipalpis</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Sagrada Família |
| 216 | Complexo <i>cortelezzii</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Balneário Maré Mansa |
| 217 | Complexo <i>cortelezzii</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Santo Antônio |
| 218 | <i>Lu. longipalpis</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Sagrada Família |
| 220 | <i>Lu. pessoai</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Balneário Maré Mansa |
| 221 | <i>Lu. sordellii</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Sagrada Família |
| 223 | <i>Lu. longipalpis</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Bosque dos Coqueiros |
| 224 | <i>Lu. pessoai</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Balneário Maré Mansa |
| 226 | Complexo <i>cortelezzii</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Bosque dos Coqueiros |
| 227 | Complexo <i>cortelezzii</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Sagrada Família |
| 229 | Complexo <i>cortelezzii</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Santo Antônio |
| 230 | <i>Lu. longipalpis</i> | <i>Le. braziliensis</i> | Balneário Maré Mansa |

5. 2 Inquérito canino censitário

5.2.1 Coleta de amostras de sangue e análise do diagnóstico sorológico

No inquérito canino sorológico foram examinados 1.105 cães domiciliados nos bairros da zona urbana do município de Jaboticatubas, no período de julho de 2012 a junho de 2013. Desses, 175 apresentaram sorologia positiva para LVC através do teste DPP®; desses 86 foram confirmados pelo ELISA.

5.2.2 Prevalência da leishmaniose visceral canina em Jaboticatubas

A prevalência da LVC foi baseada no resultado positivo dos dois testes sorológicos, que mostrou que dos 1105 cães examinados, 86 foram positivos para LVC.

A prevalência canina se distribuiu de forma variada nos bairros estudados, ficando em 7,78% a taxa de infecção total do município, sendo que o bairro Santo Antônio registrou um índice de prevalência de 3,17%, enquanto que o bairro Bom Jesus registrou 1,54% de prevalência, sendo os bairros com maior soroprevalência. O bairro com menor prevalência foi o São Vicente, com 0,36% (Tabela 10).

Tabela 10: Inquérito canino realizado em cães domiciliados na área urbana do município de Jaboticatubas, no período de julho de 2012 a junho de 2013.

| Bairros | Total de cães | Cães positivos (DPP® e ELISA) | Prevalência da LVC(%) |
|----------------------|----------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| Bom Jesus | 187 | 17 | 1,54 |
| Centro | 66 | 5 | 0,45 |
| Sagrada Família | 101 | 6 | 0,54 |
| Santo Antônio | 431 | 35 | 3,17 |
| São Benedito | 118 | 12 | 1,09 |
| São Tarcísio | 78 | 7 | 0,63 |
| São Vicente | 124 | 4 | 0,36 |
| Total | 1.105 | 86 | 7,78 |

5.2.3 Retirada sistemática de cães com LV na cidade de Jaboticatubas

Durante o período de estudo não houve nenhuma ação de controle da leishmaniose visceral nos domicílios. Em novembro de 2013 uma amostra aleatória de cães com LV foi selecionada (11) e os cães foram transportados para o Parque de Exposições da cidade, uma vez que o município não possui um Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), onde foram eutanasiados de acordo com as recomendações do MS.

5.3 Análise do diagnóstico parasitológico

5.3.1 Cultura

Parasitos de *Leishmania* foram detectados através de aspirados de medula óssea obtidas dos cães soropositivos em cultura de parasitos. Dos 11 cães sorologicamente positivos, três apresentaram crescimento de *Leishmania* em cultura, representando 27,27% de positividade (Tabela 11). Esses três cães eram sintomáticos para LVC.

5.3.2 Detecção de *Leishmania* em posições de biópsias de cães soropositivos em lâminas (“imprints”)

Foram confeccionados 44 esfregaços em lâminas, sendo 22 de cada órgão (medula e pele), que foram analisados através de leitura em microscópio. As amostras de pele de quatro cães apresentaram formas de *Leishmania* enquanto em nenhuma amostra de medula em lâmina foi encontrada tal parasita, provavelmente porque havia muito sangue periférico e pouco aspirado de medula. Dessa forma, a taxa de positividade da pele foi de 36,36% (Tabela 11). Desses cães somente um cão não era sintomático.

5. 4 Análise do diagnóstico molecular

5.4.1 Detecção de *Leishmania* através da PCR

Foi realizada PCR das amostras de pele e medula. As amostras de medula de sete cães (63,6%) apresentaram positividade (Figura 11), enquanto somente uma

amostra de pele (9%) foi positiva. Três dos sete cães supracitados não apresentavam sintomas da doença.

Na Tabela 11 é possível visualizar os resultados de todas as técnicas utilizadas neste estudo.

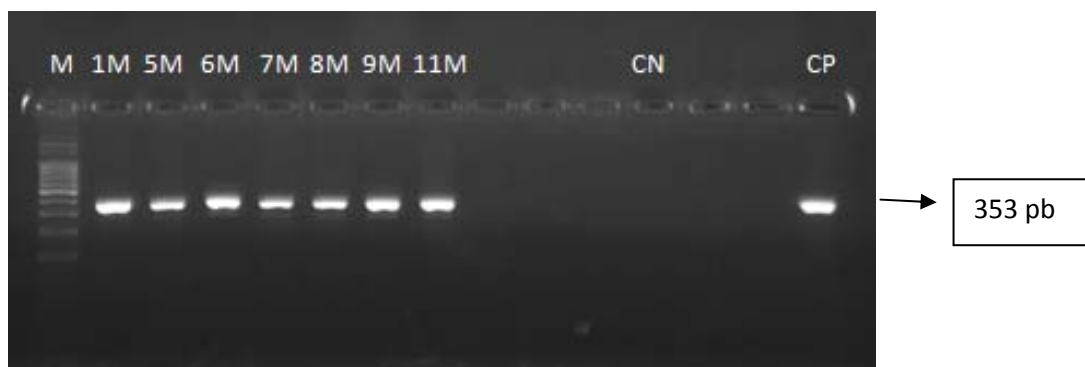


Figura 11: Exemplos de amostras de produtos de amplificação de DNA de cães com iniciadores para o gene SSUrRNA da PCR R3R4 (353 pb) visualizados após gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio. Canaletas: M- marcador. **1M a 11M-** Amostras de medula positivas de DNA de *Leishmania* spp. **CN-** Controle negativo (sem DNA). **CP-** Controle positivo: *Leishmania chagasi*.

Tabela 11: Detecção de positividade através de diagnóstico parasitológico (cultura e imprints) e molecular (técnica de PCR), de amostras de biópsias de cães soropositivos, provenientes de Jaboticatubas, MG.

| Cães | PCR | | Imprints | | Cultura |
|--------------|--------------|-----------------|------------------|--------------|------------------|
| | Pele | Medula | Pele | Medula | Medula |
| 1 | - | + | - | - | - |
| 2 | - | - | + | - | - |
| 4 | - | - | + | - | - |
| 5 | - | + | - | - | + |
| 6 | - | + | + | - | + |
| 7 | - | + | + | - | - |
| 8 | - | + | - | - | - |
| 9 | - | + | - | - | - |
| 10 | + | - | - | - | - |
| 11 | - | + | - | - | + |
| 12 | - | - | - | - | - |
| Total | 1(9%) | 7(63,6%) | 4(36,36%) | 0(0%) | 3(27,27%) |

5.5 Georreferenciamento e Análise espacial

5.5.1 Distribuição espacial dos domicílios com casos caninos de LVC na área urbana da cidade de Jaboticatubas

Somente entraram nesta análise, os animais soropositivos para LVC diagnosticados entre o mês de julho de 2012 a junho de 2013, na zona urbana da cidade. Endereços de 86 cães soropositivos para leishmaniose visceral foram georreferenciados nos bairros da cidade de Jaboticatubas, onde foram notificados casos de LVC.

O menor número de domicílios com casos de LVC foi observado no bairro São Vicente (4 domicílios). O Centro também apresentou um número baixo (5 domicílios), mas devido ao grande número de casas fechadas/recusa dos moradores o número pequeno pode não refletir a realidade local. O maior número de domicílios foi observado no bairro Santo Antônio (35 domicílios).

Dos 86 cães com LVC, três são da raça americano, dois são pastor alemão, dois pinscher, um galgo, um pit bull, um pointer, um poodle e um rottweiler. Os demais são sem raça definida (SRD).

5.5.2 Distribuição espacial dos domicílios com casos de leishmaniose visceral ou leishmaniose tegumentar humana na área urbana cidade de Jaboticatubas, entre 2008 e 2013

Somente entraram nesta análise os casos humanos de LVH notificados nos últimos seis anos (2008 a 2013), que ocorreram na zona urbana. O ano de 2013 não entrou no estudo porque, até o momento, só havia sido notificado um caso, em área rural. Na Tabela 12, estão registrados os dados da distribuição por bairros dos domicílios com casos de LV ou LTA humanos, georreferenciados na cidade de Jaboticatubas, entre 2008 e 2013, na área urbana, segundo dados da Prefeitura local.

Tabela 12: Distribuição dos casos de leishmanioses humanas, georreferenciados na cidade de Jaboticatubas, entre 2008 e 2013, na área urbana.

| Bairros | Casos humanos de leishmaniose na zona urbana entre 2008 a 2013 | |
|---|---|------------|
| | LV | LTA |
| Bom Jesus | 0 | 2 |
| Bosque dos Coqueiros | 1 | 0 |
| Centro | 0 | 0 |
| Nossa Senhora da Conceição/São Tarcísio | 1 | 0 |
| Sagrada Família | 1 | 0 |
| Santo Antônio | 1 | 1 |
| São Benedito | 0 | 0 |
| São Sebastião | 1 | 0 |
| São Vicente | 0 | 0 |
| Total | 5 | 3 |

Os bairros Centro, São Benedito e São Vicente não apresentaram casos de leishmanioses no período analisado. Os demais bairros tiveram pelo menos um caso de LTA ou LV no período estudado, sendo que no ano de 2011 o bairro Santo Antônio acumulou um caso de LV e um de LTA. E no bairro Bom Jesus ocorreram dois casos de LTA nesse período. Houve um óbito por LV no bairro Sagrada Família. O bairro Nossa Senhora da Conceição e São Tarcísio foram considerados como um único bairro no estudo devido à proximidade das casas.

O mapa de Kernel (Figura 12) mostra que existe uma concentração de casos caninos de LVC nos bairros Santo Antônio e Bom Jesus. Em seguida é apresentado outro mapa mostrando a concentração de casos caninos e humanos de leishmanioses ocorridos no município na área urbana (Figura 13).

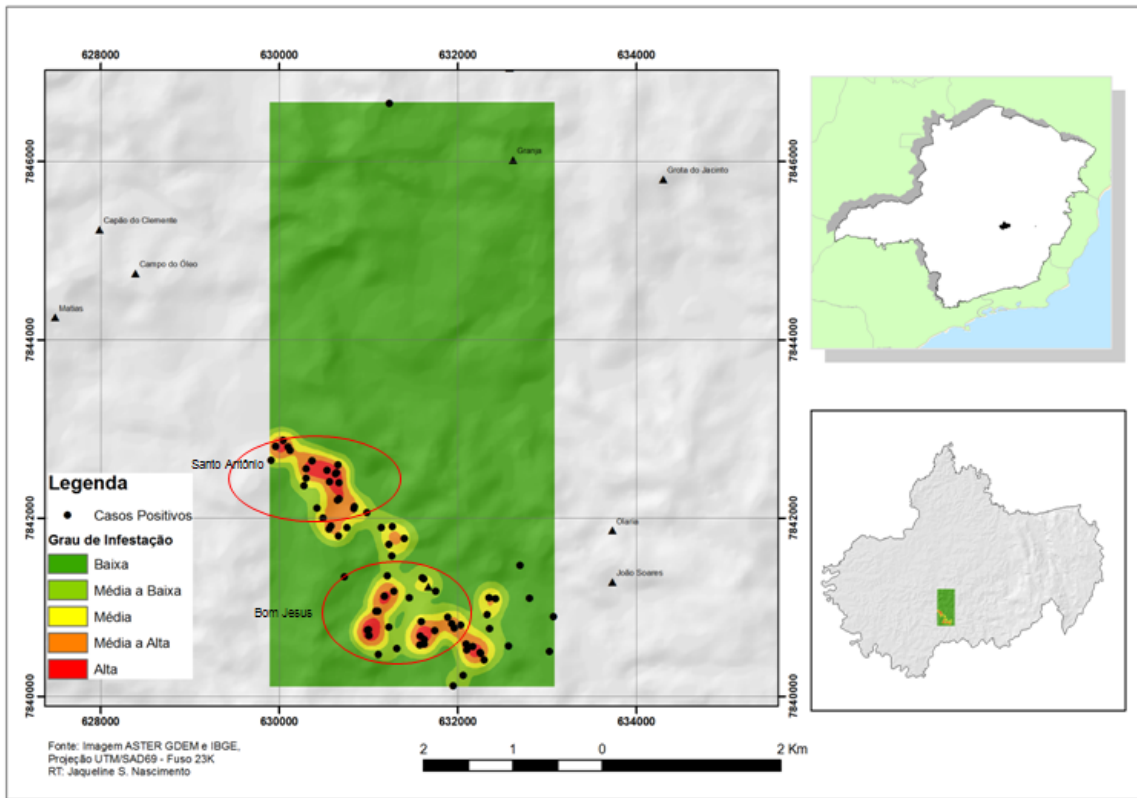


Figura 12: Mapa de Kernel para georreferenciamentos da distribuição espacial dos domicílios com casos de leishmaniose visceral canina, registrados na cidade de Jaboticatubas.

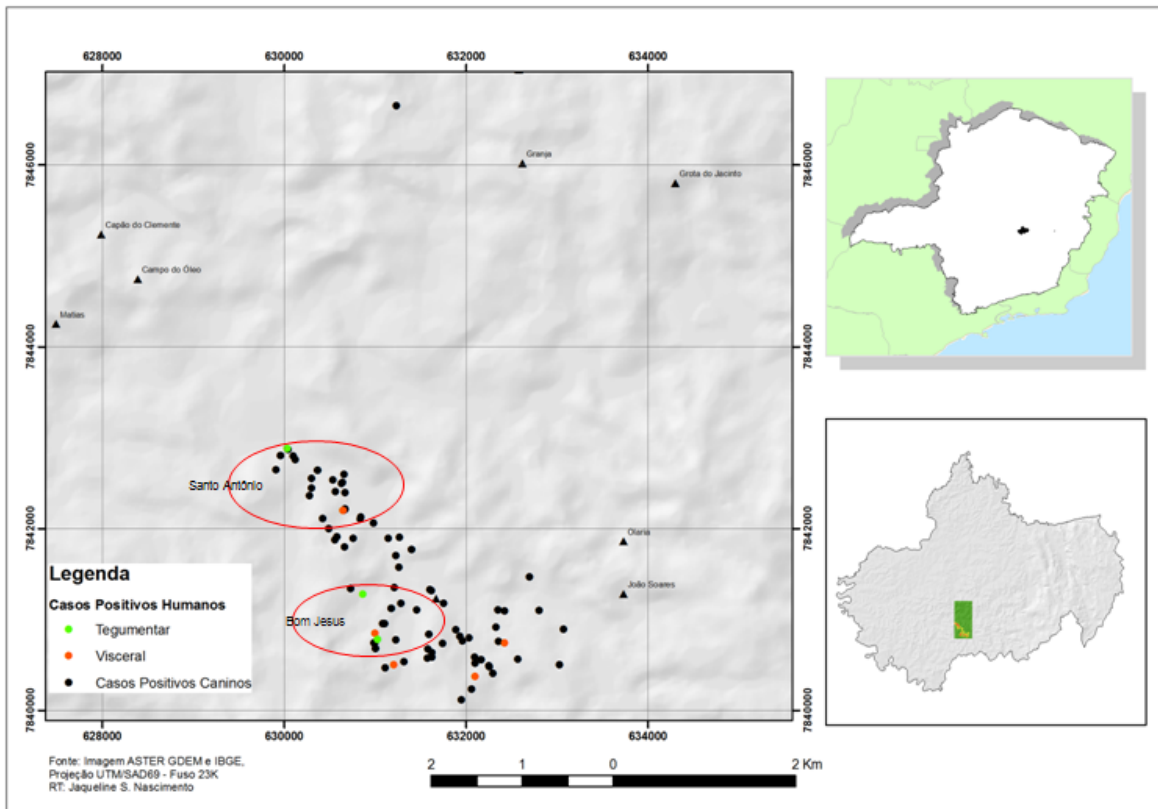


Figura 13: Distribuição espacial dos domicílios com casos de leishmaniose humana e canina, registrados na cidade de Jaboticatubas.

6 DISCUSSÃO

No Brasil até a década de 50, a LTA se disseminou praticamente por todo o território nacional, coincidindo com o desmatamento para a construção de estradas e instalação de aglomerados populacionais, atingindo principalmente os estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Ceará e Pernambuco (Vale & Furtado, 2005).

A LV até a década de 80 ocorria principalmente em zonas rurais e municípios de regiões menos desenvolvidas, mas atualmente houve mudança desse perfil, com o estabelecimento de novas fronteiras da doença e urbanização, comprovada pela ocorrência de casos em cidades de médio e grande porte (Gontijo & Melo, 2004; Maia-Elkoury *et al.*, 2008).

As mudanças das condições ambientais que ocorrem rapidamente em muitas regiões tropicais graças à destruição de habitat e processos de desmatamento e urbanização têm uma influência enorme na população de vetores e, conseqüentemente, na transmissão da doença. Enquanto algumas espécies não são mais encontradas, outras se tornam abundantes (Bejarano *et al.*, 2002).

Estudos com relação a transmissão da LV, mostram que onde há pobreza, desnutrição, grande número de cães infectados e alta densidade de flebotomíneos tanto no intradomicílio como no peridomicílio, más condições sanitárias e baixo nível sócio-econômico, existe maior correlação com casos humanos da doença, como observado por Sherlock (1996) na Bahia e em outras regiões do país. Certamente outros fatores estão envolvidos, em especial os componentes da cadeia de transmissão ligados ao vetor, tais como densidade vetorial e taxa de infecção parasitária, além da vulnerabilidade das pessoas suscetíveis ao desenvolvimento da doença. Os inquéritos sorológicos na população de cães e os levantamentos entomológicos flebotomínicos, nas áreas endêmicas, revelam em alguns lugares taxas de prevalência canina altas e a presença predominante e abundante do vetor, demonstrando um elevado risco de transmissão para o homem (Vieira & Coelho, 1998).

As epidemias registradas em importantes centros urbanos do país evidenciam como o processo migratório do campo para as grandes cidades influenciou na mudança do perfil epidemiológico da LV (Vieira & Coelho, 1998). Dos grandes centros urbanos a doença parece atingir regiões metropolitanas, como ocorreu em Santa Luzia (Carvalho *et al.*, 2008), e parece estar ocorrendo em Jaboticatubas.

Estuda-se pela primeira vez no município o perfil epidemiológico das leishmanioses em Jaboticatubas, levando-se em conta não só o aspecto vetorial, mas a doença canina, os casos humanos e a distribuição espacial das leishmanioses na área urbana.

A fauna flebotomínica coletada em Jaboticatubas apresentou-se diversificada, com a presença de 17 espécies, sendo quatro delas incriminadas como vetoras de leishmanioses no Novo Mundo: *Lu. intermedia*, *Lu. migonei* e *Lu. whitmani*, vetoras de *Le. braziliensis* (Falqueto *et al.*, 1986) e *Lu. longipalpis*, principal vetora de *Le. chagasi* (Deane & Deane, 1962). O município estudado foi considerado receptivo para *Lu. longipalpis*, uma vez que já foi constatado, através de inquérito entomológico prévio, a sua presença no município (Curi *et al.*, 2006; Minas Gerais, Secretaria Municipal de Jaboticatubas, 2007).

A maior parte dos insetos capturados neste estudo foram machos (69,68%). Se o método da coleta, armadilha luminosa HP, estiver refletindo a dinâmica das populações, pode-se pensar que esteja havendo atração diferenciada para ambos os sexos dessas espécies, como observado por Margonari *et al* (2006). É possível também que isso aconteça devido à proximidade das armadilhas dos criadouros, sabendo-se que os machos nascem antes das fêmeas. Há também a possibilidade de que os machos atraem as fêmeas para a cópula, pois machos de flebotomíneos formam agregados com o propósito de acasalamento (Feliciangeli, 1987). Caso a prevalência de flebotomíneos machos sobre as fêmeas indicar realmente a existência de criadouro no local onde foram capturados, ou nas proximidades, as espécies que possuem essa característica nos ambientes domiciliar e peridomiciliar tendem a prosperar no processo de adaptação nesses ambientes (Teodoro *et al.* 1993).

Os bairros Balneário Maré Mansa e Canto da Siriema apresentaram o maior número dos exemplares capturados, provavelmente por estarem próximos aos remanescentes de mata com presença de matéria orgânica no solo e devido à presença de animais domésticos, como cão, galinha, cavalo, próximos aos locais de exposição das armadilhas.

A espécie *Lu. whitmani* foi a mais numerosa neste estudo e também tem sido encontrada em maior abundância em outras investigações. Em estudo realizado por Santos (2009) em área urbana de Maringá, Paraná, *Lu. whitmani* foi predominante no ambiente antrópico e de mata (92% e 93,7%, respectivamente). Em estudo

realizado em aldeia indígena do Mato Grosso, Missawa & Maciel (2009) encontraram predominância desta espécie. Dos exemplares encontrados 28,7% era *Lu. whitmani*. Em estudo realizado por Gomes & Galati (1977), em reserva florestal em Londrina, *Lu. whitmani* foi a espécie predominante durante todo o ano entre as 13 espécies capturadas. Esta espécie também foi mais abundante em estudo realizado por Mayrink *et al.* (1979) no Vale do Rio Doce, no período de 1973-1974 e 1976-1977. Em Timóteo, Andrade-Filho (1997) relatou a predominância de *Lu. whitmani* entre as 20 espécies encontradas, seguida de *Lu. intermedia*, como neste estudo, sendo a fauna encontrada nesse local semelhante a encontrada em Jaboticatubas. A espécie *Lu. whitmani* está entre as espécies vetoras de LTA mais importantes do Brasil (Rangel & Lainson, 2009). *Lu. whitmani* e *Lu. migonei* são consideradas importantes vetores da LTA, tendo sido comumente encontradas no peridomicílio de regiões do sudeste como São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (Gomes & Galati, 1989); nordeste nos estados da Bahia, Ceará e Pernambuco (Dias-Lima *et al.*, 2003; Brandão-Filho *et al.*, 2011) e centro-oeste nos estados do Mato Grosso e Tocantins (Andrade Filho *et al.*, 2001; Missawa *et al.*, 2008).

A espécie *Lu. intermedia* foi capturada em Jaboticatubas durante todo o período de estudo, o que apresenta um importante dado, já que tem sido assinalada como importante veiculadora do agente etiológico da LTA em diversas regiões do sudeste do Brasil (Gomes & Galati, 1989; Camargo-Neves *et al.*, 2002; Saraiva *et al.*, 2006; Lara-Silva, 2010). Em Minas Gerais, *Lu. intermedia* se apresenta bastante abundante em áreas afetadas pela LTA (Andrade-Filho *et al.*, 1997; Gontijo *et al.*, 2002). Saraiva *et al.* (2006) encontraram uma alta densidade de *Lu. intermedia* (83%) no Alto Caparaó e Caparaó, Minas Gerais, demonstrando o fato de que as modificações antrópicas favorecerem o aparecimento da espécie, fato também observado no estudo de Silva (2010) em Governador Valadares.

Foi possível observar em Jaboticatubas que as variáveis climáticas interferiram no número de flebotomíneos coletados. Alguns fatores abióticos como temperatura, pluviosidade e umidade estão relacionados à ocorrência de flebotomíneos em determinadas áreas, seja por influência sobre os adultos ou pela modificação nos criadouros (Scorza *et al.* 1968).

Em relação às variáveis climáticas recomendamos que o controle químico seja feito nos meses em que a densidade de flebotomíneos adultos esteja elevada e

os índices pluviométricos estejam baixos, ou seja, no fim da estação chuvosa nesse caso, a fim de impedir a reprodução dos adultos e a consequente elevação dos índices de transmissão nos meses pós-chuva. Forattini (1960) analisando a influência da sazonalidade na densidade de flebotomíneos observou que nos meses mais quentes e úmidos há um aumento no número de espécies capturadas, enquanto nos meses secos e frios há uma redução considerável no número de exemplares, o que também foi verificado por Barata *et al.* (2004) e Dias *et al.* (2007). Nossos estudos corroboram com este padrão, apresentando maior densidade dos flebotomíneos após os meses com altos índices pluviométricos e temperaturas um pouco mais elevadas. O mesmo perfil foi observado por Barata *et al.* (2004) mostrando que estas duas variáveis (precipitação pluviométrica e umidade) influenciaram significativamente a densidade de flebotomíneos, enquanto a temperatura não teve efeito significativo sobre a população dos mesmos. Em nosso estudo, a temperatura não foi um fator determinante na densidade de flebotomíneos, como demonstrado também por outros autores (Missawa & Dias, 2007; Dias *et al.*, 2007; Michalsky *et al.*, 2009).

No estado do Mato Grosso do Sul, a densidade maior de flebotomíneos foi observada durante a estação chuvosa (Galati *et al.*, 1997), fato também observado nos nossos estudos. É importante salientar que não há uma regra; deve-se considerar que os fatores climáticos influenciam de modo variável a população de flebotomíneos, de acordo com a região estudada e com o padrão de distribuição de chuvas. No período estudado, houve um aumento da densidade de *Lu. intermedia*, *Lu. whitmani* e *L. longipalpis* durante o período chuvoso, com o pico de densidade no mês de dezembro, apresentando tendência em reduzir nos meses mais secos e frios (maio e junho).

Camargo-Neves *et al.* (2001) consideraram importante a análise da densidade do vetor e sua relação com aspectos ambientais do peridomicílio, como presença de vegetação, raízes, troncos de árvores e matéria orgânica no solo, representando os possíveis criadouros dos vetores, e também a associação com animais domésticos, que são fonte de alimentação para os flebotomíneos. Em diversos trabalhos observa-se que a proximidade das moradias em relação às áreas verdes favorece o contato homem-vetor (Teodoro *et al.*, 1993; Condino *et al.*, 1998, Lara-Silva, 2010).

No município de Jaboticatubas é encontrado um ambiente característico e propício a ocorrência de leishmanioses. Nos bairros estudados foram observadas

características ambientais que provavelmente favorecem a ocorrência de flebotomíneos e a presença de mamíferos reservatórios de *Leishmania* spp. no peridomicílio como abrigos de animais domésticos localizados próximos às habitações humanas, más condições de higiene no peridomicílio e a localização deste ao lado de remanescentes de mata, conforme já observado por Teodoro *et al.*, (2001).

Em Jaboticatubas, a proporção de *Lu. whitmani* em relação a *Lu. intermedia* demonstra que a primeira é uma espécie melhor adaptada ao ambiente peridoméstico. Foi observado por Passos *et al.* (1993), no município de Sabará, uma elevada densidade de *Lu. whitmani* tanto em áreas urbanizadas como no ambiente doméstico, sugerindo adaptação desta espécie neste ambiente e como vetora da LTA nesta região. *Lu. whitmani* parece estar associada ao ambiente peridomiciliar e às áreas verdes segundo Lara-Silva (2010).

O número considerável da espécie *Lu. longipalpis*, vetora comprovada de *Le. chagasi*, encontrado no município, pode ter implicações importantes na transmissão da LV na região, haja vista que esta espécie está amplamente distribuída em todo o país e está presente em regiões onde a LV apresenta um problema de saúde pública, como Belo Horizonte (Margonari *et al.*, 2006), Araçatuba (Camargo-Neves *et al.*, 2001) e Montes Claros (Monteiro *et al.*, 2005). A espécie está bem adaptada ao ambiente peridomiciliar, alimentando-se em uma grande variedade de hospedeiros vertebrados (Barata *et al.*, 2005), sendo frequentemente associada à presença de animais domésticos (Forattini, 1960).

Neste estudo foram encontradas exemplares da espécie *Lu. sordellii*, considerada exclusivamente de áreas de floresta (Donalísio *et al.*, 2012). As espécies *Lu. evandroi*, *Lu. quinquefer* e *Lu. migonei* (Donalísio *et al.*, 2012) e *Lu. fischeri* (Mayo *et al.*, 1998) comumente encontradas no ambiente modificado pelo homem, também foram encontradas neste trabalho.

Meneses *et al.* (2002) estudando a fauna local de flebotomíneos em Mesquita, Rio de Janeiro, perceberam que a espécie *Lu. quinquefer* era atraída pelo homem em ambiente florestal. Esta espécie já foi encontrada naturalmente infectada por *Leishmania* sp., sendo capturada no peridomicílio na Argentina por Salomón *et al.* (2009). A espécie *Lu. migonei* e *Lu. fischeri* foram encontradas em menor número, mas não devem ser ignoradas, pois apresentam potencial epidemiológico na transmissão da LTA (Teodoro *et al.*, 1993; Mayo *et al.*, 1998; Dias *et al.*, 2007).

Neste estudo foram encontrados exemplares de *Lu. whitmani* e *Lu. intermedia* infectados com *Le. braziliensis*, sugerindo o papel destes vetores na transmissão da LTA no município, bem como a espécie *Lu. longipalpis* encontrada naturalmente infectada por *Le. chagasi*.

Em áreas onde *Lu. longipalpis* está ausente e ocorrem casos de LV, autores sugerem que *Lu. migonei* possa estar participando da transmissão na região (Souza *et al.*, 2003). Reforçando essa hipótese, no presente estudo *Lu. migonei* foi encontrado naturalmente infectado com *Le. chagasi*. Em contrapartida, Camargo-Neves *et al.* (2002) utilizaram aspectos ambientais associados a LTA no estado de São Paulo no período entre 1986-1995 e demonstraram que a incidência da LTA esteve associada, significativamente, à presença de *Lu. migonei* nos municípios situados na região geomorfológica do Planalto Atlântico e naqueles cuja cobertura vegetal predominante foi a mata.

Alguns autores acreditam que a espécie *Lu. pessoai* também apresenta relevância na epidemiologia da LTA (Teodoro *et al.*, 1993, Silva-Rodrigues & Lima, 2013), sendo que neste estudo tal espécie foi encontrada naturalmente infectada por *Le. braziliensis* e *Le. chagasi*. Teodoro *et al.* (1993) em estudo no norte do Paraná consideraram que *Lu. pessoai* poderia estar envolvida na transmissão de *Leishmania* ao homem nessa região.

A espécie *Lu. lenti*, a segunda mais abundante nas coletas com armadilha HP, não é suspeita de ser vetor ou de ter papel vetorial comprovado. Estudos realizados por Brazil *et al.* (1997) demonstraram que experimentalmente esta espécie não apresenta antropofilia, e é refratária à infecção por *Leishmania*, embora neste estudo *Lu. lenti* tenha sido encontrada naturalmente infectada por *Le. chagasi* e *Le. braziliensis*. Segundo Galati *et al.* (1996) essa espécie de flebotomíneo é bem representada em áreas onde animais domésticos estão presentes, sendo comum em galinheiros, corroborando com nossos resultados.

As espécies do Complexo *cortelezzii* foram encontradas em grande número e recentemente foram encontradas naturalmente infectadas em trabalhos realizados em Minas Gerais (Carvalho *et al.*, 2008; Saraiva *et al.*, 2009), por isso, merecem mais investigações. Neste estudo tais espécies foram encontradas naturalmente infectadas por *Le. chagasi* e *Le. braziliensis*.

Investigações realizadas em regiões de planalto do Estado de São Paulo demonstraram que apenas algumas espécies, tais como *Lu. whitmani*, *Lu.*

intermedia, *Lu. migonei*, *Lu. fischeri* e *Lu. pessoai* apresentaram-se como sendo mais abundantes em ambientes antrópicos (Gomes *et al.*, 1989). Em tais estudos, ora uma, ora outra parecem ter papel prioritário na transmissão de LTA, uma vez que as características lhes conferem capacidade vetorial. Apesar da diversidade, a predominância quase absoluta de poucas espécies (Tabela 2) coincide com dados de outros autores (Gomes & Galati, 1987).

Estudos sobre a ecologia dos flebotomíneos, bem como os estudos de variação sazonal são importantes, para melhor entender a interação da espécie com seu hábitat, assim como a dinâmica de transmissão da leishmaniose, e assim poder direcionar melhor os métodos de controle, como a aplicação de inseticidas (Macedo *et al.*, 2008). É válido ressaltar que o aprimoramento das ações de controle depende das investigações sobre vetores, reservatórios, agentes etiológicos, e outros determinantes epidemiológicos.

A infecção de flebotomíneos por *Leishmania* spp. era frequentemente investigada através da dissecação do inseto e observação direta do parasito. Porém este método é laborioso e requer grande habilidade técnica, devido ao tamanho reduzido dos insetos (Oliveira-Pereira *et al.*, 2006). Já a PCR é mais prática e vantajosa, amplifica o DNA do parasita em tecidos de biópsia ou em leucócitos de sangue periférico, apresentando um alto potencial de sensibilidade, especificidade e facilidade, e vem sendo muito usado no diagnóstico das leishmanioses (Oliveira-Pereira *et al.*, 2006).

A sensibilidade da PCR pode ser aumentada pelo uso de iniciadores que apresentam mais de uma cópia por célula; no caso de *Leishmania* essas sequências incluem o cinetoplasto e famílias de genes de multicópias. Entre estes últimos, o mais estudado é o SSUrRNA. Van Eys *et al.* (1992) desenharam os pares de iniciadores R221 E R332 (R1 e R2 neste trabalho) que amplificam uma região menos específica de 603 pb e R223 E R333 (R3 e R4 neste trabalho) que amplificam uma região de 353 pb somente de espécies do gênero *Leishmania* (menos sensível). Em 2002, Cruz *et al.* sugerem a combinação destes dois pares de iniciadores em uma Nested PCR para detectar *Leishmania* em humanos, aumentando a sensibilidade e especificidade da reação.

Recentemente, o sequenciamento de fragmentos de DNA obtidos pela amplificação de diferentes genes alvo tem sido realizado e utilizado junto com o alinhamento das sequências obtidas como uma forma de identificar a espécie de

Leishmania envolvida na infecção (Parvizi *et al.*, 2008; Medeiros *et al.*, 2008). Ferreira (2010), comparando diferentes técnicas de PCR em amostras de população canina e pequenos mamíferos oriundos da mesma área endêmica para diferentes formas de leishmanioses, observou que a partir do momento que se obteve o produto amplificado, a identificação da espécie de *Leishmania* por sequenciamento foi mais eficaz do que a análise pela digestão por enzimas de restrição (PCR RFLP).

A contaminação da PCR neste estudo pôde ser evitada pela utilização de controles negativos e controles internos da extração, tanto para flebotomíneos quanto para os cães (LnPCR), validando assim tanto o processo de extração quanto a confirmação dos resultados negativos.

Dos 249 “pools” de flebotomíneos analisados, a infecção foi observada em 32 deles, correspondendo a 11 “pools” positivos do Complexo *cortelezzii*, dois da espécie *Lu. intermedia*, quatro da espécie *Lu. lenti*, seis *Lu. longipalpis*, um *Lu. migonei*, quatro *Lu. pessoai*, um *Lu. sordellii* e três “pools” de *Lu. whitmani*. Desses, 12 “pools” são considerados espécies de importância médica, ficando a taxa de infecção em 2,60% para *Lu. intermedia*; 12% para *Lu. longipalpis*; 20% para *Lu. migonei*; 1,14% para *Lu. whitmani*. As taxas de infecção de *Lu. longipalpis* e *Lu. migonei* são consideradas altas, ainda mais por se tratar de um município com casos esporádicos da doença, levando a necessidade de medidas de controle efetivas para evitar um possível surto, já que a região tem todas as características que indicam que o ciclo de transmissão pode estar ocorrendo no município. Entretanto, a taxa geral de infecção natural dos flebotomíneos por *Leishmania* foi relativamente baixa (3,40%), corroborando com trabalhos realizados em área endêmica de leishmaniose. Lara-Silva (2010) encontrou 2,5% em Governador Valadares; Miranda *et al.* (2002) encontraram na Bahia taxa de positividade de 1,5% para *Le. braziliensis*; e Oliveira-Pereira *et al.* (2006) encontraram taxas ainda mais baixas em estudo na Amazônia Maranhense (0,4%).

É importante ressaltar, que em todos os bairros estudados verificamos a presença de infecção por leishmania em algumas das espécies dos flebotomíneos capturados, demonstrando o risco de infecção da população por este parasito.

Para se estudar a história natural das doenças, antes de tudo é preciso identificá-las. Uma das alternativas é a pesquisa de anticorpos através de testes sorológicos. Métodos sorológicos têm contribuído, e muito, para o diagnóstico em estudos epidemiológicos de doenças endêmicas, especialmente na LV e LVC.

Contudo, quando os resultados da sorologia são utilizados como medidores da prevalência da doença, é preciso ter-se um bom estudo da sensibilidade e, principalmente, da especificidade do método empregado. Caso contrário, pode-se estar manipulando taxas de positividade equivocadas, o que leva a um falso conhecimento da gravidade da endemia na região (Monteiro *et al.*, 2005).

A RIFI foi utilizada nos últimos anos como a técnica de referência adotada pelo MS em inquéritos sorológicos, antecedida pelo ELISA que era o teste de triagem de casos de LVC. Porém, em 2012, o MS passou a indicar como método de triagem uma nova técnica imunocromatográfica, chamada DPP®.

Queiroz-Júnior (2011) e Schubach (2012) desenvolveram estudos sobre a validação do novo teste imunocromatográfico para diagnóstico da LVC, o DPP®, e encontraram resultados satisfatórios. Queiroz-Júnior (2011) utilizou amostras de soro da veia cefálica e gota de sangue da ponta da orelha e demonstrou que o teste DPP® apresentou desempenho superior aos obtidos pelo ELISA. Dessa forma o autor sugere que o DPP® pode ser usado como teste de triagem sorológica do programa de controle da LVC, apresentando alta sensibilidade e especificidade (88,9% e 100%, respectivamente) no diagnóstico de cães sintomáticos para LVC. Ainda assim, novos estudos devem ser realizados com o objetivo de aumentar a sensibilidade do teste DPP® sobre cães assintomáticos e sintomáticos. Na análise de Schubach (2012), a sensibilidade do DPP® chegou a 88% e a especificidade 73,3%, utilizando amostras de sangue periférico, sangue da veia jugular e pele íntegra. Porém, sugere que seu uso seja associado a outros testes.

A grande vantagem do ELISA é que ele pode ser usado em grande escala e tem sensibilidade e especificidade altas, cerca de 95% para ambos. E é recomendado pelo MS para avaliação de soroprevalência em inquéritos caninos (Brasil, 2006), detectando anticorpos contra *Leishmania* na fase mais precoce da infecção (Biogene, 2007).

No presente estudo, o DPP® foi utilizado como técnica de diagnóstico da LVC para a realização do inquérito censitário canino do município de Jaboticatubas, e de 1.105 cães analisados, apresentou positividade para 175 cães. A confirmação dos resultados foi obtida pelo ELISA, resultando em 86 cães positivos.

O conhecimento dos reservatórios é importante para o efetivo controle das leishmanioses. Entretanto, outros fatores de risco relacionados à epidemiologia da doença são mais complexos, como a urbanização do ciclo de transmissão e a

manutenção de um ciclo enzoótico nas cidades (Cabrera *et al.*, 2003).

Com relação ao estudo de reservatórios domésticos (*Canis familiaris*) vários inquéritos sorológicos já foram realizados no município de Montes Claros, no ano de 1994, 2001 e 2002 e verificaram que a taxa média de prevalência canina era de 9,7%; 4,6% e 5% respectivamente. (França-Silva *et al.*, 2003; Monteiro *et al.*, 2005). Esses estudos revelaram a importância do cão como reservatório para *Le. (Le.) chagasi* no município. Corroborando com esses resultados, neste estudo também foi encontrada uma taxa de prevalência canina alta (7,78%), sendo possível verificar taxas de 3,17% no bairro Santo Antônio e 1,54% no Bom Jesus.

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

Diferentes materiais biológicos podem ser utilizados nas reações para diagnóstico de leishmanioses: aspirado de linfonodos, medula óssea, baço, sangue total, camada leucocitária, cultura e sangue coletado em papel filtro, biópsia ou escarificação da pele. O melhor teste de laboratório para diagnosticar LV é a demonstração do parasita em material de biópsia ou punção aspirativa de tecidos (Melo, 2004). É um método seguro de diagnóstico, uma vez que o resultado positivo é dado pela observação direta de formas amastigotas ou promastigotas, no caso de cultura de parasitos. No caso do aspirado de medula e baço geralmente pode-se verificar a presença de formas amastigotas do parasito. A punção aspirativa esplênica é o método que oferece maior sensibilidade (90-95%) para a demonstração do parasita, seguida pelo aspirado de medula óssea, biópsia hepática e a aspiração de linfonodos. Por ser um procedimento mais seguro, recomenda-se a punção aspirativa da medula óssea (Brasil, 2006).

A especificidade destes métodos é de 100%, mas a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição dos parasitas não é homogênea no mesmo tecido (Gontijo & Melo, 2004).

Quanto ao isolamento do parasito, os métodos de cultura “in vitro” em meios especiais apresentam positivities superiores a 60% em muitos casos. Formas amastigotas do parasita, inoculadas em meios de cultura especiais, contendo ágar e sangue de coelho, transformam-se em formas promastigotas. O isolamento “in vivo”

é feito preferencialmente em hamsters (*Mesocricetus auratus*), quando alíquotas do meio contendo formas promastigotas são inoculados nesses animais.

O exame direto ou a cultura de aspirados de baço ou medula óssea são as principais técnicas usadas para o diagnóstico da LV tanto em humanos como em cães. Já o exame microscópico de fragmentos de pele ou biópsia de lesão como “imprints”, embora rápido e de baixo custo, tem sensibilidade limitada, particularmente em lesões crônicas. A técnica de cultura “in vitro” é ligeiramente mais sensível que o exame microscópico de biópsias de lesão e amostras histológicas, apesar de mais laboriosa, onerosa e sujeita a contaminações microbiológicas (Manna *et al.*, 2004). Porém, neste estudo a sensibilidade foi maior nos “imprints” que na cultura (36,36% e 27,27%, respectivamente).

Quanto ao diagnóstico molecular o método da PCR, constitui-se em uma nova perspectiva para o diagnóstico da LV, pois apresenta 94% de especificidade (Brasil, 2006).

Rodrigues *et al.* (2002) obtiveram uma sensibilidade de 95,4% e especificidade de 100% da PCR em amostras de pacientes. Uma explicação possível para os resultados falso-negativos é atribuída à baixa carga parasitária, instabilidade do DNA extraído ou a qualidade da amostra de DNA, que podem apresentar diferentes concentrações de inibidores da DNA polimerase.

No presente estudo foi utilizado aspirado de medula para cultura, “imprints” de medula e pele em lâminas analisados por microscopia, além da realização de PCR de amostras de medula e pele.

A cultura de aspirados de medula óssea dos cães soropositivos utilizados neste estudo, apresentou positividade em somente três dos 11 cães soropositivos (27,27%). Deve-se salientar que a sensibilidade da cultura, depende em grande parte do profissional, do número de campos microscópicos examinados e da prevenção de contaminações do material. Já nos nossos resultados obtidos através dos “imprints”, quatro dos 11 cães apresentaram positividade (36,36%).

Segundo Sollano-Gallego *et al.* (2001) a frequência de detecção de DNA do parasito é variável em diferentes tecidos. A baixa porcentagem de amostras positivas na medula óssea pode indicar que a disseminação do parasito pela medula não ocorra com frequência nos animais. No mesmo estudo, os autores sugerem que a pele é o maior tecido reservatório de parasitos em cães já que a PCR utilizando biópsia de pele detectou DNA de *Leishmania* em metade dos cães estudados e da

medula somente 17%. Porém neste estudo, através da PCR, houve a detecção do DNA de *Leishmania* na medula óssea em mais da metade dos cães estudados (63,6%) enquanto a PCR de biópsia de pele detectou somente uma amostra (9%) com DNA de *Leishmania*. Estes resultados contrastam com os estudos de Reithinger *et al.* (2002), que demonstraram que a carga parasitária tende a ser menor em aspirados de medula óssea, baço e linfonodos, pois estes órgãos contêm inibidores da PCR que podem afetar a sensibilidade da técnica.

A PCR de medula apresentou maior sensibilidade em relação às outras técnicas utilizadas (cultura, imprints e até mesmo a PCR de amostras de pele).

O georreferenciamento dos cães positivos para LV bem como dos casos humanos de leishmanioses no município de Jaboticatubas demonstrou a existência de alguns focos da doença no município (Figura 13). Resultados mais esclarecedores provavelmente seriam obtidos através de um estudo prospectivo realizando o georreferenciamento acumulativo dos casos nos próximos anos, incluindo a zona rural.

A permanência do cão infectado nos domicílios pode ser explicada por vários motivos: não colaboração dos moradores, ausência de uma estratégia eficaz por parte dos órgãos competentes para exame dos cães de modo sistemático, a baixa sensibilidade do teste utilizado em estudos de forma geral – resultando em falsos negativos, além disso, o fato de existir cães assintomáticos garante a manutenção do parasita no município. Deste modo, a soroprevalência canina se mantém alta e o surgem novos casos humanos (Reithinger & Davies, 1999; Silva *et al.*, 2001; Cabrera *et al.*, 2003).

No ano de 2005, foi implementado no município o PCLV (MINAS GERAIS, Secretaria Municipal de Saúde de Jaboticatubas, 2007) mas o programa ainda não funciona em sua integralidade. Atualmente existe a demanda espontânea de casos de LVC, no qual o veterinário vai até a casa do morador para colher sangue do seu cão e realizar o diagnóstico. Quanto aos casos humanos, há uma varredura da área próxima à casa do morador acometido pela enfermidade, com a realização de borrifação das casas ao redor. O município ainda não possui visitas domiciliares periódicas de veterinários para coleta de amostras de sangue dos cães para diagnóstico da leishmaniose canina, freqüente borrifação das casas, um canil e nem mesmo um serviço para apreensão de animais errantes (João Paulo: Epidemiologista da Secretária de Saúde de Jaboticatubas – comunicação pessoal).

De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), até o ano de 2012, quatro casos humanos de LV, bem como 10 casos de LTA, foram notificados em Jaboticatubas. O primeiro caso de LTA foi registrado em 1975 enquanto de LV foi registrado somente em 2006. Segundo dados da Prefeitura, ocorreram cinco casos de LV no município e não quatro como registrados no SINAN. E em 2012 e 2013 não foram registrados casos humanos de leishmanioses nos humanos na zona urbana, mesmo com uma soroprevalência canina alta no município. Contudo, em 2010 houve um óbito de paciente acometido cm LV no bairro Sagrada Família. A alta taxa de soroprevalência canina no inquérito sorológico do município e o número de casos humanos distribuídos por todo o município torna urgente a tomada de medidas por parte dos órgãos competentes do Município e do Estado. Neste estudo, foram analisados somente dados de leishmanioses canina e humana na zona urbana da cidade, e os resultados já são alarmantes, faz-se necessário, a título de aprimoramento das medidas de controle, estudar ainda as áreas rurais.

Um aspecto importante é que provavelmente o número de casos humanos de leishmaniose diagnosticados é subestimado, representando apenas uma pequena parcela das pessoas infectadas. Em estudos prospectivos realizados nos estados da Bahia e Ceará, a taxa de indivíduos assintomáticos/ sintomáticos era respectivamente 6:1 a 18:1, dependendo da idade do paciente e da localidade estudada (Badaró *et al.*, 1986; Evans *et al.*, 1992).

As alterações no ambiente causadas por atividades humanas como, por exemplo, desmatamento e construções em áreas verdes, acarretam alterações no clima e no meio ambiente, modificando a epidemiologia das leishmanioses. Isso pode levar à invasão dos hospedeiros silvestres e dos vetores ao ambiente próximo ao homem, caracterizando a domiciliação do ciclo de transmissão (Costa *et al.*, 2007; Chaves *et al.*, 2008).

As leishmanioses, principalmente a LTA, ainda hoje, são associadas a áreas rurais, às favelas e bolsões de pobreza (Souza *et al.*, 2001). Entretanto, Kawa & Sabroza (2002), observaram que o movimento urbano criou as condições necessárias à intensificação da endemia em focos bem definidos, onde o ambiente de trabalho possibilitou maior contato entre indivíduos suscetíveis e vetores. Nesse mesmo sentido, Lima (2000), através de análises espaciais, observou que a LTA em vários municípios do Estado do Paraná têm relação com áreas de mata nativa

modificada, pequenas matas ciliares ou resquícios destas e/ou com área domiciliar e peridomiciliar.

Considerando que a área de estudo se localiza dentro da Serra do Cipó, a circulação de parasitas entre canídeos silvestres, marsupiais, cães domésticos e pessoas, além do intercâmbio de cães de uma região para outra, migração ou doação, torna-se necessário a adoção de medidas urgentes de controle da infecção em Jaboticatubas visando impedir o estabelecimento de um foco na área de estudo. Além disso, o município de Jaboticatubas pertence à RMBH, onde casos de leishmanioses vem ocorrendo nos últimos anos (Menezes, 2011).

De fato, foi constatado na área de estudo através de conversa com moradores e da Prefeitura que o município possui potencial epidemiológico para instalação da doença: das 10 casas percorridas, somente uma não apresentava galinhas, cães ou outros animais domésticos. Com a possibilidade de esses animais virem a participar como fonte alimentar de flebotomíneos, a aproximação e a manutenção desses insetos no ambiente peridomiciliar pode ser favorecida. Verifica-se que as capturas de flebotomíneos não são bem sucedidas em casas que não existem animais domésticos (Dias *et al.*, 2003). A galinha é um dos animais mais atrativos para *Lu. longipalpis*, sendo que o município de estudo foi considerado receptivo para *Lu. longipalpis*, segundo inquérito entomológico realizado no município. Nesse período, foram capturados diversos exemplares desse vetor, mas ainda não haviam sido notificados casos de leishmaniose visceral humana nem canina (Minas Gerais, Secretaria Municipal de Jaboticatubas, 2007).

O encontro de espécies vetoras infectadas com *Le. chagasi* ou *Le. braziliensis*, a alta prevalência de cães com LVC, além da ocorrência de casos humanos de leishmanioses no município, indica a urgência de uma vigilância entomológica rigorosa e de ações que evitem a formação de ambiente propício ao contato dos flebotomíneos com os animais domésticos, pois provavelmente estes servem como fonte de infecção para o flebotomíneo e o homem se infecta acidentalmente. Estas observações aliadas à vigilância e controle da doença podem evitar um possível surto da LV no município, comprovando a importância dos estudos envolvendo a biologia, ecologia, comportamento e análise de infecção natural de vetores e hospedeiros para o entendimento da epidemiologia da doença na área de estudo.

Os dados obtidos neste trabalho demonstram que a leishmaniose no

município de Jaboticatubas não pode ser negligenciada, sugerindo que as medidas de controle da LVC canina devem ser implementadas para que os níveis de prevalência canina não aumentem de modo a aumentar também o número de casos humanos. Atualmente a LVC está amplamente distribuída no município de Jaboticatubas e os resultados do presente trabalho mostram uma correlação na distribuição de casos de leishmaniose canina e humana no município estudado. (Figura 13). Esse resultado corrobora com dados de Margonari *et al.* (2006) onde foi observado que os casos humanos do município de BH ocorreram em áreas em que a densidade dos cães soropositivos era relativamente alta. Em um estudo semelhante utilizando análise espacial na vigilância epidemiológica de LV em Araçatuba (SP), os autores observaram que a transmissão da LV não foi homogênea no município: a transmissão humana ocorreu nas áreas com maiores taxas de prevalência canina (Camargos-Neves *et al.*, 2001).

É importante salientar que os ciclos de transmissão das leishmanioses dependem do movimento de seus reservatórios e a identificação destes hospedeiros é fundamental para o entendimento da epidemiologia e controle efetivo de transmissão da doença.

7 CONCLUSÕES

A fauna flebotomínica de Jaboticatubas apresentou exemplares pertencentes a dois gêneros distribuídos em 17 espécies do gênero *Lutzomyia* e dois exemplares de *Brumptomyia*. Dentre elas, importantes vetoras da LTA e LV, sendo *Lu. whitmani* a espécie mais numerosa.

O encontro de *Lu. whitmani* em elevada densidade nos bairros estudados, a sua infecção natural por *Le. braziliensis*, além de sua implicação na literatura como importante vedora da LTA, sugerem que esta seja a principal espécie responsável pela transmissão da LTA em Jaboticatubas.

O grande número de exemplares de *Lu. longipalpis* capturado e o encontro de infecção natural por *Leishmania chagasi* sugerem a participação desta espécie como vedora da LV no município estudado.

De acordo com análises entre o número de flebotomíneos capturados e os dados climáticos, os meses mais chuvosos e quentes foram os que apresentaram maior número de flebotomíneos capturados no município.

A presença do vetor *Lu. longipalpis* e cães infectados por *Leishmania chagasi* nos bairros estudados, sugerem que o ciclo da LV em Jaboticatubas tenha um perfil urbano e ativo de transmissão.

Foi observada uma maior concentração de casos humanos e caninos nos bairros Santo Antônio e Bom Jesus, áreas onde as medidas de controle deverão ser mais intensificadas.

A espécie *Lu. intermedia* foi encontrada infectada por *Le. braziliensis*, reforçando sua importância na transmissão da LTA no município estudado.

As espécies *Lu. whitmani* e *Lu. longipalpis* encontradas, também, infectadas com *Le. chagasi* e *Le. braziliensis*, respectivamente, demonstraram a permissividade destes flebotomíneos a infecção por diferentes espécies de leishmania e indicam a importância de novos estudos para esclarecimento do real papel de suas competências vetoriais para essas leishmanias.

O encontro de *Lu. lenti* infectada com *Le. chagasi* e *Le. braziliensis*, do complexo *cortezii* infectado tanto com *Le. chagasi* quanto com *Le. braziliensis*, de *Lu. migonei* e *Lu. pessoai* infectadas com *Le. chagasi* demonstraram que estas espécies merecem mais investigação do ponto de vista da transmissão destes parasitos em áreas urbanas.

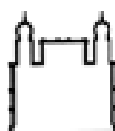
A taxa de soroprevalência canina foi alta para um município onde é transmissão de LV é considerada esporádica.

A técnica de PCR de medula foi mais sensível que as demais técnicas utilizadas, uma vez que apresentou maior taxa de positividade em relação as demais técnicas.

Até então o município é considerado área de transmissão esporádica para as LV, mas possui todos os elementos que favorecem a transmissão intensa no município, por isso é importante que medidas de controle sejam intensificadas, principalmente em áreas onde a transmissão é maior, a fim de evitar que o problema se agrave no município.

8 Anexos

8.1 Anexo 1 – Consentimento Livre e Esclarecido do Voluntário



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Laboratório de Leishmanioses

ESTUDO: Eco-epidemiologia das Leishmanioses na região da Serra do Cipó (MG), Brasil.

Nome do voluntário:

Casa:

Endereço:

Bairro

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO VOLUNTÁRIO

Esta pesquisa tem como objetivo estudar aspectos das Leishmanioses relacionados ao vetor no município de Jaboticatubas, sob a responsabilidade do pesquisador Dr. Edelberto Santos Dias.

Tenho consciência que a minha participação como voluntário não me trará nenhum benefício ou privilégio e em hipótese alguma prejudicará a minha saúde e bem-estar.

Poderei a qualquer momento me retirar do projeto de pesquisa por qualquer motivo, sem que isso acarrete prejuízo para mim ou minha família.

Poderei no momento em que desejar procurar o coordenador ou o responsável pela pesquisa, para esclarecer qualquer questão relacionada ao projeto.

Coordenador da Pesquisa: Dr. Edelberto Santos Dias

Endereço: Centro de Pesquisas René Rachou, Avenida Augusto de Lima, 1715, Bairro Barro Preto, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Telefone de contato: (31-3349-7758)

Eu li este consentimento e me foram dadas oportunidades para esclarecer minhas dúvidas. Minha participação é inteiramente voluntária, portanto, concordo em participar e assino abaixo em 2 vias.

Jaboticatubas, 21 de Maio de 2012.

Assinatura do voluntário: _____

Assinatura do pesquisador responsável: _____

8.3 Anexo 3 - Termo de certificação de resultado de exame laboratorial de leishmaniose visceral canina



PREFEITURA DE JABOTICATUBAS
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE

1

TERMO DE CIENTIFICAÇÃO DE RESULTADO DE EXAME LABORATORIAL DE
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Nº _____

CIENTIFICADO

Nome do proprietário do animal: Vanderlan dos Santos
Endereço: Rua Benedito Quinteiro, 210, Centro
Contato caso o dono não esteja presente: _____

A gerência do controle de Zoonoses de Jaboticatubas juntamente com a Fundação Osvaldo Cruz – FIOCRUZ comunica que o resultado da análise do material colhido do animal abaixo descrito é reagente (positivo) para Leishmaniose Visceral conforme laudo laboratorial em anexo. Em virtude desse fato o animal supraqualificado deverá ser levado à eutanásia tendo em vista o risco que representa para a saúde pública.

O procedimento citado será realizado no período de 18 a 22 de novembro de 2013.

O proprietário do animal aceita o resultado do exame e se prontifica a entregar o referido animal à gerência de controle de Zoonoses de Jaboticatubas, para que o mesmo seja eutanasiado.

O proprietário não concorda com o resultado do exame e tem o prazo de 10 dias a contar de ____/____/____ Para apresentação de exame de contra prova para Leishmaniose visceral ou outro documento que argumente a recusa.

DADOS DO ANIMAL

NOME: Belinha
Porte: _____ Sexo: F Raça: _____ Cor: _____
 Pequeno Macho
 Médio Fêmea
 Grande

Outras características: _____

Vanderlan dos Santos
Assinatura do Cientificado

OK

8.4 Anexo 4 - Alinhamento para as amostras positivas para *Leishmania* spp.

Alinhamento amostra 52 (*Lu. pessoai*) – *Le. chagasi*

```

Leishmania amazonensis TCCCATCGCAACTTCGGTTCGGTGTGTGGCGCCTTTGGAGGGGTTTAGTGCGTCCGGTGCGAGI
Leishmania braziliensis .....G.
Leishmania chagasi .....C.....A.....
Amostra 52 .....C.....A.....

CCGGTTCGTCCGGCCGTAAACGCCTTTTCAACTCACGGCCTCTAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCI
.....
.....

GTTTCGGGGGAGAACGTACTGGGGCGTCAGAGGTGAAATTCTTAGACCGCACCAAGACGAACTF
.....
.....

TACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGAGATCGAAGA
.....
.....

GATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGATCATTATG(
.....
.....

```

Alinhamento amostra 107 (Complexo *cortezzi*) – *Le. chagasi*

```

Leishmania amazonensis TCCCATCGCAACTTCGGTTCGGTGTGTGGCGCCTTTGGAGGGGTTTAGTGCGTCCGGTGCGAGI
Leishmania braziliensis .....G.
Leishmania chagasi .....C.....A.....
Amostra 107 .....C.....A.....

CCGGTTCGTCCGGCCGTAAACGCCTTTTCAACTCACGGCCTCTAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCI
.....
.....

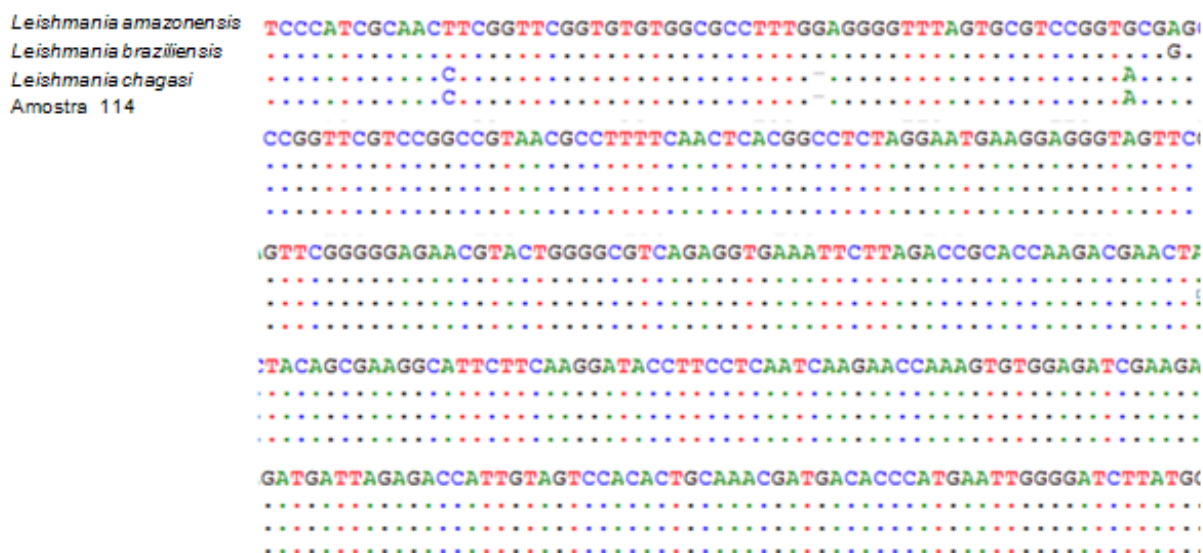
GTTTCGGGGGAGAACGTACTGGGGCGTCAGAGGTGAAATTCTTAGACCGCACCAAGACGAACTF
.....
.....

TACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGAGATCGAAGA
.....
.....

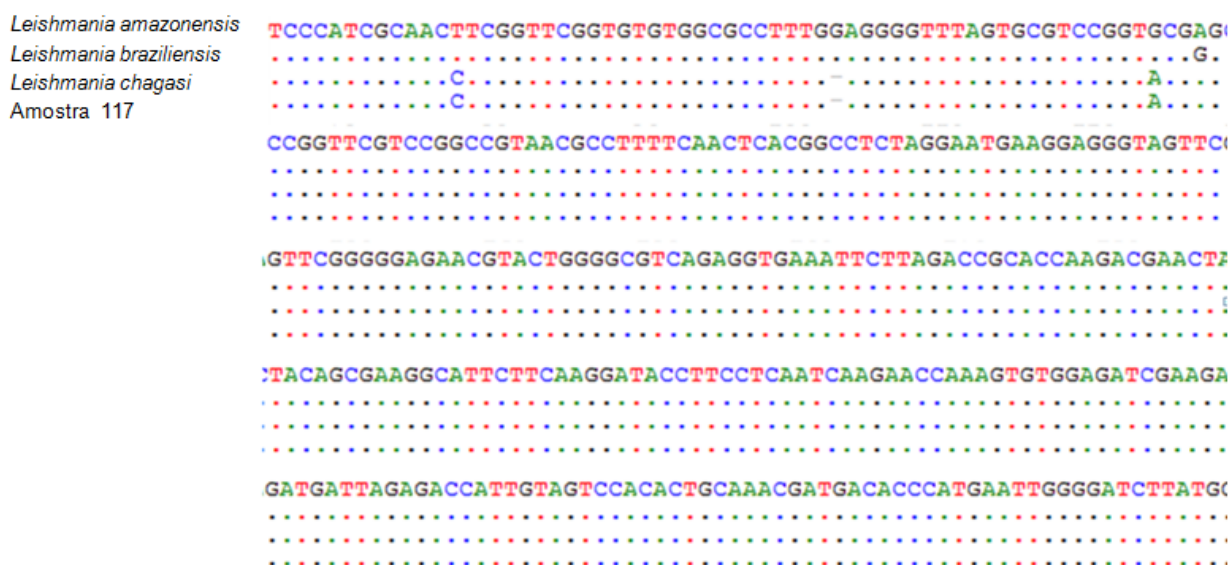
GATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGATCATTATG(
.....
.....

```


Alinhamento amostra 114 (*Lu. longipalpis*) – *Le. chagasi*



Alinhamento amostra 117 (*Complexo cortelezii*) – *Le. chagasi*



Alinhamento amostra 125 (*Lu. lenti*) – *Le. chagasi*

```

Leishmania amazonensis TCCCATCGCAACTTCGGTTCGGTGTGTGGCGCCTTTGGAGGGGTTTAGTGCCTCCGGTGCAGAG
Leishmania braziliensis .....G.
Leishmania chagasi .....C.....A.....
Amostra 125 .....C.....A.....

CCGGTTCGTCCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCACGGCCTCTAGGAATGAAGGAGGGTAGTTC
.....
.....

GTTTCGGGGGAGAACGTACTGGGGCGTCAGAGGTGAAATTCTTAGACCGCACCAAGACGAACT
.....
.....

TACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACC AAAAGTGTGGAGATCGAAGA
.....
.....

GATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGATCTTATG
.....
.....

```

Alinhamento amostra104 (Complexo *cortelezzii*) - *Le. braziliensis*

```

Leishmania amazonensis TCCCATCGCAACTTCGGTTCGGTGTGTGGCGCCTTTGGAGGGGTTTAGTGCCTCCGGTGCAGAG
Leishmania braziliensis .....G.
Leishmania chagasi .....A.....
Amostra 104 .....G.

CCGGTTCGTCCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCACGGCCTCTAGGAATGAAGGAGGGTAGTTC
.....
.....

GTTTCGGGGGAGAACGTACTGGGGCGTCAGAGGTGAAATTCTTAGACCGCACCAAGACGAACT
.....
.....

TACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACC AAAAGTGTGGAGATCGAAGA
.....
.....

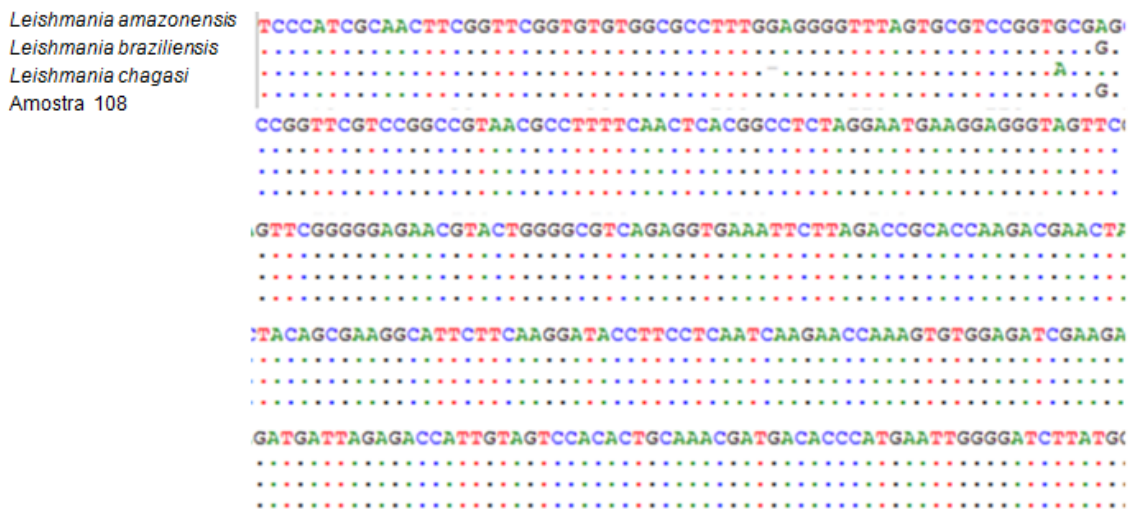
GATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGATCTTATG
.....
.....

```

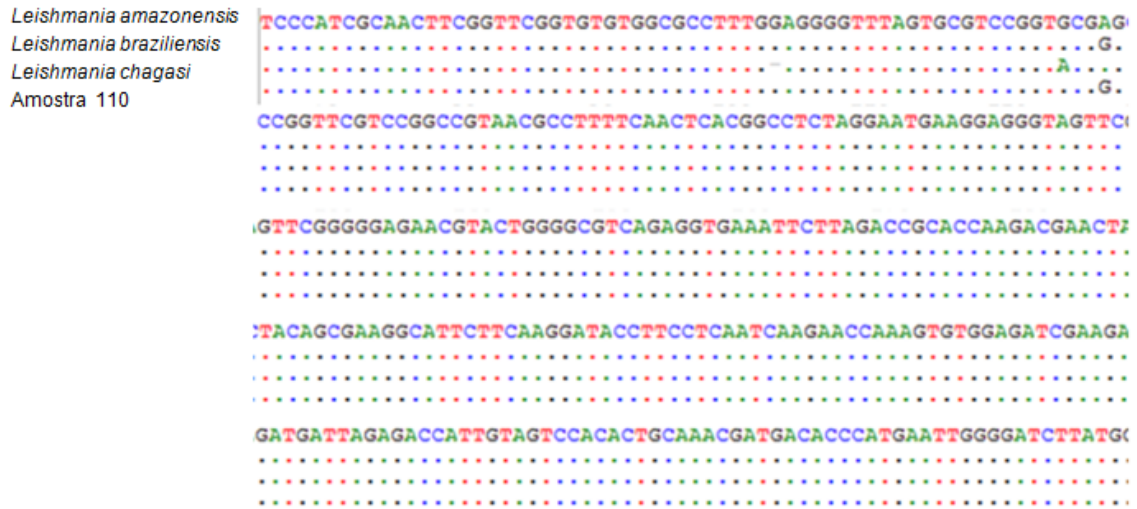
Alinhamento amostra106 (*Lu intermedia*) - *Le. braziliensis*



Alinhamento amostra108 (*Lu. pessoai*) - *Le. braziliensis*



Alinhamento amostra110 (Complexo *cortezzei*) - *Le. braziliensis*



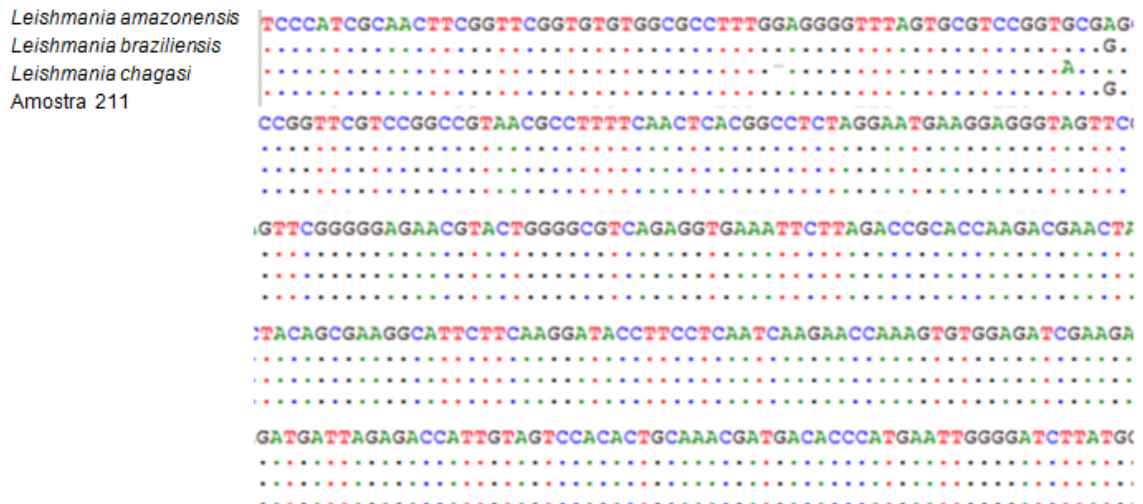
Alinhamento amostra112 (Lu. lenti) - *Le. braziliensis*



Alinhamento amostra126 (*Lu. lenti*) - *Le. braziliensis*



Alinhamento amostra 211 (*Lu. whitmani*) - *Le. braziliensis*



Alinhamento amostra 214 (*Lu. longipalpis*) - *Le. braziliensis*



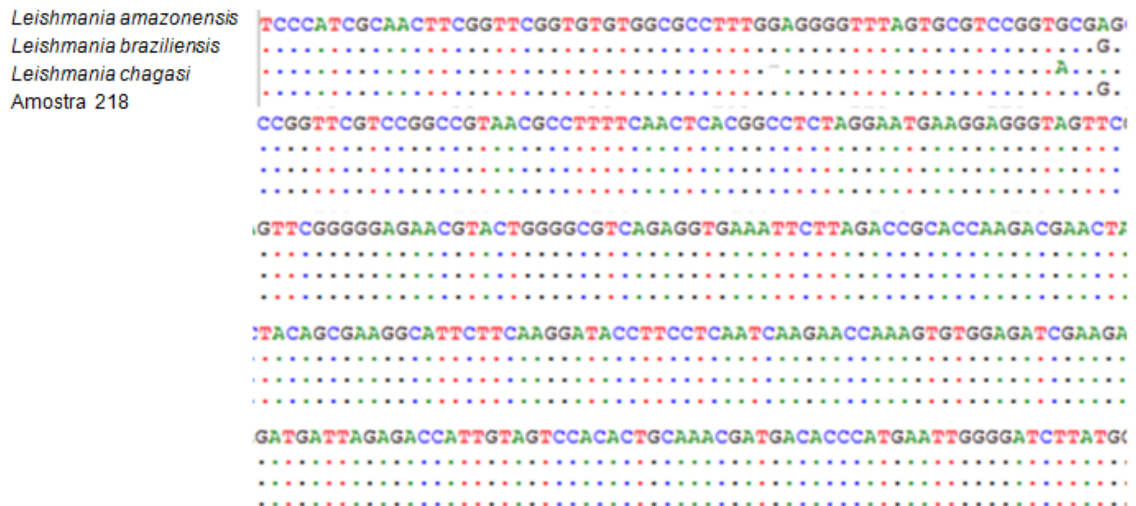
Alinhamento amostra 216 (Complexo *cortezzi*) - *Le. braziliensis*



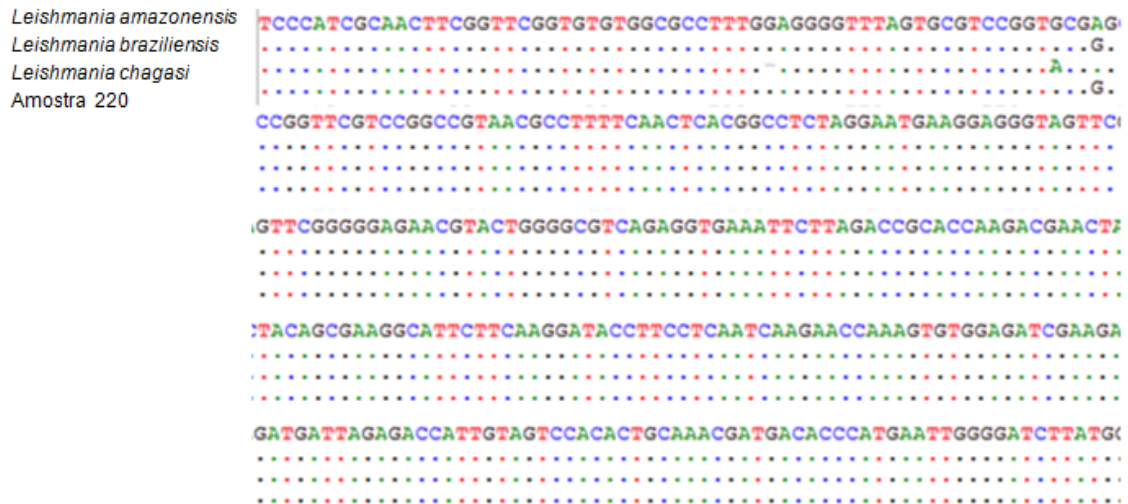
Alinhamento amostra 217 (Complexo *cortezzi*) - *Le. braziliensis*



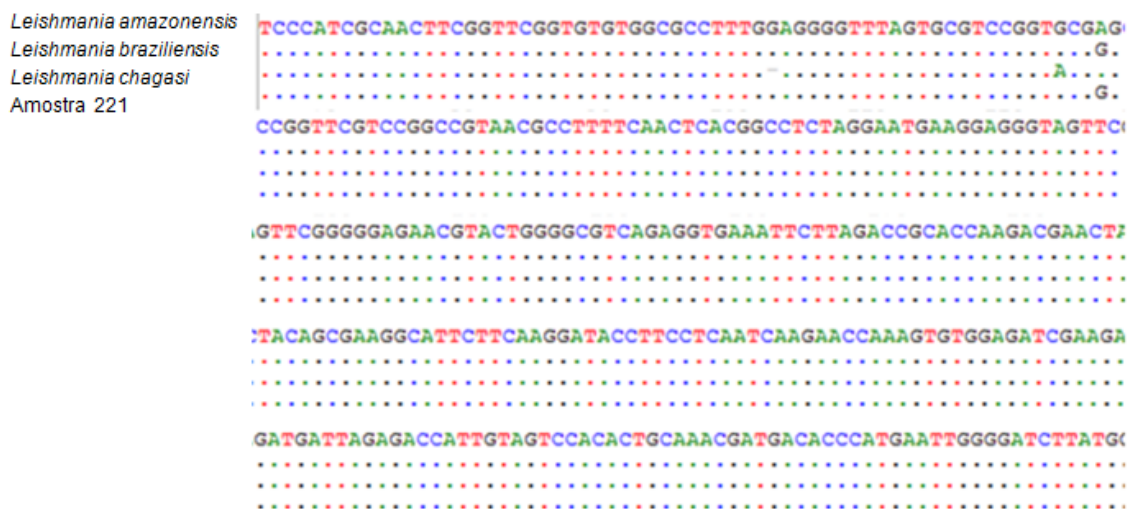
Alinhamento amostra 218 (*Lu. longipalpis*) - *Le. braziliensis*



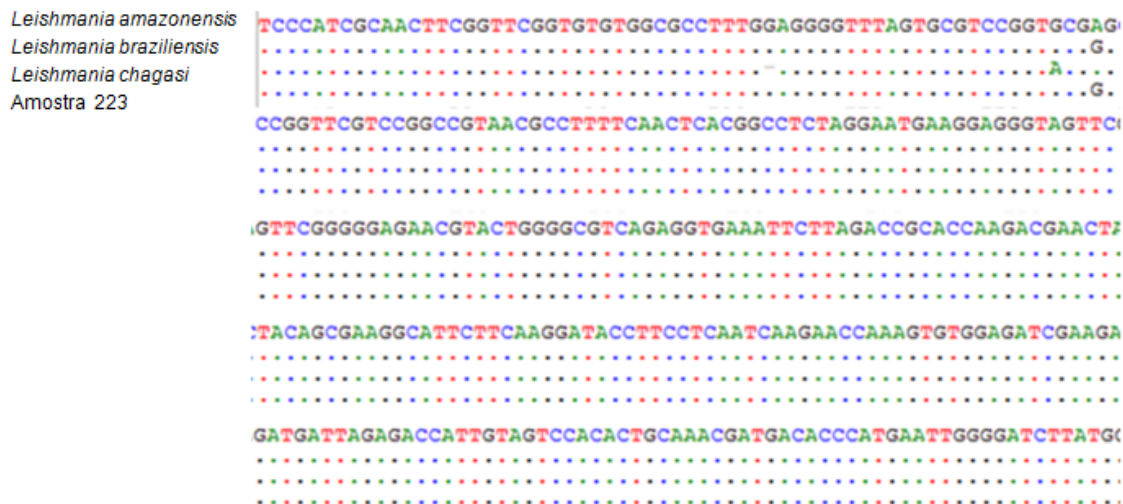
Alinhamento amostra 220 (*Lu. pessoai*) - *Le. braziliensis*



Alinhamento amostra 221 (*Lu. sordellii*) - *Le. braziliensis*



Alinhamento amostra 223 (*Lu. longipalpis*) - *Le. braziliensis*



Alinhamento amostra 224 (*Lu. pessoai*) - *Le. braziliensis*



Alinhamento amostra 226 (Complexo *cortezzi*) - *Le. braziliensis*



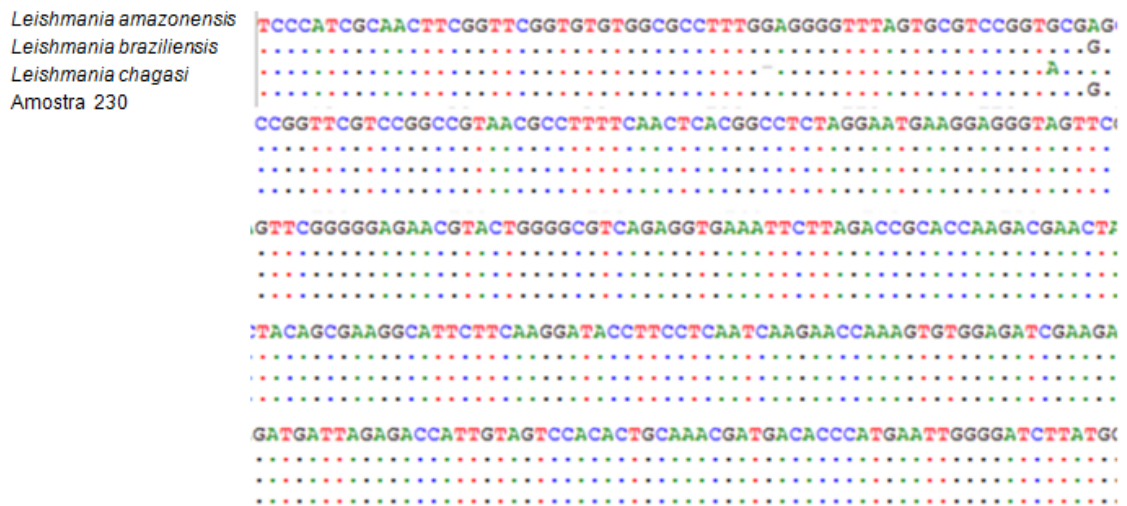
Alinhamento amostra 227 (Complexo *cortezzi*) - *Le. braziliensis*



Alinhamento amostra 229 (*Complexo cortelezii*) - *Le. braziliensis*



Alinhamento amostra 230 (*Lu. longipalpis*) - *Le. braziliensis*



9 Referências Bibliográficas

Abranches P, Silva Pereira MC, Conceição-Silva FM, Santos Gomes GM, Janz JG. Canine leishmaniosis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol* 1991; 77: 557-561.

Aguiar GM, Medeiros WM. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil 2003; p.207- 255. In Rangel EF & Lainson R (org.), *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 368 pp.

Aguillar CM, Fernández E, Fernández R, Cannova DC, Ferrer E, Cabrera Z, Souza WJS, Coutinho SG. Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93: 15- 16.

Almeida OS, Minzão ER, Minzão LD, Silva RS, Ferreira AD, Faccenda O, Andrade-Filho JD. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43:723-727.

Almeida MAO, Jesus EEV, Sousa-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol* 2005; 127: 227-232.

Andrade AJ. Ecologia química de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): desenvolvimento de uma armadilha e análise dos hidrocarbonetos cuticulares das espécies. [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

Andrade-Filho JD, Carneiro APS, Lima MLN, Santiago RM, Gama MA, Santos CA, Falcão AL, Brazil RP. Flebotomíneos de Timóteo, Estado de Minas Gerais, Brasil (Diptera: Psychodidae). *Cad Saúde Pública* 1997; 13: 767-770.

Andrade Filho JD, Valente MB, Andrade WAD, Brazil RP, Falcão AL. Phlebotomine sand flies in the State of Tocantins, Brazil (Diptera: Psychodidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34: 323-329.

Antonialli SAC, Torres TG, Paranhos-Filho AC, Tolezano JE. Spatial analysis of American visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul state, Central Brazil. *J Infect* 2007; 54:509-514.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1269-81.

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

Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology* 1996; 14: 523-532.

Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cef BJ, Sampaio D, Carvalho EM, Rocha H, Teixeira R, Johnson WD. A prospective study of visceral leishmaniasis in endemic area of Brazil. *J Infect Dis* 1986; 154: 639-649.

Barata RA, França-Silva JC, Costa RT, Fortes-Dias CL, Silva JC, Paula EV, et al. Phlebotomine Sand Flies in Porteirinha, na Area of American Visceral Leishmaniasis Transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 481-487.

Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES, Fiúza JA, Gonçalves CM, de Paula KM, Dias ES. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38: 421-425.

Barcellos C, Bastos FI. Geoprocessamento, ambiente e saúde: uma união possível? *Cad Saúde Pública*. 1996; 12: 389-97.

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

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 2007; 37: 1097-106.

Beati L, Cáceres AG, Lee JA, Munstermann LE. Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol* 2004; 34: 225-234.

Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez ID. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban Leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 645-647.

Biogene. Kit para o diagnóstico do Calazar canino. Disponível em: <http://www.biogene.ind.br/index.php?pag=produtos>. Acesso em: 20 de jan de 2014.

Borges BKA, Silva JAD, Haddad JPA, Moreira EC, Magalhães DFD, Ribeiro LML, Fiúza VDOP. Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saude Publica* 2008, 24: 777-784.

Brasil. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde. Ministério da Saúde (MS)/ Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília. DF. 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ed.MS, 2006. 120 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 85-334-0742-4. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_viscerai2006.pdf. Acesso em: 05 dez 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde - Manual de vigilância da leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, Ministério da Saúde, 2007.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Legislação Federal*. 2008.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. II Fórum de discussão sobre o tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC)

2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/PDF/ii_forum_tratamento_relatorio_final30_7_10.pdf. Acesso em: 04 Dez 2013

Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos e Notificação. Proporção e Listagem de casos de doença de notificação compulsória (DNC) encerrados oportunamente. Brasília: MS, [s.d]. 2013. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>. Acesso em: 14 mar 2013.

Brazil RP & Brazil BG. Bionomia. In: Rangel EF, Lainson R (orgs) Flebotomíneos do Brasil. Editora da Fundação Oswaldo Cruz 2003; 257-274.

Brazil RP, Carneiro LV, Andrade Filho JD, Alves JCM, Falcão AL. Biology of *Lutzomyia lenti* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae). Ann Soc Bras Entomol 1997; 26: 191-193.

Brener Z. Calazar canino em Minas Gerais [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da Universidade de Minas Gerais, 1957.

Brumpt E, Pedroso A. Pesquisa epidemiológica sobre a leishmaniose americana das florestas no Estado de São Paulo. Ann Paul Med Cir 1913; 1: 97-136.

Burns-Jr JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaró 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 1993; 90:775–779.

Cabrera MAA, Paula AA, Da Silva AVM, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Jansen AM. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assesment of risk factors. Rev Inst Med Trop São Paulo 2003; 45: 79-83.

Caceres AG. Distribucion geografica de *Lutzomyia verrucarum* (Townsend, 1913) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), vector de la batonellosis humana en el Peru. Rev Inst Med Trop São Paulo 1993; 35: 485-490.

Caldas AJM, Costa JML, Silva AAM, Vinhas V, Barral A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in northeast Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001; 95:1-8.

Camargo LB; Langoni H. Impact of leishmaniasis on public health. J Ven Anim and Toxins including Trop Dis 2006; 12, 527-548.

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

Camargo-Neves VLF, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spínola RMF, Cruz OG. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana- Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. Cad Saúde Pública 2001; 17: 1263-1267.

Cândido TC, Perri, SHV, Gerzoschkwitz TO, Luvizotto MCR, Lima V.M.F. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. Vet Parasitol 2008; 157: 175–181.

Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcão AL, A. C. V. M. Lima & C. M. F. Gontijo. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. Vect Borne and Zoo Dis 2008; 8: 407-414.

Chaves LF, Cohen LM, Pascual M, Wilson ML. Social exclusion modifies climate and deforestation impacts on a vector-borne disease. Negl Trop Dis. 2008; 2.

Choi CM & Lerner EA. Leishmaniasis as an Emerging Infection. J Investig Dermatol Symp Proc 2001; 6: 175-182.

Ceará. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Informe Epidemiológico: Leishmaniose visceral, p. 1-9, 2009.

Ceará. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Situação de Saúde do Ceará: Leishmaniose visceral, p. 58, 2011.

Chagas E, Cunha AM, Ferreira L C, Deane L, Deane G, Guimarães FN, Von Paumgarten MJ, Sá B. Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1938; 33: 89-229.

Comer JA & Brown J. Use of hollow trees as diurnal resting shelter by *Lutzomyia shannoni* (Diptera, Psychodidae) on Ossabaw Island, Georgia. Environ Entomol 1993; 22: 613-617.

Condino MLF, Sampaio SMP, Henriques LF, Galati EAB, Wanderley DMV, Corrêa FMA 1998. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos do estado de São Paulo, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 31: 355-360.

Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Morales A, Carrasquilla CF, Young DG, Kreutzer RD, Boshell J, Palau MT, Caceres E, Pelaez D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. Am J Trop Med Hyg 1989; 40: 480-486.

Costa JML. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. Gazeta Médica 2005; 75: 3-17.

Costa MCN, Teixeira MGLC. A concepção de “espaço” na investigação epidemiológica. Cad Saúde Pública 1999; 15: 217-279.

Costa SM, Cechenel 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: 149-53.

Coutinho MTZ, Linardi PM. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? Vet Parasitol 2007;147: 320-325.

Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MCA, Tramontano N. A survey for American cutaneous and visceral Leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human disease occur. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985; 80: 17-22.

Cross ER, Newcomb WW, Turcker CJ. Use of weather data and remote sensing to predict the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in southwest Asia. Am J Trop Med Hyg 1996; 54: 530-536.

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

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

Curi, N. H. A; Miranda I.; Talamoni S. A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 99-101.

Dantas-Torres F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101: 117-118.

Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 2007; 149: 139-146.

Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad Saúde Pública* 2000; 16: 925-950.

Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Tese de Livre Docência. Faculdade de Medicina 1956; USP, São Paulo, 162 pp.

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

Deane LM, Deane MP. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. *O Hospital* 1954; 45: 419-421.

Deane LM, Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *O Hospital* 1955; 47: 75-87.

de Paula AA, da Silva AM, Fernandes O, Jansen AM. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. *J Parasitol* 2003; 89: 832-836.

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

Dias FDOP, Lorosa ES, Rebêlo JMM. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912)(Psychodidae, Phlebotominae). *Cad Saúde Pública* 2003; 19: 1373-1380.

Dias-Lima AG, Castellon EG, Sherlock I. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma floresta primária de terra firme da estação experimental de silvicultura tropical, estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica* 2003; 33: 303-316.

Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, Corey R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 1240-1242.

Donalísio MR, Peterson AT, Costa PL, da Silva FJ, Valença HF, Shaw JJ, Brandão-Filho SP. Microspatial Distributional Patterns of Vectors of Cutaneous Leishmaniasis in Pernambuco, Northeastern Brazil. *J Trop Med* 2012; 2012.

Dye C, Killick-Kendrick R, Vitutia MM, Walton R, Killick-Kendrick M, Harith AE, Guy MW, Canavate MC, Hasibeder G. Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basis reproduction number calculated from a cross - sectional serological survey on the Island of Gozo. *Parasitology* 1992; 105: 35-41.

el Hassan AM, Khalil EAG, el Sheikh EA, Zijlstra EE, Osman A, Ibrahim ME. Post kala-azar ocular leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 177-179.

Elnaiem DEA, Connor SJ, Thomson MC, Hassan MM, Hassan HK, Aboud MA, Ashford RW. Environmental determinants of the distribution of *Phlebotomus orientalis* in Sudan. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92: 877-887.

Elkhoury ANSM. Vigilância e controle da leishmaniose visceral no Brasil. Consulta de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas 2005; 24.

Elnaiem DEA, Schorscher J, Bendall A, Obsomer V, Osman ME, Mekkawi AM, Connor SJ, Ashford RW, Thomson MC. 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: 10-17.

Eterovick PC. & Fernandes W. 2001. Tadpole distribution within montane meadow streams at the Serra do Cipó, southeastern Brazil: ecological or phylogenetic constraints? *J Trop Ecology* 2001; 17: 683-693.

Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa AD, Lima JW, Pearson RD. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brasil. *J Infect Dis* 1992; 166: 1124-1132.

Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi-Filho G, Sessa PA, Carias VRD, Jesus AC, Alencar JTAD. Participação do cão no ciclo de transmissão da Leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil; Participation of the dog in the cycle of transmission of cutaneous leishmanioses in the municipality of Viana, State of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986; 81: 155-63.

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

Figueiredo FB, Bonna ICF, Nascimento LD, Costat BC, Pacheco TMV, Amendoeira MRR, MAadeira MF. (2009). Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. *Rev Soci Bras Med Trop* 2009; 42: 141-145.

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

Forattini OP & Patoli D Aun R. Algumas observações sobre o comportamento da *Leishmania braziliensis* em cães. *Arq Fac Hig* 1953; 7:139, 55.

Forattini OP, Pattoli DB, Rabello EX, Ferreira OA. Nota sobre infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 1973; 7: 181-184.

França-Silva JC. Leishmaniose visceral canina no município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. Dissertação de Mestrado 1997; 120 pp.

França-Silva JC. Distribuição espacial e temporal da leishmaniose visceral canina em relação à densidade vetorial e ao controle de cães infectados em Porteirinha - Minas Gerais (1998-2002) [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

Fróes HP. Leishmaniose Visceral no Brasil e especialmente na Bahia. *Médico* 1935; 4:109-112.

FUNASA 2002. Vigilância e Monitoramento da Leishmaniose Tegumentar Americana em Unidades Territoriais, 199-2001. Boletim Eletrônico Epidemiológico, número 05.

Galati EAB. Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF, Lainson R. (Org.). Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz 2003; 23-52.

Galati EAB, Nunes VL, Dorval MEC, Oshiro ET, Cristaldo G, Espíndola MA, Rocha HC, Garcia WB. 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 EA, Nunes VL, Rego Jr FDA, 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: 378-90.

Galimbertti MZ, Katz G, Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Casanova C, Costa AI, Araujo, MFL, Taniguchi HH, Barbosa JAR, Barbosa JER, Tolezano JE, Pinto PLS. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32 (Suppl 1): 217.

Genaro O. Leishmaniose visceral canina experimental. [Tese Doutorado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1993.

Gleiser RM, Gorla DE, Ludueña Almeida FF 1997. Monitoring the abundance of *Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus* (Macquart 1838) (Diptera: Culicidae) to the south

of Mar Chiquita Lake, central Argentina, with the aid remote sensing. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; 91: 917-926.

Godoy MFD, Lucena JMD, Miquelin AR, Paiva FF, Oliveira DLDQ, Augustin Junior JL, Chiaravalloti-Neto F. Mortalidade por doenças cardiovasculares e níveis socioeconômicos na população de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, Brasil. *Arq Bras Cardiol* 2007; 88: 200-206.

Gomes AC, Barata JMS, Rocha e Silva EO, Galati EAB. Ecological aspects of American cutaneous leishmaniosis: 6. Anthrophillic botomus fauna of residual forest situated in central north-eastern region of the São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop* 1989; 31: 32-39.

Gomes AC, Galati EAB. Flebotomíneos de Londrina, Paraná (Brasil) e observações ecológicas sobre algumas espécies. *Rev Saúde Pública* 1977; 11: 284-287.

Gomes AC, Galati EAB. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 5. Estratificação da atividade espacial e estacional de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) em áreas de cultura agrícola da região de Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Inst Med Trop* 1987; 82: 467- 473.

Gomes AC, Galati EAB. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 7-Capacidade vetorial flebotomínea em ambiente florestal primário do sistema da Serra do Mar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública* 1989; 23: 136-142.

Gontijo CMF, da Silva ES, de Fuccio MB, de Souza MCA, Pacheco RS, Dias ES, Andrade-Filho JD, Brazil RP, Melo MN. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop* 2002; 81: 143-150.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 2004; 7: 338-349.

Grimaldi Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Review* 1993; 6: 230-250.

Guimarães FN, Azevedo M, Damasceno R. Tegumentar leishmaniosis-zoonosis of wild rodents in Amazonia. Mem Inst Oswaldo Cruz 1968; 66: 151-168.

IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2006a. Disponível em: www2.ibama.gov.br/~geobr/geo3port/geo3port/cap2%20_biodiversidade.pdf; Acesso em 20 nov de 2013.

IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2006b. Disponível em: www2.ibama.gov.br/unidades/parques/reuc/3.htm; Acesso em 20 nov de 2013.

IBGE. Censo Demográfico 2010, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=313460>; Acesso em 18 de nov de 2013.

Kawa H, Sabroza PC. Espacialização da leishmaniose tegumentar na cidade do Rio de Janeiro. Cad Saúde Pública 2002; 18: 853-65.

Killick-Kendrick R, Moroli M, Killick-Kendrick M. Bibliography on the colonization of Phlebotomine sandflies. Parasitologia 1991; 33: 321-333.

Kitron U. Landscape Ecology and epidemiology of vector borne diseases: tools for spatial analysis. J Med Entomol 1998; 35: 435-445.

Krauspenhar C, Beck C, Sperotto V, Da Silva AA, Bastos R, Rodrigues L. Visceral leishmaniasis in a dog in Cruz Alta, Rio Grande do Sul, south Brazil. Ciência Rural 2007, 37: 907-910.

Langohr REIM, Schossler JEW, de Barros SS, de Barros CSL. Leishmaniose cutânea em cobaias (*Cavia porcellus*). Ciência Rural 2000 30: 525-528.

Lainson R, Dye C, Shaw JJ, Macdonald DW, Courtenay O, Souza A, Silveira T. Amazonian visceral leishmaniasis - distribuição of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 1990; 85: 135-137.

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – Review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100: 811-827.

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 & Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: v. studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso state, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1970; 64: 654.

Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Silveira FT. Leishmaniasis in Brazil XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79: 223-226.

Lara-Silva FO. Leishmaniose tegumentar americana em Governador Valadares (Minas Gerais, Brasil): estudo de reservatórios e vetores [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

Lewis DJ. The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis. *Annual Review of Entomology* 1974; 19: 363-384.

Lima, JFS. Diversidade cariológica de roedores de pequeno porte do estado do Tocantins, Brasil [Tese de Doutorado]. Rio Claro (SP): Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2000.

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

Macedo ITF, Bevilacqua CML, Moraes NB, Souza LC, Linhares FE, Amóra SSA, Oliveira LMB. Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de Leishmaniose Visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. *Ciência Animal* 2008; 18: 67-74.

Madeira MDF, Schubach ADO, Schubach TMP, Leal CA, Marzochi MCDA. 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 J Infect Dis* 2004; 8: 440-444.

Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 2008; 158: 274-287.

Magalhães PA, Mayrink W, Costa C, Batista SM, Michalik MSM, Williams P. Calazar na zona do Rio Doce - Minas Gerais. Resultado das medidas profiláticas. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1980; 22:197-202.

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

Manna L, Vitale F, REale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N, Gravino AE. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2004; 125: 251-262.

Marcondes CB, Santos- Neto LG, Lozovei AL. Ecology of Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in Brazilian Atlantic Forest. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34: 255- 260.

Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura AM, Timbó M, Gripp AH, Pessanha JE, Dias ES. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spacial analysis, in Belo Horizontemunicipality, state of Minas Gerais, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 31-38.

Marzochi, MCA. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. *J Bras Med* 1992; 63: 82-104.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJ, Amendoeira MR. Leishmaniose visceral (Calazar). *J Bras Med* 1981; 41: 61-84.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJS, Toledo LM, Grimaldi JR G, Momen H, Pacheco RS, Sabrosa PC, Souza MA, Rangel JR FB, Tramontano N. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brasil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological finds (1977-1983). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1985; 80: 349-357.

Marzochi M, & Marsden P. Ecologia e controle de vetores-Leishmanioses. *Encontro Nacional sobre Saúde e Meio Ambiente* 1991; 31-36.

Marzochi MCA & Marzochi KB. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging Anthroponosis and Possibilities for Their Control. *Cad. Saúde Pública* 1994; 10: 359-75.

Maurício IL, Gaunt MW, Stothard JR, Miles MA. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitology*. 2001; 122: 393-403.

Mayo RC, Casanova C, Mascarini L M, Pignatti MG, Rangel O, Galati EAB, Wanderley DMV, Corrêa FMDA. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana, no município de Itupeva, região sudeste do estado de São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31: 339-45.

Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, da Costa CA, Falcão AR, Melo MN, Falcão AL. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 1979; 73: 123-137.

Medeiros AR, Silva Jr WA, Roselino AM. DNA sequencing confirms the involvement of *Leishmania (L.) amazonensis* in american tegumentary leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. *Clinics*. 2008; 64: 451-456.

Medronho RA. Geoprocessamento e saúde: uma nova abordagem do espaço no processo saúde-doença. Rio de Janeiro. FIOCRUZ/CICT/NECT, 1995, 135 p.

Medronho RA, Perez MA. Distribuição das doenças no espaço e no tempo. In: Medronho RA, Carvalho DM, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL. *Epidemiologia*. São Paulo: Editora Atheneu; 2002. p. 57-71.

Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. *Rev Bras Parasitol Vet* 2004; 23: 41-45.

Meneses CRV, de Azevedo ACR, Miranda S, da Costa WAC, Rangel EF. Ecology of American cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *J Soc Vector Ecology* 2002; 27: 207-214.

Menezes FCD. Sistema de informação de Leishmaniose Visceral (LV) em Belo Horizonte - Minas Gerais: avaliação do subcomponente Inquérito Canino no período

de 2006 a 2010 [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

Michalsky EM, França-Silva JC, Barata RA, Lara-Silva FO, Loureiro AMF, Fortes-Dias CL, Dias ES. Phlebotomine diistribution in Janaúba, na area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104:56-61.

Michalsky EM, Rocha MF, da Rocha Lima AC, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, dos Santos SL, Barata RA, Romanha AJ, Fortes-Dias CL, Dias ES. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. Vet Parasitol 2007; 147: 67-76.

MINAS GERAIS, Secretaria Municipal de Saúde de Jaboticatubas. Planejamento Estratégico para Implantação do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral - PCLV, 2007.

Ministério da Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Brasília. 2010: 62.

Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Gonçalves M, Reis MG, Carvalho L, Fernandes O, Barral-Netto M, Barral A. Frequency of Infection of *Lutzomyia* Phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian Endemic Area as Assessed by Pinpoint Capture and Polymerase Chain Reaction. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97: 185-188.

Missawa NA & Dias ES. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Várzea Grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102: 913-918.

Missawa NA, Lorosa ES, Dias ES. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. Rev Soc Bras Med Trop 2008; 41: 365-368.

Monteiro EM, França-Silva JC, Costa RTD, Costa DC, Barata RA, de Paula EV, Machado-Coelho GLL, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias, E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38: 147-52.

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

Negrão GN & Ferreira MEC. Leishmaniose Tegumentar Americana: aspectos geográficos intervenientes na ocorrência da enfermidade no município de Maringá, Paraná. *Hygeia* 2009; 5(8).

Nunes CM, Pires MMP, da Silva KM, Assis FD, Gonçalves-Filho J, Perri SHV. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Veterinary Parasitology* 2010; 170:131–133.

Nunes VLB, Galati EAB, Nunes DB, Zinezzi RO, Savani ESMM, Ishikawa E, Camargo MCGO, D'Áuria SRN, Cristaldo G, Rocha HC. Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34: 301-302.

Oliveira AG, Andrade-Filho JD, Flacão 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: 933-944.

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

Oliveira CDL, Morais MHF, Machado-Coelho GLL. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. *Cad Saúde Pública* [online]. 2008; 24: 2953-2958.

Oliveira LS, Julião FS, Souza VMM, Freitas DS, Souza BMPS, Paule BJA, Aguiar HP, Melo SMB, Franke CR. A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. *Cienc Anim Bras* 2005; 6: 41-47.

Oliveira-Pereira YN, Rebêlo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp. na Amazônia maranhense. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39: 540-543.

Paiva BR, Secundino NFC, Nascimento JC, Pimenta PFP, Galati EAB, Junior HF, Malafronte RS. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Tropica* 2006; 99: 252-259.

Parvizi P, Moradi G, Akbari G, Farahmand M, Ready PD, Piazak N, Assmar M, Amirkhani A. PCR detection and sequencing of parasite ITS-rDNA gene from reservoirs host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Parasitol Res* 2008; 103:1273-1278.

Passos VMA, Falcão AL, Marzochi MCA, Gontijo CMF, Dias ES, Barbosa-Santos EGO, Guerra HL, Katz N. Epidemiological Aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in a Periurban Area of the Metropolitan Region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993; 88: 103-110.

Paz GF, Ribeiro MFB, Michalsky EM, Lima ACVMR, França-Silva JC, Barata RA, Fortes-Dias CL, Dias ES. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 2010; 106: 523-528.

Penna HA. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil Médico* 1934; 48: 949-950.

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

Pimenta PFP, Secundino NFC, Blanco EEN. Interação leishmania-hospedeiro invertebrado. In: Rangel EF & Lainson R. (Org.). *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. cap. 5, p. 275-290.

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

Porrozzi R, da Costa MVS, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD, Fernandes AP, Gazzinelli RT, Campos-Neto A, Grimaldi G. 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 Vacc Immunol 2007; 14: 544-548.

Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. Microbes Infect 2007; 9: 1307-1315.

Prado PFD, Rocha MF, Sousa JFD, Caldeira DI, Paz GF, Dias ES. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. Rev Soc Bras Med Trop 2011; 44: 561-566.

Pugedo H, Barata RA, França-Silva JC, Silva JC, Dias ES. HP: an improved model of suction light trap for the capture of small insects. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38: 70-72.

Quaresma PF. Estudo da leishmaniose tegumentar na terra indígena Xakriabá: o parasito, os hospedeiros e os vetores [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

Queiroz-Júnior EM. Validação do teste imunocromatográfico rápido dual path platform para o diagnóstico da leishmaníase visceral canina. Universidade Estadual do Ceará. Dissertação de Mestrado 2011; 77 pp.

Queiroz MFM, Varjão JR, Moraes SC, Salcedo GE. Analysis of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Barra do Garças, State of Mato Grosso, Brazil, and the influence of environmental variables on the vector density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). Rev Soc Bras Med Trop 2012; 45: 313-317.

Ramiro MJ, Zárate JJ, Hanke T, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Lucientes J, Castilho JA, Larraga V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. Vaccine 2003; 21: 2474–2484.

Rangel EF & Lainson R. Ecologia das Leishmanioses: transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana In: Rangel EF & Lainson R, editores. Flebotomíneos do Brasil. 20 ed. Rio de Janeiro: Editora Fliocruz; 2003. p. 291-309.

Rangel EF & Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Mem Instituto Oswaldo Cruz 2009; 104: 937-954.

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: 2352-2356.

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: 530-541.

Rezende CL, Bastos O. Calazar infantil. Relato de 1 caso ocorrido em Belo Horizonte. J Pediatr 1959; 24: 324-331.

Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Rioux JA, Lanoie G, Serres F, Prailong F, Bastian P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. Ann Parasitol Human Comp 1990; 65: 111-125.

Rodrigues EH, Brito MEF, Mendonca MG, Werkhauser RP, Coutinho EM, Souza WV, de Albuquerque MFPM, Jardim ML, Abath FG. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in area of endemicity in northeastern Brazil. J Clin Microbiol 2002; 40: 3572-3576.

Rogers DJ. Satellite imagery, tsetse and trypanosomiasis in Africa. Preventive Veterinary Medicine 1991; 11: 201-220.

Romero GA & Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - a systematic review. PLoS neglected tropical diseases 2010; 4: 584.

Rosati S, Ortoffi M, Profiti M, Mannelli A, Mignone W, Bollo E, Gradoni L. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. Clin Diag Lab Immunology 2003; 10: 1153-1156.

Salomón OD, Acardi SA, Liotta DJ, Fernández MS, Lestani E, López D, Mastrangelo AV, Figueroa M, Fatorre G. Epidemiological aspects of cutaneous leishmaniasis in the Iguazú falls area of Argentina. *Acta Trop.* 2009; 109: 5-11.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. *J Biol Chem* 1989; 264: 8222-43229.

Santos DRD, Santos ARD, Santos ESD, Oliveira OD, Poiani LP, Silva AMD. Observações sobre a atividade diurna de *Nyssomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) na área urbana de Maringá, Paraná, Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 2009; 18: 227-236.

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

Santos SO, Arias JR, Hoffmann MP, Furlan MBG, Ferreira WF, Pereira C, Ferreira L. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul State. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36: 633-634.

Saraiva L, Carvalho GML, Gontijo CMF, Quaresma PF, Lima ACVMR, Falcão AL, Andrade-Filho JD. Natural infection of *Nyssomyia neivai* and *Evandromyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J Med Entomol* 2009; 46: 1159–1163.

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

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. Universidade Federal de Brasília. Faculdade de Medicina. Dissertação de Mestrado 2012; 74 pp.

Scorza JV, Ortiz I, Gomez I. Observaciones biologicas sobre algunos flebotomos de Rancho Grande (Venezuela). Sobre los factores microclimáticos que determinan la

endemicidad de la flebotomo fauna de "Rancho Grande". Acta Biol Venez 1968; 6: 76-83.

Seaman J, Mercer AJ, Sondorp E. The epidemic of visceral leishmaniasis in western Upper Nile, southern Sudan: course and impact from 1984 to 1994. International Journal of Epidemiology 1996; 25: 862-871.

Secundino NFC, Eger Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PFP. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. J Med Entomol 2005; 42: 928-938.

Shaw JJ. New World Leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In J Farrell, World Class Parasites: *Leishmania*, 4, Kluwer Academic Publishers 2002; 11-31.

Sherlock IA. Ecological interactions of visceral Leishmaniasis in the state of Bahia. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91: 671-683.

Sherlock IA. Importância Médico-Veterinária. In: Rangel EF & Lainson R. (Org.). Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. cap. 1, p. 15-22.

Shimabukuro PHF, Galati EAB. Checklist dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. Biota Neotrop 2011; v. 11.

Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96: 285- 291.

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

Silva-Rodrigues EDA & Lima SDC. Alterações ambientais e os riscos de transmissão da leishmaniose tegumentar americana na área de influência da UHE Serra do Facão, Goiás, Brasil. Hygeia 2013; 9: 148-158.

Simpson L. The mitochondrial genome of Kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. Ann Review Microbiol 1987; 41: 363-382.

Snow J. Sobre a maneira de transmissão da cólera. São Paulo: Hucitec/Abrasco; 1990.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alerola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. J Clin Microbiol 2001; 39: 560-563.

Souza MB, Marzochi MCA, Carvalho RW, Ribeiro PC, Pontes CS, Caetano JM, Meira AM. Ausência da *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no município do Rio de Janeiro. Cad Saúde Pública 2003; 19:1881-5.

Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Rangel EF 2001. The Phlebotominae Sand Fly (Diptera: Psychodidae) fauna of two Atlantic Rain Forest Reserves in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 96: 319-324.

Teodoro U, La Salvia-Filho V, Lima EMD, Spinosa RP, Barbosa OC, Ferreira MEMC, Lonardoní MVC. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. Rev Saúde Pública 1993; 27: 242-249.

Teodoro U, Silveira TGV, Santos AR, Santos DR, Santos ES, Oliveira O, Kuhl BB. Freqüência da fauna de flebotomíneos no domicílio e em abrigos de animais domésticos no peridomicílio, nos municípios de Cianorte e Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. Rev Patol Trop 2001; 30: 209-224.

Teodoro U, Silveira TGV, Santos DR, Santos ES, Santos AR, Oliveira O. Influência da organização, da limpeza do peridomicílio e da desinsetização de edificações na densidade populacional de flebotomíneos no município de Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. Cad Saúde Pública 2003; 19: 1801-1813.

Teodoro U, La Salvia Filho V, Lima EM, Misuta NM, Verginassi TG, Ferreira MEMC. Leishmaniose tegumentar americana: Flebótomos de área de transmissão no Norte do Paraná, Brasil. Rev Saúde Pública. 1991; 25: 129-133.

Tesh RB. The genus Phlebovirus and its vectors. Ann Review Entomol; 33: 169–181, 1988.

Tesh RB, Papaevangelou G. Effect of insecticide spraying for malaria control on the incidence of sandfly fever in Athens, Greece. *Am J Trop Med Hyg* 1977; 26:163-166.

Thomaz-Soccol V, Castro EA, Navarro IT, de Farias MR, de Souza LM, Carvalho Y, Bispo S, Membrive NA, Minozzo JC, Truppel J, Bueno W, Luz E. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009; 18: 46-51.

Thomson MC, Connor SJ, Miligan PJW, Flasse S. Mapping malaria risk in Africa – what can satellite data contribute? *Parasitol Today* 1997; 8: 313-318.

Thomson MC, Connor SJ. Environment information systems for the control of arthropod vectors of disease. *Med Vet Entomol* 2000; 14: 227-244.

Thomson MC, Elnaiem DA, Ashford RW, Connor SJ. Toward a malaria risk map for Sudan: mapping the potential distribution of *Phlebotomus orientalis* using digital data of environmental variables. *Trop Med Inter Health* 1999; 4: 105-113.

Travi BL, Vélez ID, Brutus L, Segura I, Jaramillo C, Montoya J. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84: 676-677.

Tuon FF, Amato VS, Graf ME, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis - a systematic review with a meta-analysis. *Int J Dermatol* 2008; 47: 109-124.

Umumbo JA., Hay SI, Goetz RWS, Rogers DJ. Updating historical maps of malaria transmission intensity in East Africa using remote sensing. *Photogramm Eng Remote Sensing* 2002; 68: 161-166.

Vale ECS & Furtado T. Leishmaniose Tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *An. Bras. Dermatol.* 2005; 80: 421-8.

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.

Viannia G. Sobre uma espécie de *Leishmania*. *Brasil Médico* 1912; 25:411.

Vieira JBF, Coelho GE. Leishmaniose visceral ou calazar: Aspectos epidemiológicos e de controle. Rev Soc Bras Med Trop 1998; 31:85-92.

Zulueta AM, Villarroel E, Rodriguez N, Feliciangeli MD, Mazzarri M, Reyes O, Rodriguez V, Centeno M, Barrios RM, Ulrich M. Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniasis in an endemic focus in Eastern Venezuela. Am J Trop Med Hyg 1999; 61: 945-950.

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis: background information. Disponível em: www.who.int/leishmaniasis/en/ 2010; Acesso em 17 nov 2013.

Werneck GL, Maguire JH. Spatial modeling using mixed models: an ecologic study of visceral leishmaniasis in Terezina, Piauí State, Brasil. Cad Saúde Pública 2002; 18: 633-637.

Young GG & 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, 54 Associates Publishers, Am Entomol Inst, Gainesville, Fl., 1994.