

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

ANÁLISE ESPACIAL DAS LEISHMANIOSES NO MUNICÍPIO DE DIVINÓPOLIS,
MINAS GERAIS, BRASIL

por

Rafael Gonçalves Teixeira Neto

Belo Horizonte
Outubro / 2014

TESE DDIP-CPqRR R.G.TEIXEIRA NETO 2014

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

ANÁLISE ESPACIAL DAS LEISHMANIOSES NO MUNICÍPIO DE DIVINÓPOLIS,
MINAS GERAIS, BRASIL

por

Rafael Gonçalves Teixeira Neto

Tese apresentada com vistas à obtenção do
Título Doutor em Ciências na área de
concentração Doenças Infecciosas e
Parasitárias.

Orientação: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo

Coorientação: Dr. Eduardo Sérgio da Silva

Belo Horizonte
Outubro / 2014

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

T266a Teixeira Neto, Rafael Gonçalves.
2014

Análise espacial das leishmanioses no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil / Rafael Gonçalves Teixeira Neto. – Belo Horizonte, 2014.

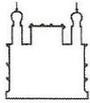
XX, 111 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 113 - 131

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

1. Leishmaniose/epidemiologia 2. *Leishmania*/parasitologia 3. Análise Espacial 4. Vigilância em Saúde Pública/métodos I. Título. II. Gontijo, Célia Maria Ferreira (Orientação). III. Silva, Eduardo Sérgio da (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 4



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

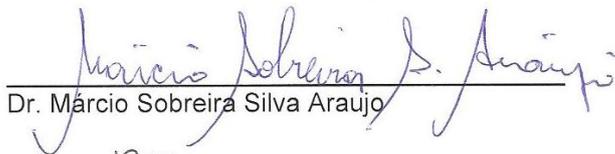
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Ata nonagésima defesa de tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do aluno Rafael Gonçalves Teixeira Neto sob a orientação da Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo e coorientado pelo Dr. Eduardo Sérgio da Silva.

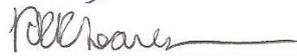
Ao vigésimo nono dia do mês de outubro do ano de dois mil e quatorze às quatorze horas, realizou-se na sala de aula 1 do Centro de Pesquisas René Rachou, o exame da nonagésima defesa de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências – área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias. A tese do aluno, Rafael Gonçalves Teixeira Neto intitula-se “Análise espacial das leishmanioses no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil”. A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo - CPqRR/FIOCRUZ – (Orientadora/Presidente); Dr. Márcio Sobreira Silva Araujo - CPqRR/FIOCRUZ (Titular); Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares - CPqRR/FIOCRUZ (Titular); Dr. Reginaldo Peçanha Brazil - IOC (Titular); Dr. Alexandre Barbosa Reis - UFOP (Titular). Após argüir o aluno e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, o aluno foi considerado APROVADO. Uma vez encerrado o exame, eu, Célia Maria Ferreira Gontijo, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, 29 de outubro de 2014.



Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo



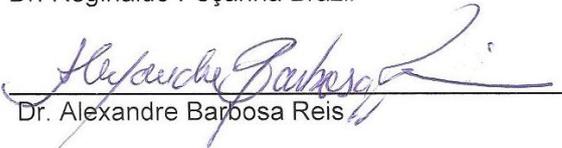
Dr. Márcio Sobreira Silva Araujo



Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares



Dr. Reginaldo Peçanha Brazil



Dr. Alexandre Barbosa Reis

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho à população do Município de Divinópolis

Dedico também a minha esposa Grazielly, meu filho Enzo e minha família

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo, por sempre incentivar minhas ideias, por mais mirabolantes que parecessem. A forma carinhosa com que trata todos que trabalham com você lhe torna um exemplo a ser seguido. Agradeço sinceramente por tudo e torço para que nossa amizade dure para sempre.

Ao meu orientador Dr. Eduardo Sérgio da Silva. Serei sempre agradecido pela confiança que depositou em mim e pela amizade de longa data. Você que abriu as portas da UFSJ e possibilitou a execução deste trabalho e de muitos outros nos quais trabalhamos junto. Espero poder continuar fazendo parte do seu ciclo de trabalho e de amizade pessoal.

Aos colaboradores do projeto Dr. José Dilermando Andrade Filho, Dra. Cláudia di Lorenzo, Msc. Vinícius Silva Belo, Msc. Letícia Cavalari Pinheiro pelo auxílio na execução do projeto e pela amizade meu muito obrigado.

À Renata Aparecida Nascimento por auxiliar em diversas etapas do desenvolvimento deste trabalho, por sua disposição, alegria e amizade meus sinceros agradecimentos.

À equipe de captura de pequenos mamíferos: Helbert Antônio Botelho, Gabriel Barbosa Tonelli e Bruno Warley Leandro Nascimento meus sinceros agradecimentos pelo auxílio na execução desta etapa difícil do trabalho, pelos momentos de alegria proporcionados e pela amizade de todos.

À Marcella Oliveira e Marianna Manhani técnicas responsáveis pelos exames sorológicos da Leishmaniose Canina, por seu comprometimento e auxílio primordial para o desenvolvimento deste trabalho.

À Geraldina Marçal Gama pelo desenvolvimento do inquérito piloto dos cães. Seus dados foram de extrema importância para a realização de um trabalho bem feito.

À técnica do laboratório de Parasitologia da UFSJ Valeriana Valadares Pereira pela ajuda e disponibilidade em todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de Leishmanioses da FIOCRUZ/Minas: Patrícia Quaresma, Ana Cristina, Agnes Sampaio, Janaina de Moura, Felipe Dutra Rego, Raquel Carvalho Gontijo, Jeronimo Rugani, Érika Michalsky, Josie Lopes, Shara Regina, Fabiana Lara e todos os demais membros do LALEI, meu muito obrigado pela amizade.

Aos novos amigos e colegas de trabalho da UFSJ principalmente aos professores Gilberto Fontes e Eliana Maria meus agradecimentos pelos conselhos e dicas.

Aos agentes de saúde da Prefeitura Municipal de Divinópolis que participaram do desenvolvimento do inquérito sorológico da Leishmaniose Canina, meus sinceros agradecimentos.

À Prefeitura do Município de Divinópolis e Secretaria Municipal de Saúde obrigado pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Plano Diretor do Município de Divinópolis agradeço pela disponibilização das Bases digitais necessária para a elaboração dos mapas de distribuição da doença.

Aos Professores Rodrigo Pedro Pinto Soares, Márcio Sobreira Silva Araújo e Cláudia Di Lorenzo Oliveira pelas sugestões e contribuições importantíssima durante a qualificação.

Às funcionárias da UFSJ Enária, Claudinha, Luciana, Joice, Érika, Fernanda e Aline obrigado pela prestatividade, paciência e amizade.

Aos Motoristas do CPqRR e UFSJ-CCO pela disponibilidade e apoio nos trabalhos de campo e nas viagens necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

À coordenação do curso de Doutorado em Ciências da Saúde (FIOCRUZ/MG) e a todos os professores que fazem parte deste programa pela oportunidade e pelos ensinamentos, meus sinceros agradecimentos.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, pela infraestrutura, especialmente, dos Laboratórios de Leishmanioses.

À Universidade Federal de São João del Rei – Campus Centro Oeste pelo apoio e infraestrutura oferecida.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou pela oportunidade recebida.

À minha família querida, Romeu e Eliana, pai e mãe que tanto amo. Janaína, Victor e Vanessa pelo amor que nos mantém sempre unidos. Aos meus sobrinhos queridos Quésia, Natã, Davi, Arthur, Sara, Henrique e a Laís, amo vocês!

À minha esposa, Grazielly, pela presença constante, pelo apoio, compreensão e carinho. Te amo!

Ao maior presente que a vida poderia me dar, meu filho Enzo. Pelo seu amor incondicional. Tudo que faço é para você, te amo!

Finalmente à Deus por proporcionar momentos tão maravilhosos na minha vida. Não tenho nada a pedir, somente agradecer!

AGRADECIMENTOS INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; APQ-00371-10).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; no. 478672/2010-1).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XVII
RESUMO.....	XIX
ABSTRACT	XX
1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS:.....	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
3.1 As leishmanioses	24
3.2 Leishmaniose Tegumentar Americana.....	26
3.3 Leishmaniose Visceral	30
3.4 Leishmaniose Visceral Canina.....	33
3.5 Urbanização das Leishmanioses	36
3.6 Análise espacial em saúde.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Delineamento do estudo	40
4.2 Área de estudo.....	41
4.3 Procedimentos éticos.....	42
4.4 Estudo dos animais silvestres e sinantrópicos	43
4.4.1 Definição das trilhas e residências de captura dos animais	43
4.4.2 Coleta das amostras biológicas.....	45
4.5 Estudo dos reservatórios domésticos.....	45
4.6 Métodos de diagnóstico	47
4.6.1 Diagnóstico parasitológico.....	47
4.6.2 Diagnóstico sorológico da Leishmaniose Canina	48
4.6.3 Diagnóstico molecular: Detecção e caracterização da infecção natural em reservatórios domésticos e silvestres.....	50
4.7 Georreferenciamento.....	53
4.7.1 Densidade de Kernel	53
4.7.2 Distribuição Direcional (Elipse de Desvio Padrão).....	54

4.7.3	Função K de Ripley Bivariada (K_{12})	54
5	RESULTADOS	56
5.1	Pequenos mamíferos: captura e identificação	56
5.2	Pequenos mamíferos: infecção natural	59
5.2.1	Isolamento em meio de cultura	59
5.2.2	Diagnóstico molecular	59
5.3	Estudo dos reservatórios domésticos	62
5.3.1	Isolamento e caracterização do parasito	62
5.3.2	Inquérito Sorológico amostral da Leishmaniose Canina	64
5.3.3	Análise Espacial da LVC	66
5.4	Análise espacial das leishmanioses humanas	69
5.4.1	Leishmaniose visceral	69
5.4.2	Leishmaniose tegumentar americana	70
5.5	Dependência espacial entre Leishmaniose canina e humana	73
6	DISCUSSÃO	76
6.1	Estudo dos hospedeiros silvestres e sinantrópicos de <i>Leishmania</i> em Divinópolis	77
6.2	Distribuição espacial dos casos humanos de LTA	83
6.3	Estudo dos reservatórios domésticos e dos casos humanos de LV	85
7	CONCLUSÕES	90
8	ANEXOS	91
8.1	Anexo 01 - CEPEA CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISAS ENVOLVENDO ANIMAIS PROTOCOLO:35/2010 DATA DE EMISSÃO:13/08/2010.....	91
8.2	Anexo 02 - MMA/IBAMA/SISBIO LICENÇA PERMANENTE PARA COLETA DE MATERIAL ZOOLOGICO N.º 12989-1 DATA DE EMISSÃO: 21/11/2007 17:46.....	92
8.3	Anexo 03 - TABELA DE NÚMEROS ALEATÓRIOS MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL	93
8.4	Anexo 04 - ARTIGO PUBLICADO: RAFAEL G TEIXEIRA-NETO, EDUARDO S SILVA, RENATA A NASCIMENTO, CLÁUDIA L OLIVEIRA, VINÍCIUS S BELO, LETÍCIA C PINHEIRO AND CÉLIA MF GONTIJO. CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN NA URBAN SETTING OF SOUTHEASTERN BRAZIL:	

	AN ECOLOGICAL STUDY INVOLVING SPATIAL ANALYSIS. <i>PARASITES & VECTORS</i> .7:485, 2014.....	94
8.5	Anexo 05 - ARTIGO PUBLICADO: NASCIMENTO, B.W.; SARAIVA, L.; TEIXEIRA-NETO, R.G.; MEIRA, P.C.; SANGUINETTE, C.C.; TONELLI, G.B.; BOTELHO, H.A.; BELO, V.S.; SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.; FILHO, J.D. STUDY OF SAND FLIES (DIPTERA: PSYCHODIDAE) IN VISCERAL AND CUTANEOUS LEISHMANIASIS AREAS IN CENTRAL WESTERN OF MINAS GERAIS STATE – BRAZIL. <i>ACTA TROPICA</i> . 125:P.262-268, 2013.	105
9	BIBLIOGRAFIA	113

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** Mapa representativo da Zona Urbana do Município de Divinópolis, (A) Destaque da Zona Urbana, bairros e principais áreas de mata, (B) localização geográfica do município em relação ao estado de Minas Gerais e (C) Estado de Minas Gerais e sua localização no Brasil42
- Figura 02:** Imagens das áreas de mata onde foram montados os transectos para captura e disposição das armadilhas e exemplos de pequenos mamíferos capturados. 1: Mata do Noé; 2: Armadilha disposta no Parque do Gafanhoto; 3: Mata do Sidil; 4: Exemplar de *Necromys lasiurus*; 5: Morro da Antena; 6: Exemplar de *Micureus demarerae*.....44
- Figura 03:** Mapa da Zona Urbana do município de Divinópolis, Minas Gerais. Destaque dos pontos de coleta de pequenos mamíferos. Os diamantes em amarelo representam as trilhas de captura em áreas de mata e as estrelas em vermelho as residências selecionadas para a captura.....44
- Figura 04:** Parcelamento do Município de Divinópolis segundo o Plano de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa). A divisão dos estratos é baseada na densidade populacional da região.....46
- Figura 05:** Gráfico representando a frequência dos pequenos mamíferos capturados de acordo com a espécie no período de outubro de 2010 a agosto de 2011 no município de Divinópolis, Minas Gerais.....57

Figura 06: Distribuição dos pequenos mamíferos capturados de acordo com o local de captura entre o período de outubro de 2010 e agosto de 2011 no município de Divinópolis, MG.....58

Figura 07: Gel de agarose a 2% das amostras positivas para o alvo ITS1. PM = Peso Molecular; B20, B26 e B74 = Amostras de baço dos pequenos mamíferos; CP = Controle Positivo e CN = Controle Negativo.....60

Figura 08: PCR-RFLP do alvo ITS1 (Gel 01) e do Gene hsp70 (Gel 02) das amostras dos pequenos mamíferos positivas na PCR. PM = Peso Molecular (100pb); B20, B26 e B74 amostras de DNA do Baço; L.i = controle positivo de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), L.a = controle positivo de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); L.g = controle positivo de *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) e L.b = controle positivo de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903).....61

Figura 09: Mapa da Zona Urbana de Divinópolis. A estrela vermelha representa a residência 03 Bairro Ipiranga onde foi identificado um pequeno mamífero infectado por *L. infantum*. As áreas de mata identificadas pela cor vermelha representam os locais onde foram capturados pequenos mamíferos infectados por *L. braziliensis*.....62

Figura 10: Perfil de digestão do DNA de *Leishmania* (*hsp70*) utilizando a enzima de restrição *HaeIII*. PM: Peso molecular(100pb), M: medula óssea, L: linfonodo, 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 18, 19, 21, 25, 23: número dos cães, CN: controle negativo, L.i.: controle positivo de *L. infantum*, L.b.: controle positivo de *L. braziliensis* e L.a.: controle positivo de *L. amazonensis*63

Figura 11: Mapa da Zona urbana do município de Divinópolis com destaque das quadras onde foram avaliados animais para a realização do Inquérito Sorológico Amostral. Os pontos verdes representam as quadras onde não foram encontrados animais reagentes. Os pontos vermelhos as quadras onde foram identificados animais reagentes na RIFI e ELISA.....65

Figura 12: Mapa da Zona Urbana do município de Divinópolis. Em destaque a densidade de Kernel e as áreas quentes "*Hotspots*" relacionadas à infecção de LVC.....67

Figura 13: Mapa da Zona Urbana do município de Divinópolis. A elipse em vermelho representa a distribuição direcional da LVC.....68

Figura14: Mapa da zona urbana do Município de Divinópolis. As estrelas em vermelho representam os casos humanos de LV ocorridos entre os anos de 2007 e 2013.....69

Figura 15: Mapa da zona urbana do município de Divinópolis. Em destaque a Distribuição direcional dos casos humanos de LV.....70

Figura 16: Perfil histórico da distribuição dos casos humanos de LTA notificados no município de Divinópolis entre os anos de 2007 e 2013. Os círculos em amarelo representam os casos humanos notificados em cada ano.....71

Figura 17: Mapa da zona urbana do município de Divinópolis. As estrelas em vermelho representam os casos humanos de leishmaniose tegumentar notificados entre os anos de 2007 e fevereiro de 2013.....72

Figura18: Mapa da zona urbana do município de Divinópolis. Em destaque (elipse vermelha) a distribuição direcional dos casos humanos de LT notificados entre os anos de 2007 e fevereiro de 2013.....73

Figura 19: Função K12 de Ripley. O gráfico comprova a dependência espacial entre a ocorrência de casos caninos de leishmaniose visceral e casos humanos. A curva em vermelho acima do envelope demonstra que esta dependência é positiva.....74

Figura 20: Mapa da zona urbana do município de Divinópolis. A elipse vermelha representa a aglomeração de casos de LVC. A elipse em azul representa o aglomerado de casos humanos de LV notificados nos últimos 5 anos no município de Divinópolis.....75

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Número absoluto e frequência do total de pequenos mamíferos capturados de acordo com a espécie e a campanha de captura no período de outubro de 2010 a agosto de 2011 no município de Divinópolis, Minas Gerais.....57

Tabela 02: Prevalência da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) de acordo com o estrato avaliado no município de Divinópolis, Minas Gerais no período de março de 2013 a fevereiro de 2014.....66

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aC – Antes de Cristo

CEPEA – Comitê de Ética em Pesquisa com animais

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CREVISA - Centro de Referência e Vigilância em Saúde

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DPP® - Dual Path Platform

ELISA – Ensaio Imunoenzimático ligado à Enzima (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GPS – Sistema de Posicionamento Global

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

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia

IDH – Índice de Desenvolvimento Humano

kDNA - Ácido Desoxirribonucleico do Cinetoplasto

LCD – Leishmaniose Cutânea difusa

LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada

LCM – Leishmaniose Cutâneo-Mucosa

LIT – Liver Infusion Tryptose

LPG – Lipofosfoglicano

LT – Leishmaniose Tegumentar

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

Min – Minutos

mL – Mililitros

mM – Milimolar

MS – Ministério da Saúde

NNN – Meio de Cultura Novy, Mc Neal, Nicolle

°C – Grau Célsius

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCLV – Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

PEAa – Plano de Erradicação do *Aedes aegypti*

pmol – Picomolar

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

RNA – Ácido Ribonucleico

SIG – Sistema de Informações Geográficas

SMF – Sistema Mononuclear Fagocitário

TMB – Tetrametilbenzidina

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFSJ – Universidade Federal de São João del Rei

µL – Microlitros

µM – Micromolar

RESUMO

As Leishmanioses compreendem um grupo de doenças parasitárias, distribuídas em países tropicais e subtropicais, em ciclos zoonóticos e antroponóticos e constituem um grave problema de saúde pública. No Brasil, as leishmanioses eram caracterizadas como endemias rurais, no entanto, casos autóctones vêm sendo notificados em centros urbanos e sua distribuição vem se ampliando consideravelmente. O município de Divinópolis é considerado região endêmica para Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a ocorrência de Leishmaniose Visceral (LV) apesar de recente, vem se expandindo nos últimos anos. Com base neste cenário, o presente estudo objetivou ampliar o conhecimento sobre a situação epidemiológica da LV e da LTA no município de Divinópolis, enfatizando a distribuição espacial dos hospedeiros vertebrados e dos casos humanos na área urbana. Um total de 102 pequenos mamíferos foi capturado no período de um ano em cinco áreas de mata espalhadas na zona urbana do município e em 15 residências com casos de LTA ou LV notificados entre 2005 e 2010. Deste total, três exemplares foram identificados naturalmente infectados por *Leishmania* através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Também foi avaliada a distribuição espacial dos casos humanos de LTA notificados entre os anos de 2007 e fevereiro de 2013. A circulação de *Leishmania infantum* foi confirmada através do isolamento do parasito em cães soropositivos. Foi realizado um inquérito sorológico para Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em toda a zona urbana do município utilizando uma amostragem estratificada e uma prevalência de 3%. Dos 3.652 cães avaliados distribuídos nos 11 estratos do município 169 apresentaram sorologia positiva, com prevalência estimada de 4,62% (3,95 – 5,31). Todas as quadras amostradas no inquérito da LVC e casos humanos de LV ocorridos no município foram georreferenciados. A análise de dependência espacial confirmou que existe uma correlação positiva entre a ocorrência de LVC e casos humanos de LV. Estes achados contribuem para a compreensão da epidemiologia da LTA e da LV no município de Divinópolis e podem auxiliar na definição de áreas prioritárias para a implementação de medidas de controle.

ABSTRACT

The Leishmaniases comprise a group of parasitic diseases, distributed in tropical and subtropical countries in zoonotic and anthroponotic cycles and are a serious public health problem. In Brazil, leishmaniases were characterized as rural endemic diseases, however, autochthonous cases have been reported in urban centers and their distribution has expanded considerably. The municipality of Divinópolis is considered an endemic area for American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) and the occurrence of Visceral Leishmaniasis (VL) although recent, has expanded in recent years. Based on this scenario, the present study aimed to increase knowledge of the epidemiological situation of VL and ACL in the municipality of Divinópolis, emphasizing the spatial distribution of vertebrate hosts and human cases in the urban area. A total of 102 small mammals were captured during one year in five forest areas scattered in the urban area and 15 residences with cases of ACL or VL reported between 2005 and 2010. From these, three specimens were identified naturally infected by *Leishmania* by Polymerase Chain Reaction (PCR). We also evaluated the spatial distribution of human cases of ACL reported between the years 2007 and February 2013. *Leishmania infantum* circulation has been confirmed by isolation of parasites in seropositive dogs. A serological for Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) was conducted across the urban area using a stratified sampling and a prevalence of 3%. Among the 3,652 evaluated dogs distributed in 11 strata of the city 169 had a positive serology, with an estimated prevalence of 4.62% (3.95 to 5.31). All blocks sampled in the survey of CVL and human cases of VL occurring in the municipality were georeferenced. The spatial dependence analysis confirmed a positive correlation between the occurrence of CVL and human cases of VL. These findings contribute to the understanding of the epidemiology of ACL and VL in Divinópolis city and can assist in definition of priority areas for the implementation of control measures.

1 INTRODUÇÃO

Os fatores ecoepidemiológicos envolvidos na gênese das diferentes formas de leishmanioses no Novo Mundo são muito complexos. Várias espécies de *Leishmania* são capazes de causar doença no homem que por sua vez, interagem com diversas espécies de flebotomíneos e mamíferos hospedeiros. O resultado destas interações é uma profusa variedade epidemiológica de difícil entendimento e controle (ASHFORD, 2000; LAINSON & SHAW, 1987; REITHINGER *et al.*, 2007).

Casos autóctones de leishmaniose vêm sendo notificados e aumentam em grandes cidades de Minas Gerais, como por exemplo, em Belo Horizonte e Montes Claros (OLIVEIRA *et al.*, 2001; PRADO *et al.*, 2011). Neste contexto, estudos de transmissão em áreas endêmicas urbanizadas são necessários, pois a falta de conhecimentos ecoepidemiológicos pode contribuir para o aumento no risco da transmissão (GONTIJO & MELO 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Segundo dados da Secretaria Municipal de Saúde o município de Divinópolis é considerado uma região endêmica de transmissão da LT, com 43 casos notificados entre os anos de 2007 até o início de 2013. Durante o período de 2007-2013 15 novos casos de LV foram notificados, demonstrando que o município está passando por um processo de urbanização semelhante ao já observado em outros grandes centros urbanos. Independente dos casos humanos confirmados existem poucos estudos avaliando distribuição das leishmanioses, seus reservatórios ou vetores.

O presente trabalho buscou integrar elementos da pesquisa básica e aplicada que vai desde a utilização de métodos moleculares para a identificação de infecção natural em pequenos mamíferos à avaliação da dependência espacial entre reservatórios e casos humanos. Estas informações, associadas à análise espacial dos dados fortaleceu os conhecimentos sobre a distribuição da doença.

A dificuldade no controle das infecções leishmanióticas explica-se pela grande diversidade de agentes etiológicos, grande número de espécies vetoras, e pela diversidade de animais que podem ser reservatórios destas doenças. Cada área de transmissão possui características únicas que tornam necessários estudos

Introdução

epidemiológicos locais para investigar a(s) espécie(s) de *Leishmania* circulante(s), bem como os vetores e reservatórios. Somente através desta avaliação é possível propor medidas de controle mais específicas e eficientes para a realidade local.

Portanto, a análise espacial das leishmanioses no município de Divinópolis torna-se fundamental para auxiliar na definição de medidas de controle adequadas ao município e na avaliação da distribuição das leishmanioses em um centro urbanizado.

2 OBJETIVOS:

2.1 Objetivo Geral

Estudar a distribuição espacial das leishmanioses no município de Divinópolis, Minas Gerais.

2.2 Objetivos Específicos

Identificar (a)s espécie(s) de *Leishmania* que ocorrem em animais domésticos e silvestres.

Realizar inquérito sorológico amostral da leishmaniose canina na zona urbana do município.

Avaliar a distribuição espacial de reservatórios domésticos, silvestres e de casos humanos de LT e LV.

Verificar a dependência espacial entre a ocorrência de casos humanos de leishmaniose visceral e a presença de reservatórios domésticos infectados por *Leishmania infantum*.

Identificar as áreas de risco de transmissão das leishmanioses no município de Divinópolis.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 As leishmanioses

As Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), pertencentes à família Tripanosomatidae e à ordem Kinetoplastida. Este protozoário digenético apresenta duas formas evolutivas: uma flagelada denominada promastigota, que é encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra forma arredondada e sem flagelo aparente (amastigota), intracelular obrigatória, sendo encontrada nas células do sistema mononuclear fagocitário dos hospedeiros vertebrados (mamíferos de diferentes ordens como roedores, marsupiais, edentados, carnívoros e primatas). O modo de transmissão habitual do protozoário é através da picada de fêmeas de flebotomíneos (Díptera: Psychodidae; Phlebotomínae) pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (KILLICK-KENDRICK, 1999).

As leishmanioses são classificadas em quatro principais formas clínicas denominadas: leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) e leishmaniose cutânea difusa (LCD), sendo que no Novo Mundo as formas cutâneas são agrupadas em uma única denominação conhecida por leishmaniose tegumentar americana (LTA). Várias espécies de *Leishmania* podem ser agentes causadores da LTA, incluindo *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindenberg* (LAINSON, 2010). A forma clínica visceral é causada pelas espécies *Leishmania (Leishmania) donovani* e *L. (L.) infantum* no Velho Mundo, atingindo partes do continente asiático, africano e europeu. No Novo Mundo, a *Leishmania (L.) chagasi* é o agente etiológico da LV. Porém, em estudo realizado no ano de 2000, MAURÍCIO e colaboradores demonstraram que *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* na verdade se tratava da mesma espécie, fato este confirmado em trabalhos posteriores (CHICHARRO *et al.*, 2002; CAMPINO *et al.*, 2006, KALLEL *et al.*, 2008; SERIDI *et al.*, 2008ab; LAURENT *et al.*,

Revisão da Literatura

2009). Apesar de MARCILI *et al.* (2014), após a avaliação das relações filogenéticas das espécies de *Leishmania* com ocorrência na América Latina, propor a utilização da nomenclatura *Leishmania (L.) infantum chagasi*, ao afirmar que esta é uma unidade taxonômica válida, optamos por utilizar a nomenclatura *L. infantum* para nos referirmos ao agente causador da LV também no Novo Mundo.

As Leishmanioses compreendem um grupo de doenças parasitárias, distribuídas em países tropicais e subtropicais, em ciclos zoonóticos e antroponóticos (ASHFORD, 2000; LAINSON & SHAW, 1987). Atualmente, as Leishmanioses constituem um grave problema de saúde pública, uma vez que estão distribuídas por 88 países em todos os continentes. A prevalência global destas endemias é estimada em 12 milhões de pessoas infectadas e incidência anual varia entre 1,5 a 2 milhões de casos. Sendo aproximadamente 1 a 1,5 milhões destes relacionados às espécies causadoras das formas cutâneas e 500.000 causados pelas formas viscerais da doença. Entre as notificações de leishmaniose tegumentar simples, a maioria ocorre no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã (República Islâmica do) e a República Árabe da Síria; 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem no Brasil, Peru e Bolívia; enquanto que para a forma visceral, 90% dos indivíduos infectados concentram-se em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2014).

No Brasil, as leishmanioses são reconhecidas como endemias rurais (ORSINI, 1940; MARTINS, 1956). No entanto, há algumas décadas, sua distribuição vem se ampliando para grandes cidades, como por exemplo, Belo Horizonte, que apresenta casos autóctones tanto de LV quanto de LTA desde o início da década de 80 (GENARO *et al.*, 1990; PASSOS *et al.*, 1993, SILVA *et al.*, 2001).

As leishmanioses podem ser consideradas, doenças de extrema complexidade, visto que 21 espécies de parasitos do gênero *Leishmania* são capazes de infectar o homem e diversas espécies de reservatórios e vetores podem estar envolvidos nos ciclos de transmissão. Aproximadamente 30 espécies de flebotomíneos são vetores comprovados de *Leishmania* (ASHFORD, 2000; LAINSON & SHAW, 1987).

Portanto, para que a epidemiologia das leishmanioses seja compreendida é necessário o conhecimento de todos os elos que compõem seu ciclo de

transmissão, os parasitos, seus reservatórios silvestres, sinantrópicos e urbanos e as espécies de flebotomíneos vetores.

Neste contexto, estudos que abordem os aspectos relacionados à transmissão em áreas endêmicas são importantes, visto que a falta de conhecimento ecoepidemiológico pode favorecer o risco da transmissão e dificultar a implementação de medidas de controle que sejam eficientes para a realidade local.

3.2 Leishmaniose Tegumentar Americana

A LTA é considerada uma doença infecciosa, não contagiosa, com quadro de persistência (MS, 2007). Primariamente caracterizada como uma zoonose em expansão geográfica, porém sua transmissão não é mais restrita às pessoas que entram em contato com áreas de matas e animais silvestres, ocorrendo também em áreas rurais desmatadas e regiões periurbanas (MS, 2007). Pode-se observar três perfis epidemiológicos distintos: i) Perfil Silvestre: quando a transmissão ocorre em áreas de vegetação primária; ii) Perfil Ocupacional ou de Lazer: quando a transmissão está associada ao extrativismo vegetal, atividades de ecoturismo, construção de estradas entre outras atividades associadas às áreas de mata; iii) Perfil Rural ou Periurbano: quando a transmissão ocorre em áreas de colonização ou áreas periurbanas (MS, 2007).

As diferentes formas clínicas de LTA são documentadas na América desde 400-900 aC pelos povos ameríndios, fato este documentado em suas esculturas apresentando faces mutiladas. Colonizadores espanhóis também relataram a ocorrência da doença na população que habitava o continente durante o período de colonização (LAINSON & SHAW, 1998; Da-CRUZ & PIRMEZ, 2005).

No Brasil, a LTA é uma doença com diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores, representando diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, o que torna seu controle complexo. A partir da década de 80, as taxas de incidência da LTA vêm apresentando tendência de crescimento em todo Brasil, com coeficientes de detecção que chegam a 140 casos

Revisão da Literatura

por 100.000 habitantes em estados como o Acre e Roraima. O aumento da incidência em áreas endêmicas e a emergência em regiões indenes, caracterizado não apenas pelo crescente número de casos, mas também pela sua expansão geográfica, possibilitou a observação de casos autóctones da doença em todas as unidades federadas do Brasil (GRIMALDI JR & TESH, 1993; BRANDÃO-FILHO & SHAW, 1994; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; MS, 2007) .

Desde a metade do século passado, quando a doença foi descrita em Minas Gerais, têm sido registrados no estado, surtos de LTA relacionados com atividades de desmatamento (MARTINS *et al.*, 1956; DIAS *et al.*, 1977; GONTIJO *et al.*, 2002). Outros fatores como as mudanças nos hábitos e estilo de vida de uma população podem resultar em alterações ambientais que poderiam levar a variações nos padrões de transmissão da LTA, favorecendo a aproximação de vetores e reservatórios com as áreas habitadas por humanos (SILVA *et al.*, 2005; CHAVES *et al.*, 2008; TRAVI *et al.*, 2002). A partir da última década, devido ao processo de expansão geográfica da doença, alterações na epidemiologia da LTA vêm sendo descritos, e a doença que era primariamente rural e silvestre passou a apresentar casos em áreas peri-urbanas de cidades de médio e grande porte (CARVALHO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006).

Em Belo Horizonte, a LTA começou a ser estudada em 1940 quando 13 casos humanos foram notificados (ORSINI 1945). Porém, em meados de 1993, uma investigação epidemiológica desenvolvida no município de Belo Horizonte evidenciou a possibilidade da transmissão domiciliar dos parasitos causadores da LTA em áreas periurbanas PASSOS *et al.* (1993). Nos anos consecutivos, o número de casos humanos de LTA identificados na Região Metropolitana de Belo Horizonte foi crescente, desde então, a LTA é considerada endêmica nesta área (FANTAUZZI 2009).

O município de Divinópolis também é considerado uma região endêmica para a LTA. A secretaria de saúde do município notificou 43 casos humanos entre os anos de 2007 e 2013, porém, o escasso conhecimento acerca da ocorrência e distribuição das espécies vetoras e dos reservatórios no município dificultam a implementação de medidas de controle.

Revisão da Literatura

Dentre as espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* a mais prevalente no Brasil é a *L. (V.) braziliensis*, sendo esta a principal responsável pelos casos de LTA em nosso país (GONTIJO & CARVALHO 2003). Com relação às espécies do subgênero *Leishmania* a de maior importância é a *L. (L.) amazonensis*, considerada restrita a região amazônica até o final do século passado, porém casos autóctones de LTA ocasionados por esta espécie vêm sendo descritos também na região sudeste (GONTIJO, 2000; GONTIJO & CARVALHO 2003; AZEREDO-COUTINHO, *et al.*, 2007).

A LTA é uma doença com característica epidemiológica complexa, possui diferentes espécies de reservatórios e vetores e pode ser causada por uma grande diversidade de agentes (MS, 2007). Estes fatores, associados à virulência da espécie de *Leishmania* envolvida e à resposta imunológica do hospedeiro podem levar a diferentes manifestações clínicas. As principais formas de manifestação da doença são: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (REITHINGER *et al.*, 2007).

Diversas espécies de flebotômíneos são suspeitas de atuarem como vetoras de espécies de *Leishmania* causadoras de LTA. Porém algumas espécies têm sido mais observadas naturalmente infectadas, isso pode ser devido a uma maior capacidade de adaptação destas espécies ao ambiente modificado pelo homem, como o peridomicílio (BRAZIL & BRAZIL, 2014). A *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*, pode se alimentar tanto em animais silvestres quanto domésticos como cavalos, cães, vacas e galinhas e também no homem, sendo considerado importante vetor de *Leishmania braziliensis* (DE SOUZA *et al.*, 2006; MARGONARI *et al.*, 2006). A *L. (Nyssomyia) whitmani* possui ampla distribuição sendo capturada em praticamente todos os estados brasileiros. Está associada tanto ao ciclo de transmissão silvestre quanto ao ciclo peridoméstico de *L. braziliensis*, e a transmissão de *L. guyanensis* e *L. shawi* em diferentes regiões do Brasil (RANGEL & LAINSON 2009). Vários estudos têm demonstrado que esta espécie vem se adaptando ao ambiente urbano, pois tem sido coletada com frequência no peridomicílio e em áreas verdes dentro da área urbana (MARGONARI *et al.*, 2005; SAMPAIO *et al.*, 2009). Outras espécies de *Lutzomyia* como o *L. (Bichromomyia) flaviscutellata*, *L. (Nyssomyia) umbratilis* e mais recentemente o *L. (Nyssomyia)*

neivai também podem ser considerados eventuais vetores da LTA (KILLICK-KENDRICK, 1999; MARCONDES *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Outro fator importante na epidemiologia da LTA é a grande diversidade de reservatórios silvestres e sinantrópicos. Estes reservatórios são muito importantes no processo de urbanização da doença, visto que algumas espécies se adaptam muito bem às alterações ocasionadas pela expansão dos centros urbanos, principalmente nas periferias, onde vegetações de mata primária têm sido substituídas por ocupações humanas de forma desordenada (ROQUE & JANSEN, 2014). Dentre as possíveis espécies de reservatórios da LTA podemos citar: marsupiais como *Didelphis marsupialis*, *D. albiventris*, roedores *Oryzomys* sp., *Akodon* sp., *Necomys lasiurus*, *Rattus rattus*, além de edentados e canídeos silvestres (GRAMICCIA & GRADONI, 2005; FALQUETO & FERREIRA, 2005; SCHALLIG *et al.*, 2007; QUARESMA *et al.*, 2011). Também existem diversos estudos de animais domésticos infectados pelas formas dermatópicas de *Leishmania*, como cães, gatos e cavalos, porém o papel destes animais como reservatório da doença ainda é uma incógnita e mais estudos seriam necessários para que estes fossem realmente incriminados como reservatórios da doença (SOUZA *et al.*, 2005; DANTAS-TORRES 2007; QUARESMA *et al.*, 2011; TRUPPEL *et al.*, 2014).

Embora, no Brasil, os cães possuam um importante papel na manutenção da LV, é cada vez mais frequente sua associação como possível reservatório no ciclo de transmissão da LTA (DANTAS-TORRES, 2007; QUARESMA *et al.*, 2011). Para que se comprove o papel de um hospedeiro como reservatório de *Leishmania* é necessário que muitas variáveis sejam avaliadas, como abundância e distribuição do hospedeiro e o potencial de infectar o vetor flebotomíneo, fatores que são raramente investigados (CHAVES *et al.*, 2007). Mesmo assim, vários estudos têm sido desenvolvidos para investigar o papel do cão como reservatório dos parasitos causadores da LTA no ciclo de transmissão peridoméstico da infecção (GONTIJO *et al.* 2002; FALQUETO *et al.* 2003). Apesar de ser comum a observação de cães naturalmente infectados por espécies dermatópicas de *Leishmania*, ainda não existe um consenso quanto ao seu papel como reservatório do parasito (MADEIRA *et al.* 2005). Até hoje o que existe são apenas evidências circunstanciais de que os

cães atuem como reservatórios de *L. braziliensis*, sendo necessários mais estudos (REITHINGER & DAVIES 1999; DANTAS-TORRES 2007).

Neste contexto, a LTA apresenta importante heterogeneidade, relacionada às diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas em sua etiologia. Os vetores e reservatórios responsáveis pela manutenção e transmissão dos parasitos causadores de LTA e as diferentes formas clínicas associadas são um desafio para as estratégias de planejamento dos programas de controle relacionados à doença.

3.3 Leishmaniose Visceral

A LV é a mais grave entre as formas clínicas de leishmaniose, estimam-se uma incidência anual de 500.000 novos casos da doença e 51.000 mortes (DESJEUX, 2004; WHO 2011). A LV possui um amplo espectro epidemiológico podendo ocorrer em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, (DEANE & DEANE. 1962; ALVAR *et al.*, 2004). É endêmica em 88 países. Porém, aproximadamente 90% dos casos notificados ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul, e Sudão (ALVAR *et al.*, 2012; WHO, 2014).

Nas Américas, a LV humana ocorre desde o sul do México até o norte da Argentina, sendo 90% dos casos ocorridos no continente americano autóctones do Brasil (MONTEIRO *et al.*, 1994). Observa-se que 21 das 27 unidades federativas já registraram casos da doença, sendo que entre 2006 e 2010 foram registrados 18.168 casos de LV no país. A LV atinge as cinco regiões brasileiras e sua maior incidência encontra-se no Nordeste, com 47,1% dos casos, seguida pelas regiões Norte (18,0%), Sudeste (17,8%), Centro-Oeste (8,6%) e Sul (0,1%) (MS 2012). No Brasil, nos últimos anos, registra-se entre 3.500 e 4.000 novos casos de LV/ano e a incidência é de 2 casos/100.000 habitantes (MS, 2012).

Apesar de a *Leishmania infantum* acometer indivíduos de qualquer faixa etária, a doença é mais frequente em crianças menores de 10 anos (46,2%) e o sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (62,2%) (MS, 2012).

Revisão da Literatura

A infecção do inseto vetor ocorre durante o repasto sanguíneo, ao picar um animal infectado. Estes insetos ingerem juntamente com o sangue formas amastigotas presentes nos macrófagos parasitados, que ao atingirem o tubo digestivo se transformam em formas promastigotas e se multiplicam intensamente. Após esta fase as formas promastigotas migram para a região anterior do tubo digestivo, permitindo que, ao realizar um novo repasto, o vetor regurgite as formas promastigotas infectantes (metacíclicas). Estas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), principalmente os macrófagos, diretamente ou após a infecção dos neutrófilos (PETERS *et al.*, 2008). Este processo envolve ligação de moléculas de superfície dos parasitos como o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína 63 KD (gp 63), a receptores de macrófagos expressos na superfície celular, incluindo os receptores 1 e 3 do complemento (CR1 e CR3), receptor manose-fucose e receptor de fibronectina (GREEN *et al.*, 1994; BRITTINGHAM *et al.*, 1995). Dentro dos macrófagos o flagelo do parasito fica interiorizado, e o parasito torna-se arredondado ou ovoide e passa a ser denominado amastigota, forma que reside no interior dos fagolisossomos, onde iniciam o processo de multiplicação. Alguns macrófagos infectados, devido ao acúmulo de amastigotas em seu interior, se rompem e liberam as amastigotas e estas são então fagocitadas por outros macrófagos.

As espécies causadoras da LV possuem um forte tropismo tecidual, estabelecendo-se primariamente, em órgãos viscerais como o fígado, baço, e medula óssea. A lesão primária na pele é raramente observada e uma porcentagem substancial das infecções parece ser assintomática ou auto-resolutiva (JAFFE & GREENBLATT 1991). Já a doença ativa, conhecida como leishmaniose visceral clássica, quando não tratada, pode levar ao óbito. Em geral, indivíduos portadores da LV clássica apresentam febre, hepatoesplenomegalia, perda de peso, linfadenopatia, anemia e leucopenia (BERMAN, 1997; HERWALDT, 1999).

No Novo Mundo, 10% das cerca de 470 espécies descritas de flebotomíneo revelaram-se suspeitos ou são vetores de *Leishmania* (GALATI, 2003; LAINSON & SHAW, 2005). No Brasil a principal espécie de flebotomíneo incriminada na transmissão da LV é a *Lutzomyia longipalpis*, cuja distribuição sobrepõe as áreas endêmicas da doença (LAINSON & RANGEL, 2005). Também existem relatos do

envolvimento da *Lutzomyia cruzi* no ciclo de transmissão da *Leishmania infantum* (GALATI *et al.*, 1997. PITA-PEREIRA *et al.*, 2008).

Animais silvestres como os canídeos *Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*, além de roedores e marsupiais como *Proechimys canicollis*, *Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis* são considerados os possíveis reservatórios e os responsáveis pela manutenção do parasito no ambiente silvestre (LAINSON & SHAW, 1987, TRAVI *et al.*, 1998, SHERLOCK *et al.*, 1984, SILVA *et al.*, 2000; CABRERA *et al.*, 2003; SCHALLIG *et al.*, 2007).

Já o cão doméstico (*Canis familiares*) é considerado o principal reservatório do parasito no ciclo rural e urbano. Sua importância tem sido apontada, principalmente por estudos realizados em algumas cidades brasileiras, como responsável pelo aumento no número de casos humanos, visto que a presença de casos caninos se correlaciona com a ampliação da ocorrência de casos humanos de LV (BEVILAQUA *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

O Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) utiliza a vigilância epidemiológica como um dos seus componentes, objetivando reduzir as taxas de letalidade e o grau de morbidade, além de combater o vetor e os reservatórios da doença. Desta forma, as estratégias de controle estão relacionadas à redução dos casos humanos e caninos, consistindo basicamente na eliminação dos reservatórios domésticos, no tratamento de todos os casos humanos que apresentam sintomatologia clínica, no combate ao vetor e numa rigorosa vigilância epidemiológica. (MS, 2006). Do ponto de vista epidemiológico, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é considerada no Brasil, tão importante quanto a própria doença humana, visto que a ocorrência da doença canina precede o surgimento de casos humanos (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Entretanto, o processo de expansão geográfica e urbanização da LV têm levado à necessidade de se compreender mais as peculiaridades do ciclo urbano para estabelecer medidas mais eficazes de controle (SILVA *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

3.4 Leishmaniose Visceral Canina

A LVC tem aumentado sua importância na última década e fatores como a sua expansão geográfica, invadindo áreas antes livres da doença, sua urbanização e reemergência em focos endêmicos antigos reforçam a sua importância dentro da epidemiologia da LV (GONTIJO & MELO, 2004).

O cão representa um importante elo no ciclo de transmissão dos agentes etiológicos da LV, e questões como o de intenso parasitismo cutâneo facilita a infecção do vetor (DEANE & DEANE, 1954; MOLINA *et al.*, 1994; GIUNCHETTI *et al.*, 2006). Além disto, cães assintomáticos, apesar de não apresentarem os sintomas da doença, também são fontes de infecção para o vetor (MICHALSKY, *et al.*, 2007; MOSHFE *et al.*, 2009). Observa-se ainda que a expansão dos focos humanos de LV no Brasil está intimamente relacionada às áreas onde são encontrados altos índices de soroprevalência canina (OLIVEIRA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2001; ARAUJO *et al.*, 2013).

Aproximadamente 50% dos animais infectados por *Leishmania infantum* não apresentam sinais clínicos da LVC (ALVAR *et al.*, 2004; BANETH, 2006), o que dificulta o diagnóstico clínico, tornando-o praticamente impossível. Dessa forma, o diagnóstico da doença deve se fundamentar em informações referentes à sintomatologia clínica do animal associado à epidemiologia da área e a confirmação de circulação do parasito, seja através de inquéritos sorológicos ou testes moleculares, sendo que todos os dados devem ser considerados em conjunto (ALVAR *et al.*, 2004). Podemos dividir as técnicas de diagnóstico laboratorial da seguinte forma: isolamento do parasito, métodos moleculares de detecção do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) do parasito e técnicas de imunodiagnóstico (GONTIJO & MELO, 2004).

Podem ser aplicadas como técnicas diretas de detecção do parasito: a pesquisa de amastigotas de *Leishmania* em esfregaços ou *imprints* de tecidos corados pelas técnicas de *Leishmam* ou *Giemsa* (DEANE & DEANE, 1955; FERRER, 2002; SRIVASTAVA *et al.*, 2011), o isolamento de formas promastigotas em meios de culturas como o NNN (Novy-McNeal-Nicole) ou a infecção em

Revisão da Literatura

laboratório de modelos experimentais como o *Mesocricetus auratus*. Para a Organização Mundial de Saúde (OMS), estas técnicas são consideradas padrão ouro no diagnóstico da LVC, já que a observação direta do parasito não deixa dúvidas sobre a infecção. Entretanto, mesmo sendo técnicas de certeza, possuem algumas desvantagens, dentre elas: punções ou coletas de amostras clínicas são procedimentos invasivos, a cultura é laboriosa, lenta, apresenta baixa sensibilidade, necessita de pessoal capacitado e acompanhamento sistemático, o que torna estas técnicas inadequadas no diagnóstico rotineiro (FERRER, 1997). A análise de lâminas coradas por *Giemsa* ou *Leishman* torna-se mais difícil em animais com baixa carga parasitária e a leitura completa da lâmina exige tempo e treinamento adequado (ASHFORD *et al.*, 1995; FERRER, 1997). Outro método parasitológico é a inoculação experimental em mamíferos susceptíveis e o xenodiagnóstico, porém estas técnicas são laboriosas, demoradas e devem ser realizadas com extrema cautela, ficando restrita a sua realização a centros de referência (ALVAR *et al.*, 2004).

O diagnóstico imunológico vem sendo amplamente aplicado em inquéritos caninos, principalmente devido à facilidade na coleta de material (sangue) e a uma resposta imunológica humoral exacerbada em animais infectados por *Leishmania*. As principais técnicas utilizadas na rotina soropidemiológica são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (GRADONI, 2002; SRIVASTAVA *et al.*, 2011). Estas duas técnicas sorológicas foram recomendadas pelo Ministério da Saúde (MS) do Brasil para avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários até o ano de 2011, quando o MS substituiu a RIFI pelo teste rápido DPP® (*Dual Path Platform*) (MS, 2006; MS, 2011). Atualmente o DPP® é recomendado para triagem de cães e a ELISA para a confirmação dos cães sororreagentes ao teste DPP® (MS, 2011).

Possivelmente a substituição do teste RIFI pelo DPP® ocorreu devido às limitações observadas no teste RIFI como: a subjetividade na leitura, principalmente em soros com baixa titulação e apresentar baixa sensibilidade ao ser relacionada à ELISA (GRADONI, 2002). Por outro lado, o ELISA é uma técnica muito sensível, porém com algumas limitações como níveis de especificidade relativamente baixos. O DPP® é o único exame rápido para a LVC disponível no mercado, o que facilita a sua implementação em estudos de campo como inquéritos sorológicos, por não

necessitar de estrutura laboratorial ou equipamentos. O DPP® tem apresentado uma alta sensibilidade e especificidade (MS, 2011; GRIMALDI *et al.*, 2012).

As técnicas moleculares de diagnóstico, principalmente a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem sendo amplamente aplicada em estudos epidemiológicos da LVC (SRIVASTAVA *et al.*, 2011). Trata-se de uma técnica extremamente sensível e específica que visa a amplificação de fragmentos de DNA do parasito. Os alvos utilizados na PCR podem ser tanto de DNA do cinetoplasto (kDNA) quanto de DNA genômico. As vantagens na utilização da PCR como ferramenta de diagnóstico em inquéritos caninos estão relacionadas a rapidez na execução e sua alta sensibilidade, sendo capaz de detectar a presença de DNA de um único parasito o que a torna eficaz também na detecção da infecção em animais assintomáticos e com baixa carga parasitária (BERRAHAL *et al.*, 1996; CRUZ *et al.*, 2002). Outro ponto importante na utilização de técnicas moleculares como a PCR é a possibilidade de identificação do agente causador da infecção e diferenciar animais infectados com *Leishmania infantum* de animais infectados por *L. braziliensis*. Apesar de serem observados cães infectados por *L. braziliensis*, o papel deste como reservatório do parasito ainda não foi confirmado (DANTAS-TORRES, 2011). Dai a importância da correta identificação da espécie para que as medidas de controle sejam aplicadas corretamente. A principal desvantagem da PCR ainda é o seu alto custo de execução, o que pode impossibilitar sua aplicação em grandes inquéritos epidemiológicos (ALVAR *et al.*, 2004; SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

Embora ainda seja controverso o significado do impacto da eliminação de cães soropositivos na ocorrência de LV humana, estudos epidemiológicos em centros urbanos concluíram que a LVC geralmente precede a doença humana (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Além disso, a infecção canina tem sido apontada como fator primordial em todos os surtos registrados, e não há relato na literatura sobre a ocorrência de casos humanos de LV sem a presença de cães infectados (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Outros estudos tem reforçado a associação entre a presença de LVC e a ocorrência de casos humanos. CAMARGO-NEVES *et al.* (2001) mostraram que altos índices de casos humanos são observados em áreas de alta prevalência de LVC. OLIVEIRA *et al.* (2001) analisando a distribuição espacial da LV na zona urbana de Belo Horizonte apontou a existência de correlação entre casos caninos e humanos. MESTRE *et al.* (2011) observaram que nas regiões de ocorrência de

casos humanos de LV em Cuiabá foram observadas altas prevalências de cães infectados e de vetores, para o autor o elevado número de cães positivos para LVC pode explicar a alta endemicidade de LV nos bairros estudados. Também em estudo recente, a presença de cães infectados foi apontada como um fator de risco para a infecção humana em área urbana (ARAUJO *et al*, 2013). De maneira geral, a maioria dos estudos epidemiológicos que comparam a distribuição da doença humana e canina aponta para a mesma direção, a de que a infecção canina parece preceder a doença humana.

Portanto, novos estudos em grandes centros urbanos e principalmente em regiões onde a doença é emergente podem trazer novas informações que possam reforçar o papel do cão na ocorrência de casos humanos de LV. Somente com esta confirmação poderemos aplicar de maneira eficaz estratégias de controle que impeçam a disseminação da doença humana.

3.5 Urbanização das Leishmanioses

As leishmanioses vêm ocorrendo de forma endêmico-epidêmica em várias regiões do Brasil, e não estão necessariamente associadas à penetração do homem em focos silvestres. Áreas consideradas de colonização antiga tem frequentemente registrado casos de leishmanioses, demonstrando uma possível adaptação dos vetores e reservatórios a ambientes modificados (DUNAISKI, 2006).

A comunidade científica reconhece o fato das leishmanioses serem doenças dinâmicas e, portanto, as mudanças ocasionadas pelo comportamento humano, podem estar afetando o quadro epidemiológico das mesmas. As transformações ambientais associadas ao êxodo rural, a falta de planejamento urbano, as condições precárias de saneamento, a adaptação de vetores ao ambiente urbano e a presença de reservatórios domésticos e sinantrópicos são apontados como fatores envolvidos neste fenômeno (GONTIJO & MELO 2004; MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008; WERNECK, 2010).

Revisão da Literatura

O processo de urbanização das leishmanioses tem sido observado em diversas cidades brasileiras (COSTA *et al.*, 1990; NASCIMENTO *et al.*, 1996; MENDES *et al.*, 2002; ALVES *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2001), mas não é considerado exclusividade do Brasil, já sendo descrito em outros países como Iran, México e Marrocos (MOHAMMAD *et al.*, 2010; SÁNCHEZ-GARCÍA *et al.*, 2010; BOUSSAA *et al.*, 2005).

A urbanização da LV no Brasil foi intensificada no final da década de 80, com surtos confirmados em Teresina, PI e São Luís, MA (COSTA *et al.*, 1990; NASCIMENTO *et al.*, 1996; MENDES *et al.*, 2002). Na década de 90, a doença se estabeleceu em Montes Claros, MG e Recife, PE (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; MONTEIRO *et al.*, 1994). Dados epidemiológicos dos últimos quinze anos revelam periurbanização e urbanização da LV, com destaque para surtos ocorridos nas cidades do Rio de Janeiro, RJ, Belo Horizonte, MG, Araçatuba, SP, Santarém, PA, Corumbá, MS, Teresina, PI, Natal, RN, São Luís, MA, Fortaleza, CE, Camaçari, BA Três Lagoas, MS, Campo Grande, MS, e Palmas, TO (MS, 2006). Neste contexto, os cães são considerados importantes reservatórios e talvez os responsáveis por essa mudança no perfil epidemiológico da LV (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994), uma vez que os casos caninos precedem os humanos e que a ocorrência de casos humanos de LV depende espacialmente da ocorrência de LVC (OLIVEIRA *et al.*, 2001; ARAUJO *et al.*, 2013).

O PCLV no Brasil está pautado na vigilância epidemiológica e nas medidas de controle objetivando reduzir as taxas de letalidade e o grau de morbidade, além de diminuir os riscos de transmissão. Desta forma, as estratégias de controle estão relacionadas ao diagnóstico e tratamento precoces dos casos humanos, detecção da infecção e eliminação dos reservatórios domésticos e combate ao vetor (MS, 2006). A realidade é que estas medidas não têm apresentado resultados satisfatórios, seja na redução de casos em áreas endêmicas, ou no impedimento do surgimento de focos em áreas até então consideradas indenes (DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO 2006). A escassez de recursos financeiros associada à falta de infra-estrutura dos serviços de saúde tornam as atuais medidas de controle pouco eficientes. Este quadro favorece a manutenção do ciclo da doença em muitos estados brasileiros (DANTAS-TORRES & BRANDÃO FILHO, 2006).

O processo de desmatamento reduz áreas de florestas primárias e animais silvestres infectados e com hábitos sinantrópicos passam a invadir com maior frequência as residências e os peridomicílios, podendo servir de fonte de infecção para flebotomíneos bem adaptados ao ambiente modificado como *Lutzomyia longipalpis*, *L. whitmani* e *L. intermedia* (GONTIJO *et al.*, 2002). Portanto, a ação antrópica causada ao meio ambiente torna-se fator primordial para a aquisição da infecção, sendo identificada como um dos fatores de risco para o estabelecimento da transmissão (VANZELI & KANAMURA 2007).

3.6 Análise espacial em saúde

A análise espacial em saúde é um ramo da ciência que busca compreender os padrões espaciais de morbidade e mortalidade relacionados a uma determinada doença e associar a estes padrões as características ou fatores de risco mais importantes sobre sua disseminação (MEDRONHO, 2005).

A Epidemiologia Geográfica vem se tornando uma ferramenta comum nos últimos anos, possibilitando a avaliação da distribuição espacial e temporal de agravos à saúde. A análise de dados distribuídos pelo espaço geográfico tem se tornado cada vez mais útil para os serviços de gestão de saúde, por apontar novos subsídios para o planejamento e por avaliar as ações mais adequadas baseadas na análise da distribuição espacial das doenças, na localização dos serviços de saúde e dos riscos ambientais. Aplicado às questões de Saúde Coletiva, o Sistema de Informações Geográficas (SIG) possibilita a realização de análises espaciais complexas, pois permite a manipulação de grande volume de dados, sua integração e a recuperação rápida de informações armazenadas (MEDRONHO, 2005).

Nas leishmanioses, esta técnica vem sendo amplamente empregada, e diversos fatores avaliados, entre eles: a dependência espacial entre a ocorrência de casos caninos e humanos, a distribuição do vetor, a caracterização de áreas de maior incidência e de maior risco de morbidade relacionadas à doença (OLIVEIRA *et al.*, 2001; WERNECK *et al.*, 2002; MARGONARI, *et al.*, 2006; ANTONIALLI *et al.*,

Revisão da Literatura

2006; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006; MESTRE & FONTES, 2007; SARAIVA, *et al.*, 2011, ARAUJO, *et al.*, 2013; BARBOSA, *et al.*, 2014).

As técnicas de análise espacial permitem identificar as áreas prioritárias para o controle e com base nestas informações é possível aplicar medidas de vigilância mais direcionadas, reduzindo os custos aplicados nos programas de controle. Esta redução de custos justifica a aplicação da análise espacial no controle das leishmanioses, visto que a falta de recursos financeiros é um dos principais entraves para o desenvolvimento de políticas eficazes relacionadas ao controle das leishmanioses no Brasil (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008, OTRANTO & DANTAS-TORRES 2013).

A ocorrência de fatores, como a ampliação dos espaços ocupados por reservatórios domésticos e transmissores das leishmanioses, a maior concentração de pessoas e cães em áreas urbanas, associada à expansão e adaptação do transmissor a diferentes ambientes, pode resultar em maiores chances para a ocorrência das leishmanioses (MESTRE & FONTES, 2007; SARAIVA, *et al.*, 2011, ARAUJO, *et al.*, 2013; BARBOSA, *et al.*, 2014)..

Com base neste cenário, o presente estudo procurou ampliar o conhecimento sobre a situação epidemiológica da LV e da LTA no município de Divinópolis, enfatizando a distribuição espacial dos reservatórios e dos casos humanos na área urbana. Desta forma, pretende-se obter maior entendimento sobre o contexto das leishmanioses, de modo a contribuir com o planejamento de ações de vigilância e monitoramento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

A captura de pequenos mamíferos ocorreu em 15 residências onde houveram casos confirmados de LV e LT no período de 2005 a 2010 e em áreas de mata preservada distribuídas na zona urbana do município de Divinópolis. Inicialmente foi realizada a captura de animais silvestres e coletada de amostras biológicas para a detecção e identificação das espécies de *Leishmania* no período de outubro de 2010 a agosto de 2011.

Para confirmar a presença do parasito nos cães foram selecionados, junto ao Centro de Referência e Vigilância em Saúde (CREVISA), 25 animais com sorologia positiva e realizados testes laboratoriais para a identificação da espécie de *Leishmania* responsável pela infecção. Em seguida, foi realizado o inquérito sorológico canino amostral. Como a Secretaria de Saúde do município não conta com dados referentes à infecção canina um fragmento do município foi utilizado para determinar a prevalência esperada da LVC. A prevalência da infecção canina observada nesta área foi de aproximadamente 3% (GAMA, G.M. 2013). Com base na prevalência de cães infectados observada no inquérito piloto, estipulou-se o tamanho da amostra de animais a serem avaliados no inquérito canino, sendo 332 animais amostrados em cada um dos 11 estratos que dividem o município, totalizando 3.652 cães amostrados.

Os quarteirões amostrados no inquérito sorológico canino, os casos humanos de LT e LV notificados à partir do ano de 2007, além das trilhas e residências de captura dos pequenos mamíferos foram georeferenciados utilizando sistema de posicionamento global (GARMIN GPSMAP 76S). Ferramentas de análise espacial como: densidade de Kernel, distribuição direcional e função K de Ripley bivariada foram então empregadas a fim de identificar as regiões com maior concentração de casos humanos da doença e de reservatórios infectados. Todos os quarteirões amostrados durante a realização do inquérito sorológico canino, os casos humanos de LT e LV notificados à partir do ano de 2007, além dos locais de captura dos

pequenos mamíferos foram georeferenciados utilizando sistema de posicionamento global (GARMIN GPSMAP 76S).

4.2 Área de estudo

O município de Divinópolis está localizado na zona metalúrgica, micro-região o Vale do Itapecerica: (20,13889 S; 44,88389 O); macro-região do Alto São Francisco, margem direita (**Figura 01**).

A população estimada é de 216 mil habitantes (IBGE, 2010). Apresenta um quadro social com alta taxa de alfabetização (94,7%). A taxa de crescimento populacional de Divinópolis é da ordem de 4,2% ao ano (aproximadamente 7.300 pessoas em média nos últimos 10 anos) e é a quinta cidade com melhor IDH (índice de Desenvolvimento Humano) do Estado de Minas Gerais.

O município de Divinópolis é considerado uma região endêmica para LT sendo 43 casos humanos notificados entre os anos de 2007 e 2013. No ano de 2007 foi confirmado o primeiro caso de LV humana e outros 15 casos foram registrados no período de 2007 a 2013 sendo o município classificado como área de transmissão moderada. Apesar da ocorrência de casos humanos os estudos epidemiológicos relacionados aos vetores e à caracterização das espécies de *Leishmania* que circulam entre os diferentes hospedeiros são escassos.

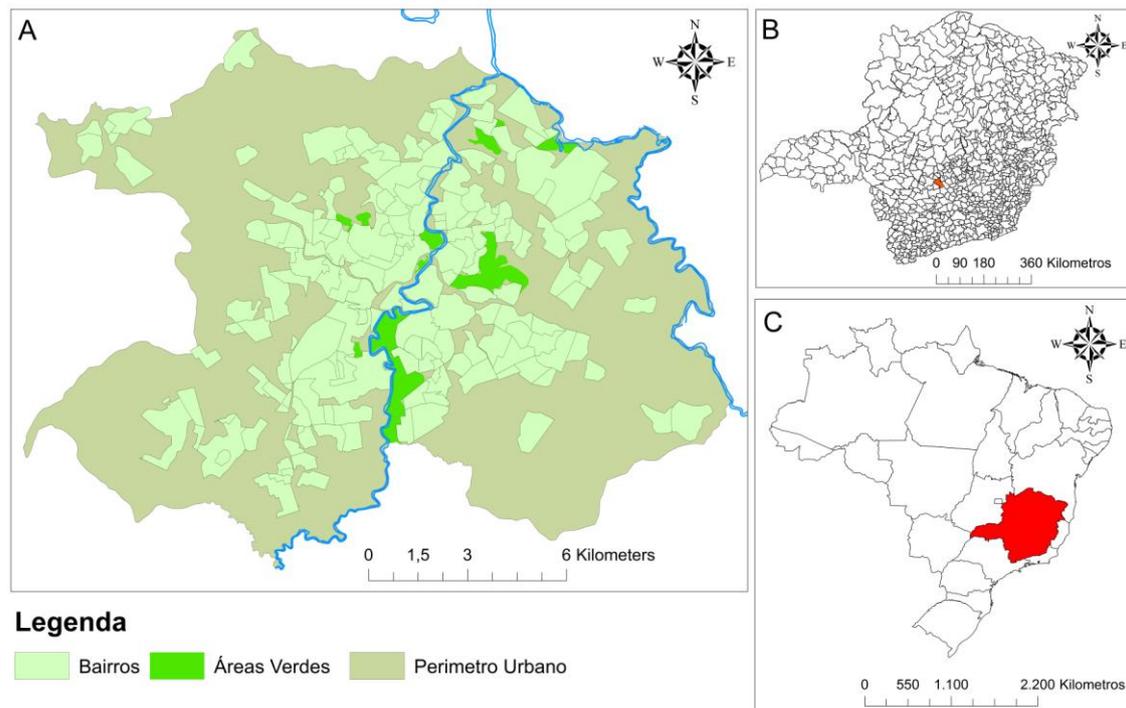


Figura 1: Mapa representativo da Zona Urbana do Município de Divinópolis, (A) Destaque da Zona Urbana, bairros e principais áreas de mata, (B) localização geográfica do município em relação ao estado de Minas Gerais e (C) Estado de Minas Gerais e sua localização no Brasil.

4.3 Procedimentos éticos

O projeto foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa com animais da Universidade Federal de São João Del Rey (CEPEA/UFSJ) sob o protocolo nº 35/2010 (**Anexo 1**). Todos os procedimentos de coleta do material foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os pequenos mamíferos foram capturados mediante licença permanente para coleta de material zoológico (Nº 12989-1) do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (**Anexo 2**).

4.4 Estudo dos animais silvestres e sinantrópicos

4.4.1 Definição das trilhas e residências de captura dos animais

Nas áreas preservadas de mata distribuídas pelo município foram montados transectos para a disposição das armadilhas de coleta, seguindo a metodologia de campo padrão para captura de pequenos mamíferos (LACHER *et al.*, 1989; PAGLIA *et al.*, 1995). Em cada transecto foram definidas estações de coleta distanciadas aproximadamente 20m uma da outra, sendo dispostas um total de 20 armadilhas em cada uma das 5 trilhas totalizando 100 armadilhas. O número de estações de coleta foi estabelecido de modo a amostrar os diferentes ambientes relacionados aos padrões de atividade humana (**Figura 2**). A coleta de possíveis reservatórios silvestres no peridomicílio de residências foi realizada em quinze casas com casos confirmados de LTA ou LV entre os anos de 2005 e 2010. Foram dispostas duas armadilhas para captura de pequenos mamíferos em cada residência, totalizando 30 armadilhas. As capturas foram realizadas a cada 2 meses, no período de outubro de 2010 a agosto de 2011. Este intervalo de 2 meses entre as campanhas foi necessário para respeitar a reposição natural dos pequenos mamíferos. A **Figura 3** destaca as quinze residências e as cinco trilhas onde foram empregados esforços para a captura dos pequenos mamíferos.



Figura 2: Imagens das áreas de mata onde foram montados os transectos para captura e disposição das armadilhas e exemplos de pequenos mamíferos capturados. 1: Mata do Noé; 2: Armadilha disposta no Parque do Gafanhoto; 3: Mata do Sidil; 4: Exemplar de *Necomys lasiurus*; 5: Morro da Antena; 6: Exemplar de *Micureus demarerae*.

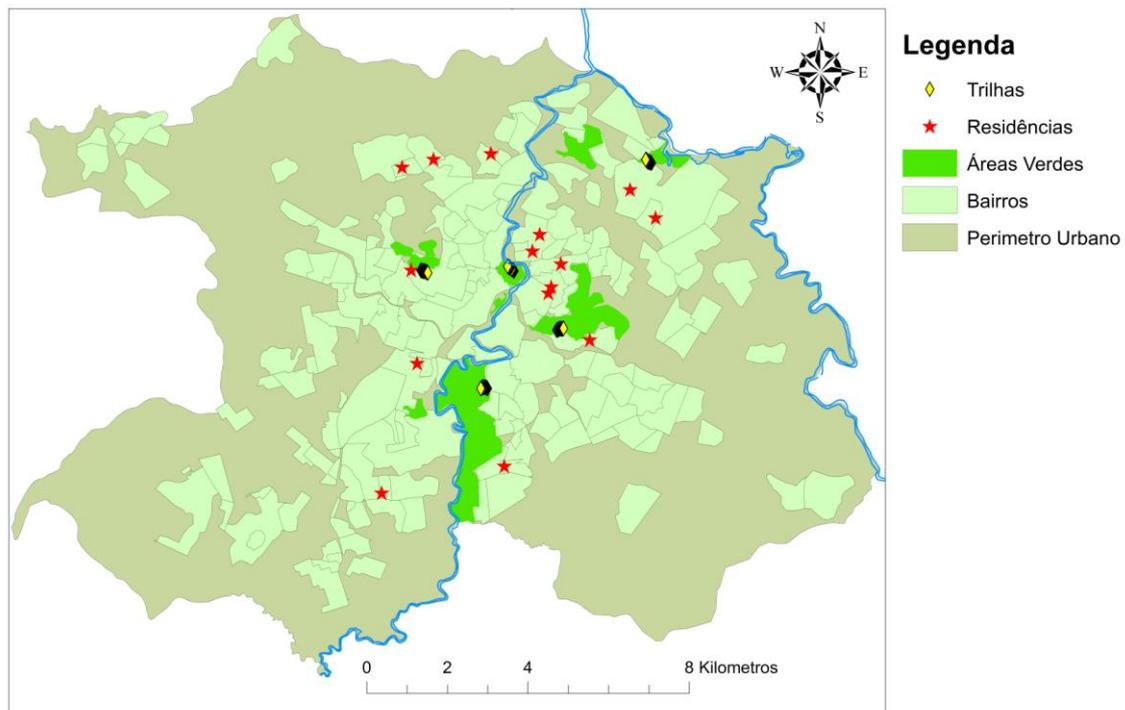


Figura 3: Mapa da Zona Urbana do município de Divinópolis, Minas Gerais. Destaque dos pontos de coleta de pequenos mamíferos. Os diamantes em amarelo representam as trilhas de captura em áreas de mata e as estrelas em vermelho as residências selecionadas para a captura.

4.4.2 Coleta das amostras biológicas

Para a coleta das amostras de tecidos dos animais (pequenos mamíferos e cães), os mesmos foram sedados com acepromazina (Aceprom - 0,05mg/Kg de peso) e posteriormente eutanasiados para garantir a ausência de dor e desconforto. A identificação das espécies de pequenos mamíferos foi feita utilizando-se literatura específica, analisando-se caracteres morfológicos e, caso necessário, a comparação com exemplares depositados na coleção de mastozoologia da UFMG.

Foram coletadas amostras de pele, sangue, baço e medula óssea dos pequenos mamíferos e de 25 cães soropositivos, selecionados para confirmar a circulação de *Leishmania infantum* no município.

4.5 Estudo dos reservatórios domésticos

Para realização do inquérito sorológico amostral nos cães do município, foram realizadas coletas de sangue em papel filtro em quarteirões amostrados a partir da metodologia proposta pelo Ministério da Saúde (MS, 2006). O Ministério da Saúde indica a realização do inquérito sorológico amostral canino da leishmaniose em municípios com transmissão moderada e intensa, sob a justificativa de que o mesmo auxiliará na avaliação das taxas de prevalência em cada setor, a fim de identificar as áreas prioritárias a serem trabalhadas.

A amostragem utilizada foi a estratificada proporcional por conglomerados, onde os estratos são setores do Plano de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa) e os conglomerados os quarteirões localizados dentro de cada bairro. O município baseia sua estratificação de acordo com a densidade populacional da área, sendo que cada estrato possui uma população aproximada de 17.000 habitantes. Divinópolis é dividido em 11 estratos que são subdivididos em bairros (**Figura 04**). Usamos esta divisão para definir o número de animais a serem avaliados em cada bairro pertencente ao estrato, ou seja, se a população humana do bairro em questão fosse

Materiais & Métodos

de 10% da população total do estrato, a amostra de cães avaliados neste mesmo bairro também representaria 10% do total de cães a serem amostrados no estrato. Desta maneira garantimos a amostragem de animais em todos os bairros do município e a manutenção da proporcionalidade.

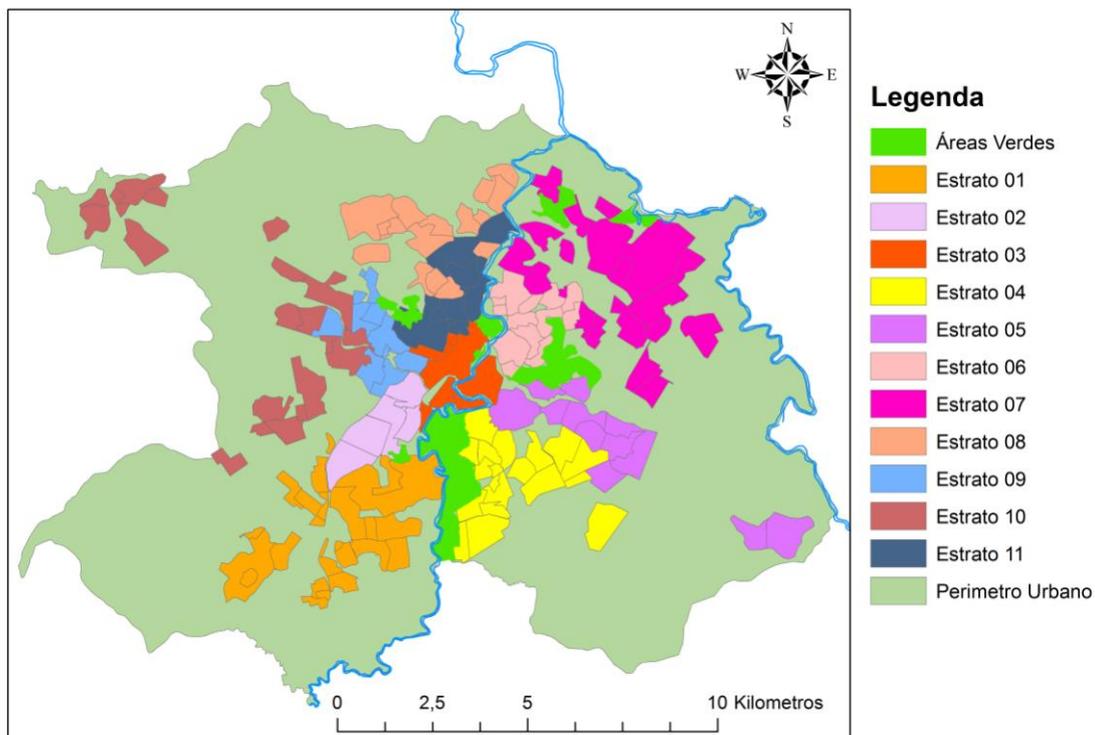


Figura 4: Parcelamento do Município de Divinópolis segundo o Plano de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa). A divisão dos estratos é baseada na densidade populacional da região.

Para o cálculo do tamanho da amostra foi utilizada uma tabela que determina o número de animais a serem avaliados segundo a população canina estimada no setor e a prevalência esperada da infecção canina, considerando um nível de significância de 5% (MS, 2006). A prevalência da infecção canina utilizada para o cálculo da amostra foi de 3%, estimada a partir de estudo realizado anteriormente em uma área restrita do município (GAMA, G.M. 2013). Um total de 3.652 cães foram amostrados sendo 332 animais em cada um dos 11 estratos do PEAa. Os quarteirões onde foram realizadas as coletas de amostra de sangue dos cães foram selecionados com o auxílio de uma tabela de números aleatórios (**Anexo 3**). Defini-

se quarteirão como um espaço urbano delimitado por ruas ou avenidas com tamanho aproximado de 10.000 metros quadrados.

O número de quarteirões a serem sorteados foi baseado no total de cães a serem avaliados em cada bairro, utilizando-se uma proporção estimada pela densidade populacional do bairro em relação ao estrato.

O número de cães a ser amostrado em cada quarteirão foi definido através da média entre o total de cães e o total de quarteirões a serem amostrados no bairro. Este número foi estabelecido para evitar que muitos animais fossem amostrados em um único quarteirão, favorecendo a distribuição adequada da amostra.

4.6 Métodos de diagnóstico

4.6.1 Diagnóstico parasitológico

Para a tentativa de isolamento do parasito, amostras clínicas provenientes de cães (linfonodo e medula) e de pequenos mamíferos (baço, medula e pele de cauda) foram armazenadas a 4°C durante 24 horas em solução salina com antibióticos (estreptomicina 100µg/ml e penicilina 500U/ml) e inoculadas em tubos contendo meio de cultura NNN (Novy e Mc Neal, 1903; Nicolle, 1908) enriquecido com LIT (Liver Infusion Tryptose) e mantidos em estufa à 25° C ± 1° C.

As culturas foram repicadas a cada cinco dias para novos tubos e consideradas positivas quando observada a presença de formas promastigotas de *Leishmania*. Após quatro semanas de observação as amostras que não apresentaram a presença de promastigotas foram consideradas negativas. Amostras contaminadas por fungos ou bactérias foram descartadas. As amostras positivas foram expandidas até a obtenção de um volume final de 30mL a uma concentração de 10⁶ parasitos por mL para a caracterização da espécie utilizando métodos moleculares.

4.6.2 Diagnóstico sorológico da Leishmaniose Canina

Para realização do diagnóstico sorológico da LVC foram empregadas as técnicas de ELISA como triagem e a RIFI como exame confirmatório, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil até 2013, período de realização do inquérito.

Os exames sorológicos ELISA e RIFI foram realizados pelo Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de São João Del Rei – Campus Centro-Oeste, credenciado pelo Ministério da Saúde do Brasil para a realização de exames sorológicos para a LVC.

Para realização dos ensaios imunoenzimáticos foram utilizados kits EIE Leishmaniose Visceral Canina do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos FIOCRUZ, e o kit IFI Leishmaniose Visceral Canina do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos FIOCRUZ, ambas aplicando as especificações do fabricante..

4.6.2.1 Ensaio Imunoenzimático

O ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA – “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”) consiste na reação de anticorpos presentes nos soros ou plasmas de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania*. O kit da Bio-Manguinhos utiliza antígenos de *Leishmania major like* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Os antígenos são previamente adsorvidos nos poços das microplacas consistindo a fase sólida. Em seguida adicionam-se os soros das amostras, controles positivos e negativos previamente diluídos. Caso as amostras possuam anticorpos específicos, estes irão se ligar aos antígenos da fase sólida.

Materiais & Métodos

Posteriormente, adiciona-se o conjugado específico, anti-imunoglobulina, marcado com a enzima peroxidase. Na presença de anticorpos específicos, ocorrerá a ligação conjugado-anticorpo, que poderá ser evidenciada com a adição do cromógeno (tetrametilbenzidina – TMB).

Ocorre então a formação de um composto com coloração azul turquesa devido a ligação da peroxidase com o peróxido de hidrogênio, que ao adicionar-se o ácido sulfúrico interrompe a reação. Os resultados foram avaliados por meio de espectrofotômetro com filtro de 450nm. Foi calculado o *Cut-Off* do teste para a determinação dos resultados. De acordo com as instruções do fabricante, o *Cut-Off* é dado pela média das densidades óticas dos controles negativos multiplicado por três. A “faixa-cinza” (indeterminados) é considerada para as densidades entre o valor obtido do *Cut-Off* e o valor obtido com a multiplicação deste por 1,2 e os negativos são aquelas amostras cujo resultado ficar inferior ao do *Cut-Off*.

4.6.2.2 Reação de Imunofluorescência Indireta

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) consiste na reação de soros com promastigotas de *Leishmania*, aderidas a lâminas de microscopia.

Utiliza-se um conjugado fluorescente, para evidenciar a reação. A leitura é realizada em microscópio de fluorescência que utiliza incidência de luz azul e ultravioleta, sendo considerado positivos os soros que apresentarem fluorescência e negativos àqueles com ausência de fluorescência, adotando-se como referência os soros controle positivo e negativo.

O kit da RIFI era produzido por Bio-Manguinhos, unidade produtora de Imunobiológicos da FIOCRUZ, utilizando como antígeno promastigotas de *Leishmania major like*. Atualmente sua produção foi descontinuada devido a alteração no protocolo do diagnóstico sorológico da LVC pelo MS que retirou a RIFI do protocolo e instituiu a utilização do teste rápido imunocromatográfico DPP® como triagem e o ELISA como confirmatório (MS, 2011).

4.6.3 Diagnóstico molecular: Detecção e caracterização da infecção natural em reservatórios domésticos e silvestres

4.6.3.1 Extração de DNA

As amostras biológicas coletadas dos animais domésticos, silvestres e sinantrópicos (cães e pequenos mamíferos) foram acondicionadas em solução salina a -20°C e posteriormente submetidas à extração do DNA. Para a extração seguiu-se a orientação do fabricante do Kit de extração de DNA QIAamp DNA Mini Kit® (QIAGEN®). Após a extração o DNA foi dosado, aliquotado e estocado à -20°C para posterior utilização.

4.6.3.2 Alvos selecionados para amplificação na PCR

Altos níveis de variação inter e intraespecíficas têm sido observados em espécies de *Leishmania* do Velho Mundo e do Novo Mundo, sendo assim, a escolha de uma técnica de PCR com alta sensibilidade e capaz de determinar a espécie de *Leishmania* responsável pela infecção, são de extrema importância. A escolha da sequência alvo influencia na sensibilidade e especificidade, sendo o máximo de sensibilidade alcançado quando utilizamos sequências presentes em cópias múltiplas como: DNA do cinetoplasto (kDNA), genes do RNA ribossomal, genes de RNA derivados do mini-exon e repetições genômicas (ALVAR *et al.*, 2004).

Para realização da PCR foram selecionados os alvos ITS1 e *hsp70*. O alvo ITS1 é um espaçador intergênico presente nas multicópias dos genes do rRNA. Quando utilizado nas reações de amplificação seguidas por RFLP é altamente sensível e adequado para utilização com diferentes tipos de amostras clínicas sendo capaz de diferenciar as seguintes espécies de *Leishmania*: (*L. donovani*, *L. infantum*,

L. aethiopica, *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamanensis*). Os genes codificadores de proteínas de choque térmico de 70 kD de *Leishmania* (*hsp70*), compreendendo uma família de genes cujas sequências são altamente conservadas (FOLGUEIRA *et al.*, 2007). Em contraste com o ITS1, o gene *hsp70* codifica para proteínas antigênicas importantes e, portanto, permite investigar a variabilidade genética de moléculas possivelmente envolvidas na imunopatologia. A sensibilidade do teste é de cerca de 95% e a digestão do produto de PCR com *HaeIII* discrimina 6 espécies/grupos de *Leishmania* (*L. infantum*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*).

4.6.3.3 PCR-RFLP do ITS1

A PCR do ITS1 foi aplicada na identificação da infecção natural dos pequenos mamíferos. Amostras de DNA de baço, pele de cauda e sangue foram submetidas à amplificação para a triagem dos animais positivos. Os iniciadores LITS1R 5' CTGGATCATTTCGATG 3' e L5.8S 5' TGATACCACTTATCGCACTT 3' amplificam um fragmento de aproximadamente 350pb através da seguinte reação: solução tampão 1x (200 mM Tris-HCl pH8,4, 500 mM KCl), 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de mistura de dNTPs, 0,5 pmol do primer LITS1R, 0,5 pmol do primer L5.8S, 1 U de Taq DNA polimerase platinum® (Invitrogen), 2 µl de DNA molde em um volume final de 25 µl. A amplificação foi realizada alternando 32 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 53°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min em equipamento termociclador automático. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 2% corado por brometo de etídeo. As amostras que apresentarem a banda específica de aproximadamente 350pb foram submetidas à análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição, através da técnica de RFLP utilizando a enzima *HaeIII*. Esta técnica é capaz de distinguir as principais espécies de *Leishmania* devido ao padrão diferenciado de digestão do DNA. A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 µL, contendo 1µL de *HaeIII* (10 U/µL), 1,5 µL de tampão da enzima e 10,0 µL de produto de PCR. A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas, os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 2% e comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR

de cepas controles de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

4.6.3.4 PCR-RFLP do hsp70

Todas as amostras positivas na amplificação do alvo ITS1 foram submetidas à amplificação do gene hsp70. Esta técnica foi aplicada para confirmar a infecção natural dos pequenos mamíferos e na identificação da espécie responsável pela infecção. Também foi o alvo de escolha nas amostras provenientes das culturas dos cães positivos.

Alíquotas de 2,0 a 5,0 µL de DNA foram amplificadas utilizando iniciadores que estendem um fragmento de 1300pb do *hsp70*. A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µL utilizando 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP mix (Invitrogen), 5,0% DMSO (Invitrogen), 2,5 unidades de Taq platinum DNA polimerase (Invitrogen), 0,4 pmol de primer forward e 0,4 pmol de primer reverse (Prodimol). Os iniciadores utilizados: HSP70 for – 5'GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3' e HSP70 ver 5'CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3'. A amplificação do DNA molde foi processada em termociclador alternando 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento específico dos iniciadores a 61°C por 1 min. E extensão das fitas a 72°C por 3 min., seguido por um passo de extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 2% corado por brometo de etídeo. As amostras que apresentaram a banda específica de 1300pb foram submetidas à análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição, através da técnica de RFLP utilizando a enzima HaeIII. A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 µL, contendo 1µL de HaeIII (10 U/µL), 1,5 µL de tampão da enzima e 10,0 µL de produto de PCR. A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas. Os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 2% e comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR de cepas controle de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis*

(MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

4.7 Georreferenciamento

Todos os quarteirões amostrados durante a realização do inquérito sorológico canino e os casos humanos notificados entre os anos de 2007 e fevereiro de 2013 foram georeferenciados utilizando sistema de posicionamento global GARMIN GPSMAP 76S (Olathe, KS, USA). A coordenada geográfica foi ajustada para que a mesma correspondesse ao centro do quarteirão avaliado com o auxílio do programa Google Earth® (Mountain View, CA, USA).

Os dados foram armazenados em banco de dados especialmente estruturado para o estudo e plotados no mapa da região, para as análises espaciais.

O mapeamento de todos os dados coletados foi realizado com o auxílio do programa ArcGIS™ versão 10.0 (Redlands, CA, USA) e do programa R-3.0.2 (R Development Core Team, Wirtschaftsuniversität, Vienna) para a análise espacial dos dados e identificação dos padrões de distribuição da doença.

4.7.1 Densidade de Kernel

A ferramenta de densidade Kernel (BAILEY & GATRELL, 1995; TEEKAYUWAT *et al.*, 2000) é um método estatístico de estimação de curvas de densidade. Cada uma das observações é ponderada pela distância em relação a um valor central, o núcleo. Este estimador tem como parâmetros básicos o raio de influência (τ), que define a vizinhança do ponto a ser interpolado e controla o grau de “alisamento” da superfície gerada; e uma função de estimação (κ) com propriedades de suavização do fenômeno. O raio de influência ou largura de banda (“bandwidth”), define a área baseada no ponto de estimação μ , que indica quantos eventos μ_i

contribuem para a estimativa da função intensidade (λ). Esta ferramenta de análise espacial cria *hotspots* que auxiliam na identificação das áreas com maior densidade do evento avaliado, ou seja, a densidade de LVC. Para avaliação da densidade foi estipulado um raio de pesquisa de 300m. O programa ArcGIS™ versão 10.0 (Redlands, CA, USA) foi usado para produção dos mapas de densidade.

4.7.2 Distribuição Direcional (Elipse de Desvio Padrão)

A técnica da elipse de distribuição direcional propicia conhecer a distribuição espacial em dois sentidos: identificação de aglomerados e orientação. A identificação de aglomerados foi feita pelo desenho de elipses que marcam regiões com maior concentração de pontos que o esperado, baseado em um modelo de aleatoriedade, proporcionando o conhecimento da natureza da distribuição dos dados na sua assimetria e permitindo a identificação da tendência da distribuição de pontos. O eixo maior define a direção de máxima dispersão da distribuição, enquanto o menor é perpendicular ao eixo anterior e define a mínima dispersão. Ou seja, ela transforma a distribuição aleatória dos casos caninos em uma elipse. A aplicação da distribuição direcional foi empregada utilizando o programa SIG ArcGIS™ versão 10.0 (Redlands, CA, USA).

4.7.3 Função K de Ripley Bivariada (K_{12})

A função K12 é um teste aplicado para verificar se os padrões pontuais das distribuições de dois tipos diferentes de eventos, dentro de uma determinada área, são independentes (LOTWICK & SILVERMAN, 1982). Avaliamos como eventos pontuais os casos humanos e caninos de LV. A Função K12 estima a dependência espacial entre os tipos de eventos 1 e 2 medindo o número esperado de eventos do tipo 2 a uma distância de até d de um evento arbitrário do tipo 1, dividido pela densidade total de eventos do tipo 2 na área estudada. Onde, $E(N_{2D})$ é o número

Materiais & Métodos

esperado de eventos tipo 2 dentro de uma distância de até d de um evento arbitrário do tipo 1, e λ_2 é a densidade total de eventos do tipo 2 na área de estudo.

$$K(d) = \frac{1}{\lambda_2} E(N_{2d})$$

Após a avaliação dos eventos é produzido um gráfico do valor resultante em função das distâncias d avaliadas. Também é construído um gráfico dos dois padrões pontuais. Caso a curva construída esteja dentro do envelope conclui-se que os processos pontuais sejam espacialmente independentes. Caso contrário, conclui-se haver dependência espacial entre os dois padrões pontuais. Neste caso, pode haver uma relação positiva ou negativa. No caso da relação positiva, a curva construída pela função aparece acima da linha superior do envelope. Na negativa, ela aparece abaixo da linha inferior do envelope. A aplicação da função K de Ripley foi empregada utilizando o programa R-3.0.2 (R Development Core Team, Wirtschaftsuniversität, Vienna).

5 RESULTADOS

5.1 Pequenos mamíferos: captura e identificação

Um total de 102 pequenos mamíferos foi capturado durante o período de outubro de 2010 a agosto de 2011. Os filhotes ou as fêmeas prenhas eram soltos de volta ao ambiente no mesmo local onde foram capturados, sendo usados no estudo somente animais jovens/adultos.

O mamífero mais amostrado foi *Didelphis albiventris* (44,1%), o segundo pequeno mamífero mais amostrado foi o *Necromys lasiurus* (37,2%). As outras espécies capturadas, porém em menor frequência, foram: *Cerradomys subflavus* e *Oligoryzomys* sp. (4,9%), *Micureus demarerae* (2,9%), *Mus musculus* e *Rattus novergicus* (2%) e *Rattus rattus* e *Gracilinanus agilis* (1%) (**Figura 5**). A **tabela 1** apresenta o resultado do total de pequenos mamíferos capturados em todas as campanhas realizadas ao longo de um ano no município de Divinópolis, destacando a frequência de cada espécie capturada por campanha.

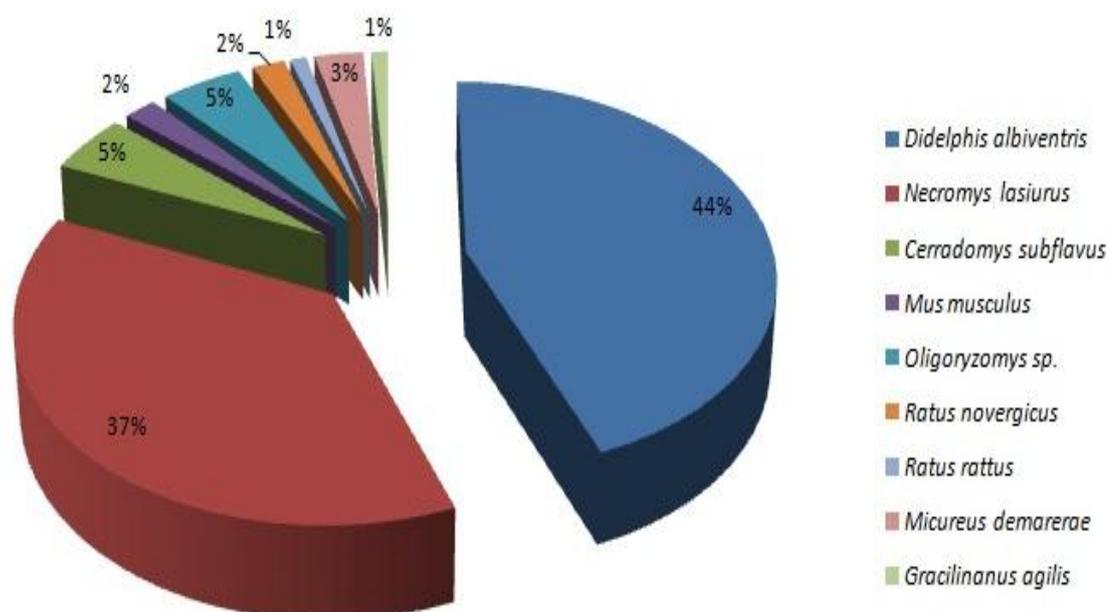


Figura 5: Gráfico representando a frequência dos pequenos mamíferos capturados de acordo com a espécie no período de outubro de 2010 a agosto de 2011 no município de Divinópolis, Minas Gerais.

Tabela 1: Número absoluto e frequência do total de pequenos mamíferos capturados de acordo com a espécie e a campanha de captura no período de outubro de 2010 a agosto de 2011 no município de Divinópolis, Minas Gerais.

Espécie	Campanha 1 (10/2010)	Campanha 2 (12/2010)	Campanha 3 (02/2011)	Campanha 4 (04/2011)	Campanha 5 (06/2011)	Campanha 6 (08/2011)	Total (%)
<i>Didelphis albiventris</i>	4	6	9	11	13	2	45 (44,11)
<i>Necromys lasiurus</i>	7	6	2	3	2	18	38 (37,25)
<i>Cerradomys subflavus</i>	1	2	0	0	1	1	5 (4,9)
<i>Oligoryzomys sp.</i>	1	0	0	1	0	3	5 (4,9)
<i>Micureus demarerae</i>	0	0	0	0	0	3	3 (2,94)
<i>Mus musculus</i>	1	0	0	1	0	0	2 (1,96)
<i>Ratus novergicus</i>	0	1	0	0	1	0	2 (1,96)
<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	0	0	1	1 (0,98)
<i>Ratus rattus</i>	0	0	0	0	1	0	1 (0,98)
Total (%)	14 (13,73)	15 (14,71)	11 (10,78)	16 (15,69)	18 (17,65)	28 (27,45)	102

Resultados

Com relação ao local, foram capturados pequenos mamíferos em todas as trilhas de mata dispostas no município, porém em duas áreas (Morro da Antena e Parque do Gafanhoto) foram capturados quase 70% dos animais. Espécies silvestres como *D. albiventris*, *N. lasiurus*, *Oligoryzomys* sp., *G. agilis*, *M. demarerae* e *C. subflavus*, foram capturados somente nas trilhas de área verde distribuídas pelo município. Já espécies introduzidas (por exemplo: *Rattus rattus* e *Mus musculus*) foram capturadas nas residências. Os exemplares capturados *R. norvegicus* apesar de serem animais introduzidos e com alta antropofilia, foram capturados em áreas de mata, mas isso é facilmente explicado, já que as áreas de mata estão muito próximas de moradias humanas (**Figura 6**).

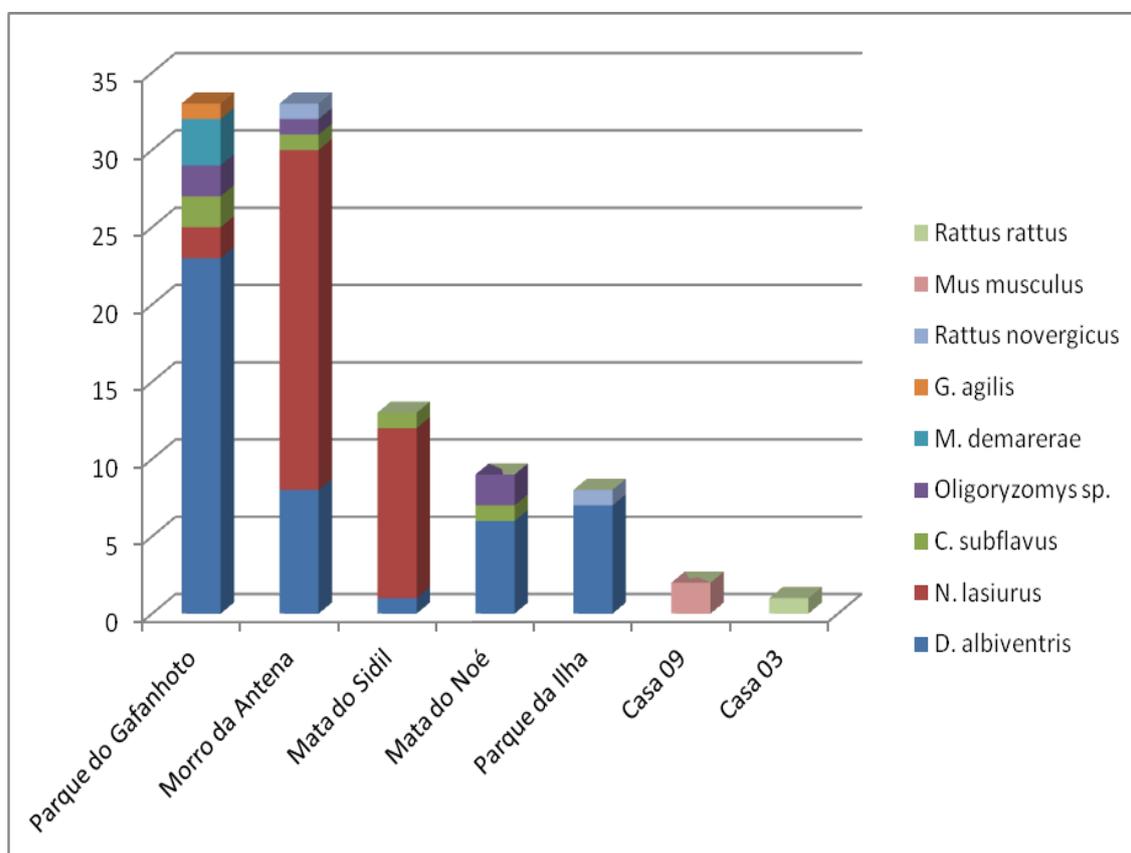


Figura 6: Distribuição dos pequenos mamíferos capturados de acordo com o local de captura entre o período de outubro de 2010 e agosto de 2011 no município de Divinópolis, MG.

*Locais onde não foram capturados animais não estão representados nesta figura.

5.2 Pequenos mamíferos: infecção natural

5.2.1 Isolamento em meio de cultura

Inicialmente as amostras de pele de cauda, baço e medula foram submetidas ao isolamento do parasito em meio de cultura NNN/LIT. Não foi possível isolar o parasito em nenhuma das amostras devido ao grande índice de contaminação dos meios de cultura por fungos e bactérias.

As contaminações foram mais observadas nas amostras de pele de cauda, onde apenas uma amostra pode ser acompanhada até o último repique. Do total de amostras de medula submetidas ao isolamento em meio de cultura nove puderam ser acompanhadas até a última passagem e das amostras de baço vinte e uma.

Estes dados confirmam a dificuldade de isolamento de parasitos a partir de amostras de pequenos mamíferos (ALVAR & BARKER, 2002; ADERIAN *et al.*, 2005).

5.2.2 Diagnóstico molecular

Inicialmente, as amostras de baço, pele de cauda e sangue foram submetidas à extração de DNA e quantificadas. Após o procedimento de extração foi realizada a PCR do ITS1 para triagem das amostras positivas. Das amostras avaliadas três apresentaram a banda compatível com o controle positivo para o alvo ITS1 (**Figura 7**).

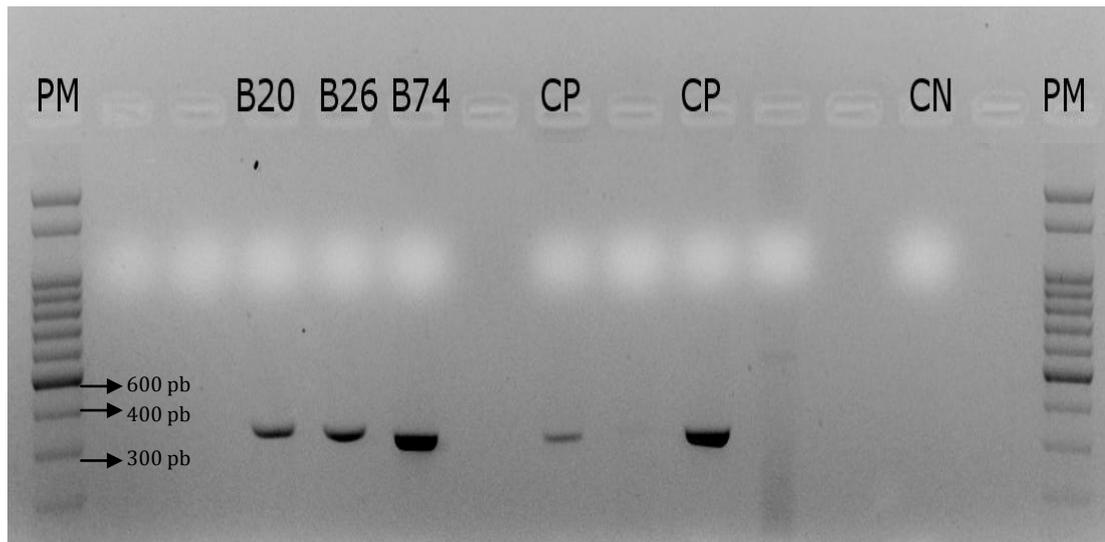


Figura 7: Gel de agarose a 2% das amostras positivas para o alvo ITS1. PM = Peso Molecular; B20, B26 e B74 = Amostras de baço dos pequenos mamíferos; CP = Controle Positivo e CN = Controle Negativo.

Para confirmação e identificação das espécies responsáveis pela infecção nos pequenos mamíferos, o DNA das amostras positivas foi submetido a amplificação do gene *hsp70* e digestão tanto dos alvos ITS1 e *hsp70*. Os resultados observados com a amplificação do *hsp70* confirmaram aqueles obtidos com a PCR/ITS1. A PCR/RFLP de ambos os alvos identificou as espécies responsáveis pela infecção nas amostras B20 e B26 como *Leishmania braziliensis* e B74 como *Leishmania infantum* (**Figura 8**).

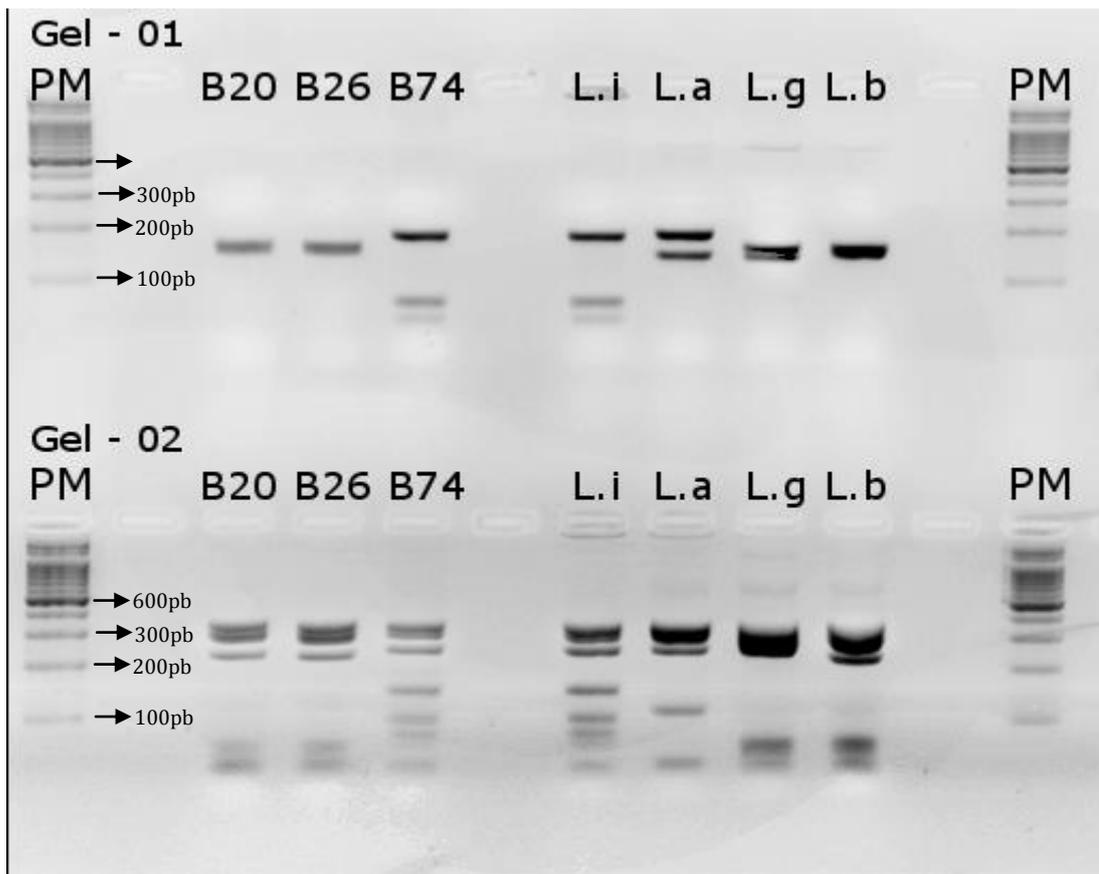


Figura 8: PCR-RFLP do alvo ITS1 (Gel 01) e do Gene *hsp70* (Gel 02) das amostras dos pequenos mamíferos positivas na PCR. PM = Peso Molecular (100pb); B20, B26 e B74 amostras de DNA do Baço; L.i = controle positivo de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), L.a = controle positivo de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); L.g = controle positivo de *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) e L.b = controle positivo de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903).

Três espécimes de pequenos mamíferos foram observados com infecção natural por *Leishmania*, sendo: um exemplar de *Didelphis albiventris*, capturado no Parque do Gafanhoto e um exemplar de *Necomys lasiurus*, capturado no Morro da Antena infectados por *L. braziliensis*, e um exemplar de *Rattus rattus*, capturado na casa de número 3 localizada no Bairro Ipiranga, infectado por *L. infantum*. A **figura 9** destaca no mapa do município de Divinópolis a localização geográfica dos pequenos mamíferos infectados.

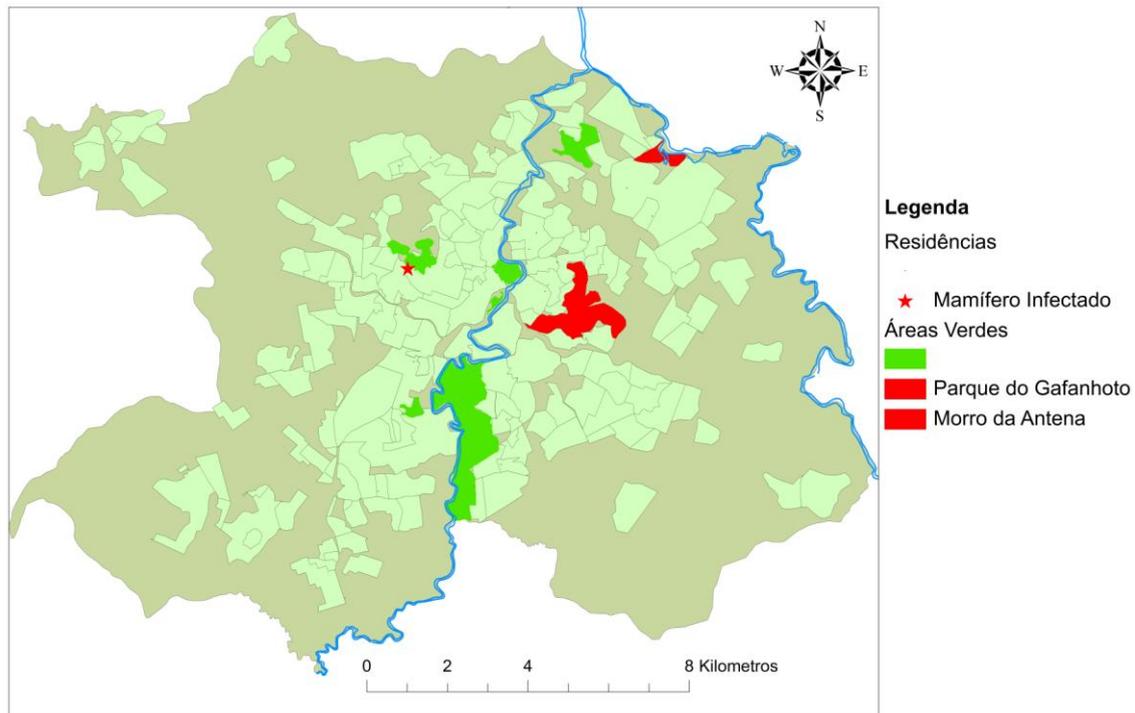


Figura 9: Mapa da Zona Urbana de Divinópolis. A estrela vermelha representa a residência 03 onde foi identificado um pequeno mamífero infectado por *L. infantum*. As áreas de mata identificadas pela cor vermelha representam os locais onde foram capturados pequenos mamíferos infectados por *L. braziliensis*.

5.3 Estudo dos reservatórios domésticos

5.3.1 Isolamento e caracterização do parasito

Vinte e cinco cães com sorologia positiva para leishmaniose foram selecionados aleatoriamente junto ao Centro de Referência em Vigilância e Saúde (CREVISA) da Prefeitura de Divinópolis. Foram coletadas amostras biológicas de linfonodo e medula óssea para a tentativa de isolamento e caracterização da espécie de *Leishmania* circulante nos reservatórios domésticos.

Dos 25 animais avaliados foi possível isolar o parasito em amostras oriundas de 14 cães (56%). Em um animal foi possível isolar o parasito tanto da amostra de

Resultados

medula óssea quanto da de linfonodo, totalizando 16 isolados (60%). Os parasitos foram lavados, o DNA extraído e realizada a PCR do gene *hsp70* de *Leishmania*. Todas as amostras foram positivas e para a identificação específica o produto amplificado foi submetido a digestão pela enzima de restrição *HaeIII*. Todos os isolados apresentaram um padrão de digestão idêntico ao da cepa de referência de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), comprovando que os cães estavam infectados pela espécie causadora da forma visceral da doença (**Figura 10**).

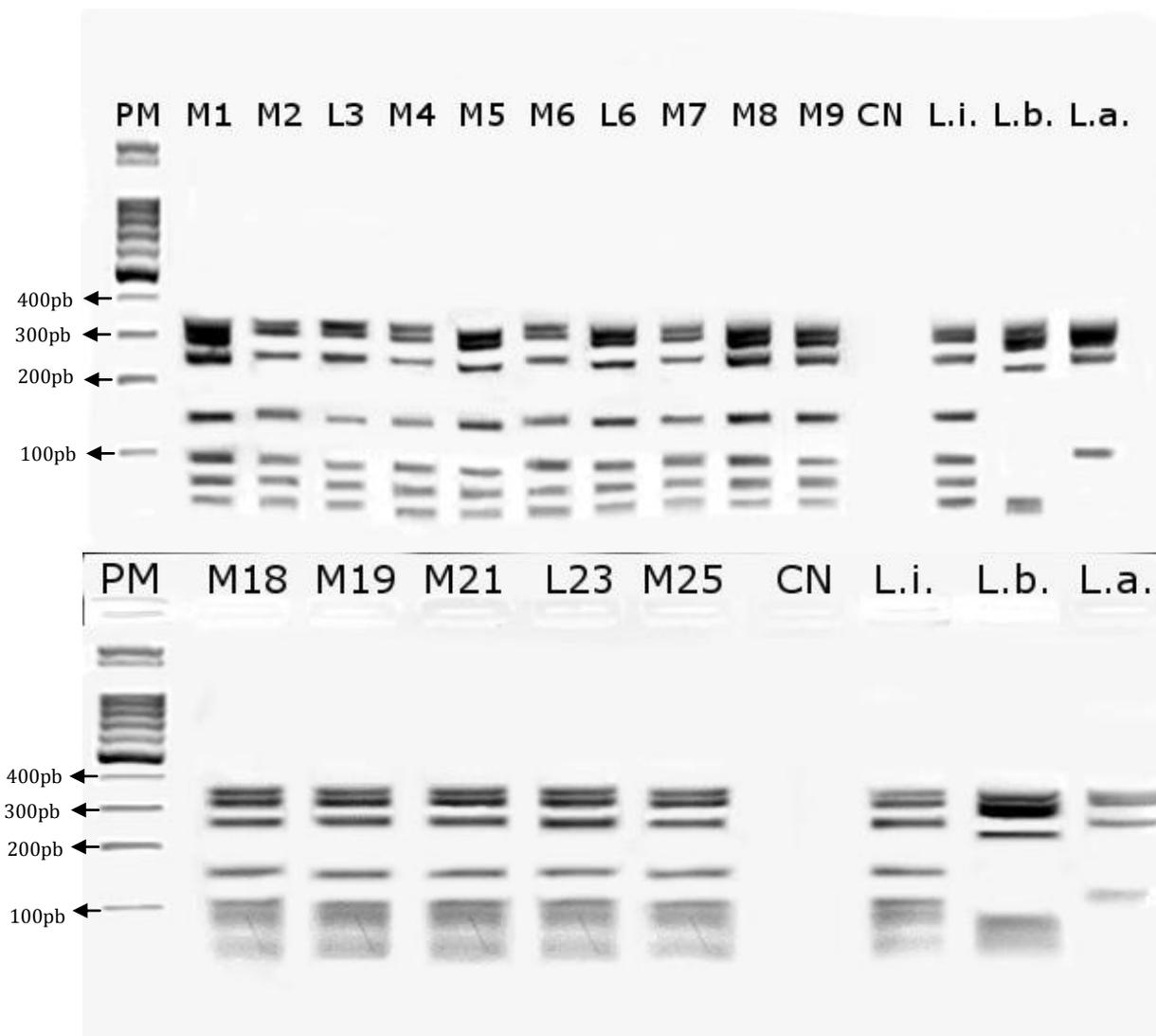


Figura 10: Perfil de digestão do DNA de *Leishmania* (*hsp70*) utilizando a enzima de restrição *HaeIII*. PM: Peso molecular(100pb), M: medula óssea, L: linfonodo, 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 18, 19, 21, 25, 23: número dos cães, CN: controle negativo, L.i.: controle positivo de *L. infantum*, L.b.: controle positivo de *L. braziliensis* e L.a.: controle positivo de *L. amazonensis*.

5.3.2 Inquérito Sorológico amostral da Leishmaniose Canina

Para avaliar a distribuição da LVC no município foi realizado o inquérito sorológico amostral. Foram examinados 3.652 cães distribuídos nos 11 estratos do município, sendo identificados 169 cães com sorologia positiva e prevalência estimada de 4,62% (3.95 - 5.31).

Para a coleta das amostras de sangue dos cães foram visitados 1.247 quarteirões posteriormente plotados em um mapa de acordo com suas coordenadas geográficas. Todos os quarteirões avaliados foram georreferenciados e aqueles que apresentaram animais reagentes foram destacados para realização da análise espacial da LVC (**Figura 11**). Apesar da ampla distribuição da LVC no município, a prevalência da infecção canina variou de 0,9% no estrato 02 a mais de 8% nos estratos 06 e 07, demonstrando que a distribuição da LVC no município não é homogênea (**Tabela 2**).

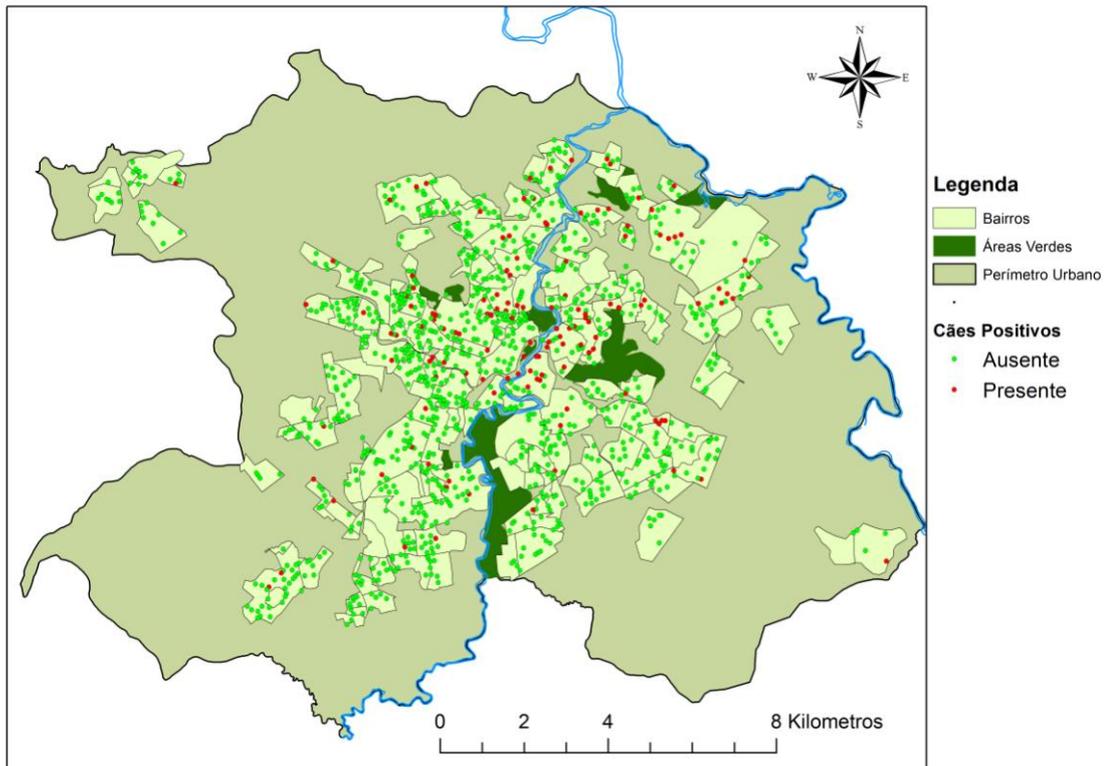


Figura 11: Mapa da Zona urbana do município de Divinópolis com destaque das quadras onde foram avaliados animais para a realização do Inquérito Sorológico Amostral. Os pontos verdes representam as quadras onde não foram encontrados animais reagentes. Os pontos vermelhos as quadras onde foram identificados animais reagentes na RIFI e ELISA.

Tabela 2: Prevalência da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) de acordo com o estrato avaliado no município de Divinópolis, Minas Gerais no período de março de 2013 a fevereiro de 2014.

	Número de cães avaliados	Número de cães soropositivos	Prevalência de LVC (95% Intervalo de Confiança)
Estrato 01	332	10	3,01% (1,14% - 4,88)
Estrato 02	332	3	0,90% (0,00 – 1,91)
Estrato 03	332	16	4,82% (2,48 – 7,16)
Estrato 04	332	6	1,81% (0,35 – 3,27)
Estrato 05	332	11	3,31% (1,36 – 5,26)
Estrato 06	332	28	8,43% (5,40 – 11,46)
Estrato 07	332	29	8,73% (5,65 – 11,81)
Estrato 08	332	16	4,82% (2,48 – 7,16)
Estrato 09	332	18	5,42% (2,95 – 7,89)
Estrato 10	332	6	1,81% (2,95 – 7,89)
Estrato 11	332	26	7,83% (4,90 – 10,76)
Total	3652	169	4,63% (3,95 – 5,31)

5.3.3 Análise Espacial da LVC

5.3.3.1 Densidade de Kernel da LVC

A análise da densidade de Kernel da LVC destacou que a infecção canina está amplamente distribuída pelo município de Divinópolis, sendo identificados *hotspots* em todos os estratos avaliados (**Figura 12**). Apesar da ampla distribuição da LVC no município de Divinópolis, foram identificadas áreas consideradas

Resultados

prioritárias para as ações de controle da LV por apresentarem maior concentração de cães positivos.

A região central do município foi a que apresentou a maior concentração de *hotspots*.

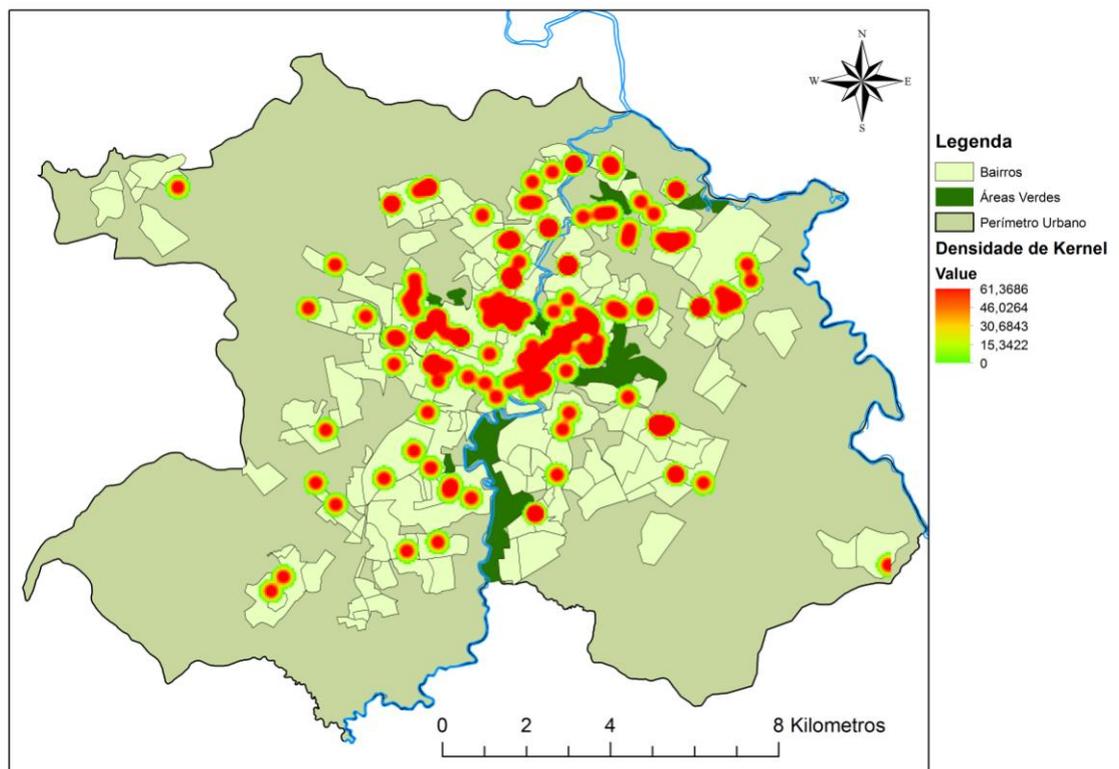


Figura 12: Mapa da Zona Urbana do município de Divinópolis. Em destaque a densidade de Kernel e as áreas quentes "*hotspots*" relacionadas à infecção de LVC.

5.3.3.2 Distribuição direcional da LVC

A distribuição direcional permitiu a identificação de um aglomerado através da formação de uma elipse identificando a região com maior concentração de casos de LVC, esta elipse é determinada pela média da distribuição espacial dos casos positivos em relação a um centroide, podendo, portanto ser considerada uma possível área prioritária para a implementação de uma política mais rigorosa de controle (**Figura 13**). A formação da elipse em uma área central, com densidade populacional mais alta fortalece o processo de urbanização da LVC.

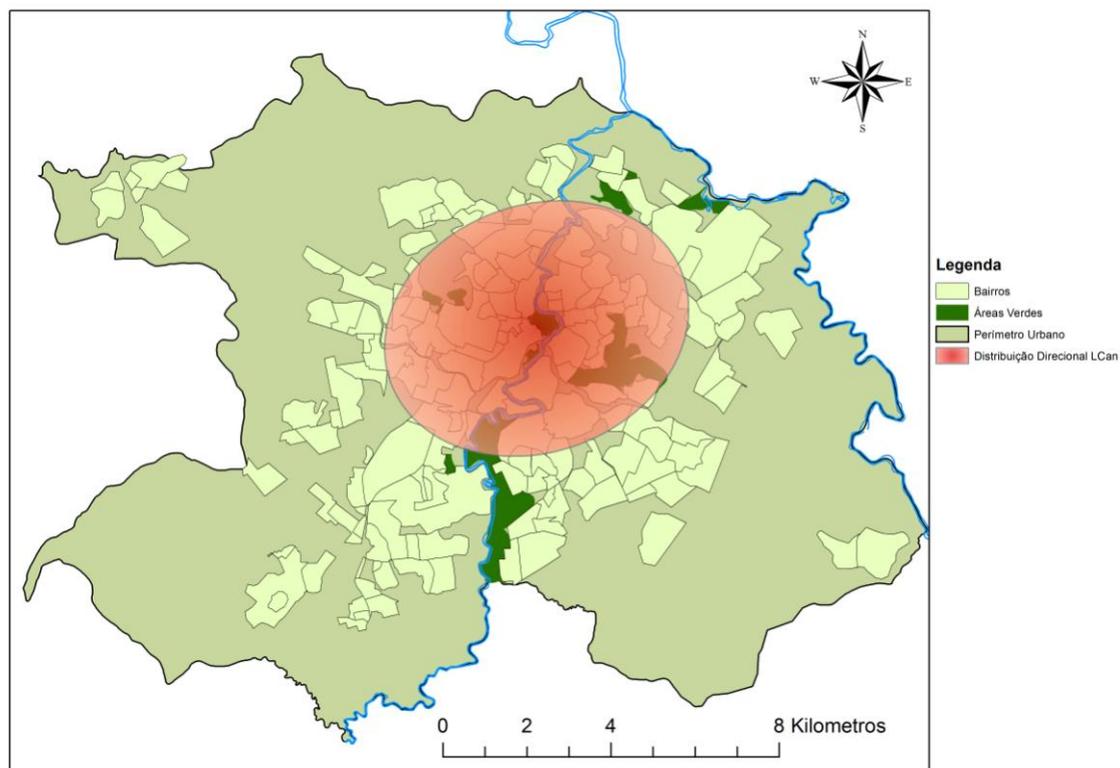


Figura 13: Mapa da Zona Urbana do município de Divinópolis. A elipse em vermelho representa a distribuição direcional da Leishmaniose Canina.

5.4 Análise espacial das leishmanioses humanas

5.4.1 Leishmaniose visceral

Os 16 casos humanos de leishmaniose visceral, confirmados e notificados no período de 2007 a 2013 foram georreferenciados e plotados no mapa como pontos **(Figura 14)**. A distribuição dos pontos relacionados aos casos humanos possibilitou avaliar a distribuição direcional da leishmaniose humana no município e a comparação desta distribuição com os casos caninos revelados no inquérito **(Figura 15)**.

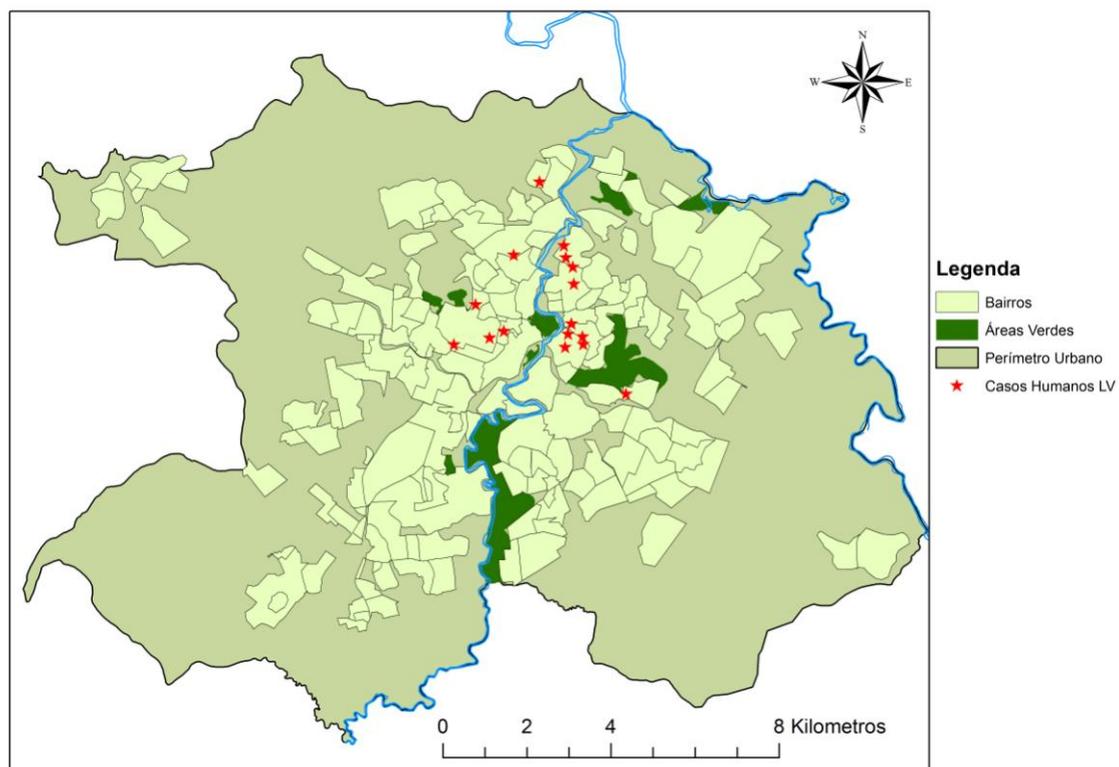


Figura14: Mapa da zona urbana do Município de Divinópolis. As estrelas em vermelho representam os casos humanos de LV ocorridos entre os anos de 2007 e 2013.

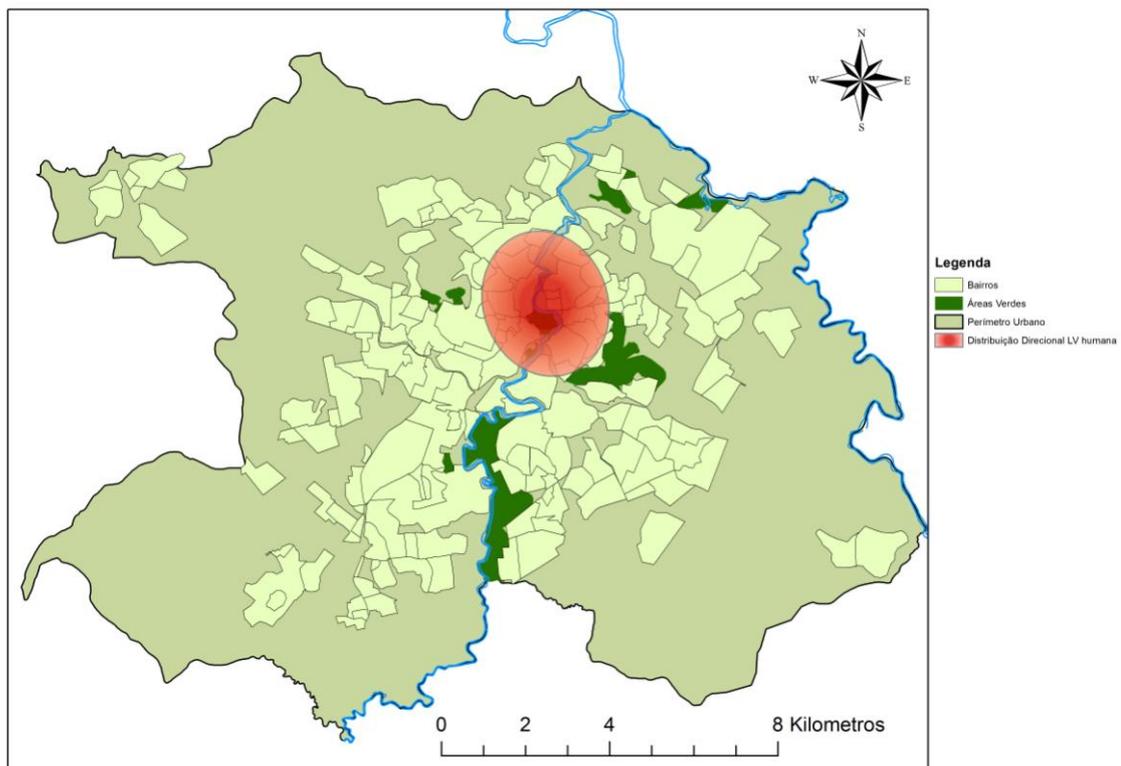


Figura 15: Mapa da zona urbana do município de Divinópolis. Em destaque a Distribuição direcional dos casos humanos de LV.

5.4.2 Leishmaniose tegumentar americana

A **Figura 16** apresenta a distribuição espacial dos casos humanos de LTA de acordo com o ano de notificação. Foram georreferenciados os 43 casos humanos notificados entre os anos de 2007 e fevereiro de 2013.

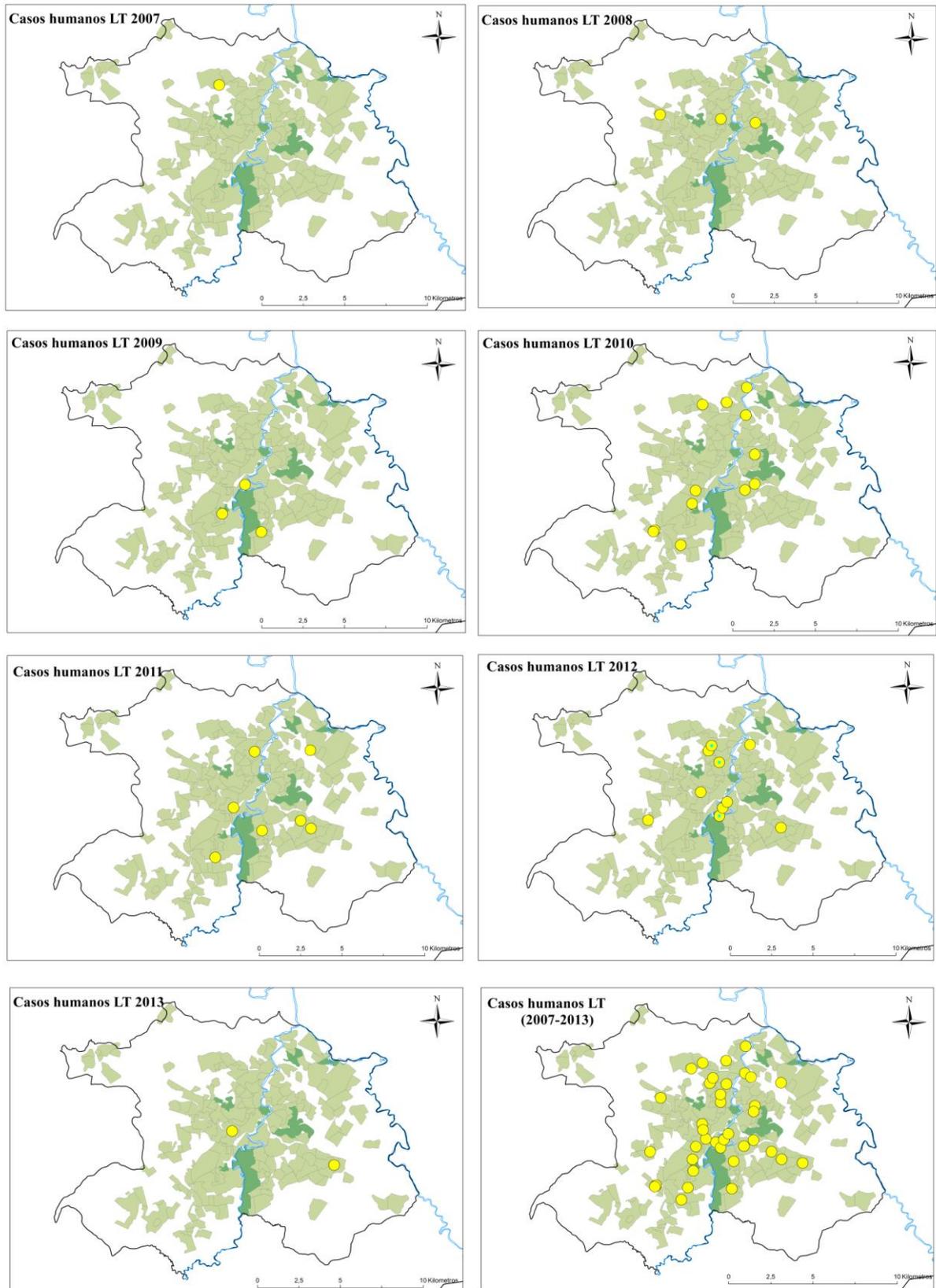


Figura 16: Perfil histórico da distribuição dos casos humanos de LTA notificados no município de Divinópolis entre os anos de 2007 e 2013. Os círculos em amarelo representam os casos humanos notificados em cada ano.

Os casos humanos de leishmaniose tegumentar, confirmados e notificados no período de 2007 a fevereiro de 2013 foram georreferenciados como pontos e agrupados em um único mapa (**Figura 17**). A distribuição dos pontos relacionados aos casos humanos possibilitou avaliar a distribuição direcional da leishmaniose tegumentar no município (**Figura 18**).

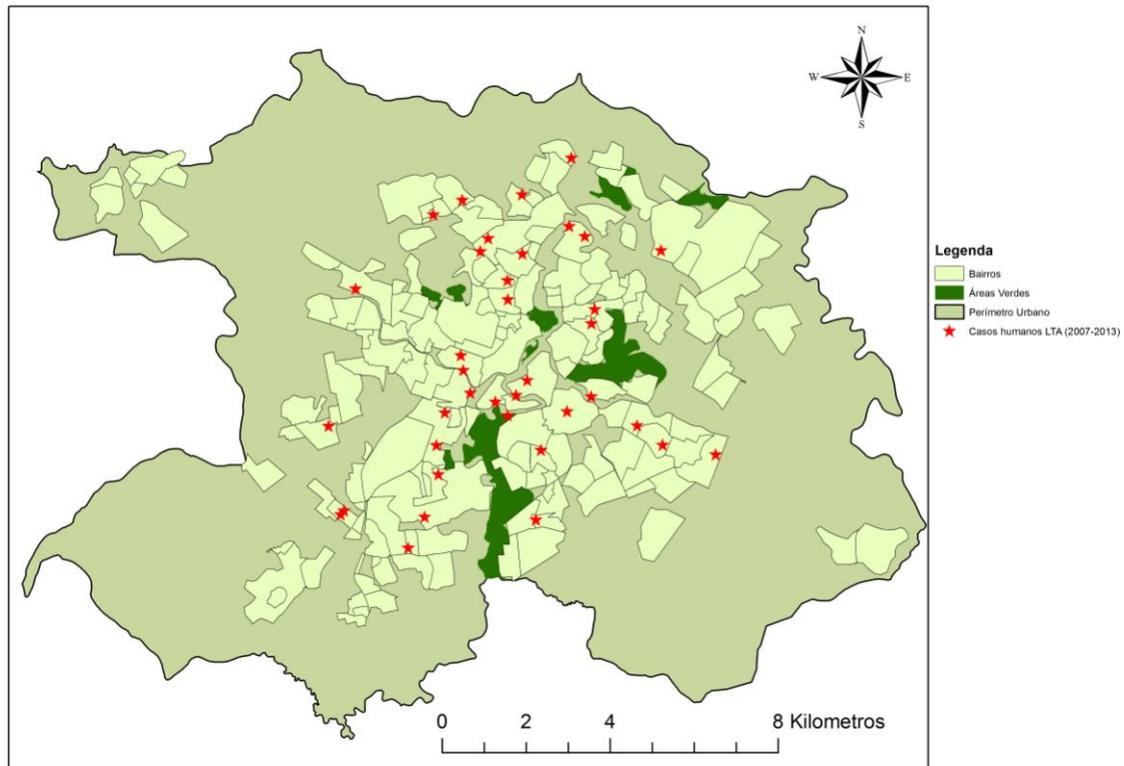


Figura 17: Mapa da zona urbana do município de Divinópolis. As estrelas em vermelho representam os casos humanos de leishmaniose tegumentar notificados entre os anos de 2007 e fevereiro de 2013.

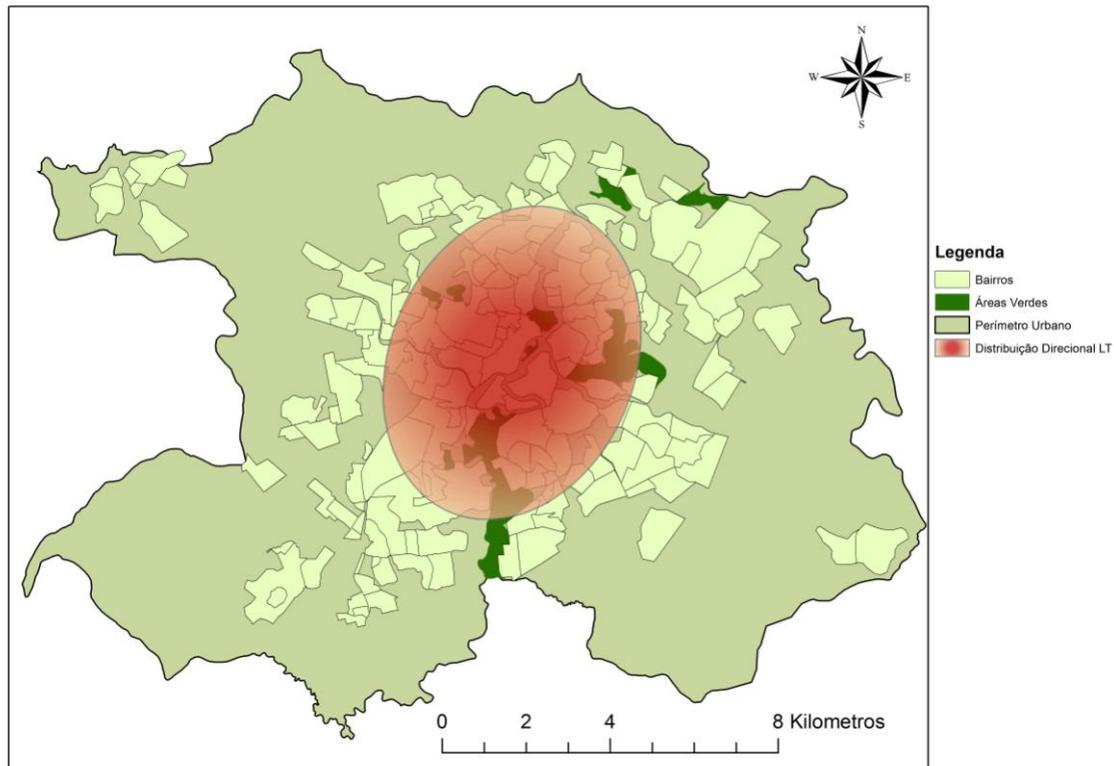


Figura18: Mapa da zona urbana do município de Divinópolis. Em destaque (elipse vermelha) a distribuição direcional dos casos humanos de LT notificados entre os anos de 2007 e fevereiro de 2013.

5.5 Dependência espacial entre Leishmaniose canina e humana

A forma como os dados estão distribuídos no espaço é um importante indicador da interação espacial, a qual é revelada nas medidas de associação ou autocorrelação espacial. Os resultados da dependência espacial entre LVC e LV humana (Função K12 de Ripley) comprovaram que a ocorrência destas doenças no município de Divinópolis são dependentes, e que a relação entre estes eventos é positiva. Ou seja, os casos humanos tendem a se concentrar em locais mais próximos das regiões com maior ocorrência de casos caninos de LV (**Figura 19**).

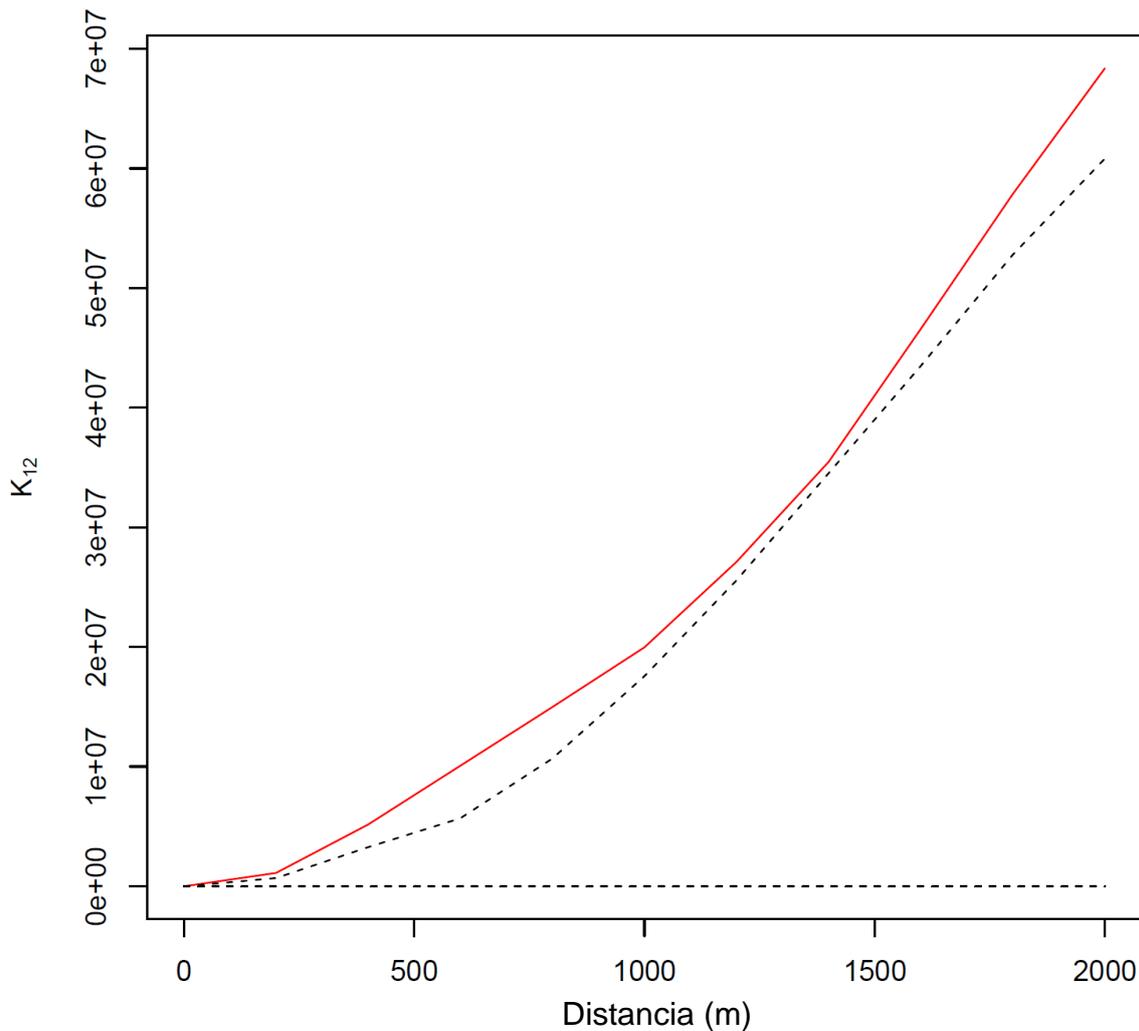


Figura 19: Função K12 de Ripley. O gráfico comprova a dependência espacial entre a ocorrência de casos caninos de leishmaniose visceral e casos humanos. A curva em vermelho acima do envelope demonstra que esta dependência é positiva.

A utilização da técnica de análise espacial de distribuição direcional avigora a dependência espacial entre os eventos observados (LVC e LV humana). Ao avaliarmos em conjunto os dados de distribuição direcional dos casos humanos e caninos observamos que a elipse produzida através da aglomeração de casos humanos está contida dentro da elipse dos casos caninos, reforçando a dependência espacial entre os eventos LVC e LV humana (**Figura 20**).

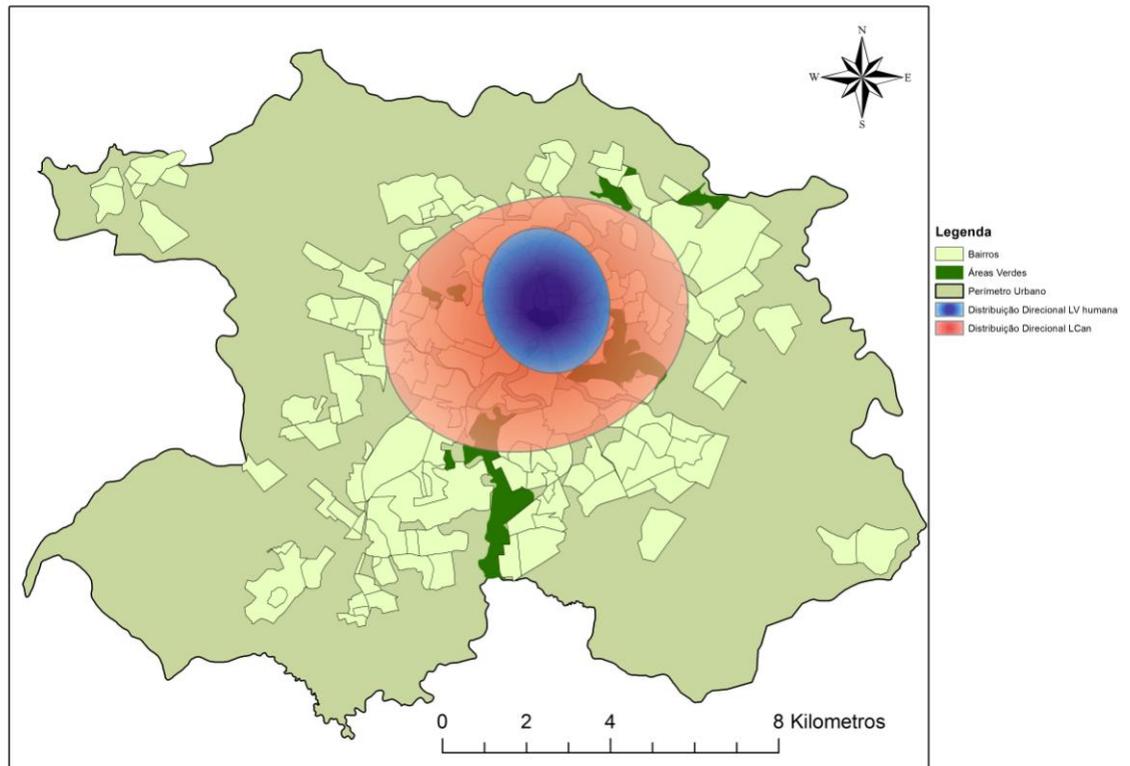


Figura 20: Mapa da zona urbana do município de Divinópolis. A elipse vermelha representa a aglomeração de casos de LVC. A elipse em azul representa o aglomerado de casos humanos de LV notificados nos últimos 5 anos no município de Divinópolis.

6 DISCUSSÃO

O município de Divinópolis, localizado na região centro-oeste do estado de Minas Gerais foi a área de estudo escolhida para o desenvolvimento de um estudo multifatorial que avaliou alguns aspectos epidemiológicos relacionados à distribuição espacial da LV e LTA.

As leishmanioses têm expandido muito nos últimos anos, no Brasil e no estado de Minas Gerais. Esta expansão geográfica tem levado ao aumento no números de notificações de LTA e LV, com casos autóctones sendo notificados em grandes cidades, como Belo Horizonte, Governador Valadares e Montes Claros. A crescente adaptação dos vetores e a presença de reservatórios sinantrópicos no ambiente peridomiciliar além da multiplicidade de fatores envolvidos na transmissão dos parasitos causadores destas doenças tem dificultado a implementação de medidas de controle nas áreas endêmicas, o que tem contribuído para este quadro.

O município de Divinópolis é considerado uma região endêmica para a transmissão de LTA há vários anos, e de acordo com dados do serviço de vigilância epidemiológica entre os anos de 2007 e 2013 foram notificados 43 novos casos de LTA. A relação de Divinópolis com a LV é bem mais recente, sendo o primeiro caso humano notificado em 2007 e 15 outros casos até o início de 2013. Apesar das boas condições sanitárias e do alto índice de escolaridade no município, casos de LT e LV continuam sendo notificados. Este fato provavelmente se deve às condições ambientais favoráveis e à presença de espécies vetoras e reservatórios dos agentes etiológicos de LTA e LV no ambiente urbano.

Este estudo descreve algumas características epidemiológicas associadas à análise espacial da LTA e LV, avaliando principalmente a distribuição dos hospedeiros humanos e reservatórios silvestres, sinantrópicos e urbanos, no espaço, empregando ferramentas com o intuito de identificar áreas de maior risco de transmissão. Este tipo de análise poderá ser utilizada na identificação das áreas prioritárias para a implentação de estratégias de prevenção e controle, na compreensão da dinâmica de transmissão e favorecer a implementação de políticas mais adequadas em diferentes áreas endêmicas.

6.1 Estudo dos hospedeiros silvestres e sinantrópicos de *Leishmania* em Divinópolis

As Leishmanioses são doenças em franca expansão geográfica no Brasil e sua ocorrência não é mais exclusividade de indivíduos que entram em contato com matas e animais silvestres, ocorrendo em áreas rurais, periurbanas e urbanas. Com isso, tem sido observado o aumento da incidência em áreas endêmicas e a emergência em regiões indenes, principalmente em áreas urbanizadas (GRIMALDI-JR & TESH, 1993; BRANDÃO-FILHO & SHAW, 1994; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; GONTIJO & MELO, 2004; DIAS *et al.*, 2007).

Apesar de ser reconhecidamente uma região de ocorrência de LT há vários anos e do crescente número de casos de LV, poucos são os trabalhos relacionados a aspectos epidemiológicos destas parasitoses. Estudos sobre a infecção humana e a presença de reservatórios e vetores de *Leishmania* em Divinópolis são escassos ou restritos a determinadas regiões do município (MARGONARI *et al.*, 2010; MARGONARI *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2013).

Um fator muito importante para a compreensão da epidemiologia destas doenças é a identificação dos possíveis reservatórios silvestres e sinantrópicos envolvidos na transmissão da infecção em uma área endêmica. Este conhecimento associado ao estudo das espécies de vetores envolvidos na transmissão auxilia na compreensão e definição dos diferentes padrões epidemiológicos da doença no Brasil (SHAW, 2007).

Apesar da necessidade de se conhecer estes reservatórios, poucos estudos avaliam o papel de animais silvestres e sinantrópicos em áreas endêmicas de transmissão, principalmente devido às dificuldades na captura destes animais e nas técnicas de isolamento do parasito empregadas. O fato de diversos autores considerarem o cão o principal responsável pela manutenção da LV no ambiente urbano e um possível envolvido na disseminação da LTA, resulta em um grande número de trabalhos voltados para a eliminação do cão soropositivo das áreas endêmicas, e os trabalhos relacionados à avaliação dos mamíferos silvestres e sinantrópicos são ignorados.

Discussão

Apesar das dificuldades de se confirmar a presença de reservatórios silvestres de *Leishmania*, o presente trabalho investigou a distribuição e a infecção natural de pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) silvestres e sinantrópicos com ocorrência na zona urbana do município de Divinópolis. A escolha de se capturar roedores e marsupiais se baseou em estudos anteriores que apontam espécies destes grupos como possíveis reservatórios de *Leishmania* sp.. (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; OLIVEIRA FS *et al.*, 2005; SCHALLIG *et al.*, 2007; QUARESMA *et al.*, 2011).

A metodologia de campo padrão para captura de pequenos mamíferos empregada em nosso estudo se mostrou bastante efetiva (LACHER *et al.*, 1989; PAGLIA *et al.*, 1995). Ao final de seis campanhas (1 campanha de captura a cada 2 meses) um total de 102 pequenos mamíferos foram capturados. O intervalo de dois meses entre cada campanha de captura possibilitou a reposição natural dos pequenos mamíferos nas trilhas de captura, fato confirmado devido ao número significativo de animais capturados nas últimas campanhas de coleta.

Dentre os pequenos mamíferos capturados, a espécie mais observada foi o *Didelphis albiventris* (44,11%), marsupial de relevante importância em focos de transmissão das Leishmanioses no Brasil. Além do fato desta espécie já ter sido encontrada naturalmente infectada por *L. braziliensis* (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; SHALLIG *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2010; QUARESMA *et al.*, 2011), *L. guyanensis* (ARIAS *et al.*, 1981) e *L. infantum* (SHERLOCK *et al.*, 1984), este marsupial possui hábitos sinantrópicos, o que pode favorecer a instalação dos parasitos que circulam no ciclo silvestre de transmissão no ambiente urbano.

O segundo pequeno mamífero mais amostrado foi o *Necromys lasiurus* (37,25%), um roedor terrestre, comum nos cerrados, caatinga e mata atlântica. Esta espécie já foi incriminada como possível reservatório de *L. braziliensis* no nordeste brasileiro após o parasito causador de LTA ter sido isolado de suas amostras clínicas (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003). A maioria dos espécimes de *N. lasiurus* foi capturada nas trilhas dispostas no Morro da Antena e na Mata do Sidil, que possuíam como característica comum estarem muito próximas de áreas habitadas e por possuírem um trecho de vegetação rasteira. Esta espécie também é conhecida por habitar regiões alteradas pelo homem, como plantações e capinzais, o que

também fortalece o seu papel na ligação entre o ciclo silvestre e urbano da LTA (MS, 2002).

As outras espécies capturadas, porém em menor frequência foram: *Cerradomys subflavus* e *Oligoryzomys* sp. (4,9%), *Micureus demarerae* (2,94%), *Mus musculus* e *Rattus novergicus* (1,96%) e *Rattus rattus* e *Gracilinanus agilis* (0,98%). Existem poucos trabalhos relacionados à avaliação da infecção natural nestas espécies, porém, a infecção natural por *Leishmania braziliensis* já foi detectada em *Mus musculus* e *Gracilinanus agilis* no estado do Mato Grosso e Minas Gerais e DNA de *Leishmania infantum* já foi detectado nas amostras de *Rattus novergicus* e *Rattus rattus* também no estado de Minas Gerais (FERREIRA *et al.*, 2010; MARCELINO *et al.*, 2011; QUARESMA *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2012; LARA-SILVA *et al.*, 2014).

Do total de pequenos mamíferos capturados, 98% foram recolhidos em áreas silvestres incluídas dentro da zona urbana do município. Em todas as trilhas de captura dispostas pelo município foram capturados pequenos mamíferos, porém em duas áreas (Morro da Antena e Parque do Gafanhoto) foram capturados quase 70% dos animais. Uma destas áreas (Parque do Gafanhoto) é caracterizada como uma mata mais preservada, onde foi capturado um grande volume de marsupiais, enquanto que a outra área (Morro da Antena) possui característica de pastagem, uma área de transição para o ambiente urbano, onde observamos um maior número de roedores.

Os pequenos mamíferos sinantrópicos têm como característica formarem colônias no ambiente silvestre, distante das áreas alteradas pelo homem, contudo em função das modificações ambientais decorrentes dos processos de urbanização e das mudanças ocasionadas nos ecossistemas naturais acabam por expandir suas colônias para estes ambientes modificados (MS, 2002). Algumas espécies, hoje, apresentam populações com elevado grau de sinantropia, como o *Necromys lasiurus*, e nesta situação aumenta-se o risco de transferência de agentes infecciosos dessas espécies para outros animais que vivem no ambiente urbano e conseqüentemente para o homem.

Diferentes metodologias foram aplicadas na tentativa de detectar a infecção natural nos pequenos mamíferos capturados durante o estudo.

Discussão

Inicialmente foi realizada a tentativa de se isolar o parasito de amostras clínicas destes animais utilizando meio de cultura NNN (Novy e Mc Nel, 1903; Nicolle, 1908) enriquecido com LIT (Liver Infusion Tryptose) e mantidos em estufa à $25^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Não foi possível isolar o parasito em nenhuma das amostras devido ao grande índice de contaminação dos meios de cultura por fungos e bactérias.

As dificuldades relacionadas ao isolamento de parasitos em amostras de pequenos mamíferos já são conhecidas (ALVAR & BARKER, 2002; ADERIAN *et al.*, 2005). O isolamento do parasito, principalmente em amostras de pele, é uma técnica laboratorial que fortalece o papel do mamífero no ciclo de transmissão das leishmanioses, visto que confirma a presença do parasito na amostra clínica avaliada, porem as contaminações e o alto índice de insucesso no isolamento do parasito dificultam a aplicação desta metodologia. Este fato pode estar relacionado a diversos fatores, entre eles: a baixa carga parasitária em roedores silvestres, a baixa resistência do protozoário frente às grandes concentrações de antifúngico e ao alto índice de contaminação nas amostras clínicas oriundas destes animais. Portanto, buscar alternativas que favoreçam o sucesso do isolamento do parasito em pequenos mamíferos torna-se um alvo importante das futuras pesquisas que avaliam o papel dos mamíferos silvestres e sinantrópicos no ciclo de transmissão das leishmanioses.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) também foi aplicada com o intuito de detectar DNA de *Leishmania* nas amostras clínicas provenientes dos pequenos mamíferos. Foram utilizados dois alvos o espaçador interno ITS1 e o gene *hsp70* na detecção da infecção natural dos pequenos mamíferos. Todas as amostras positivas para os dois alvos foram submetidas a PCR-RFLP para a identificação da espécie responsável pela infecção.

Em amostras de três pequenos mamíferos foi detectado o DNA de *Leishmania* utilizando os dois alvos ITS1 e *hsp70*. Um exemplar de *Didelphis albiventris*, capturado no Parque do Gafanhoto e um exemplar de *Necomys lasiurus*, capturado no Morro da Antena apresentaram padrão de digestão idêntico ao da cepa referência de *L. braziliensis*. Um exemplar de *Rattus rattus*, capturado na casa de número 3 no bairro Ipiranga, apresentou o mesmo padrão de *Leishmania infantum*. As espécies *Didelphis albiventris* e *Necomys lasiurus* já foram

incriminadas em alguns trabalhos como hospedeiros naturais de *L. braziliensis* (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; SHALLIG *et al.*, 2007; QUARESMA *et al.*, 2011). Este achado confirma a ocorrência do ciclo silvestre no município de Divinópolis, da principal espécie causadora da LTA no Brasil.

Dos três espécimes de pequenos mamíferos capturados nas residências, encontra-se um exemplar de *Rattus rattus*, vulgarmente conhecido como rato-preto ou rato de telhado, no qual foi identificada a infecção natural por *Leishmania infantum*. O *Rattus rattus* trata-se de um roedor de hábitos noturnos e comumente observado em habitações humanas, seja em áreas silvestres ou urbanas. Sua característica antropofílica o aponta como um importante fator no estabelecimento de diversos agravos humanos, mas seu papel no ciclo de transmissão de *Leishmania* ainda é pouco conhecido. Este roedor já foi observado naturalmente infectado por *L. braziliensis* em relatos anteriores (ALEXANDER *et al.*, 1998; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2005) e também por *Leishmania infantum*(QUARESMA *et al.*, 2011).

As técnicas de PCR aplicadas na identificação da infecção natural de pequenos mamíferos empregadas no presente trabalho se mostraram úteis, tanto na caracterização da infecção natural quanto na identificação da espécie responsável pela infecção.

A aplicação de estudos epidemiológicos voltados para a identificação da infecção natural em pequenos mamíferos é uma ferramenta imprescindível para a compreensão da circulação de *Leishmania* em áreas endêmicas de transmissão, principalmente em áreas endêmicas onde mais de uma espécie de *Leishmania* está presente.

É importante deixar claro que alguns critérios devem ser levados em consideração para que um hospedeiro de *Leishmania* seja considerado um reservatório, entre eles: sobreposição na distribuição geográfica e temporal de vetores e hospedeiros; o tempo de vida do hospedeiro deve ser longo o suficiente para garantir a transmissão do parasito; prevalência da infecção deve ser alta entre a população deste hospedeiro; a carga parasitária deste hospedeiro deve ser alta na pele ou no sangue para permitir a fácil infecção do vetor; deve-se observar a presença da mesma espécie de *Leishmania* entre o possível reservatório e

hospedeiros humanos (SILVA *et al.*, 2005). As relações dos possíveis reservatórios com os vetores também devem ser avaliadas, como: os hábitos de realizar repasto em humanos; sua distribuição do vetor pode ser diferente de um reservatório; suas preferências alimentares podem não incluir uma série de reservatórios; ou eles podem ser incapazes de desenvolver os parasitas (KILLICK-KENDRICK, 1999). Por isso, são necessários maiores estudos para confirmar o verdadeiro papel destes pequenos mamíferos como reservatórios das diferentes espécies de *Leishmania* e suas relações com as espécies vetoras que ocorrem na área estudada.

O município de Divinópolis é uma área endêmica para LTA, e apesar do pequeno número de mamíferos encontrados naturalmente infectados por *Leishmania*, não podemos descartar a importância destes animais na manutenção do ciclo zoonótico da infecção, principalmente devido ao grande número de possíveis reservatórios capturados durante o estudo. As espécies *Didelphis albiventris* e *Necromys lasiurus* representaram mais de 81% do total de pequenos mamíferos capturados. Este fato é de extrema relevância, visto que ambos já foram incriminados como possíveis reservatórios de espécies dermatrópicas de *Leishmania* (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003). Ou seja, uma grande parcela dos pequenos mamíferos que habitam as áreas verdes incluídas dentro da zona urbana do município de Divinópolis são de espécies consideradas potenciais reservatórios de *Leishmania*. Esta informação associada à grande riqueza de espécies vetoras descrita por NASCIMENTO *et al.* (2013) no município de Divinópolis são fatores importantes para a manutenção do ciclo silvestre de *Leishmania* e consequentemente para a manutenção da endemia das leishmanioses no município.

A análise integrada dos resultados obtidos neste estudo associada a outros estudos ainda em andamento na área poderão auxiliar na escolha de medidas de prevenção e controle mais eficientes para a realidade local, favorecendo a implementação de uma estratégia mais adequada no controle das leishmanioses na área.

6.2 Distribuição espacial dos casos humanos de LTA

No Brasil, a LTA é uma doença com diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores, representando diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, o que torna seu controle complexo (MS, 2007). No município de Divinópolis são comuns os relatos de casos humanos de LTA, porém não existem estudos que avaliam a distribuição da doença.

A definição de área de risco para a ocorrência de LTA no Brasil é muito complexa, principalmente devido à dificuldade de se estratificar áreas prioritárias para a prevenção e o controle da doença. Muitos fatores podem influenciar nesta dificuldade de definição de áreas prioritárias, entre eles os problemas de se identificar a real localização onde ocorreu a infecção. Diversas situações devem ser avaliadas pelos serviços de vigilância em saúde, entre elas: o indivíduo infectado realmente adquiriu a doença em seu município de residência? Qual o verdadeiro local onde ocorreu a infecção, em seu ambiente de trabalho, residência ou outra localidade? Estas informações são primordiais para que a avaliação da distribuição espacial da doença seja eficiente. Para tal uma melhoria do sistema de notificação se faz necessária, principalmente a investigação epidemiológica do caso e o treinamento adequado dos agentes de saúde, para que os dados obtidos pelos sistemas de notificação sejam mais confiáveis.

A avaliação de aspectos epidemiológicos da LTA já foi aplicada em diversos estudos: BARRAL *et al.* (1999), determinaram a frequência de LTA e caracterizaram clinicamente um surto no povoado de Canoa, na Bahia; KAWA & SABROZA (2002) analisaram os determinantes históricos e espaciais da implantação, difusão e persistência da LTA na cidade do Rio de Janeiro, GONTIJO *et al.*, 2002 avaliaram os aspectos clínicos e epidemiológicos da LTA na região do Vale do Rio Jequitinhonha em Minas Gerais, além de NUNES *et al.* (2006), que verificaram fatores eco-epidemiológicos implicados na manutenção da LTA em Varzelândia, Minas Gerais. Apesar de envolverem elementos epidemiológicos comuns, como a mesma família de insetos vetores, os possíveis reservatórios silvestres, sinantrópicos e domésticos, além da participação do humano no ciclo, cada região de estudo possui características únicas, que são as responsáveis pelas diferenças em frequência e

distribuição da doença e conseqüentemente associadas às dificuldades relacionadas ao controle da LTA.

No presente trabalho avalliamos a distribuição espacial dos casos humanos notificados entre os anos de 2007 e 2013. O mapa de densidade de Kernel não foi utilizado para a avaliação da distribuição da LTA em Divinópolis, principalmente devido ao pequeno número de casos observados nos últimos anos, o que é um fator limitante para a produção do mapa. A ferramenta de distribuição direcional se mostrou mais útil na determinação da área com maior intensidade de transmissão o que pode contribuir na definição das estratégias de controle.

No município de Divinópolis, o aglomerado formado pela distribuição espacial dos casos humanos de LTA abrangeu grande parte do município, devido ao fato dos casos humanos estarem dispersos por toda zona urbana do município. Como a ferramenta de distribuição direcional fornece a medida de dispersão espacial baseada na distribuição espacial de todos os casos observados, delimitando uma região com maior concentração de pontos que o esperado, informações inexatas sobre a real localidade onde ocorreu a infecção humana influenciariam menos no resultado final da elipse.

É importante destacar a presença de mamíferos silvestres infectados por *L. braziliensis* em áreas de mata localizadas na zona urbana do município de Divinópolis. Além disso, em estudo realizado no mesmo período e local, NASCIMENTO *et al.* (2013) observaram a presença de 15 espécies de flebotomíneos nas áreas verdes de captura e dentre elas as espécies *Lutzomyia intermedia*, *Lu. neivai*, *Lu. migonei* e *Lu. whitmani* que estão relacionadas com a transmissão de *L. braziliensis* (KILLICK-KENDRICK, 1999; DE SOUZA *et al.*, 2006; MARGONARI *et al.*, 2006; MARCONDES *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011). A presença de possíveis reservatórios e vetores de *Leishmania* nas mesmas áreas de ocorrência é um forte indicativo da manutenção do ciclo silvestre, fator este que favoreceria a endemicidade da LTA em Divinópolis.

Novos estudos relacionados à distribuição espacial da LTA no município de Divinópolis devem avaliar não somente a localização espacial dos casos humanos, mas também variáveis que podem influenciar no surgimento de novos casos, como a proximidade com áreas silvestres e a distribuição das principais espécies de

vetores. Além disso, os serviços de vigilância em saúde devem buscar, exaustivamente, identificar de maneira exata o local onde ocorreu a infecção humana, visto que esta informação é primordial para a determinação de áreas prioritárias e para a implementação de medidas preventivas.

6.3 Estudo dos reservatórios domésticos e dos casos humanos de LV

A LV é um grave problema de saúde pública em todo o território brasileiro e a expansão da mesma, principalmente em áreas urbanas de todo o país, demonstra a necessidade de se adequar as medidas de controle à realidade da área de ocorrência (SILVA *et al.*, 2001; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006).

Apesar dos esforços empregados pelos órgãos de vigilância epidemiológica, o que tem sido observado é que a doença ainda continua em expansão (ROMERO & BOELAERT, 2010). Vários aspectos podem estar relacionados à ineficiência do Programa de Controle da LV no Brasil, porém, um dos mais destacados pelos estudiosos em epidemiologia é a dificuldade na destinação de recursos financeiros dos municípios ao programa de controle (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Diversos fatores estão associados ao processo de expansão da LV nos centros urbanos do Brasil, dentre eles as limitações na implementação das medidas de controle como: dificuldades operacionais e técnicas na eliminação de reservatórios, falhas na aplicação de medidas contra o vetor e o alto custo de aplicação das medidas de controle (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Estas falhas contribuem para a permanência de reservatórios e vetores nos centros urbanos, o que possibilita a manutenção e a expansão da doença nestas regiões.

Os primeiros casos de LVC no município de Divinópolis foram identificados por nosso grupo em 2003 (dados não publicados), quando foi possível isolar e caracterizar o parasito (*L. infantum*) em cães da sociedade protetora dos animais. Segundo dados da Secretaria Municipal de Saúde, somente em 2007 foi notificado o primeiro caso de LV humana, e no período de 2007 a 2013 mais 15 casos foram registrados. Outro fator determinante para a circulação do parasito no município de

Divinópolis é a presença do principal vetor da forma visceral da doença. Em estudo recente, dezessete espécies de flebotomíneos foram coletadas na zona urbana do município de Divinópolis, o que representa alta riqueza de espécies quando comparado a outras áreas urbanas endêmicas para LV em Minas Gerais. Das 17 espécies coletadas, sete são vetores comprovados ou suspeitos de *Leishmania*, sendo o principal vetor de *L. infantum*, a *Lutzomyia longipalpis*, a espécie mais abundante (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

O surgimento de casos humanos de LV no município de Divinópolis, a distribuição da LVC e a presença do vetor na zona urbana comprovam o processo de urbanização da LV. As dificuldades do município em implementar um programa de controle eficiente, a falta de treinamento dos agentes de saúde, a falta de recursos financeiros, além de outros fatores, tem favorecido a manutenção da doença e o surgimento de novos casos humanos e caninos ano após ano.

Embora ainda seja controverso o significado do impacto da eliminação de cães soropositivos na ocorrência de LV humana, estudos epidemiológicos em centros urbanos concluíram que a LVC geralmente precede a doença humana. Além disso, a infecção canina tem sido apontada como fator primordial em todos os surtos registrados, e não há relato na literatura sobre a ocorrência de casos humanos de LV sem a presença de cães infectados (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Diversos estudos tem reforçado a associação entre a presença de LVC e a ocorrência de casos humanos. CAMARGO-NEVES *et al.* (2001) mostraram que altos índices de casos humanos são observados em áreas de alta prevalência de LVC. OLIVEIRA *et al.* (2001) analisando a distribuição espacial da LV na zona urbana de Belo Horizonte apontou a existência de correlação entre casos de LVC e casos humanos. A presença de cães infectados tem sido apontada como um fator de risco para a infecção humana em área urbana (ARAUJO *et al.*, 2013).

Estudos realizados em outros países também têm destacado a relação entre a LVC e a ocorrência de casos humanos de LV. No Iran o aumento na soropositividade de crianças para leishmaniose foi associado a regiões com maior concentração de cães soropositivos (GAVGANI, *et al.*, 2002). No Uzbequistão a relação entre casos caninos e humanos também foi descrita por KOVALENKO *et al.* (2011). A maioria dos estudos epidemiológicos sustenta a hipótese de que o cão é o

principal reservatório de *Leishmania infantum* no ambiente urbano (GONTIJO & MELO, 2004; BELO *et al.*, 2013).

As ferramentas de geoprocessamento e análise espacial em saúde se tornaram um hábito comum entre os pesquisadores que trabalham com doenças transmissíveis no Brasil, dentre elas as leishmanioses (OLIVEIRA *et al.*, 2001; WERNECK *et al.*, 2002; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006; MESTRE & FONTES, 2007; ARAUJO, *et al.*, 2013; BARBOSA, *et al.*, 2013). A análise espacial permite visualizar as regiões de maior prevalência da doença e auxilia na identificação de fatores de risco associados. Desta forma, as técnicas de análise espacial permitem identificar as áreas prioritárias para o controle e, com base nestas informações, é possível aplicar medidas de vigilância mais direcionadas, reduzindo os custos aplicados no PCLV. Esta redução de custos justifica a aplicação da análise espacial no controle da LV, visto que a falta de recursos financeiros é um dos principais entraves para o desenvolvimento de políticas eficazes relacionadas ao PCLV no Brasil (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008, OTRANTO & DANTAS-TORRES 2013).

Diversos trabalhos tem buscado caracterizar as áreas de ocorrência de LV em zonas urbanas, para que diferentes estratégias de controle sejam aplicadas em áreas de maior ou menor risco de transmissão. Em estudo recente, COSTA *et al.* (2013) descrevem a necessidade de se conhecer dentro das regiões endêmicas as áreas prioritárias para o controle da LV. Os autores afirmam que as medidas de controle podem ser aplicadas de acordo com a prevalência de cães infectados, sendo que nas áreas de maior prevalência canina a retirada de animais assintomáticos deve ser mais eficiente. COURA-VITAL, (2011) observou que a PCR possui maior acurácia que a sorologia na detecção da infecção de animais assintomáticos e que a aplicação desta técnica de biologia molecular em larga escala possibilitaria minimizar o número de cães falsos negativos encontrados na sorologia. .

BARBOSA *et al.* (2013) utilizaram a distribuição espacial de casos humanos e caninos de LV para identificar áreas prioritárias para a implementação de medidas de controle em Terezina, Piauí, e mostraram que as áreas com maior número de cães infectados são de extrema relevância para a implementação de políticas de

vigilância e controle. ARAUJO *et al.* (2013) utilizou a análise espacial agregada a fatores de risco para determinar regiões com risco relativo mais elevado de ocorrência de LV na zona urbana do município de Belo Horizonte, Minas Gérias. Neste mesmo estudo o risco relativo de infecção humana apresentou correlação positiva com o número de cães infectados. Portanto, comprovar a dependência espacial entre a ocorrência de casos caninos e humanos torna-se uma ferramenta útil na avaliação epidemiológica do ciclo de transmissão da *Leishmania infantum*, visto que ao identificar as áreas de maior ocorrência de casos caninos, indiretamente estamos identificando as regiões com maior risco de ocorrência dos casos humanos.

O estudo desenvolvido no município de Divinópolis constatou a dependência espacial entre a ocorrência de casos caninos e humanos de LV, através da função K_{12} de Ripley, sendo a LVC um fator importante para a ocorrência de casos humanos. A distribuição direcional fortalece esta informação, visto que a elipse formada para os casos humanos está incluída dentro da elipse referente aos casos caninos. Assim, com base em estudos anteriores e nos resultados obtidos neste estudo podemos afirmar que a análise da distribuição da LVC pode ser aplicada na identificação das áreas de maior risco para a ocorrência de casos humanos de LV em centros urbanos. Além disso, as ferramentas de análise espacial como densidade de Kernel e distribuição direcional mostraram-se eficazes na determinação de áreas prioritárias. Porém, devemos enfatizar que a eficiência da análise espacial da LVC, como ferramenta de controle da LV humana, aumenta à medida que os métodos de diagnóstico se tornam mais sensíveis, e capazes de identificar todos os animais infectados. Neste contexto a busca por animais assintomáticos seria muito importante, e a aplicação de metodologias de diagnóstico mais sensível auxiliaria na identificação das áreas de maior risco de LV.

Com base nos mapas produzidos, a secretaria de vigilância em saúde de cada município pode direcionar as medidas de controle mais intensas para as áreas de alta densidade de LVC, como a aplicação de inquéritos caninos censitários, ações de combate ao vetor como aplicação de inseticida e programas de manejo ambiental, além de programas de educação em saúde. Nas áreas de menor densidade de cães infectados ou onde a LVC ainda não se instalou as medidas de

Discussão

controle podem ser mais relacionadas à vigilância epidemiológica, como a aplicação de inquéritos caninos amostrais e programas de educação em saúde.

Sendo assim, destacamos a funcionalidade da aplicação da análise espacial como ferramenta no direcionamento dos programas de controle municipais da LV. Mapas de densidade, como Kernel, e a distribuição direcional, quando aplicados sobre a distribuição espacial dos casos de LVC, permitem reconhecer áreas com maior densidade de animais infectados e conseqüentemente com maior risco de surgimento de casos humanos, favorecendo o direcionamento dos programas de controle e permitindo que os recursos financeiros sejam aplicados de maneira mais eficaz.

7 CONCLUSÕES

Considerando o caráter zoonótico das leishmanioses no Novo Mundo a observação de pequenos mamíferos naturalmente infectados por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* confirma a ocorrência do ciclo de transmissão destes parasitos no município de Divinópolis.

A presença de reservatórios domésticos infectados por *L. infantum* e o registro de casos humanos autóctones a partir de 2007 confirma a urbanização da leishmaniose visceral em Divinópolis.

A sobreposição das elipses formadas a partir dos dados de distribuição direcional da LVC e dos casos humanos de LV em uma área densamente habitada do município alerta para o risco de transmissão da *Leishmania infantum*.

A aplicação da Função bivariada K12 de Ripley verificou a dependência espacial positiva entre os casos de LVC e LV humanos na área estudada.

A observação da dependência espacial entre os casos de LVC e LVH sugere que áreas com alta prevalência de cães infectados por *L. infantum* devem ser consideradas prioritárias para a implementação de medidas de controle.

A combinação de diferentes abordagens de análise espacial se mostraram efetivas na identificação de áreas prioritárias para a aplicação de medidas de controle para a LV.

8 ANEXOS

8.1 Anexo 01 - CEPEA CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISAS ENVOLVENDO ANIMAIS PROTOCOLO:35/2010 DATA DE EMISSÃO:13/08/2010



Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais da UFSJ - CEPEA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 35/2010, sobre o projeto intitulado “Mapeamento das leishmanioses no município de Divinópolis”, sob a responsabilidade do Prof. Eduardo Sergio da Silva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal dispostos na Lei Federal nº 11.794, de 08.10.2008, e foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais da UFSJ - CEPEA em reunião no dia 13 de agosto de 2010.

São João del-Rei, 23 de agosto de 2010.

A handwritten signature in blue ink that reads 'Leila de Genova Gaya'.

Prof^ª Dr^ª Leila de Genova Gaya
Presidente da CEPEA

8.2 Anexo 02 - MMA/IBAMA/SISBIO LICENÇA PERMANENTE PARA COLETA DE MATERIAL ZOOLOGICO N.o 12989-1 DATA DE EMISSÃO: 21/11/2007 17:46



Ministério do Meio Ambiente - MMA

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

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 12989-1		Data da Emissão: 21/11/2007 17:46
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2055205	Nome: Adriano Pereira Paglia	CPF: 893.843.266-15
Nome da Instituição: CONSERVATION INTERNACIONAL DO BRASIL		CNPJ: 38.737.938/0001-61

Observações, ressalvas e condicionantes

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

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ORDEM	Didelphimorphia, Rodentia, Lagomorpha
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFMG - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	coleção

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

Código de autenticação: 31875873



Página 1/2

8.3 Anexo 03 - TABELA DE NÚMEROS ALEATÓRIOS MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Tabelas para sorteio de números aleatórios

03 47 43 73 86	36 96 47 36 61	46 98 63 71 62	33 26 16 80 45	60 11 14 10 95
97 74 24 67 62	42 81 14 57 20	42 53 32 37 32	27 07 36 07 51	24 51 79 89 73
16 76 62 27 66	56 50 26 71 07	32 90 79 78 53	13 55 38 58 59	88 97 54 14 10
12 56 85 99 26	96 96 68 27 31	05 03 72 93 15	57 12 10 14 21	88 26 49 81 76
55 59 56 35 64	38 54 82 46 22	31 62 43 09 90	06 18 44 32 53	23 83 01 30 30
16 22 77 94 39	49 54 43 54 82	17 37 93 23 78	87 35 20 96 43	84 26 34 91 64
84 42 17 53 31	57 24 55 06 88	77 04 74 47 67	21 76 33 50 25	83 92 12 06 76
63 01 63 78 59	16 95 55 67 19	98 10 50 71 75	12 86 73 58 07	44 39 52 38 79
33 21 12 34 29	78 64 56 07 82	52 42 07 44 38	15 51 00 13 42	99 66 02 79 54
57 60 86 32 44	49 17 46 09 62	49 17 46 09 62	90 52 84 77 27	08 02 73 43 28
18 18 07 92 46	44 17 16 58 09	79 83 86 19 62	06 76 50 03 10	55 23 64 05 05
26 62 38 97 75	84 16 07 44 99	83 11 46 32 24	20 14 85 88 45	10 93 72 88 71
23 42 40 64 74	82 97 77 77 81	07 45 32 14 08	32 98 94 07 72	93 85 79 10 75
52 36 28 19 95	50 92 26 11 97	00 56 76 31 38	80 22 02 53 53	83 60 42 04 53
37 85 94 35 12	83 39 50 08 30	42 34 07 96 88	54 42 06 87 98	35 85 29 48 39
70 29 17 12 13	40 33 20 38 26	13 89 51 03 74	17 76 37 13 04	07 74 21 19 30
56 62 18 37 35	96 83 50 87 75	97 12 25 93 47	70 33 24 03 54	97 77 46 44 80
99 49 57 22 77	88 42 95 45 72	16 64 36 16 00	04 43 18 66 79	94 77 24 21 90
16 08 15 04 72	33 27 14 34 09	45 59 34 68 49	12 72 07 34 45	99 27 72 95 14
31 16 93 32 43	50 27 89 87 19	20 15 37 00 49	52 85 66 60 44	38 68 88 11 80
68 34 30 13 70	55 74 30 77 40	44 22 78 84 26	04 33 46 09 52	68 07 97 06 57
74 57 25 65 76	59 29 97 68 60	71 91 38 67 54	13 58 18 24 76	15 54 55 95 52
27 42 37 86 53	48 55 90 65 72	96 57 69 36 10	96 46 92 42 45	97 60 49 04 91
00 39 68 29 61	66 37 32 20 30	77 84 57 03 29	10 45 65 04 26	11 04 96 67 24
29 94 98 94 24	68 49 69 10 82	53 75 91 93 30	34 25 20 57 27	40 48 73 51 92
16 90 82 66 59	83 62 64 11 12	67 19 00 71 74	60 47 21 29 68	02 02 37 03 31
11 27 94 75 06	06 09 19 74 66	02 94 37 34 02	76 70 90 30 86	38 45 94 30 38
35 24 10 16 20	33 32 51 26 38	79 78 45 04 91	16 92 53 56 16	02 75 50 95 98
38 23 16 86 38	42 38 97 01 50	87 75 66 81 41	40 01 74 91 62	48 51 84 08 32
31 96 25 91 47	96 44 33 49 13	34 86 82 53 91	00 52 43 48 85	27 55 26 89 62
66 67 40 67 14	64 05 71 95 86	11 05 65 09 68	76 83 20 37 90	57 16 00 11 66
14 90 84 45 11	75 73 88 05 90	52 27 41 14 86	22 98 12 22 08	07 52 74 95 80
68 05 51 18 00	33 96 02 75 19	07 60 62 93 55	59 33 82 43 90	49 37 38 44 59
20 46 78 73 90	97 51 40 14 02	04 02 33 31 08	39 54 16 49 36	47 95 93 13 30
64 19 58 97 79	15 06 15 93 20	01 90 10 75 06	40 78 78 89 62	02 67 74 17 33
05 26 93 70 60	22 35 85 15 13	92 03 51 59 77	59 56 78 06 83	52 91 05 70 74
07 97 10 88 23	09 98 42 99 64	61 71 62 99 15	06 51 29 16 93	58 05 77 09 51
68 71 86 85 85	54 87 66 47 54	73 32 08 11 12	44 95 92 63 16	29 56 24 29 48
26 99 61 65 53	58 37 78 80 70	42 10 50 67 42	32 17 55 85 74	94 44 67 16 94
14 65 52 68 75	87 59 36 22 41	26 78 63 06 55	13 08 27 01 50	15 29 39 39 43
17 53 77 58 71	71 41 61 50 72	12 41 94 96 26	44 95 27 36 99	02 96 74 30 83
90 26 59 21 19	23 52 23 33 12	96 93 02 18 39	07 02 18 36 07	25 99 32 70 23
41 23 52 55 99	31 04 49 69 96	10 47 48 45 88	13 41 43 89 20	97 17 14 49 17
60 20 50 81 69	31 99 73 68 68	35 81 33 03 76	24 30 12 48 60	18 99 10 72 34
91 25 38 05 90	94 58 28 41 36	45 37 59 03 09	90 35 57 29 12	82 62 54 65 60
34 50 57 74 37	98 80 33 00 91	09 77 93 19 82	74 94 80 04 04	45 07 31 66 49
85 22 04 39 43	73 81 53 94 79	33 62 46 86 28	08 31 54 46 31	53 94 13 38 47
09 79 13 77 48	73 82 97 22 21	05 03 27 24 83	72 89 44 05 60	35 80 39 94 88
88 75 80 18 14	22 95 75 42 49	39 32 82 22 49	02 48 07 70 37	16 04 61 67 87
90 96 23 70 00	39 00 03 06 90	55 85 78 38 36	94 37 30 69 32	90 89 00 76 33

8.4 Anexo 04 - ARTIGO PUBLICADO: RAFAEL G TEIXEIRA-NETO, EDUARDO S SILVA, RENATA A NASCIMENTO, CLÁUDIA L OLIVEIRA, VINÍCIUS S BELO, LETÍCIA C PINHEIRO AND CÉLIA MF GONTIJO. CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN NA URBAN SETTING OF SOUTHEASTERN BRAZIL: AN ECOLOGICAL STUDY INVOLVING SPATIAL ANALYSIS. *PARASITES & VECTORS*.7:485, 2014.

RESEARCH

Open Access

Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis

Rafael Gonçalves Teixeira-Neto^{1,2*}, Eduardo Sérgio da Silva², Renata Aparecida Nascimento², Vinícius Silva Belo^{3,4}, Cláudia di Lorenzo de Oliveira², Letícia Cavalari Pinheiro¹ and Célia Maria Ferreira Gontijo¹

Abstract

Background: The physical characteristics of the environment influence the composition, distribution and behavior of the vectors and mammalian hosts involved in the transmission of visceral leishmaniasis (VL), thereby affecting the epidemiology of the disease. In Brazil, urbanization of human VL is a recent phenomenon and represents an issue of particular concern to local health authorities. The present study aimed to establish the degree of spatial dependency between canine and human VL in the municipality of Divinópolis, Minas Gerais, Brazil, and to identify priority risk areas in which stricter control measures should be implemented.

Methods: The selected canine population comprised 3,652 dogs distributed within 11 strata and 1,247 urban blocks. Serum samples were collected between March 2013 and February 2014. Serodiagnosis of dogs was performed using the enzyme-linked immunosorbent assay and the indirect fluorescent-antibody test. The blocks sampled for canine VL and the addresses of the 16 confirmed cases of human VL notified in Divinópolis during the period 2007–2013 were georeferenced. Spatial analysis of the data was performed using Kernel density estimation, Ripley's bivariate K-function and directional distribution methods.

Results: The overall prevalence of seropositive animals was 4.63% (range 3.95 - 5.31) ($n = 169$) and varied in different strata between 0.9 (range 0.0 - 1.91) and 8.73% (range 5.65 - 11.81). A positive spatial dependency was detected between human and canine VL in which the occurrence of human cases of the disease tended to concentrate in locations that were close to areas with a higher incidence of canine VL. The priority risk area could be clearly distinguished from Kernel density estimation and standard deviational ellipse plots in which the human VL ellipse was totally enclosed within the canine VL ellipse.

Conclusions: The results presented herein will enable the Municipal Health Office of Divinópolis to devise a more effective management plan for human VL in which specific strategies would be applied to areas presenting different levels of risk. This spatial evaluation of leishmaniasis model could be applied in other urban areas of Brazil.

Keywords: Visceral leishmaniasis, Epidemiology, Spatial analysis, Statistical tools, Disease control

* Correspondence: rafaelgtn@hotmail.com

¹Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Avenida Augusto de Lima 1715, Barro Preto, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil

²Universidade Federal de São João del Rei, Campus Dona Lindu, Av. Sebastião Gonçalves Coelho 400, Chanadour, Chanadour, 35501-296 Divinópolis, MG, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Teixeira-Neto et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Visceral leishmaniasis (VL) is a severe infectious disease that can result in death if not diagnosed and treated in a timely manner. It is estimated that, on a worldwide basis, more than 500,000 new cases of VL occur every year resulting in 51,000 VL-related deaths [1,2]. Although the disease is endemic in 87 countries, 66 of which are located in Africa, Asia and Europe and 21 in the Americas, the vast majority (~90%) of notified cases occur in Bangladesh, Brazil, Ethiopia, India, South Sudan, and Sudan [3].

Historically, VL was characterized in Brazil as a rural endemic [4], but during the early 1980s the disease suffered an epidemiological transformation by spreading to urban areas of the country. Moreover, reports of the occurrence of VL in large urban centers have become increasingly more frequent as shown by studies conducted in the southeastern metropolitan areas of São Paulo [5], Rio de Janeiro [6] and Belo Horizonte [7,8], as well as in the northeastern capitals of Terezina [9], São Luis [10,11] and Fortaleza [12].

The factors responsible for the urbanization of VL in Brazil have received considerable attention, particularly those relating to environmental changes promoted by the rural exodus, the lack of planning and sanitation in urban areas, the adaptation of the main insect vector to urban settings, and the presence of domestic reservoirs of the disease [13-16]. Considering such factors, it is clear that the success of disease control programs will depend on the development of tools that will assist in defining strategies for epidemiological surveillance that target local realities and in facilitating the implementation of appropriate actions.

In 1984, the Brazilian Ministry of Health created a Program for the Monitoring and Control of Visceral Leishmaniasis (*Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*; PVCLV), the objectives of which were to diminish the level of morbidity and the rate of mortality associated with VL and to reduce the risks of disease transmission. Management strategies were aimed at the diagnosis and treatment of human cases of VL as early as possible, the control of the vector population (i.e. phlebotomine sandflies), and the elimination of domestic canine reservoirs [17]. Unfortunately, these strategies have not led to a reduction in the number of cases in endemic areas nor have they impeded the emergence of VL at focal points in disease-free areas [18].

Spatial analysis in health is a field of science concerned with understanding the geographical patterns of morbidity and mortality relating to an infectious disease, and the association of these patterns with the characteristics or risk factors responsible for its dissemination. The technique has been widely employed in the study of leishmaniasis and has permitted detailed analyses of the

spatial dependency between canine and human VL, the distribution of the vector, and the characterization of areas with high incidence and high risk of morbidity [7,18-27].

The aim of the present study was to perform a spatial analysis of canine VL in the municipality of Divinópolis, state of Minas Gerais, Brazil, in order to establish the spatial dependency between the occurrence of canine and human VL and to identify priority areas for implementing stricter surveillance and control actions.

Methods

Details of the project were approved by the Ethical Committee in Research of the Universidade Federal de São João Del Rey (UFSJ; protocol number 35/2010), and all procedures were conducted in accordance with the guidelines of the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Study site

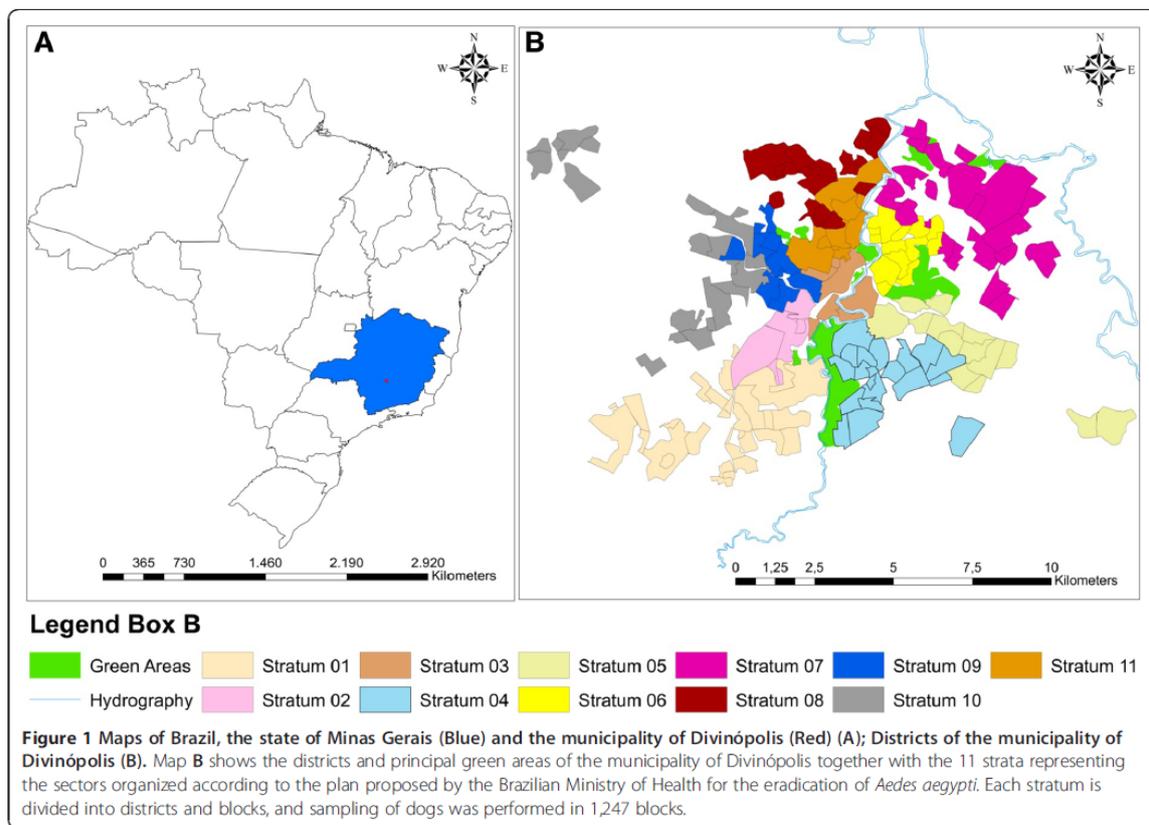
Divinópolis (20.13889 S; 44.88389 W) is located in the Vale do Itapecerica (state of Minas Gerais) and is home to one of the main centers of the metallurgical industry in the region (Figure 1). The population comprises some 216,000 inhabitants [28]. According to the Municipal Health Surveillance Service, Divinópolis is classified as endemic for cutaneous leishmaniasis and 46 human cases have been notified between 2007 and 2013. Although the first case of human VL was recorded in the area in 2007, with a further 15 new cases notified between 2008 and 2013, no investigation has been carried out concerning the prevalence of canine VL and its relation to the distribution of human leishmaniasis.

Dog population evaluated

The criteria for including dogs in the serological survey for LCan were that they were domestic animals with owners and that they had been accustomed to living at home. Stray dogs were not included in the study due to their greater rate of movement and the consequent interference in spatial data analysis.

Epidemiological survey of canine VL

The survey employed proportional stratified cluster sampling in which the strata were the sectors of the Plan for the Eradication of *Aedes aegypti* (*Plano de Erradicação do Aedes aegypti*; PEAA) and the clusters were the blocks located within each district. We chose to use the stratification system based on PEAA because it is recommended by Brazilian Ministry of Health [17] for efforts to control LV. The use of this method can facilitate consistent sampling among municipalities, however, regions that do not have a stratification system based on PEAA, may apply other stratification methods. Pursuant to



the PEAA, the council of Divinópolis has stratified the municipality according to the density of the human population by defining 11 strata each with approximately 17,000 inhabitants (Figure 1). Each stratum is subdivided into districts, and these are further segregated into blocks, delimited by streets, with an approximate size of 10,000 to 15,000 m².

In order to estimate the dog population in the city we used data from the latest rabies vaccination campaign. With this information it was possible to estimate the relationship between human and canine populations. Assuming that the geographical distribution of the population of domestic dogs correlates with the distribution of the human population and to ensure the proportional representation of all districts of Divinópolis, the number of dogs tested in each district was directly proportional to the size of the human population in that district. Thus, if the human population of a given district comprised 10% of the total population of the stratum, the canine sample size of the district was taken as 10% of the total number of dogs in the stratum.

In order to calculate the sample size, a table describing the number of animals to be sampled according to the estimated canine population of the district and the expected

prevalence of canine VL, considering a level of significance of 5%, was employed [17]. The prevalence of canine VL was set at 3% on the basis of a preliminary study performed by our research group in one restricted area of the municipality. According to the above, the total sample population required was determined to be 3,652 dogs representing 332 animals for each of the 11 strata. The selection of blocks for canine sampling was determined with the help of a random number table, with the number of blocks drawn being based on the total number of dogs to be sampled in each district while maintaining proportional representation in relation to the stratum. The number of dogs to be sampled in each block was calculated by dividing the total number of dogs in the district by the total number of blocks in the same district. In this manner, proper distribution of the sample was maintained by eliminating the possibility of sampling too many animals in a single block.

Serodiagnosis of canine VL

Blood samples were collected from animals, transferred to filter papers and stored in the freezer at -20°C until required for analysis. Following the introduction of The Brazilian Ministry of Health Guidelines that were effective

until 2013, diagnosis of infection was performed through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and confirmation of seropositivity was achieved by indirect fluorescent-antibody test (IFAT) using the respective EIE-LVC and IFI-LVC serological kits (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil) according to the instructions provided by the manufacturer. Serum samples were collected between March 2013 and February 2014. The assays were carried out in the Laboratory of Parasitology at UFSJ, which is accredited by the Brazilian Ministry of Health for the performance of such tests.

Georeferencing

All blocks in which dogs had been sampled, together with the addresses of the VL patients notified during the period 2007–2013, were georeferenced using a Garmin GPSMAP 76S (Olathe, KS, USA) hand-held global positioning unit. We included all human cases of visceral leishmaniasis that had a diagnosis confirmed by a laboratory certified by the Brazilian Ministry of Health and that were reported by the municipal health department between the years 2007 and 2013. The geographic coordinates were recorded at the centers of the blocks, the positions of which were ascertained by reference to Google Earth® (Mountain View, CA, USA). Data were stored in a database created especially for the study and plotted on the map of Divinópolis. Mapping and spatial analyses of the data were performed using ESRI ArcGIS™ version 10.0 (Redlands, CA, USA) and R version 3.0.2 (R Development Core Team, Wirtschaftsuniversität Wien, Vienna, Austria) software with the aim of identifying VL distribution patterns.

Ripley's bivariate K-function analysis

The dependency between cases of canine and human VL was determined using Ripley's K12-cross function, which indicated whether the point patterns within a study area were either independent of one another, or exhibited attraction (the two types of events tended to occur close together), or exhibited repulsion (the two types of events tended to occur far apart) [29]. Ripley's K12-function was defined as:

$$K(d) = \frac{1}{\lambda_2} E(N_{2d})$$

where, $E(N_{2d})$ is the expected number of type 2 events within a distance of up to d of an arbitrary type 1 event, and λ_2 is the total density of type 2 events in the study area.

Ripley's K12-functions were plotted using R software version 3.0.2, and envelopes of bivariate functions were constructed from random toroidal shifts in order to detect

patterns of spatial association between the two types of point patterns. If the curve is inside the envelope the two point patterns are spatially independent, otherwise they are spatially dependent. In the case of spatial dependency, the relationship may be positive (when the curve is above the upper line of the envelope) or negative (when the curve is below the lower line of the envelope).

Kernel image segmentation

Kernel density estimation is a clustering technique that has been applied to image segmentation in order to produce hotspot maps showing spatial trend patterns of an infectious disease [30]. In this study, each observation was weighted according to its distance from a central value (nucleus), thereby creating a continuous surface representing the density of VL in which hotspots (clusters) were highlighted. The search radius was fixed at 300 m, and the corresponding density map was plotted using ESRI ArcGIS™ version 10.0 software.

Directional distribution of human and canine VL

The standard deviational ellipse method was used to summarize the spatial characteristics of VL clusters in terms of central tendency, dispersion and directional trends. Ellipses, which were plotted using ESRI ArcGIS™ version 10.0 software, marked areas with higher concentrations of infection and provided information about the asymmetry and distribution of the data. The long axis of each ellipse defined the direction of maximum dispersion, whereas the short axis (perpendicular to the long axis) revealed the direction of minimum dispersion.

Results

A total of 1,247 blocks in the municipality of Divinópolis were sampled and their geographical coordinates are represented as red and green dots on the map presented in Figure 2. Of the 3,652 dogs surveyed within these blocks, 169 were seropositive for VL presenting an overall prevalence of 4.63% (range 3.95 - 5.31%). The addresses of the 16 confirmed cases of human VL notified during the period 2007–2013 were also georeferenced and are represented as yellow stars on the map shown in Figure 2.

The Ripley's K12-function plot depicted in Figure 3 indicates a positive spatial dependency between human and canine VL in which the occurrence of human cases of the disease in Divinópolis tended to concentrate in locations that were close to areas with a higher incidence of canine VL. Analysis of the Kernel density map (Figure 4) revealed that canine VL was widely distributed in the municipality with seropositive dogs identified in all 11 strata. However, the prevalence of the disease varied considerably, ranging from 0.9% (range 0.0 - 1.91%) in stratum 2 to 8.73% (range 5.65 - 11.81%) in stratum 7 (Table 1). Priority areas for the implementation of stricter measures to

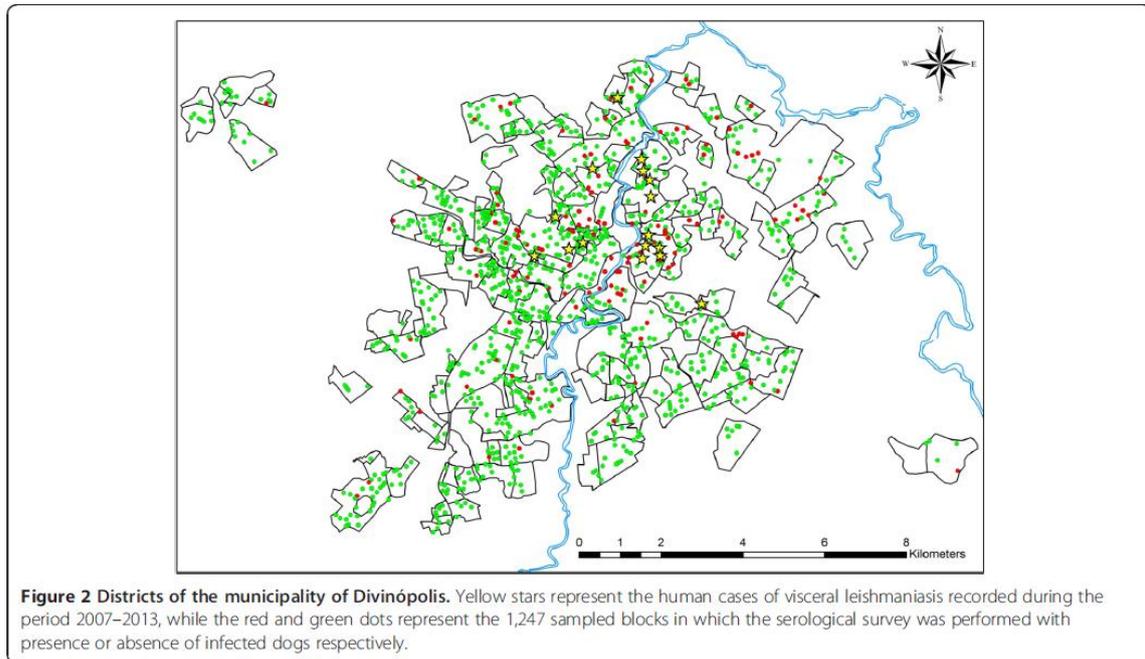


Figure 2 Districts of the municipality of Divinópolis. Yellow stars represent the human cases of visceral leishmaniasis recorded during the period 2007–2013, while the red and green dots represent the 1,247 sampled blocks in which the serological survey was performed with presence or absence of infected dogs respectively.

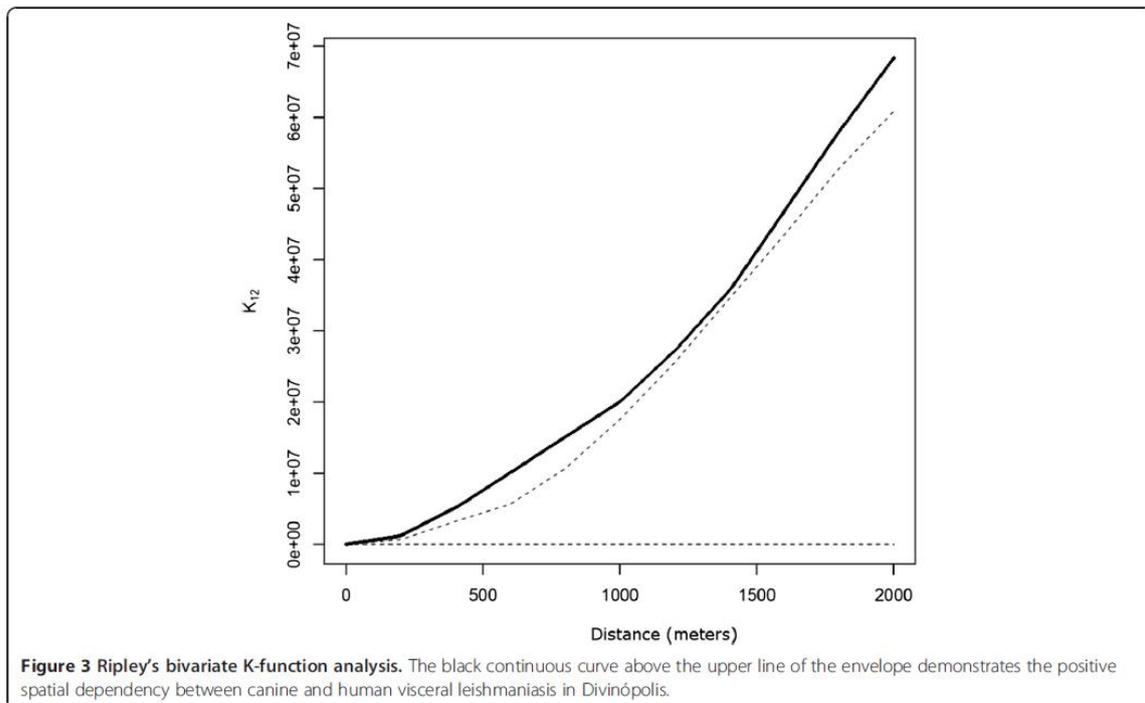
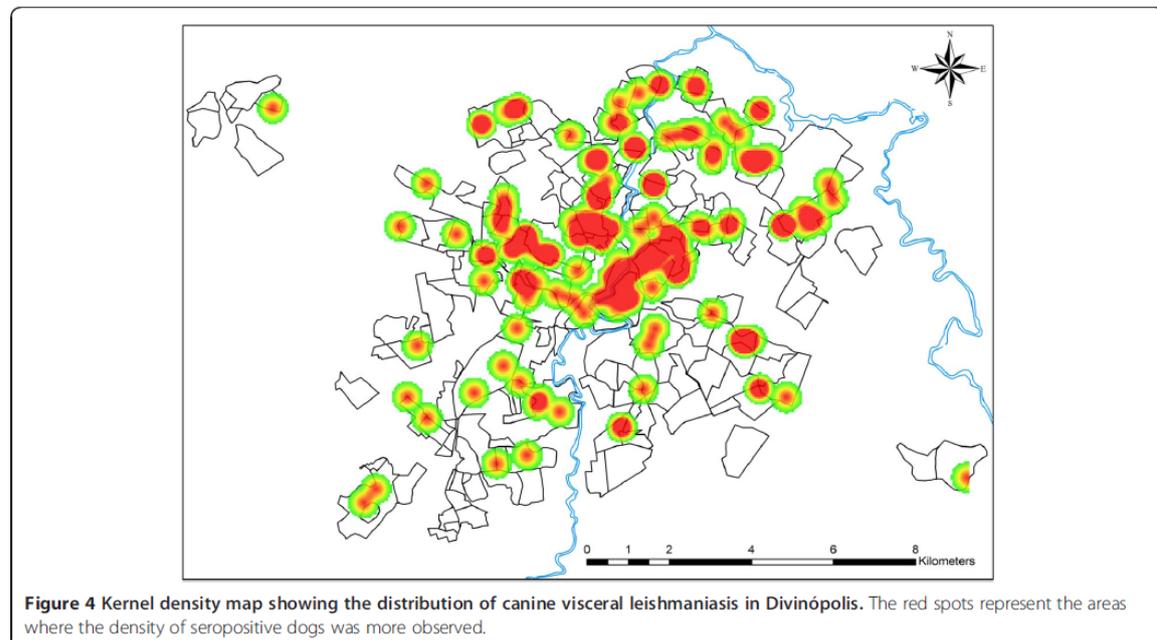


Figure 3 Ripley's bivariate K-function analysis. The black continuous curve above the upper line of the envelope demonstrates the positive spatial dependency between canine and human visceral leishmaniasis in Divinópolis.



control VL could be clearly identified from the directional distribution of canine cases revealed in the standard deviational ellipse plots of human and canine VL (Figure 5). It is noteworthy that the human VL ellipse was included inside the much larger canine VL ellipse.

Table 1 Distribution and seroprevalence of canine visceral leishmaniasis in Divinópolis, Brazil, between March 2013 to February 2014

Stratum ^a	Sampled dogs (n)	Seropositive dogs (n)	Prevalence of canine VL (%) ^b
01	332	10	3.01 (1.14 - 4.88)
02	332	3	0.90 (0.0 - 1.91)
03	332	16	4.82 (2.48 - 7.16)
04	332	6	1.81 (0.35 - 3.27)
05	332	11	3.31 (1.36 - 5.26)
06	332	28	8.43 (5.4 - 11.46)
07	332	29	8.73 (5.65 - 11.81)
08	332	16	4.82 (2.48 - 7.16)
09	332	18	5.42 (2.95 - 7.89)
10	332	6	1.81 (0.35 - 3.27)
11	332	26	7.83 (4.90 - 10.76)
Total	3,652	169	4.63 (3.95 - 5.31)

^aDivinópolis is divided into 11 strata representing the sectors organized according to the plan proposed by the Brazilian Ministry of Health for eradication of *Aedes aegypti*. Each stratum is subdivided into districts and each district is subdivided into blocks as represented in Figure 2.

^b95% confidence interval shown in brackets.

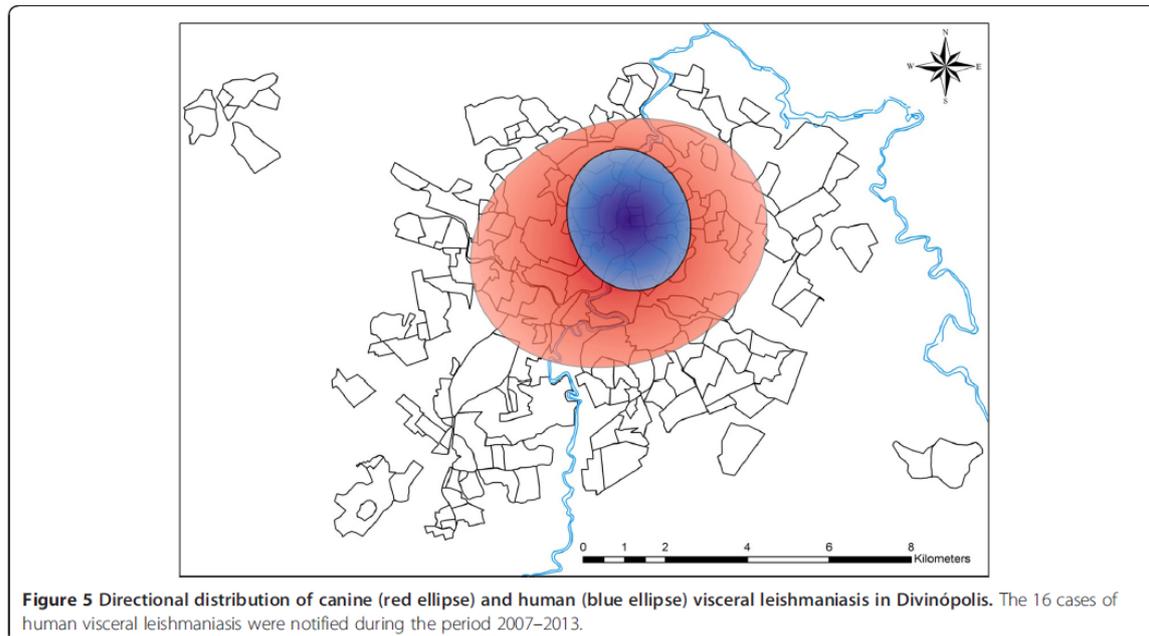
Discussion

While human VL is a serious public health problem throughout Brazil, the continued spread of the disease within urban areas represents a particular cause for concern [7-12]. Moreover, despite the efforts of the Brazilian health authorities, human VL continues to expand [31], indicating the ineffectiveness of the PVCLV.

The urbanization of VL is not a phenomenon exclusive to Brazil, however, since it has been described in other countries including Iran [32], Mexico [33] and Morocco [34]. A number of factors are believed to be responsible for the urbanization of the disease and these include operational and technical difficulties in eliminating the potential reservoirs, failure in controlling the propagation of the vector, and the high cost of control measures [35]. These failures contribute to the persistence of reservoirs and vectors in urban centers, a situation that not only sustains the disease cycle but also contributes to its expansion into disease-free areas.

In Brazil, epidemiologists are of the opinion that a key issue responsible for the failure of PVCLV is the difficulty of allocating municipal financial resources to the program [36]. Considering this shortfall in funding, it is clearly of fundamental importance to adjust control policies and actions to the specific realities of the areas concerned [8,17].

In Divinópolis, the first cases of canine VL were identified by our research group in 2003, at which time it was possible to isolate and characterize the parasite *Leishmania infantum* in dogs originating from the local society for the



protection of animals (unpublished data). Four years elapsed until the first notification of human VL in 2007 by the Municipal Health Surveillance Service of Divinópolis, and this has been followed by 15 additional cases in subsequent years (2008–2013).

Epidemiological studies carried out in various urban areas have concluded that canine VL generally precedes human VL. Moreover, canine VL is considered the primary cause of all registered outbreaks since there are no reports of the occurrence of human VL in the absence of infected dogs [35]. The association between canine and human VL was suggested in studies conducted more than 10 years ago. Thus, Camargo-Neves *et al.* [36] showed that a high incidence of human VL occurred in areas where canine VL was more prevalent, while Oliveira *et al.* [7] reported that the spatial distribution of VL in Belo Horizonte suggested a correlation between the two forms of the disease. More recently, the presence of *Leishmania*-infected dogs was considered a risk factor for human VL in urbanized environments [24]. In addition, some epidemiological studies support the hypothesis that dogs are the main reservoir of *L. infantum* in the urban environment [13,37]. It is of interest to note that the association between human VL and infected dogs has also been reported by researchers from countries such as Iran [38] and Uzbekistan [39].

A determining factor in the dissemination of VL in Divinópolis is the presence of the principal vector of *L. infantum*, namely, the phlebotomine sandfly. More than 17 species of the subfamily Phlebotominae have

been collected in the urban area of Divinópolis, demonstrating the existence of higher species richness in comparison with other towns in Minas Gerais endemic for VL. Seven of the 17 phlebotomine species identified in Divinópolis were confirmed or suspected vectors of *Leishmania spp.*, among which *Lutzomyia longipalpis* was the most abundant [40]. The rapid dissemination of VL among the canine population and the emergence of the disease among humans of Divinópolis results from the presence of the agents of disease transmission and *Leishmania*-harboring reservoirs (dogs), and the inability of PVCLV to break the transmission cycle.

Geographic information systems and spatial analysis of infectious diseases have become common tools and are used widely by Brazilian researchers working in the field of leishmaniasis [7,18,19,22,24–27]. Spatial analysis allows the visualization of regions with the highest prevalence of the disease and assists in the identification of associated risk factors and in the design of appropriate management strategies. Moreover, knowledge of the geographical context increases the ability to predict disease patterns and to identify target areas likely to be at the highest risk, thereby reducing the overall costs of control programs. Cutting costs is essential for the success of PVCLV since the program places a heavy financial burden on the municipal public health system [14,41]. Real and Biek [42] have emphasized the need to recognize the spatial heterogeneities that exist in different urban settings since the physical attributes of the environment may modulate the genetic structure and the spatial dynamics of host–pathogen

interactions. In the case of VL, there has been much concern about the importance of characterizing different cities with the purpose of proposing specific strategies for low- and high-risk areas. Thus, Costa *et al.* [43] have emphasized the need to identify priority risk areas within an endemic region and to apply control measures according to the prevalence of infected dogs. These authors state that the removal of asymptomatic seropositive animals should be intensified in areas with greater prevalence of canine VL even though the strategy of euthanasia remains somewhat controversial. Following spatial analysis of human and canine VL in São Luis, Barbosa *et al.* [25] were able to establish priority risk areas and suggested that those with a higher density of infected dogs should be preferentially targeted. Araujo *et al.* [24] performed spatial analysis in some districts of Belo Horizonte and identified the areas with the highest risk of VL together with their associated risk factors. According to these authors, the relative risk of human VL was positively correlated with the density of infected dogs.

Some limitations of the study should be mentioned: i) not evaluating stray animals may result in an underestimation of the prevalence of canine infection. According to a recent review, stray animals are at a higher risk of being infected than are domestic animals [37]; ii) we did not use spatial analysis techniques that evaluate the interpolation of data and that provide relevant information about the animals that live in non-sampled regions. Considering that local digital databases have limitations that hinder the application of more sophisticated methods of spatial analysis, we chose to use tools that are easy to implement and interpret, even by professionals not accustomed to statistical spatial analysis.

The spatial distribution of VL may not be stable, so it is important to understand the epidemiological realities of each region in order to develop more effective control measures. In spite of local peculiarities, the presence of infected dogs is considered by many researchers to be one of the major risk factors associated with human VL [13-15] and among the epidemiological variables that favor the spread of the disease the presence of domestic dogs is the most stable. We should clarify that the use of this method for defining risk areas provides an initial assessment of the distribution of the disease in an urban center and it should be followed-up with additional research. Other spatial analysis techniques that evaluate the interpolation of data, as well as studies involving stray animals and the presence of wild and synanthropic vectors and reservoirs, should also be implemented. With the addition of such studies a more realistic epidemiological assessment and documentation of the dispersion of the disease can be made.

Perhaps the techniques applied in this study (Kernel image segmentation, Ripley's K12 function and directional

distribution analysis) were efficient in determining not only the positive dependency between canine and human VL in Divinópolis but also the potential highest priority risk area. This area could be clearly distinguished from standard deviational ellipse plots in which the human VL ellipse was totally enclosed within the canine VL ellipse. However, it is necessary to keep in mind that we mapped only symptomatic human cases, and as such they may not reflect the actual spatial distribution of all human cases of VL. In order to better identify risk areas asymptomatic human cases need to be included as well before a more accurate assessment of the spatial distribution of human VL can be achieved. These techniques can be readily applied to other urban settings.

Conclusions

The results presented herein can assist the Municipal Health Office (Secretaria Municipal de Saúde) of Divinópolis to devise an appropriate disease management plan whereby specific strategies would be applied to different risk areas. The identification of risk areas based on the distribution of infected domestic dogs may serve as a directional study in that it allows the evaluation of the most efficient way to apply other epidemiological assessment strategies. Studies of the distribution of CanL should be developed continuously and include the spatial distribution of vectors, wild and synanthropic reservoirs, and stray dogs in order to contribute to a more complete understanding of the mechanisms of spatial dispersion of LV in large urban centers.

In conclusion, the PVCLV should use a risk management approach since the control and prevention of VL depends entirely on disrupting the transmission cycle of *L. infantum*. Thus, mapping high and low risk areas in urban settings is crucial to the success of such programs in large urban centers in Brazil.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

RGTN designed and supervised the study, collected the data and drafted the paper; RAN, LCP, VSB and CLO performed the statistical analyses and revised the manuscript; ESS and CMFG designed and supervised the study and revised the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; Grant no. APQ-00371-10 & CBB 39/12) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Grant no. 478672/2010-1) for financial support to the study. We are also grateful to the Secretaria de Saúde do Município de Divinópolis for assistance and logistic support and to the Municipal Director Plan by the database maps.

Author details

¹Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Avenida Augusto de Lima 1715, Barro Preto, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil. ²Universidade Federal de São João del Rei, Campus Dona Lindu, Av. Sebastião Gonçalves Coelho 400, Chanadour, Chanadour, 35501-296 Divinópolis, MG, Brazil.

³Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, Rua Leopoldo Bulhões 1480, Manguinhos, 21041-210 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁴Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, Rua Israel Pinheiro 2000, 35020-220 Governador Valadares, MG, Brazil.

Received: 2 June 2014 Accepted: 8 October 2014

Published online: 20 October 2014

References

- Desjeux P: **Leishmaniasis: current situation and new perspectives.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004, **27**:305–318.
- World Health Organization: **Data Needed On People Infected With Visceral Leishmaniasis: Call For Expansion Of Working Database.** 2011. <http://www.who.int/tdr/news/2011/vl-working-database/en/index.html>.
- World Health Organization: **Leishmaniasis Fact sheet N°375.** 2014. [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>]
- Deane LM, Deane MP: **Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1962, **4**:198–212.
- Iverson LB, Pires SRBR, Ribeiro MA: **Investigação epidemiológica de um novo caso de leishmaniose visceral ocorrido na grande São Paulo, Brasil.** *Rev Saude Publica* 1882, **16**:205–219.
- Marzochi MCA, Coutinho SG, De Souza WJ, De Toledo LM: **Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical, parasitological, therapeutic and epidemiological findings (1977–1983).** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1985, **80**:349–357.
- Oliveira CL, Assunção RM, Reis IA: **Spacial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994–1997.** *Cad Saude Publica* 2001, **7**:1231–1239.
- Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fluza VOP, Brazil RP: **Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001, **93**:285–291.
- Costa CH, Pereira HF, Araujo MV: **Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980–1986.** *Rev Saude Publica* 1990, **24**:361–372.
- Nascimento MD, Costa JM, Fiori Bt: **The epidemiological determinant aspects in the maintenance of visceral leishmaniasis in the state of Maranhão, Brazil.** *Rev Soc Bras Med Trop* 1996, **29**:233–240.
- Mendes WS, Da Silva AAM, Trovão JJ: **Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis, Maranhão, Brasil.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2002, **35**:227–231.
- Alves AL, Bevilacqua CML, Moraes NB, Franco SO: **Levantamento epidemiológico da leishmaniose visceral em cães vadios da cidade de Fortaleza, Ceará.** *Ciência Anim* 1998, **8**:63–68.
- Gontijo CMF, Melo MN: **Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas.** *Rev Bras Epidemiol* 2004, **7**:338–347.
- Maia-Elkhoury ANS, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA: **Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges.** *Cad Saude Publica* 2008, **24**:2941–2947.
- Werneck GL: **Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil.** *Cad Saude Publica* 2010, **26**:644–645.
- Carreira JCA, da Silva AVM, Pereira DP, Brazil RP: **Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil.** *Parasit Vectors* 2012, **5**:111.
- Ministério da Saúde: **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.** Secretaria de Vigilância em Saúde: Brasília; 2006.
- Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP: **Expansão Geográfica da Leishmaniose Visceral no Estado de Pernambuco.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2006, **39**:352–356.
- Werneck GL, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH: **The urban spread of visceral leishmaniasis: clues from spatial analysis.** *Epidemiology* 2002, **13**:364–367.
- Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbo M, Gripp AH, Pessanha JE, Dias ES: **Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006, **101**:31–38.
- Antonialli SAC, Torres TG, Filho ACP, Tolezano JE: **Spatial analysis of American visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, central Brazil.** *J Infection* 2007, **54**:509–514.
- Mestre GLC, Fontes CJF: **A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso, 1998–2005.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2007, **40**:42–48.
- Saraiva L, Andrade-Filho JD, Falcão AL, Carvalho DAA, Souza CM, Freitas CR, Lopes CRG, Moreno EC, Melo MN: **Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: Characterization of favored locations determined by spatial analysis.** *Acta Trop* 2013, **117**:137–145.
- Araujo VEM, Pinheiro LC, Almeida MCM, Menezes FC, Morais MHF, Reis IA, Assunção RM, Carneiro M: **Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area.** *PLoS Negl Trop Dis* 2013, **7**:e2540.
- Barbosa DS, Belo VS, Rangel MES, Werneck GL: **Spatial analysis for identification of priority areas for surveillance and control in a visceral leishmaniasis endemic area in Brazil.** *Acta Trop* 2014, **131**:56–62.
- Casariil AE, Monaco NZN, Oliveira EF, Eguchi GU, Filho ACP, Pereira LE, Oshiro ET, Galati EAB, Mateus NLF, Oliveira AG: **Spatiotemporal analysis of sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in an endemic area of visceral leishmaniasis at Pantanal, central South America.** *Parasit Vectors* 2014, **7**:364.
- Andrade ARO, da Silva BAK, Cristaldo G, Andrade SMO, Filho ACP, Ribeiro A, Santos MFC, Andreotti R: **Spatial distribution and environmental factors associated to phlebotomine fauna in a border area of transmission of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil.** *Parasit Vectors* 2014, **7**:260.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: **Cidades.** 2013. <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=312230>.
- Lotwick HW, Silverman BW: **Methods for analyzing spatial processes of several types of points.** *J R Stat Soc* 1982, **44**:406–413.
- Teekayuwat T, Pfeiffer DU, Hayes DP: **Spatial Clustering Of Enzotic Bovine Leucosis In New Zealand.** In *Proceedings of the 9th International Society on Veterinary Epidemiology and Economics: Day-By-Day Month; Breckenridge, Colorado, USA*; 2000.
- Romero GA, Boleaert M: **Control of visceral leishmaniasis in Latin America – a systematic review.** *PLoS Negl Trop Dis* 2010, **4**:e584.
- Mohammad AO, Mohammad R, Mohammad RS, Fatemeh M, Sogra D: **First report on isolation of *Leishmania tropica* from sandflies of a classical urban Cutaneous leishmaniasis focus in southern Iran.** *Exp Parasitol* 2010, **126**:445–450.
- Sánchez-García L, Berzunza-Cruz M, Becker-Fauser I, Rebollar-Téllez EA: **Sand flies naturally infected by *Leishmania (L.) mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, México.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010, **104**:406–411.
- Boussa S, Guemaoui S, Pesson B, Boumezzough A: **Seasonal fluctuations of phlebotomine sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the urban area of Marrakech, Morocco.** *Acta Trop* 2005, **95**:86–91.
- Oliveira CL, Morais MHF, Machado-Coelho GLL: **Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control.** *Cad Saude Publica* 2008, **24**:2953–2958.
- Camargo-Neves VLF, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spinola RMF, Cruz OG: **Utilização de ferramenta de análise espacial na vigilância epidemiológica de Leishmaniose Visceral Americana – Araçatuba, São Paulo, Brasil 1998–1999.** *Cad Saude Publica* 2001, **17**:1263–1267.
- Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simões TC, Nascimento BWL, Silva ES, Struchiner CJ: **Factors associated with visceral leishmaniasis in the americas: a systematic review and meta-analysis.** *PLoS Negl Trop Dis* 2013, **7**:e2182.
- Gavvani AS, Mohite H, Edrissian GH, Mohebbali M, Davies CR: **Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **67**:511–515.
- Kovalenko DA, Razzakov SA, Ponirovsky EN, Warburg A, Nasyrova RM, Ponomareva VI, Fatullaeva AA, Nasereddin A, Klement E, Alam MZ, Schnur LF, Jaffe CL, Schönian G, Baneth G: **Canine leishmaniasis and its relationship to human visceral leishmaniasis in Eastern Uzbekistan.** *Parasit Vectors* 2011, **4**:58.
- Nascimento BW, Saraiva L, Teixeira-Neto RG, Meira PC, Sanguinette CC, Tonelli GB, Botelho HA, Belo VS, Silva ES, Gontijo CM, Filho JD: **Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state – Brazil.** *Acta Trop* 2013, **125**:262–268.

41. Otranto D, Dantas-Torres F: **The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health.** *Trends Parasitol* 2013, **29**:339–345.
42. Real LA, Biek R: **Spatial dynamics and genetics of infectious diseases on heterogenous landscapes.** *J R Soc Interface* 2007, **4**:935–948.
43. Costa DNCC, Codeço CT, Silva MA, Wernbeck GL: **Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis.** *PLoS Negl Trop Dis* 2013, **7**:e2355.

doi:10.1186/s13071-014-0485-7

Cite this article as: Teixeira-Neto *et al.*: Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. *Parasites & Vectors* 2014 **7**:485.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



8.5 Anexo 05 - ARTIGO PUBLICADO: NASCIMENTO, B.W.; SARAIVA, L.; TEIXEIRA-NETO, R.G.; MEIRA, P.C.; SANGUINETTE, C.C.; TONELLI, G.B.; BOTELHO, H.A.; BELO, V.S.; SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.; FILHO, J.D. STUDY OF SAND FLIES (DIPTERA: PSYCHODIDAE) IN VISCERAL AND CUTANEOUS LEISHMANIASIS AREAS IN CENTRAL WESTERN OF MINAS GERAIS STATE – BRAZIL. ACTA TROPICA. 125:P.262-268, 2013.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state – Brazil

Bruno Warley Leandro Nascimento^a, Lara Saraiva^a, Rafael Gonçalves Teixeira Neto^a, Paula Cavalcante Lamy Serra e Meira^a, Cristiani de Castilho Sanguinette^a, Gabriel Barbosa Tonelli^a, Helbert Antônio Botelho^d, Vinícius Silva Belo^b, Eduardo Sérgio da Silva^c, Célia Maria Ferreira Gontijo^d, José Dilermando Andrade Filho^{a,*}

^a Centro de Referência Nacional e Internacional para Flebotomíneos – Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Avenida Augusto de Lima, 1715 Barro Preto, CP 1743, CEP: 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Escola Nacional de Saúde Pública-ENSP/FIOCRUZ. CEP: 21041-210, Rua Leopoldo Bulhões, 1480 Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Universidade Federal de São João del Rei/Campus Dona Lindu. CEP: 35501-296. Av. Sebastião Gonçalves Coelho, 400 Chanadour, Divinópolis, MG, Brazil

^d Laboratório de Leishmanioses – Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Avenida Augusto de Lima, 1715 Barro Preto, CEP: 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 August 2012

Received in revised form 30 October 2012

Accepted 11 November 2012

Available online 21 November 2012

Keywords:

Sand flies

Leishmaniasis

Lutzomyia longipalpis

Divinópolis city

ABSTRACT

The transmission of *Leishmania* involves several species of sand flies that are closely associated with various parasites and reservoirs, with differing transmission cycles in Brazil. A study on the phlebotomine species composition has been conducted in the municipality of Divinópolis, Minas Gerais, Brazil, an endemic area for cutaneous leishmaniasis (CL), which has intense occurrence of visceral leishmaniasis (VL) cases. In order to study the sand flies populations and their seasonality, CDC light traps (HP model) were distributed in 15 houses which presented at least one case of CL or VL and in five urban parks (green areas). Collections were carried out three nights monthly from September 2010 to August 2011. A total of 1064 phlebotomine specimens were collected belonging to two genera and seventeen species: *Brumptomyia brumpti*, *Lutzomyia bacula*, *Lutzomyia cortezzi*, *Lutzomyia lenti*, *Lutzomyia sallesi*, *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia migonei*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia neivai*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia christenseni*, *Lutzomyia monticola*, *Lutzomyia pessoai*, *Lutzomyia aragai*, *Lutzomyia brasiliensis*, *Lutzomyia lutziana*, and *Lutzomyia sordellii*. *L. longipalpis*, the main vector of *Leishmania infantum* in Brazil, was the most frequent species, accounting for 76.9% of the total, followed by *L. lenti* with 8.3%, this species is not a proven vector. Green and urban areas had different sand flies species composition, whereas the high abundance of *L. longipalpis* in urban areas and the presence of various vector species in both green and urban areas were also observed. Our data point out to the requirement of control measures against phlebotomine sand flies in the municipality of Divinópolis and adoption of strategies aiming entomological surveillance.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The leishmaniasis are the most severe and common sand fly-borne diseases. The phlebotomine sand flies are notorious vectors of human diseases caused by *Leishmania* (Young and Duncan, 1994). Over the last decade, the number of cases and the geographical spread of visceral and cutaneous leishmaniasis

has increased considerably within Brazil. Currently, the disease constitutes one of the most serious problems faced by the public health authorities (Brasil, 2006).

Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe form of the disease owing to its high mortality rate. VL presents peri-urban and urban patterns of occurrence in many Brazilian cities including Belo Horizonte, Campo Grande, São Luís, and Teresina (Silva et al., 2001; Felipe et al., 2011; Soares et al., 2011; Oliveira et al., 2012). Regarding about the 27 Brazilian states, 19 have reported autochthonous VL cases. Recently, the expansion of the disease has been observed in the Amazon basin as a result of human activities such as deforestation, establishment of field plantations, mining, and new settlements (Silva-Nunes et al., 2008).

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a disease with a range of etiological agents, reservoirs, vectors and transmission patterns. Comprehension about this zoonotic disease is still limited in certain

* Corresponding author Tel.: +55 31 3349 7756; fax: +55 31 3349 7795.

E-mail addresses: brunowarley@hotmail.com (B.W.L. Nascimento), delphinapteruslara@gmail.com (L. Saraiva), rafaelgtn@cpqrr.fiocruz.br (R.G.T. Neto), paula-lamy@hotmail.com (P.C.L.S.e. Meira), cristianics@hotmail.com (C.d.C. Sanguinette), tonelli.gabriel@gmail.com (G.B. Tonelli), helbert.bio@hotmail.com (H.A. Botelho), viniciusbelo4@hotmail.com (V.S. Belo), silvaedu@ufsj.edu.br (E.S.d. Silva), gontijo@cpqrr.fiocruz.br (C.M.F. Gontijo), jandrade@cpqrr.fiocruz.br (J.D.A. Filho).

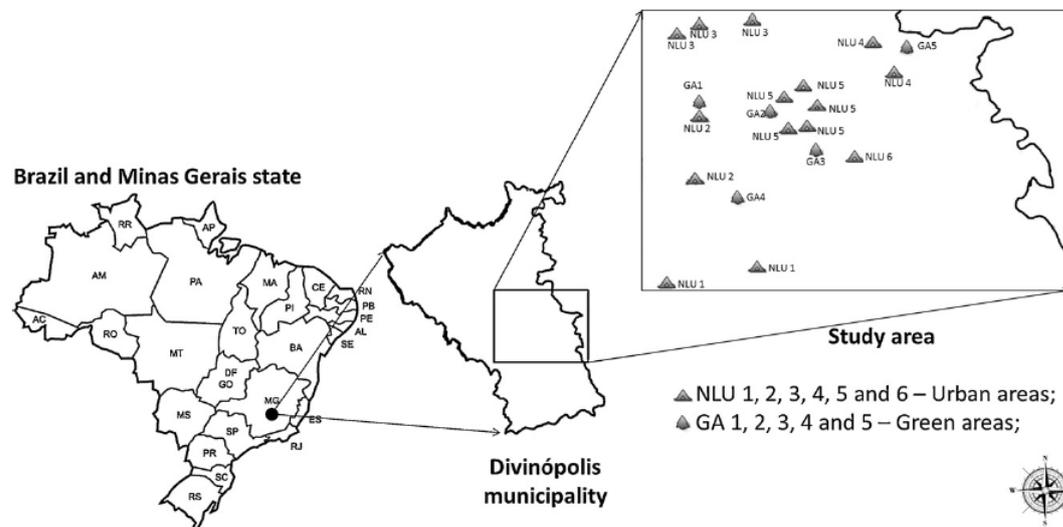


Fig. 1. Divinópolis municipality map, showing the collection places of sand flies – NLU 1 to NLU 6 – Urban localities, GA: Green areas—from September 2010 to August 2011.

aspects, which makes it difficult to control. World Health Organization considers CL one of the six most important infectious diseases due to its high detection rates and the potential to cause deformities in patients (World Health Organization, 2010).

The zoonosis is widely disseminated in Brazil, which reports cases in all regions. From 1985 to 2005, there was an average annual rate of 28,568 autochthonous cases recorded and a medium detection rate of 18.5 cases per 100,000 inhabitants (Brasil, 2007). The first records of CL cases in Minas Gerais state were associated to deforestation to construction of roads and to agricultural activities (Orsini, 1940). However the transmission of the disease in Minas Gerais has changed with outbreaks occurring in rural settlements and in peri-urban and urban areas, as in other Brazilian regions (Lainson, 1989; Brasil, 2007; Gontijo et al., 2002).

An important aspect of the leishmaniasis in Brazil is the adaptation of proven vectors of different species of *Leishmania* to urban areas of many municipalities. For instance *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), the main vector of *Leishmania infantum*, *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Lutzomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) vectors of *Leishmania braziliensis* are commonly collected in urban areas (Barata et al., 2005; Gontijo et al., 2005; Carvalho et al., 2009; Saraiva et al., 2011).

Divinópolis municipality is considered an endemic region of CL. In the 1990 decade 135 human cases of American cutaneous leishmaniasis were reported. From 2000 to 2011, 52 cases were recorded by Health Authorities (DEDCH, 2012). Considering the occurrence of VL in the municipality, four cases were registered in 2011. According to the classification of Ministry of Health in Brazil for areas to surveillance and control of visceral leishmaniasis, the Divinópolis is ranked as a moderated transmission area whereas the average number of VL human cases was between 2.4 and 4.4 cases in the last five years. Until now, 21 species of sand flies were reported in the municipality of Divinópolis (Andrade Filho et al., 2008; Margonari et al., 2010).

This classification indicates the necessity of epidemiological surveillance measures with respect to VL, once other cities in Minas Gerais state have had the same historical profile, currently are areas of intense transmission of VL, for instance Belo Horizonte and Santa Luzia municipalities (PBH, 2011).

Disorganized growth of Divinópolis can favor the proximity of suburban areas and areas of residual forest. This fact can promote the occurrence of transmission cycles of leishmaniasis. Nevertheless there are no concluded studies on the epidemiology of leishmaniasis in the municipality. As stated by Silva et al. (2001) several zoonoses have assumed increasing public health importance due to their urbanization. However these urban rates have increased without the incidence of the diseases being reduced in rural areas. Alterations in rural environments and the constant migratory movements of the population to the periphery of cities have facilitated this process.

The aim of this study was to provide information about the diversity, abundance and seasonality of sand flies vectors in the municipality, focusing the development of control measures well targeted and entomological surveillance.

2. Materials and methods

2.1. Study area

Divinópolis has 213,000 inhabitants in a total area of 708 km² (IBGE, 2011). The municipality coordinates are 20° 8'21''S e 44° 53'17''W, the altitude ranges from 600 to 850 m above sea level. Divinópolis is located in the metallurgical zone, in the region called "Alto São Francisco River" in Minas Gerais state, Brazil (Fig. 1). The municipality benefits from a humid subtropical climate (Cwa – Koppen climate classification), warm weather with a distinctly dry winter. The average annual temperature is 16 °C and an average rainfall varies from 1200 to 1700 mm/year. The average annual humidity of the air varies around 72%. The predominant vegetation in the municipality is the Brazilian Savannah called "Cerrado". Main degradation factors in the area include the pastoral activity, due to the extensive cattle raising, and the urban occupation (SEPLAN/PMD, 1998).

2.2. Sample collection and identification of phlebotomines

Sampling was performed every month between September 2010 and August 2011, using CDC light traps, HP model (Pugedo et al., 2005) located in fifteen houses and in five green areas.

Table 1
Collected sand flies per species, sex and area of study (urban and green areas) in Divinópolis municipality from September 2010 to August 2011.

Species	Total of collected specimens per sex (%)		Total of collected specimens per area (%)		Total (%)
	♀	♂	Urban	Green	
<i>Brumptomyia brumpti</i>	–	5(0.5)	–	5(0.5)	5(0.5)
<i>Lutzomyia aragaoi</i>	13(1.2)	10(0.9)	3(0.3)	20(1.9)	23(2.2)
<i>Lutzomyia bacula</i>	1(0.1)	–	–	1(0.1)	1(0.1)
<i>Lutzomyia braziliensis</i>	1(0.1)	1(0.1)	1(0.1)	1(0.1)	2(0.2)
<i>Lutzomyia christenseni</i>	2(0.2)	–	–	2(0.2)	2(0.2)
<i>Lutzomyia cortezezzii</i>	1(0.1)	13(1.2)	14(1.3)	–	14(1.3)
<i>Lutzomyia intermedia</i>	–	4(0.4)	–	4(0.4)	4(0.4)
<i>Lutzomyia lenti</i>	27(2.5)	61(5.7)	4(0.4)	84(7.9)	88(8.3)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	100(9.4)	718(67.5)	812(76.3)	6(0.6)	818(76.9)
<i>Lutzomyia lutziana</i>	2(0.2)	2(0.2)	1(0.1)	3(0.3)	4(0.4)
<i>Lutzomyia migonei</i>	1(0.1)	–	–	1(0.1)	1(0.1)
<i>Lutzomyia monticola</i>	4(0.4)	2(0.2)	3(0.3)	3(0.3)	6(0.6)
<i>Lutzomyia neivai</i>	3(0.3)	5(0.5)	1(0.1)	7(0.7)	8(0.8)
<i>Lutzomyia sallesi</i>	23(2.2)	7(0.7)	28(2.6)	2(0.2)	30(2.8)
<i>Lutzomyia sordellii</i>	2(0.2)	2(0.2)	3(0.3)	1(0.1)	4(0.4)
<i>Lutzomyia pessoai</i>	–	1(0.1)	1(0.1)	–	1(0.1)
<i>Lutzomyia whitmani</i>	18(1.7)	35(3.3)	20(1.9)	33(3.1)	53(5.0)
Total (%)	198(18.6)	866(81.4)	891(83.7)	173(16.3)	1064(100)

The sampling sites comprised 15 residences in which at least one human case of VL or CL was reported in 2009, and five segments of green areas located in the city, called urban parks.

The analyses were performed by grouping the urban sampling sites according to geographical proximity on six areas: NLU1 (two traps), NLU2 (two traps), NLU3 (three traps), NLU4 (two traps), NLU5 (five traps), NLU6 (one trap). Green areas were analyzed together (ten traps) (Fig. 1). This procedure has been made to enhance the analytical power. The comparison between the areas was carried out through the average number of collected sand flies specimens since the number of traps in each area was different.

A total of 25 traps were employed, with one trap in each residence and two in each green area. The traps were exposed between 6:00 p.m. and 06:00 a.m. during three nights of collection. Sampling time per trap was 432 h and the total sampling hours was 10,800. Trapped specimens were identified according to the classification proposed by Young and Duncan (1994).

2.3. Analyses

Data were organized through Excell 97/2003 which was used to the descriptive statistics. Graph Pad Prisma 4.0 was used for statistical analyses. The climatological data were obtained from the Health Secretary of Divinópolis Municipality.

3. Results

Phlebotomine specimens belonging to eight genera and seventeen species were collected and identified: sixteen species of *Lutzomyia* i.e. *Lutzomyia bacula* (Martins, Falcão & Silva, 1965), *Lutzomyia cortezezzii* (Brêthes, 1923), *Lutzomyia lenti* (Mangabeira, 1938), *Lutzomyia sallesi* (Galvão & Coutinho, 1939); *L. intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), *Lutzomyia. neivai* (Pinto, 1926), *L. whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), *Lutzomyia christenseni* (Young & Duncan, 1994), *Lutzomyia monticola* (Costa Lima, 1932), *Lutzomyia pessoai* (Coutinho & Barretto, 1940), *Lutzomyia aragaoi* (Costa Lima, 1932), *Lutzomyia brasiliensis* (Costa Lima, 1932), *Lutzomyia lutziana* (Costa Lima, 1932), *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *Lutzomyia migonei* (França, 1920) and *Lutzomyia sordellii* (Shannon e Del Ponte, 1927). Regarding the other genera, *Brumptomyia*, only one species of genus was collected. Respectively: *Brumptomyia brumpti* (Larrousse, 1920), (Table 1).

A total of 1064 specimens were collected. Urban sites displayed a much higher abundance of phlebotomines than the green areas, respectively 83.7% and 16.3% of the total were collected in each area.

Lutzomyia longipalpis accounted for 76.9% of the total number of specimens collected, followed by *L. lenti* (8.3%), *L. whitmani* (5.0%), *L. sallesi* (2.8%) and *L. aragaoi* (2.2%). With regard to the ratio of genders 81.4% of the specimens were males and 18.6% were females (Table 1).

Green areas displayed a little higher specific richness of phlebotomines than the urban sites; 15 phlebotomine species were identified; 12 species were collected in urban sites (Table 1). From the total collected in urban areas (891 specimens), 91% (812 specimens) belong to *L. longipalpis* species. This species was mainly collected in urban areas 99.3% of specimens and only 0.7% were collected in green areas. It is important to point out that from the specimens of *L. longipalpis* collected in urban areas 85% come from a single house located in NLU4 (Table 2).

With respect to *L. lenti*, 95.5% (84) of specimens were collected in green areas and 4.5% (4) were collected in urban areas, while *L. whitmani*, 37.7% (20) of the specimens were collected in urban areas and 62.3% (33) in green areas. Some species were collected exclusively in the green areas: *B. brumpti*, *L. bacula*, *L. christenseni*, *L. intermedia*, *L. migonei*. The species *L. cortezezzii* e *L. pessoai* were recorded only in urban areas.

The six urban areas studied showed different patterns of richness and abundance of sand flies species. In the area NLU1, five species were collected with the predominance of *L. sallesi* although *L. longipalpis* was not found at this location.

In the areas NLU 2 and 4, six species were collected with the predominance of *L. longipalpis*. In the area NLU 4, *L. longipalpis* has reached the highest average of specimens collected among all locations of the study. The location NLU 3 had a richness of eight species with the predominance of *L. sallesi*. In the localities NLU 5 and 6, the richness was five and three species, respectively, and the predominant species was *L. longipalpis* in these two areas (Table 2).

Green areas had a richness of 15 species and the predominant ones were: *L. lenti*, *L. whitmani* and *L. aragaoi*, respectively (Table 2). Differences in the proportions of species collected in the two types of environment (urban and green areas) were statistically significant ($p < 0.0001$) (Table 3).

The curve representing the seasonal variation in the numbers of sand flies captured (Fig. 2) peaked in April and May 2011. *L. whitmani* and *L. longipalpis* were the only species collected in all months of the study, *L. sallesi* has not been collected only in July. The presence of a greater number of phlebotomines coincided with the periods during and after the rainfalls, which were characterized by higher relative humidity and milder temperatures.

Table 2
Average of collected specimens per light trap in each area of study in Divinópolis municipality from September 2010 to August 2011.

Collected species	Places of collection													
	NLU1		NLU2		NLU3		NLU4		NLU5		NLU6		Green areas	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
<i>Brumptomyia brumpti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Lutzomyia aragaoi</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	2
<i>Lutzomyia bacula</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-
<i>Lutzomyia braziliensis</i>	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-
<i>Lutzomyia christenseni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	-
<i>Lutzomyia cortelezzii</i>	-	-	-	1.5	-	-	1.5	0.2	1.4	-	-	-	-	-
<i>Lutzomyia intermedia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8
<i>Lutzomyia lenti</i>	-	0.5	-	-	0.3	0.3	-	0.5	-	-	-	-	5.2	11.6
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	-	-	1	4	0.3	0.7	36	310	4.4	11.2	2	27	0.2	1
<i>Lutzomyia lutziana</i>	-	0.4	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-
<i>Lutzomyia migonei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-
<i>Lutzomyia monticola</i>	-	-	-	0.3	0.7	-	-	-	-	-	-	-	0.4	0.2
<i>Lutzomyia neivai</i>	-	-	-	-	-	-	-	0.5	-	-	-	-	0.6	0.8
<i>Lutzomyia sallesi</i>	1.5	-	0.5	-	1	0.3	1	1.5	2.6	0.4	-	-	0.2	0.2
<i>Lutzomyia sordelli</i>	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	1	0.2	-
<i>Lutzomyia pessoai</i>	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lutzomyia whitmani</i>	-	0.5	0.5	-	0.3	0.7	3	2	-	0.2	1	3	1.8	4.8

Table 3
Proportion of collected sand flies specimens per species and urban and green areas in Divinópolis municipality from September 2010 to August 2011.

Studied areas	<i>L. lenti</i>	<i>L. sallesi</i>	<i>L. longipalpis</i>	<i>L. whitmani</i>	<i>L. aragaoi</i>	Other species
Urban areas	0.4	2.6	76.2	1.9	0.3	2.3
Green areas	7.9	0.2	0.6	3.1	1.9	2.6
Total	8.3	2.8	76.7	5.0	2.2	4.9

P-value < 0.0001, Chi-square test.

4. Discussion

Leishmaniasis are considered eco-epidemiological events extremely complex. Currently, urbanization adds up to this complexity, thus them represent a challenge to global public health. An increase in the number of cases of all forms of leishmaniasis occurred in the world over the past twenty years. Some experts consider them emerging diseases in some areas, and reemerging in others (Ashford, 2000).

Seventeen species of sand flies were collected in the studied area, which represent high species richness while compared to results found in other endemic urban areas for leishmaniasis in Minas Gerais State. For instance nine species of sand flies were collected in a study carried out in Belo Horizonte city and exclusively seven species were collected in the city of Santa Luzia (Carvalho et al., 2010; Saraiva et al., 2011).

From the 17 collected species, seven are proven or suspicious vectors of *Leishmania*. The main vector of *L. infantum*, *L. longipalpis*

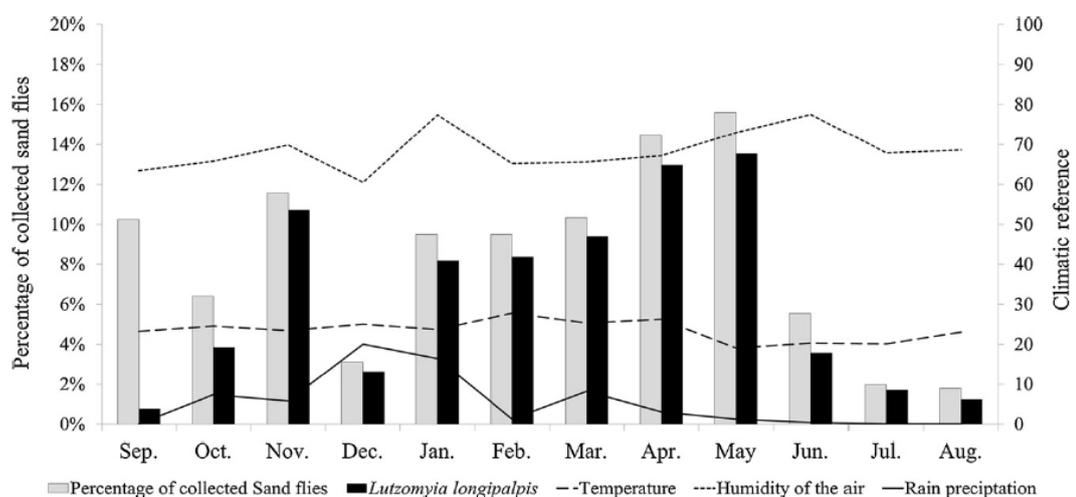


Fig. 2. Monthly amount of phlebotomine species captured in the Divinópolis municipality in comparison with the weekly mean of temperature, total rainfall and mean relative humidity of the air from September 2010 to August 2011.

was the most abundant species (76.9%). The species *L. intermedia* (0.4%), *L. neivai* (0.8%), *L. whitmani* (5.0%), and *L. migonei* (0.1%) were collected in small amount of numbers, all of them are related to the *L. braziliensis* transmission (Pita-Pereira et al., 2005; Andrade Filho et al., 2007; Costa et al., 2007).

Gender ratio represented 84.6% of males and 18.6% of females. These numbers can be understood considering the behavior of these insects during feeding and copulation. Males are active on searching for hosts. After finding them, the males release sexual pheromones which attract females (Brazil and Brazil, 2003).

The highest species richness has occurred in green areas (15 species), however, the highest abundance of specimens have occurred in the peridomiciles (83.7% of the total). This fact illustrates the adaptation of sand flies to anthropically modified environment, where some species are found in high abundance. The adaptability of *L. longipalpis* to the urban environment has been investigated since the decade of 1930, when the cycle of VL started to be elucidated. Presence of this species in peridomiciles and their opportunistic feeding habits were reported (Lainson and Rangel, 2005). One of the determinants of VL urbanization process in the Americas is the adaptability of this vector species to the anthropically modified environment (Lainson, 1989; Lainson and Rangel, 2005; Shaw et al., 2003).

Resende et al. (2006) reported *L. longipalpis* in the intra and peridomiciles from 1997 to 1999 in Belo Horizonte city. In this study, *L. longipalpis* represented 69% of the total collected specimens. Research conducted by Souza et al. (2004), also in Belo Horizonte city, from 2001 to 2003, *L. longipalpis* accounted for 68% of the collected sandflies. *L. longipalpis* was extremely abundant in the peridomiciles (99.3%) whereas few specimens were collected in green areas (0.7%) in Divinópolis municipality. *L. sallesi* is commonly recorded in the Minas Gerais State. This species has been found naturally infected by *L. infantum* (Saraiva et al., 2009), although Mayrink et al. (1979) had previously observed specimens of this species infected with trypanosomatids in eastern region of Minas Gerais state (Martins et al., 1978). In this work 30 specimens of *L. sallesi* were collected, representing 2.8% of the sand flies.

L. cortezezzii has been collected in low numbers (14 specimens) and only in urban areas, however, it is necessary to point out its occurrence, since Carvalho et al. (2008) have found that species infected by *Leishmania (L.) infantum* in the metropolitan region of Belo Horizonte city. Furthermore, in Belo Horizonte city one female of the *cortezezzii* complex was found infected by *L. braziliensis* (Saraiva et al., 2010). Although the authors cannot incriminate these species as a vector in the transmission of *Leishmania*, they do not reject the possibility of this species to be involved in the cycles of CL and VL. Recently, this species were found infected with *L. infantum* in Mato Grosso do Sul state, Brazil (Andrade et al., 2011).

L. lenti represented 8.3% of the collected sand flies, second most abundant species. This finding deserves to be highlighted in view of the fact that this species eagerly bites humans, horses and dogs. Moreover, *L. lenti* has been found naturally infected by promastigotes in Jacobina city, Bahia state (Sherlock, 1996). Recently, in Divinópolis municipality, natural infection of *L. lenti* by *L. braziliensis* it been reported in a study using molecular biology techniques (Margonari et al., 2010). It is valuable to mention that the last study was conducted in the Gafanhoto Park, one of the green areas that have taken part of the present study. Therefore, the possible epidemiological role of *L. lenti* needs to be clarified.

L. aragaoi accounted for 2.2% of the sand flies. The highest abundance occurred in green areas and a few specimens in peridomestic area. This species has already been found naturally infected by *Leishmania* sp. Margonari et al. (2010) in a study carried out in a green area (Gafanhoto Park) in Divinópolis municipality.

L. whitmani has a wide geographic distribution and high level of adaptation to various ecological niches with populations

displaying different behavioral patterns. This species inhabits primary forest areas in the Amazon region, regions of remaining forests and peridomiciliary areas in northeastern and southeastern Brazil (Rangel et al., 1996). Several authors have shown high abundance of *L. whitmani* in the peridomicile, especially in southeastern Brazil (Brazil et al., 2006). This species is considered one of the main vectors of the etiological agent of cutaneous leishmaniasis in many regions of Brazil (Queiroz et al., 1994; Teodoro et al., 1991).

Ryan et al. (1990) have isolated and characterized specimens of *L. whitmani* naturally infected by *L. braziliensis*. Carvalho et al. (2008) have found *L. whitmani* naturally infected by *L. (Viannia) spp.* using molecular techniques. Saraiva et al. (2010) and Margonari et al. (2010) have reported the infection of *L. whitmani* by *L. infantum* also employing molecular methods.

Twenty specimens of *L. whitmani* were captured in the peridomestic area in Divinópolis municipality. This fact might indicate a tendency to urbanization of this species. According to some authors, this species shows a pattern of peridomestic colonization already acknowledged (Leonardo and Rebêlo, 2004). Nevertheless, recent researches suggest the urbanization of *L. whitmani* (Souza et al., 2005; Carvalho et al., 2006; Teodoro et al., 2003; Saraiva et al., 2011).

L. intermedia represented 0.4% of the total of collected specimens. This species was collected exclusively in green areas. Occurrence of *L. intermedia* merits to be discussed due to its epidemiological importance, especially in the Southeast of Brazil (Andrade Filho et al., 2007; Marcondes et al., 1997). Lutz and Neiva (1912) have registered a high frequency of *L. intermedia* in residences in the description of the species. This species has been found naturally infected by *L. braziliensis* (Rangel et al., 1996) and it is incriminated to transmit *L. braziliensis* in several localities of Brazil (Andrade Filho et al., 2003; 2007; Gontijo et al., 2002; 2005).

L. neivai accounted for 0.8% of the total of sand flies. Only a single specimen was collected in the urban area in the present study. This species is related to *L. (Viannia) braziliensis* transmission in Brazil (Queiroz et al., 1991; Luz et al., 2000; Andrade Filho et al., 2007). Saraiva et al. (2009) reported the natural infection of *L. neivai* by *L. infantum* in the northern of Minas Gerais state, whereas Margonari et al. (2010), reported this species naturally infected by *Leishmania* sp. in a green area (Gafanhoto Park) in Divinópolis municipality.

One specimen of *L. migonei* and one of *L. pessoai* were collected in this study. Despite the low abundance, it is important to report that the former was incriminated as the vector of *L. braziliensis* and occurs frequently in foci of CL (Queiroz et al., 1994; Pita-Pereira et al., 2005; Rangel and Lainson, 2003; Saraiva et al., 2006). The latter species is anthropophilic and presents high density in endemic regions for CL and has been found naturally infected by promastigote forms considered as *Leishmania* (Pessôa and Coutinho, 1940).

Forattini (1960) studied the seasonal variation of sand flies and verified that in warm and humid months (From December to February), the number of captured specimens was higher, while in colder and drier months (From June to August), the population density became considerably reduced. The same seasonal profile was reported by Barata et al. (2004) in the municipality of Porteirinha, Minas Gerais state, an endemic area for CL.

The pattern of seasonal occurrence of phlebotomine species in the study area was basically determined by the numbers of *L. longipalpis* captured. Collection peaks were observed after periods of intense rainfall and the abundance of sand flies have increased during the following months (from January to May), with a trend to decrease during the colder and drier months. The low number of specimens collected in December might be explained by the fact that immature stages of the sand flies does not develop in drenched places (Lainson, 1982).

Souza et al. (2004) have observed that *L. longipalpis* and *L. whitmani* undergo notable increases in the populations after rainy periods (March and April) in an endemic area for cutaneous and visceral leishmaniasis in the state of Minas Gerais. This fact can be explained by favorable environmental conditions of the microhabitats.

Sherlock (1996) reported a higher occurrence of *L. longipalpis* in both the warmest and the coldest rainy months. These authors have established a correlation among the seasonal occurrence of *L. longipalpis*, human cases of VL and the peridomestic frequency of opossums which demonstrates the importance of knowing the seasonal profile of vector species in each locality.

It is worth paying attention to high percentage of specimens of *L. longipalpis* (84.6%) collected in the locality NLU4. The collection place was a hen house which was used to hang up the trap. Although domestic hens does not have ability to be infected by *Leishmania* and do not act as reservoirs of this parasite. These animals represent an important bond in the epidemiological chain of the VL since they constitute a source of supply to females of *L. longipalpis* (Alexander et al., 2002).

Environmental surveillance based on arthropod vectors provides bases for appropriate interventions in controlling diseases. Indicators delineated by vectors surveillance need to consider the diversity of enzootic activity, the abundance of the species and their rates of natural infection (Gomes, 2002). Regarding to these aspects, the important presence of *L. longipalpis* and species vectors of *L. braziliensis* point out to the necessity to elaborate an intensive entomological surveillance for prevention and control of visceral and cutaneous leishmaniasis in the municipality of Divinópolis.

Acknowledgements

The authors are grateful to the community of the Divinópolis for their collaboration in the field sampling process. The authors are indebted to CAPES, FAPEMIG and CNPq for scholarships. Technical support from LALEI CRNIF/FIOCRUZ and UFSJ/CCO are gratefully acknowledged.

References

- Alexander, B., Carvalho, R.L., McCallum, H., Pereira, M.H., 2002. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Diseases* 8, 1480–1485.
- Andrade, A.R.O., Dorval, M.E.M.C., Andrade, S.M.O., Marques, A., Júnior, M.S.C.L., Silva, B.A.K., Andreotti, R., 2011. First report of natural infection of phlebotomines for *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi captured in Ponta Porã, on the border between Brazil and Paraguay. *Asian Pacific J. Trop. Disease* 1, 253–258.
- Andrade Filho, J.D., Galati, E.A.B., Falcão, A.L., 2003. Redescription of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 1059–1065.
- Andrade Filho, J.D., Oliveira, R.C., Fonseca, A.R., 2008. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) Coletados com Armadilha Malaise no Centro-Oeste de Minas Gerais. *Neotrop. Entomol.* 37 (1), 104–106.
- Andrade Filho, J.D., Galati, E.A.B., Falcão, A.L., 2007. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 481–487.
- Ashford, R.W., 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30, 1269–1281.
- Barata, R.A., Franca-Silva, J.C., Costa, R.T., Fortes-Dias, C.L., Silva, J.C., Vieira, E.P., Prata, A., Michalsky, E.M., Dias, E.S., 2004. Phlebotomine sandflies in Porteira, an endemic area of American visceral leishmaniasis in the state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99 (5), 481–487.
- Barata, R.A., Franca-Silva, J.C., Mayrink, W., Silva, J.C., Prata, A., Lorosa, E.S., Fiúza, J.A., Gonçalves, C.M., Paula, K.M., Dias, E.S., 2005. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38, 421–425.
- Brasil, 2006. Ministério da Saúde Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.
- Brasil, 2007. Ministério da Saúde Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Editora MS, Brasília.
- Brazil, P.P., Brazil, B.G., 2003. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: Rangel, E.F., Lainson, R. (Eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. FioCruz, Rio de Janeiro, pp. 257–274.
- Brazil, R.P., Passos, W.L., Fuzari, A., Falcão, A.L., Andrade Filho, J.D., 2006. The peridomestic sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in areas of cutaneous leishmaniasis in Além Paraíba, Minas Gerais, Brazil. *J. Vector Ecol.* 31, 418–420.
- Carvalho, G.M.L., Brazil, R.P., Falcão, A.L., Andrade Filho, J.D., 2009. Distribuição geográfica do complexo *corlezzii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Brasil. *Neotrop. Entomol.* 38, 876–879.
- Carvalho, G.M.L., Gontijo, C.M.F., Falcão, A.L., Andrade Filho, J.D., 2010. Study of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) collected in a *Leishmania*-endemic area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. *J. Med. Entomol.* 47 (6), 972–976.
- Carvalho, M.L., Andrade Filho, J.D., Falcão, A.L., Rocha Lima, A.C.V.M., Gontijo, C.M.F., 2008. Naturally Infected *Lutzomyia* sand flies in a leishmania-endemic area of Brazil. *Vector Borne and Zoonotic Disorder* 8, 407–414.
- Carvalho, G.M.L., Falcão, A.L., Andrade Filho, J.D., 2006. Taxonomic revision of phlebotomine sand fly species in the series *davisi* and *panamensis* of the subgenus *Psychodopygus* Mangabeira, 1941 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101, 129–136.
- Costa, S.M., Cechinel, M., Bandeira, V., Zanuncio, J.C., Lainson, R., Rangel, E.F., 2007. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil—mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 149–153.
- DEDCH – Department of Epidemiology. Divinópolis City Hall, 2012. Leishmaniasis records. DEDCH, Divinópolis, Brazil.
- Felipe, I.M., Aquino, D.M., Kuppinger, O., Santos, M.D., Rangel, M.E., Barbosa, D.S., Baral, A., Werneck, G.L., Caldas, A.J., 2011. *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106 (2), 207–211.
- Forattini, O.P., 1960. Novas observações sobre a biologia de flebotomos em condições naturais (Diptera: Psychodidae). *Arq. Hig. Saude Publica* 25, 89–90.
- Gomes, A.C., 2002. *Vigilância Entomológica* 11 (2), 79–90.
- Gontijo, C.M.F., Silva, E.S., Fuccio, M.B., Souza, M.C.A., Pacheco, R.S., Dias, E.S., Andrade Filho, J.D., Brazil, R.P., Melo, M.N., 2002. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Tropica* 81, 43–50.
- Gontijo, C.M.F., Silva, E.S., Pacheco, R.S., Dias, E.S., Oliveira, F.S., Michalsky, E.M., Margonari, C.S., Melo, M.N., 2005. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Araçuaí, Minas Gerais state, Brazil. *Rev. Soc. Iberoam. Inform. Cient* (SIIC).
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011. Cidades@ IBGE.
- Lainson, R., 1989. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In: Service, M.W. (Ed.), *Demography of Vector-borne Diseases*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 85–106.
- Lainson, R., Rangel, E.F., 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the coepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 811–827.
- Lainson, R., 1982. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 569–596.
- Leonardo, F.S., Rebêlo, J.M.M., 2004. A periurbanização de *Lutzomyia whitmani* em área de foco de leishmaniose cutânea, no Estado do Maranhão, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37, 282–284.
- Lutz, A., Neiva, A., 1912. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 4, 84–95.
- Luz, E., Membrive, N., Castro, E.A., Dereure, J., Pratleng, E., Dedety, A., Pandey, A., 2000. Socol T. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* in Paraná State, southern Brazil. *Ann Trop. Med. Parasitol.* 94, 623–631.
- Marcondes, C.B., Day, J.R., Ready, P.D., 1997. Introgression between *Lutzomyia intermedia* and both *Lu. neivai* and *Lu. whitmani*, and their role as vectors of *Leishmania braziliensis*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91 (6), 125–126.
- Margonari, C., Soares, R.P., Andrade Filho, J.D., Xavier, D.C., Saraiva, L., Fonseca, A.L., Silva, R.A., Oliveira, M.E., Borges, E.C., Sanguinette, C.C., Melo, M.N., 2010. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. *J. Med. Entomol.* 47 (6), 1212–1219.
- Martins, A.V., Williams, P., Falcão, A.L., 1978. *American Sand Flies* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Editora da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 195 pp.
- Mayrink, W., Williams, P., Coelho, M.V., Dias, M., Martins, A.V., Magalhães, P.A., Costa, C.A., Falcão, A.R., Melo, M.N., Falcão, A.L., 1979. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 73, 123–137.
- Oliveira, E.F., Silva, E.A., Fernandes, C.E., Paranhos Filho, A.C., Gamarrá, R.M., Ribeiro, A.A., Brazil, R.P., Oliveira, A.G., 2012. Biotic factors and occurrence of *Lutzomyia longipalpis* in endemic area of visceral leishmaniasis, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 107 (3), 396–401.
- Orsini, O., 1940. Leishmaniose em Minas Gerais. *Brasil Médico* 54, 762–765.
- Pita-Pereira, D., Alves, C.R., Souza, M.B., Brazil, R.P., Bertho, A.L., de Figueiredo Barbosa, A., Britto, C.C., 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (Vianna) *braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99, 905–913.
- PBH, 2011. Prefeitura de Belo Horizonte - Secretaria Municipal de Saúde-Leishmaniose Visceral-Available in <PBH-Prefeitura Municipal de Saúde-Secretarias-Saúde-Leishmaniose Visceral 2011. Accessed in January 12, 2011.

- Available in http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pldPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=12768&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=08
- Pessoa, S.B., Coutinho, J.O., 1940. Infecção natural do *Phlebotomus pessoai* por formas em leptomonas, provavelmente da *Leishmania braziliensis*. *Revista de Biologia e Higiene* 10, 139–142.
- Pugedo, H., Barata, R.A., França-Silva, J.C., Silva, J.C., Dias, E.S., 2005. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38, 70–72.
- Queiroz, R.G., Vasconcelos, I.A.B., Vasconcelos, A.W., Pessoa, F.A.C., Souza, R.N., David, J.R., 1994. Cutaneous leishmaniasis in Ceará state in Northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturite municipality. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 693–698.
- Queiroz, R.G., Vasconcelos, A.W., Vasconcelos, I.A.B., Souza, R.N., Pessoa, F.A.C., Alencar, J.E., David, J.R., 1991. Phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) fauna survey in an american cutaneous leishmaniasis (ACL) focus in Baturité, Ceará State, Northeast Brazil. *Parassitologia* 33 (Suppl. 1), 159–167.
- Rangel, E.F., Lainson, R., 2003. Ecologia das leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In: Rangel, E.F., Lainson, R. (Eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 291–310.
- Rangel, E.F., Lainson, R., Souza, A.A., Ready, P.D., Azevedo, A.C.R., 1996. Geographical variation in populations of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) In Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91, 43–50.
- Resende, M.C., Camargo, M.C., Vieira, J.R., Nobil, R.C., Porto, M.N., Oliveira, C.D., Pessanha, J.E., Cunha, M. da C., Brandão, S.T., 2006. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, state of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39, 51–55.
- Ryan, L., Vexenat, A., Marsden, P.D., Lainson, R., Shaw, J.J., 1990. The importance of rapid diagnosis of new cases of cutaneous leishmaniasis in pin-pointing the sandfly vector. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 786.
- Saraiva, L., Andrade Filho, J.D., Falcão, A.L., Carvalho, D.A.A., Souza, C.M., Freitas, C.R., Lopes, C.R.G., Moreno, E.C., Melo, M.N., 2011. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: characterization of favored locations as determined by spatial analysis. *Acta Tropica* 117, 137–145.
- Saraiva, L., Carvalho, G.M., Contijo, C.M., Quaresma, P.F., Lima, A.C., Falcão, A.L., Andrade Filho, J.D., 2009. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum* chagasi in Brazil. *J. Med. Entomol.* 46, 1159–1163.
- Saraiva, L., Andrade Filho, J.D., Silva, S.O., Andrade, A.S.R., Melo, M.N., 2010. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 105 (8), 1033–1039.
- Saraiva, L., Lopes, J.S., Oliveira, G.B.M., Batista, F.A., Falcão, A.L., Andrade Filho, J.D., 2006. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39, 56L 63.
- SEPLAN/PMD, 1998. Secretaria municipal de planejamento. Prefeitura de Divinópolis. Available from: <http://licht.io.inf.br/mg.mapas/mapa/cgi/iga.comeco1024.htm>
- Shaw, J., Rosa, A.T., Souza, A., Cruz, A.C., 2003. Os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In: Rangel, E.F., Lainson, R. (Eds.), *Flebotomíneos do Brasil*. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, pp. 337–351.
- Sherlock, I.A., 1996. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91, 671–683.
- Silva, E.S., Gontijo, C.M.F., Pacheco, R.S., Fiúza, V.O.P., Brazil, R.P., 2001. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96 (3), 285–291.
- Silva-Nunes, M., Cavasini, C.E., Silva, N.S., Galati, E.A.B., 2008. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis and description of phlebotomine sand flies populations in the city of Acrelândia, Acre, Brazil. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 11, 241–251.
- Soares, M.R., Mendonça, I.L., Bonfim, J.M., Rodrigues, J.A., Werneck, G.L., Costa, C.H., 2011. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Tropica* 117 (1), 6–9.
- Souza, C.M., Pessanha, J.E., Barata, R.A., Monteiro, E.M., Costa, D.C., Dias, E.S., 2004. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 795–803.
- Souza, N.A., Andrade, C.C.A., Peixoto, A.A., Rangel, E.F., 2005. Nocturnal activity rhythms of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of american cutaneous leishmaniasis in Rio de Janeiro State, Brazil. *J. Med. Entomol.* 42, 986–992.
- Teodoro, U.D., Kühl, J.B., Santos, E.S., Santos, D.R., Santos, A.R., Oliveira, O., Silveira, T.G.V., Lonardon, M.V.C., 2003. Ecologia de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera, Psychodidae) em área urbana no sul do Brasil. *Revista de Saúde Pública/Journal of Public Health* 37 (5), 651–656.
- Teodoro, U., Salvia Filho, L., Lima, E.M., Misuta, N.M., Silveira, T.G.V., Ferreira, M.E.M.C., 1991. Leishmaniose Tegumentar Americana: flebotomíneos de área de transmissão no norte do Paraná. *Brasil. Revista de Saúde Pública* 25 (2), 129–133.
- Young, D.G., Duncan, M.A., 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 54, 1–881.
- WHO- World Health Organization, 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases, 184 p.

9 BIBLIOGRAFIA

Aderian MZ, Daniel PF, Lili-Franklin AN, Steven HF. Evaluation of 7SL RNA gene sequence for the identification of the *Leishmania* spp. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005; 72:415–420.

Alexander B, Lozano C, Barker DC, McCann SHE, Adler GH. Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. *Acta Trop* 1998; 69: 41-50.

Alvar J & Barker JR. Molecular tools for epidemiological studies and diagnosis of leishmaniasis and selected other parasitic diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2002; 96(Suppl.1)S1–S250, 2002.

Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. *Advances in Parasitology* 2004; 57:1-88.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence, *Plos One* 2012; 7(5): e35671.

Alves AL, Bevilaqua CML, Moraes NB, Franco SO. Levantamento epidemiológico da leishmaniose visceral em cães vadios da cidade de Fortaleza, Ceará. *Ciência Animal* 1998; 8(2):15-20.

Antonialli SAC, Torres TG, Filho ACP, Tolezano JE. Spatial analysis of american visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, central Brazil. *Journal of Infection* 2007; 54:509-514.

Araujo VEM, Pinheiro LC, Almeida MCM, Menezes FC, Morais MHF, Reis IA, Assunção RM, Carneiro M. Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: A spatial analysis in urban area. *Plos Neglected tropical diseases* 2013; 7(11):e2540.

Arias JR, Naiff RD, Miles MA, Souza AA. The opossum *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis*

Bibliografia

guyanensis in the Amazon Basin of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75 (4): 537-5.

Ashford DA, Bozza M, Freire M. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1995; 53:251-255.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 2000; 30:1269-1281.

Azeredo-Coutinho R, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella L, Madeira M, Pacheco R, Valette-Rosalino C, Mendonça S. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro state, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101:735-737.

Bailey T & Gatrell A. Interactive Spatial Data Analysis. London, *Longman Scientific and Technical* 1995; 413p.

Baneth G. Leishmaniasis. In: Greene C.E. *Infectious diseases of the dog and cat.* 3a ed. Canada: Saunders Elsevier 2006; cap.73, 685-698.

Barbosa DS, Belo VS, Rangel MES, Werneck GL. Spatial analysis for identification of priority areas for surveillance and control in a visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. *Acta tropica* 2014; 131:56-62.

Barral A, Follador I, Araújo C. *et al.* Surto de Leishmaniose Americana em Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1999; 32(5):497-503.

Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simões TC, Nascimento BWL, Silva ES, Struchiner CJ. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7(4):e.2182.

Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 1997; 24(4):684-703.

Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1996; 55:273-277.

Bibliografia

Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanization of visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootécnica* 2001; 53:1-8.

Boussa S, Guernaoui S, Pesson B, Boumezzough A. Seasonal fluctuations of phlebotomine sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the urban area of Marrakech, Morocco. *Acta Trop* 2005; 95(2):86-91.

Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 97, 291-296.

Brandão-Filho SP, Campbell-Lendrum D, Brito MEF, Shaw JJ, Davies CR. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in North-East Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93:488-494.

Brandão-Filho SP & Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil. *Parasitology Today* 1994; 10:329-330.

Brazil, RP & Brazil BG. Vetores na Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Conceição-Silva, F & Alves CR. (Orgs). Leishmanioses do Continente Americano. *Rio de Janeiro: Editora Fiocruz* 2014; p.193-200.

Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J. Immunology* 1995; 155:3102-3111.

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

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

Bibliografia

Campino L, Pratlong F, Abranches P, Rioux J, Santos-Gomes G, Alves-Pires C, Cortes S, Ramada J, Cristovão JM, Afonso MO, Dedet JP. Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Trop Med Int Health* 2006; 11:1708-1714.

Carvalho MLR, Andrade ASR, Fontes CJF, Hueb M, Silva SO, Melo MN. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the prevalent species infecting with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. *Acta Trop* 2006; 98:277-285.

Chaves LF, Hernandez MJ, Dobson AP, Pascual M. Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. *Trends in Parasitology* 2007; 23(7):311-316.

Chaves LF, Cohen LM, Pascual M, Wilson ML. Social exclusion modifies climate and deforestation impacts on a vector-borne disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2(2):e176.

Chicharro C, Morales MA, Serra T, Ares M, Salas A, Alvar J. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2002; 96(1):93-99.

Costa CH, Pereira HF, Araujo MV. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Revista de Saúde Pública de São Paulo* 1990; 24:361-372.

Costa DNCC, Codeço CT, Silva MA, Werneck GL. Culling dogs in scenarios of imperfect control: Realistic impact on prevalence of canine visceral leishmaniasis. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2013; 7(8)e2355.

Coura-Vital, W. Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* e identificação de biomarcadores de infecção. [Tese] Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais 2011; 169p.

Bibliografia

Cruz I, Canavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, Jimenez-Mejias M, Sirera G, Videla S, Alvar J, and Spanish HIV-Leishmania Study Group. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2002; 96(1):185-189.

Da-Cruz AM & Pirmez C. Leishmaniose tegumentar americana. In JR Coura, Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2005; 697-712.

Dantas-Torres F & Brandão-Filho SP. Expansão Geográfica da Leishmaniose Visceral no Estado de Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2006; 39:352-356.

Dantas-Torres F. Dogs as reservoirs for *Leishmania brasiliensis*, *Emerging Infectious Diseases* 2011; 17(2):326-327.

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

Deane LM & Deane MP. Leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1962; 4:198-212.

Deane LM & Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica do calazar no Ceará. *O hospital* 1955; 48:61-76.

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

De-Souza RL, Falqueto A, Santos CB, Grimaldi-Jr G, Cupolillo E. Genetic structure of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* populations from two ecologic regions in Brazil where transmission of *Leishmania (Viannia) braziliensis* reflects

Bibliografia

distinct ecoepidemiologic features. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2006; 76(3):559-565.

Dias ES, França-Silva JC, Silva JC, Michalsky EM, Paula KM, Gonçalves CM, Barata RA. Sandflies (Díptera: Psychodidae) in an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40(1):49-52.

Dias M, Mayrink W, Deane LM, Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Batista SM, Araújo FG, Coelho MV, Williams P. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana. I – Estudo de reservatórios em área endêmica no Estado de Minas Gerais. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1977; 19(6):403-410.

Dunaiski M. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana na região do vale do ribeira – Paraná: cães reservatórios ou hospedeiros acidentais? [Dissertação] Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2006.

Duxbury RE & Sadun EH Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Amer J Med Hyg* 1964; 13:525-529.

Falqueto A, Sessa PA, Ferreira AL, Vieira VP, Santos CB, Varejão JBM, Cupolillo E, Porrozzi R, Carvalho-Paes LE, Grimaldi Jr G. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98(8):1003-1010.

Falqueto, A, Ferreira AL. Reservatórios extra-humanos do complexo *Leishmania* e dinâmica de transmissão da infecção ao homem. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Guanabara Koogan; 2005. Vol. 1, cap 55: 739-752.

Fantauzzi, RS. Análise dos casos de leishmaniose tegumentar americana no município de belo horizonte, notificados entre 2001 e 2008, com ênfase na forma mucosa. [Dissertação] Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais 2009.

Bibliografia

- Ferrer L. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum. Sevilla, Espanha, 2002.
- Ferrer L. Leishmaniasis: update in diagnosis and therapy. *Proceedings of European Society of Veterinary dermatology*, PISA, 1997.
- Folgueira C, Cañavate C, Chicharro C, Requena JM. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. *Parasitology* 2007; 134(3):369-377.
- Freitas TPT, D'Andrea PS, de Paula DAJ, Nakazato L, Dutra V, Bonvicino CR, de Almeida ABPF, Boa-Sorte EC, Souza VRF. Natural Infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Mus musculus* Captured in Mato Grosso, Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2012; 12: 81-83.
- Galati EAB, Nunes VLB, Rego-JR FA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul. Brasil. *Rev. Saude Publica* 1997; 31:378–390.
- Galati EAB. In: Rangel EF, Lainson R. (Eds.), *Morfologia e Taxonomia. Morfologia terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. Flebotomíneos do Brasil, Fiocruz, Rio de Janeiro* 2003; 53–175.
- Gama GM. Prevalência e fatores associados à Leishmaniose Canina na região nordeste do município de Divinópolis, MG. [Dissertação] Universidade Federal de São João Del Rei. Divinópolis, Minas Gerais 2013.
- Gavvani AS, Mohite H, Edrissian GH, Mohebbali M, Davies CR. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67(5):511-515.
- Genaro O, Da Costa CA, Williams P, Silva JE, Rocha NM, Lima SL, Mayrink W. Occurrence of kala-azar in the urban area of Grande Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 1990; 23(2):121.
- Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB. Relationship between Canine

Bibliografia

Visceral Leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* Burden in Dermal Inflammatory Foci. *Journal of Comparative Pathology* 2006; 135:100-107.

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

Gontijo CMF & Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 2004; 7:338-347.

Gontijo CMF, Da Silva ES, De Fuccio MB, De Sousa 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. Leishmaniose tegumentar em Minas Gerais: estudos moleculares de amostras de *Leishmania* isoladas de casos humanos. [tese] Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2000.

Gradoni L. The diagnosis of canine leishmaniasis. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum. Sevilha, Spain 2002; 7-14.

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

Green PJ, Feizi T, Stoll MS, Thiel S, Prescott A, McConville MJ. Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 66:319-328.

Grimaldi-Jr G & Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Rev Clin Microbiol* 1993; 6(3):230-250.

Grimaldi-Jr G, Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto IS, de-Azevedo CT, Falqueto A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2012; 106:54–59.

Bibliografia

Herwaldt, B. L. Leishmaniasis. *The Lancet* 1999; 354(9.185):1.191-1.199.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Cidades 2010. <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=312230>>.

Jaffe CL & Greenblatt CL. Vaccine development against the intracellular parasite *Leishmania*. In: Vaccines and Immunotherapy. (Cryz, S.J.Jr., ed.) Pergamon Press, London 1991; 38.

Kallel K, Pratlong F, Belhadj S, Cherif F, Hammami H, Chaker E. Isoenzyme variability of *Leishmania infantum* in Tunisia concerning 245 human strains. *Act Trop* 2008; 106:132-136.

Kawa H & Sabroza PC. Espacialização de leishmaniose tegumentar na cidade do Rio de Janeiro. *Cad. Saúde Pública* 2002; 18(3):217-231.

Killick-Kendrick R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinical Dermatology* 1999; 17:279-289.

Kovalenko DA, Razakov SA, Ponirovsky EN, Warburg A, Nasyrova RM, Ponomareva VI, Fatullaeva AA, Nasereddin A, Klement E, Alam MZ, Schnur LF, Jaffe CL, Schönian G, Baneth G. Canine leishmaniosis and its relationship to human visceral leishmaniasis in Eastern Uzbekistan. *Parasites & Vectors* 2011; 4:58.

Lacher-JR TE, Mares MA, Alho CJR. The structure of a small mammal community in a central brazilian savanna, p.137-162. In: Redford, K. H. & Isenberg, J.F. (eds). *Advances in Neotropical Mammalogy. The Sandhill Crane Press, Inc., Gainesville, USA, 1989.*

Lainson R & Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil—a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2005; 100:811– 827.

Lainson R & Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Academic Press Inc. London 1987; 1:1-120.*

Bibliografia

Lainson R & Shaw, JJ. New World Leishmaniasis - Neotropical *Leishmania* species. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD, editores. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology. 9th ed. London/New York: Topley & Wilson; 1998; 241-268.

Lainson R & Shaw JJ. New World leishmaniasis. In: Cox, FEG, Kreier, JP, Wakelin D. (Eds.), Microbiology and Microbial Infections, *Parasitology. Topley & Wilson's Arnold, London/Sydney/Auckland* 2005; 313–349.

Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amaz Saude* 2010; 1(2):13-32.

Lara-Silva FO, Barata RA, Michalsky EM, Ferreira EC, Lopes MOG, Pinheiro AC, Fortes-Dias CL, Dias ES. *Rattus norvegicus* (Rodentia: Muridae) Infected by *Leishmania (Leishmania) infantum* (syn. *Le. chagasi*) in Brazil. *BioMed Research International* 2014; 2014, Article ID 592986.

Laurent T, Van der Auwera G, Hide M, Mertens P, Quispe-Tintaya W, Deborggraeve S, De Doncker S, Leclipteux T, Bañuls AL, Büscher P, Dujardin JC. Identification of Old World *Leishmania* spp. by specific polymerase chain reaction amplification of cysteine proteinase B genes and rapid dipstick detection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 63(2):173-181.

Lotwick HW & Silverman BW. "Methods for analysing spatial processes of several types of points", *Journal of the Royal Statistical Society* 1982; 44:406-413.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Serra CMB, Pereira AS, Figueiredo FB, Confort EM, Quintella LP, Marzochi MCA. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? *Parasitol Res* 2005; 97:73-76.

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

Bibliografia

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

Marcelino AP, Ferreira EC, Avendanha JS, Costa CF, Chiarelli D, Almeida G, Moreira EC, Leite RC, Reis JKP, Gontijo CMF. Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol* 2011; 183: 54-58.

Marcili A, Sperança MA, da Costa AP, Madeira MF, Soares HS, Sanches COCC, Acosta ICL, Giroto A, Minervino AHH, Horta MC, Shaw JJ, Gennari SM. Phylogenetic relationship of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania* (*L.*) *infantum chagasi* in South America. *Infection, Genetics and Evolution* 2014; 25:44-51.

Marcondes CB, Bittencourt IA, Stoco PH, Eger I, Grisard EC, Steindel M. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: *Psychodidae*, *Phlebotominae*) by *Leishmania* (*Viannia*) spp. in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103:1093-1097.

Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH, Pessanha JE, Dias ES. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis in Belo Horizonte municipality, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(1):31-38.

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

Margonari C, Menezes JA, Rocha MN, Maia KN, Oliveira ME, Fonseca AL, *et al.* Public knowledge about and detection of canine visceral leishmaniasis in urban Divinópolis, Brazil. *J. of Trop Med* 2012; e429586.

Margonari CS, Pessanha JE, Barata RA, Michalsky EM, Costa DC, Dias ES. Study of Phlebotomine Sand Fly (Diptera: *Psychodidae*) Fauna in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 99:795-803.

Bibliografia

Martins AV, Barretto MP, Brener Z, Pellegrino J. Observações preliminares sobre um foco de leishmaniose tegumentar americana em Minas Gerais. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 1956; 8(4):577-581.

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

Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. The Strange Case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today* 2000; 6(5):188-189.

Medronho RA. Epidemiologia. In: Distribuição das doenças no espaço e no tempo. Medronho RA. & Perez MA. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

Mendes WS, DA Silva AAM, Trovão JJ. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis, Maranhão, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2002; 35(3):227-231.

Mendes WS, DA Silva AAM, Trovão JJ. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis, Maranhão, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2002; 35(3):227-231.

Mestre GLC & Fontes CJF. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso, 1998-2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2007; 40:42-48.

Mestre GLC, Ribeiro ALM, Miyazaki RD, Rodrigues JSV, Almeida ABPF, Sousa VRF, Missawa NA. Phlebotomine sand flies and canine infection in areas of human visceral leishmaniasis, Cuiabá, Mato Grosso. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal 2011;20(3): 228-234.

Michalsky EM, Rocha MF, Lima ACVMR, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, 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. *Veterinary Parasitology* 2007; 147:67-76.

Bibliografia

Ministério da Saúde (MS). Fundação Nacional de Saúde. Manual de controle de roedores. Brasília, Brasil 2002. 132 p.

Ministério da Saúde (MS). Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, secretaria de vigilância em saúde, Brasília, Brasil 2006; 120p.

Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde (SMS). Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana, 2. Ed. Brasília: editora do ministério da saúde 2007; 180p.

Ministério da Saúde (MS). Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Nota técnica conjunta No. 01/2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil 2011.

Ministério da Saúde (MS). Leishmaniose Visceral. [online]. Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561> 2012.

Mohammad AO, Mohammad R, Mohammad RS, Fatemeh M, Sogra D. First report on isolation of *Leishmania tropica* from sandflies of a classical urban Cutaneous leishmaniasis focus in southern Iran. *Experimental Parasitology* 2010; 126(4):445-450.

Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andres M, Gonzales F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Méd Hyg* 1994; 88:491-493.

Monteiro SP, Lacerda MM, Arias JR. Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1994; 29:67-72.

Monteiro SP, Lacerda MM, Arias JR. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Ver da sociedade Brasileira de Méd Trop* 1994; 27:67-72.

Moshfe A, Mohebbali M, Edrissian G, Zarei Z, Akhoundi B, Kazemi B, Jamshidi S, Mahmoodi M. Canine visceral leishmaniasis: asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. *Acta Tropica* 2009; 112(2):101-105.

Bibliografia

Nascimento BW, Saraiva L, Teixeira-Neto RG, Meira PC, Sanguinette CC, Tonelli GB, Botelho HA, Belo VS, Silva ES, Gontijo CM, Filho JD. Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state – Brazil. *Acta Tropica* 2013; 125:262-268.

Nascimento MD, Costa JM, Fiori BI. The epidemiological determinant aspects in the maintenance of visceral leishmaniasis in the state of Maranhão, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1996; 29:233-240.

Nunes AG, Paula AG, Teodoro R. *et al.* Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana em Varzelândia, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Pública* 2006. 22(6):1343-1347.

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

Oliveira CL, Moraes MHF, Machado-Coelho GLL. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: Challenges for control. *Reports in Public health* 2008; 24(12):2953-2958.

Oliveira DM, Reinhold-Castro KR, Bernal MVZ, Legriffon CMO, Lonardoni MVC, Teodoro U, Silveira TGV. Natural Infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania (Viannia)* spp. in the State of Paraná, Southern Brazil, Detected by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Vector-borne and zoonotic diseases* 2011; 11(2): 137-143.

Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 129:219-227.

Orsini O. Aspectos epidemiológicos e clínicos da leishmaniose tegumentar americana no estado de Minas Gerais. *Anais da 1ª. Reunião anual dos dermatosifilógrafos brasileiros* 1940; 1:12-26.

Orsini O. Leishmaniose em Minas Gerais. *Brasil Médico* 1945; 54: 762-766.

Bibliografia

Otranto D & Dantas-Torres F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends in parasitology* 2013; 29(7):339-345.

Paglia AP, De-Marco-JR P, Costa FM, Pereira RF, Lessa G. Heterogeneidade estrutural e diversidade de pequenos mamíferos em um fragmento de mata secundária de Minas Gerais, Brasil. *Rev. Brás. Zool* 1995; 12:67-79.

Passos VMA, Falcão AL, Marzochi MCA, Gontijo CMF, Dias ES, Katz N. Epidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in a periurban area of Belo Horizonte, MG, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1993; 88:103-110.

Prado PF, Rocha MF, Sousa JF, 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. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2011; 44(5):561-566.

Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 2008; 321(5891):970-974.

Pita-Pereira D, Cardoso MA, Alves CR, Brazil RP, Britto C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using PCR multiplex assay. *Acta Trop* 2008; 107:66-69.

Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, *et al.* Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2011; 105: 579-585.

Rangel, EF & Lainson, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2009; 104(7):937-954.

Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. Mamíferos do Brasil, Londrina, Paraná 2006; 437p.

Bibliografia

Reithinger R & Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(4):530-541.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7(9):581-596.

Romero GA, Boleaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America – a systematic review. *Plos Negl. Trop. Dis* 2010; 4:e.584.

Roque, ALR & Jansen, AM. Hospedeiros e reservatórios de *Leishmania* sp. e sua importância na manutenção dos ciclos de transmissão nos ambientes silvestres e sinantrópicos. In: Conceição-Silva, F & Alves CR. (Orgs). Leishmanioses do Continente Americano. *Rio de Janeiro: Editora Fiocruz* 2014; p233-258.

Ross E. Notes on the bodies recently described by Leishmann and Donovan. *Britanic Medicine Journal* 1903; 2:1261-1262.

Sampaio RNR, Gonçalves MC, Leite VA, França BV, Santos G, Carvalho MSL, Taul PT. Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2009; 42(6):686-690.

Sánchez-García L, Berzunza-Cruz M, Becker-Fauser I, Rebollar-Téllez EA. Sand flies naturally infected by *Leishmania (L.) mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, México. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010; 104(6):406-411.

Saraiva L, Andrade-Filho JD, Falcão AL, Carvalho DAA, Souza CM, Freitas CR, Lopes CRG, Moreno EC, Melo MN. Phlebotominae fauna (Diptera: Phlebotomidae) in a urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: Characterization of favored locations determined by spatial analysis. *Acta tropica* 2013;117:137-145.

Schallig HDFH, Silva ES, Van-Der-Meide WF, Gontijo CMF. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potencial reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2007; 7(3):387-393.

Bibliografia

Seridi N, Amro A, Kuhls K, Belkaid M, Zidane C, Al-Jawabreh A, Schönian G. Genetic polymorphism of Algerian *Leishmania infantum* strains revealed by multilocus microsatellite analysis. *Microbes Infect.* 2008a; 10(12-13):1309-1315.

Seridi N, Belkaid M, Quispe-Tintaya W, Zidane C, Dujardin JC. Application of PCR-RFLP for the exploration of the molecular diversity of *Leishmania infantum* in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008b; 102(6):556-563.

Shaw J. The leishmaniasis – Survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2007; 102(5):541-547.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi JRG. Natural infections of the *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984; 79:515.

Silva ACT, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GAS. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop Med Internat Health* 2006; 9:1388-1398.

Silva ES, Gontijo CMF, Melo MN. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends in Parasitol* 2005; 21(12):550-552.

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. do Inst. Oswaldo Cruz* 2001; 93(3):285-291.

Silva ES, Pirmez C, Gontijo CMF, Fernandes O, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. *Veterinary Record* 2000; 147:421-422.

Souza AI, Barros EMS, Ishikawa E, Ilha IMN, Marin GRB, Nunes VLB. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 2005; 128(1-2):41-45.

Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2011; 105:1-6.

Bibliografia

Teekayuwat T, Pfeiffer DU, Hayes DP. Spatial clustering of bovine leukemia virus infection in New Zealand. In: Proceedings of the 9th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics. Breckenridge, Colorado, USA 2000; 526p.

Travi BL, Osorio Y, Guarín N, Cadena H. Leishmania (Leishmania) chagasi: clinical and parasitological observations in experimentally infected Didelphis marsupialis, reservoir of New World visceral leishmaniasis. Experimental parasitology 1998; 88:73-75.

Travi BL, Adler GH, Lozano M, Cadena H, Montoya-Lerma J. Impact of habitat degradation on phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forests in Northern Colombia. *J Med Entomol.* 2002; 39(3):451-456.

Truppel JH, Otomura F, Teodoro U, Massafra R, Costa-Ribeiro MCVd, *et al.* Can Equids Be a Reservoir of *Leishmania braziliensis* in Endemic Areas? PLoS ONE 2014; 9(4): e93731.

Vanzeli AC & Kanamura HY. Estudo de Fatores Socioambientais associados à ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no município de Ubatuba, SP, Brasil. *Rev Panam Infectol* 2007; 9(3):20-25.

Werneck GL, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. The urban spread of visceral leishmaniasis: clues from spatial analysis. *Epidemiology* 2002; 13(3):364-367.

Werneck GL. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. *Cad. Saúde Pública* 2010; 26(4):644-645.

World Health Organization (WHO). [online]. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/news/2011/vl-working-database/en/index.html>>. Genebra 2011.

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis burden and distribution [online]. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Genebra 2012.

Bibliografía

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis Fact sheet N°375, updated February 2013 [online]. Disponible em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Genebra 2014.