

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

**Ecoepidemiologia e Controle da Leishmaniose Visceral no município de Belo Horizonte  
(Minas Gerais, Brasil).**

**por**

**Fabiana de Oliveira Lara e Silva**

**Belo Horizonte**

**Julho/ 2015**

**TESE**

**DDIP-CPqRR**

**F. O. L. SILVA 2015**

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

**Ecoepidemiologia e Controle da Leishmaniose Visceral no município de Belo Horizonte  
(Minas Gerais, Brasil).**

**por**

**Fabiana de Oliveira Lara e Silva**

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

**Orientação: Dr. Edelberto Santos Dias**

**Coorientação: Dra. Érika Michalsky Monteiro**

**Belo Horizonte**

**Julho/ 2015**

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

S586e  
2015

Silva, Fabiana de Oliveira Lara e.

Ecoepidemiologia e Controle da Leishmaniose Visceral no município de Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil) / Fabiana de Oliveira Lara e Silva. – Belo Horizonte, 2015.

XIX, 152 f.: il.; 210 x 297mm.  
Bibliografia: f.: 132-171

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 Visceral/prevenção & controle 2. *Leishmania*/parasitologia 3. Psychodidae/parasitologia 4. Cães/parasitologia I. Título. II. Dias, Edelberto Santos (Orientação). III. Michalsky, Erika Monteiro (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

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

**Ecoepidemiologia e Controle da Leishmaniose Visceral no município de Belo Horizonte  
(Minas Gerais, Brasil).**

**por**

**Fabiana de Oliveira Lara e Silva**

**Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:**

**Prof. Dr. Edelberto Santos Dias (Presidente)**

**Prof. Dra. Elizabeth Ferreira Rangel**

**Prof. Dra. Vera Lucia Fonseca de Camargo-Neves**

**Prof. Dra. Danielle Ferreira de Magalhães**

**Prof. Dra. Patrícia Flávia Quaresma**

**Suplente: Prof. Dr. Edward José de Oliveira**

**Tese defendida e aprovada em: 06/07/2015**

**Dedico este trabalho às pessoas  
mais importantes da minha vida:  
meu querido esposo, Léo, meus  
pais, meus avós e meu irmão.**

## **Agradecimentos**

A Deus, por ter me guiado sempre para o caminho do bem, colocando anjos em minha vida com os quais esta caminhada foi mais amena. Por ter me dado força e determinação necessárias para seguir em frente, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu amado esposo Léo, meu companheiro de todas as horas, pelo apoio, carinho e compreensão durante toda esta caminhada, entendendo minhas ausências e me ajudando sempre com palavras de motivação amor. Por me fazer ser uma pessoa melhor a cada dia. Não há palavras que expressem a admiração e o amor que sinto; espero poder ser para você este porto seguro que você é para mim. Te amo!

À minha mãe, minha maior inspiração, maior exemplo, a você dedico tudo o que sou. Se hoje cheguei até aqui, devo ao seu esforço e ao seu estímulo. Por ser o motivo pelo qual eu continuo acreditando que vale a pena correr atrás dos meus sonhos. Obrigada por me acompanhar sempre, você é minha luz! “Foi você que me ensinou antes de ir... vou vivendo assim... conhecendo o coração que você fez pulsar em mim...”

Ao meu pai, por acreditar sempre em mim e me apoiar em todos os momentos. Por entender minha ausência e ter sempre palavras de carinho e conforto. Você é meu exemplo de ser humano, de bondade e caridade, com as pessoas e os animais... admiro muito seu coração puro. Obrigada por ter investido em mim, acreditando nos meus sonhos... espero te dar todo o retorno que merece. Amo você!

Ao meu irmão, meu melhor amigo! Por ser paciente comigo, sempre me ouvir sem julgamentos, e por me aconselhar. Te admiro muito pelo homem íntegro que você se tornou, meu exemplo de fortaleza e superação. Você é minha inspiração para seguir em frente quando me sinto desanimada. Te amo muito!

Aos meus avós, pelo amor incondicional, a vocês devo grande parte do que sou. Vocês são meus exemplos de dignidade e caráter, luta e vitória. Obrigada por sempre acreditarem em mim e não medir esforços para me ver feliz. Agradeço a Deus pela vida de vocês e por serem tão perfeitos, me espelho na felicidade e no amor de vocês. Obrigada por tudo! Amo vocês!

À minha família, por ser meu esteio, meu pilar. Pela união, amor e incentivo, sem os quais seria difícil chegar até aqui. Em especial à Tinonon, meu exemplo de profissional e pessoa, pela motivação, conselhos e por todo o carinho. Palavras não cabem para expressar meu amor.

Ao Edelberto, por ter me aceitado no laboratório e ter acompanhado meu crescimento até aqui, pela confiança em mim depositada. Pelo exemplo de profissional e de pessoa, sempre pronto a ajudar a todos. Pela compreensão em todos os momentos e pelo estímulo para seguir carreira no CPqRR.

À Érika, pela amizade, por sempre ter acreditado em mim e ser minha maior incentivadora. Sempre de prontidão para auxiliar a todos que necessitam da sua ajuda. Você merece tudo que está colhendo, você mostrou seu potencial. Te admiro muito pela pessoa que é, pela profissional brilhante e só tenho a agradecer pelo estímulo constante em toda a minha caminhada até aqui.

À Consuelo, pessoa maravilhosa que tive o prazer de conviver mais de perto, obrigada pelos ensinamentos que levarei para a vida toda. Exemplo de dedicação e inteligência. Admiro muito seu profissionalismo e a maneira como você conduz as coisas. Admiro a pessoa que você é e só tenho a agradecer pelo privilégio de poder contar com sua colaboração.

Aos veterinários Shara Regina e João Carlos, pela enorme colaboração na necrópsia dos animais e Ana Cristina e Daniel pela colaboração na realização dos exames parasitológicos.

Aos queridos amigos do LALEI: Maiara, por todo o tempo de convivência na colônia, obrigada não só pela enorme ajuda, mas pela companhia, que sempre alegrou e alegrou meus dias. Sou muito grata pelo apoio e carinho! Fabi Paixão, obrigada por nunca me negar qualquer ajuda, você é muito prestativa e sei que sempre posso contar com você. Pelas boas risadas e “causos” que me distraem e me alegam. Jose, por ter me ensinado tudo sobre a criação de flebotomíneos, obrigada por sempre compartilhar comigo suas experiências, por ser tão prestativa e pelas palavras de carinho. Jeiza, Andreza, Lívia e Nathália: Meninas, vocês são anjos enviados de Deus, torço muito para que cresçam como profissionais e pessoas, seja no laboratório ou fora de lá. Fico feliz se eu puder ter alguma contribuição para a formação de vocês. Vocês têm muito potencial. Obrigada pela super ajuda no dia a dia.

Rosana, por ser este doce de pessoa, você é muito especial. Pelas conversas e troca de experiências. Você tem muito potencial! Shara, agradeço por compartilhar sua enorme experiência comigo e por todo o carinho e conforto das suas palavras, principalmente quando me sinto desanimada. Te admiro muito pela pessoa e profissional que é. Elisa, Lise, Tina e Ju: obrigada pela convivência tão agradável do dia a dia, pelos papos, pelo incentivo e pela amizade. Com vocês meus dias são mais felizes. Cris, Agnes, Jê, Lara, Taís, Gabi, Du, Paty e Rafael: obrigada pelas risadas e por terem sempre palavras de carinho. Tenho uma admiração especial por cada um de vocês. Thaís, Ailton, Kelly, Juliana e Jéssica: agradeço a cada um de vocês, sem vocês não seria possível realizar todas as atividades propostas no projeto. Obrigada por tudo! Aos demais amigos do CPqRR, que contribuíram muito para meu crescimento pessoal e profissional.

A todos os colaboradores da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte, na pessoa de Vanessa Fiúza, pelo enorme auxílio na execução do projeto e no fornecimento de dados relativos à Leishmaniose no município. Sem o serviço, seria impossível realizarmos um projeto deste porte e tão importante, por isso a união entre pesquisa e serviço se faz tão necessária. Obrigada pela colaboração.

Aos demais colaboradores do projeto, pela enorme contribuição dada na execução e na finalização do trabalho.

Aos moradores das residências de estudo do Salgado Filho e Miramar, por nos receberem bem e entenderem a importância deste trabalho para a promoção da saúde e bem-estar da população.

Ao melhor amigo do homem, por contribuir nos estudos da LV, precisando para isso, terem suas vidas sacrificadas em prol da ciência.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa (Fapemig) e Secretaria Estadual de Saúde (SES/MG) pelo financiamento do projeto no PPSUS – EFP\_00001429

## Sumário

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>XV</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIX</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
1.1 AS LEISHMANIOSES .....	20
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>24</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>25</b>
3.1 A LEISHMANIOSE VISCERAL .....	25
3.1.1 <i>O parasito.....</i>	29
3.1.2 <i>Biologia e ecologia de flebotomíneos: Lu. longipalpis.....</i>	31
3.1.3 <i>Influência das variáveis climáticas sobre os flebotomíneos.....</i>	35
3.1.4 <i>Reservatórios.....</i>	37
3.2 A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA .....	38
3.2.1 <i>Diagnóstico da LVC.....</i>	41
3.3 A UTILIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA SPP. ....	44
3.4 A LEISHMANIOSE VISCERAL EM BELO HORIZONTE .....	45
3.5 AÇÕES DE CONTROLE PARA A LEISHMANIOSE VISCERAL .....	52
3.5.1 <i>Controle químico.....</i>	56
3.5.2 <i>Educação e Manejo Ambiental .....</i>	58
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>61</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	61
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	61
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>62</b>
5.1 ÁREA DE ESTUDO .....	62
5.2 ESTUDO DE FLEBOTOMÍNEOS .....	63
5.2.1 <i>Captura de flebotomíneos .....</i>	63
5.2.2 <i>Preparo, montagem e identificação de flebotomíneos.....</i>	64
5.2.3 <i>Influência das variáveis climáticas no número mensal de flebotomíneos.....</i>	65
5.2.4 <i>Extração de DNA das fêmeas capturadas para detecção de infecção natural.....</i>	65
5.2.5 <i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de gene constitutivo de flebotomíneo (cacofonia).....</i>	65
5.2.6 <i>Detecção de infecção natural de flebotomíneos por Leishmania spp.....</i>	66
5.2.7 <i>Análise dos produtos amplificados pela PCR.....</i>	67
5.2.8 <i>Sequenciamento para determinação da espécie de Leishmania spp. ....</i>	67
5.2.9 <i>Cálculo da taxa mínima de infecção natural.....</i>	68
5.2.10 <i>Controle Químico e Manejo Ambiental.....</i>	68

5.2.11	<i>Análise estatística</i> .....	69
5.3	ESTUDO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES .....	70
5.3.1	<i>Procedimentos éticos</i> .....	70
5.3.2	<i>Coleta das amostras para o diagnóstico sorológico</i> .....	71
5.3.3	<i>Necrópsia dos cães soropositivos e coleta das amostras biológicas</i> .....	72
5.3.4	<i>Isolamento e manutenção das cepas de Leishmania spp.</i> .....	73
5.3.5	<i>Pesquisa dos parasitos em esfregaços corados</i> .....	73
5.3.6	<i>Extração de DNA de tecidos e medula óssea</i> .....	73
5.3.7	<i>Diagnóstico molecular (Reação em Cadeia da Polimerase)</i> .....	73
5.3.8	<i>Análise estatística</i> .....	74
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>75</b>
6.1	FLEBOTOMÍNEOS.....	75
6.1.1	<i>Fauna</i> .....	75
6.1.2	<i>Influência das variáveis climáticas na população de flebotomíneos</i> .....	78
6.1.3	<i>Deteção de DNA de Leishmania spp.</i> .....	79
6.1.4	<i>Controle Químico e Manejo Ambiental</i> .....	81
6.2	CÃES.....	84
6.2.1	<i>Determinação da taxa de soropositividade canina</i> .....	84
6.2.2	<i>Pesquisa direta e indireta do parasito</i> .....	85
6.2.3	<i>Comparação entre os testes diagnósticos</i> .....	88
6.2.4	<i>Deteção de DNA de Leishmania spp. pela LnPCR</i> .....	92
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>107</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>109</b>
9.1	DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE LVH NOS CS MIRAMAR E SALGADO FILHO E NOS CS VIZINHOS, NOS ANOS DE 2008 A 2013, MUNICÍPIO DE BELO HORIZONTE. ....	109
9.2	DISTRIBUIÇÃO DAS ARMADILHAS PARA CAPTURA DE FLEBOTOMÍNEOS NOS TRECHOS CONTROLE, MANEJO E BORRIFAÇÃO DOS CS MIRAMAR E SALGADO FILHO, MUNICÍPIO DE BELO HORIZONTE. ....	111
9.3	INQUÉRITO CANINO CENSITÁRIO REALIZADO NOS TRECHOS DO ESTUDO NO CS MIRAMAR, MUNICÍPIO DE BELO HORIZONTE, NOS ANOS DE 2010, 2011 E 2012. ....	112
9.4	INQUÉRITO CANINO CENSITÁRIO REALIZADO NOS TRECHOS DO ESTUDO NO CS SALGADO FILHO, MUNICÍPIO DE BELO HORIZONTE, NOS ANOS DE 2010, 2011 E 2012. ....	115
9.5	FICHA CLÍNICA DOS CÃES SOROPOSITIVOS DOS CS MIRAMAR E SALGADO FILHO SELECIONADOS PARA NECRÓPSIA .....	118
9.6	BANCO DE DADOS DOS CÃES DOS CS MIRAMAR E SALGADO FILHO.....	121
9.7	ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DAS AMOSTRAS POSITIVAS DE <i>LU. LONGIPALPIS</i> E DOS CÃES COM AS SEQUÊNCIAS DE <i>LEISHMANIA</i> DEPOSITADAS NO GEN BANK .....	122
9.8	ARTIGO CIENTÍFICO: “EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF VECTOR, PARASITE AND DOMESTIC RESERVOIR IN AREAS OF RECENT TRANSMISSION AND NO REPORTED HUMAN CASES OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN BRAZIL” .....	123
<b>10</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>132</b>

## Lista de Figuras

- Figura 1** - Mapa da dispersão da leishmaniose visceral humana (LVH) no município de Belo Horizonte, de 2001 a 2012. .... 47
- Figura 2** - Série histórica da LVH no município de Belo Horizonte, de 1994 a 2014 ..... 48
- Figura 3** - Percentual de positividade da LVC em Belo Horizonte, período de 1996 a 2014. 48
- Figura 4** - Expansão dos inquéritos caninos censitários no município de Belo Horizonte, período 2006 a 2012..... 50
- Figura 5** - Mapa da evolução dos níveis de transmissão de LVH, segundo taxa de incidência acumulada (100.000 habitantes), do município de Belo Horizonte, no período de 2002 a 2008..... 51
- Figura 6** - Mapa da estratificação das áreas de abrangência segundo o risco de leishmaniose visceral humana (LVH) no município de Belo Horizonte, nos triênios 2010-2012 e 2011-2013..... 52
- Figura 7**- Mapa do município de Belo Horizonte e os distritos do estudo com seus respectivos Centros de Saúde: Oeste (A- Salgado Filho) e Barreiro (B- Miramar), e pontos de captura de flebotômíneos nos trechos do estudo: controle, borrifação e manejo. .... 63
- Figura 8**- Porcentagem de *Lu. longipalpis* em relação às demais espécies capturadas, utilizando armadilha luminosa HP, nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012. .... 76
- Figura 9**- Porcentagem de *Lu. longipalpis* em relação ao comportamento (endofilia e exofilia) capturadas utilizando armadilha luminosa HP nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012. .... 76
- Figura 10**- Índice pluviométrico total no período de setembro/2009 a agosto/2012 nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012. .... 78
- Figura 11**- Índice pluviométrico e flutuação populacional de *Lu. longipalpis* no período de setembro/2010 a agosto/2012 nas áreas de abrangência estudadas, nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil..... 79
- Figura 12**- Produtos de amplificação de DNA de flebotômíneos obtidos com iniciadores para o gene da cacofonia, visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio. Canaletas: M- Marcador de peso molecular 100 pb; Amostras: 1 a 22. Controle Positivo da Reação (*Lu. longipalpis*). CN: Controle Negativo a Reação (sem DNA)..... 80
- Figura 13**- Exemplo de produtos de amplificação de DNA de flebotômíneos obtidos com iniciadores para o gênero *Leishmania* (SSUrRNA), visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio. Canaletas: M- Marcador de peso molecular 100 pb; Amostras: 1 a 18; CP- Controle Positivo da Reação (*Le. braziliensis*/M2903); CN- Controle Negativo da Reação (sem DNA). .... 81

- Figura 14-** Gráfico referente aos meses dos trechos controle, borrifação e manejo, nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012. .... 82
- Figura 15-** Gráfico referente aos trechos controle, pré-tratamento e pós-tratamento (borrifação e manejo ambiental), nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012. .... 83
- Figura 16-** Distribuição da frequência absoluta do teste de PCR por tecido, de acordo com o grupo clínico. O estudo foi desenvolvido nos CS Miramar e Salgado Filho, município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012. .... 87
- Figura 17-** Frequência cumulativa absoluta dos testes molecular, técnica de aposição em lâmina e mielocultura em cães soropositivos (RIFI/ELISA) para LV, de acordo com o grupo clínico. O estudo foi desenvolvido nos CS Miramar e Salgado Filho, município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012. .... 88
- Figura 18-** Número de diagnósticos positivos de acordo com o grupo clínico de cães soropositivos (RIFI/ELISA) para LV. O estudo foi desenvolvido nos CS Miramar e Salgado Filho, município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012. .... 89
- Figura 19-** Comparação entre testes diagnósticos de cães sintomáticos e assintomáticos dos CS Miramar e Salgado Filho, Belo Horizonte, 2010 a 2012. .... 90
- Figura 20-** Frequência de sinais clínicos sugestivos entre cães sintomáticos dos CS Miramar e Salgado Filho, Belo Horizonte, 2010 a 2012. .... 91
- Figura 21-** Produtos de amplificação de amostras de baço obtidas de cães necropsiados utilizando-se iniciadores para o gênero *Leishmania* visualizados em gel de agarose 2% corado por brometo de etídio. M: marcador de peso molecular (100pb). 1 a 51: amostras de baço. CP: Controle Positivo (*Le. braziliensis*/M2903); CN: Controle Negativo (sem DNA). .... 92

## Lista de Tabelas

- Tabela 1-** Estratificação das áreas de risco segundo taxa de incidência acumulada de casos por regional, do município de Belo Horizonte, no período de 2007 a 2009..... 51
- Tabela 2 -** Flebotomíneos capturados, utilizando armadilha luminosa HP, nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012..... 75
- Tabela 3 -**Número de *Lu. longipalpis* capturados, utilizando armadilha luminosa HP, de acordo com o sexo, nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012..... 76
- Tabela 4 -** Número mensal de *Lu. longipalpis*, capturados utilizando armadilha luminosa HP, nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012..... 77
- Tabela 5 -** Espécies de flebotomíneos capturados para detecção de DNA de *Leishmania* spp., nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012..... 81
- Tabela 6 -** Inquérito canino realizado em cães domiciliados dos CS Miramar e Salgado Filho, município de Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012..... 84
- Tabela 7 -** Tabela de contingência das co-positividades (sensibilidade relativa) de testes diagnósticos de LVC. A referência foi o resultado RIFI/ELISA, adotado pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde, no período do estudo. .... 85
- Tabela 8–** Tabela de contingência das co-positividades de testes diagnósticos de LVC de acordo com o grupo clínico. A referência foi o resultado RIFI/ELISA, adotado pelo Ministério da Saúde no período do estudo (2010-2012). A *Ln*PCR para o baço, apresentou 100% de co-positividade em ambos os casos, e não foi incluído..... 86

## Lista de abreviaturas e símbolos

AA: Áreas de Abrangência  
ACE: Agentes de Combate a Endemias  
BDMEP: Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa  
CCZ: Centro de Controle de Zoonoses  
CN: Controle Negativo  
CP: Controle Positivo  
CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou  
CS: Centros de Saúde  
DAT: Teste de Aglutinação Direta  
dATP: Desoxiadenosina trifosfato  
dCTP: Desoxicitosina trifosfato  
dGTP: Desoxiguanina trifosfato  
DMSO: Dimetilsufóxido  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
DPP: Dual Path Platform  
DS: Distritos Sanitários  
dTTP: Desoxitimina trifosfato  
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético  
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay  
FC: Fixação do Complemento  
FIOCRUZ: Fundação Instituto Oswaldo Cruz  
GECOZ- Gerência de Controle de Zoonoses  
GEEPI- Gerência de Epidemiologia e Informação  
GPS: Global Positioning System  
HA: Hemaglutinação Direta  
HAI: Hemaglutinação Indireta  
HP: Hoover Pugedo  
HSP70: Heat Shock Protein 70  
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IDH: Índice de Desenvolvimento Humano  
INCT: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia  
INMET: Instituto Nacional de Meteorologia  
ITS1: Internal Transcribed Spacer 1

KCl: Cloreto de Potássio  
kDNA: DNA do cinetoplasto  
LC: Leishmaniose cutânea  
LCD: Leishmaniose cutânea difusa  
LCM: Leishmaniose cutâneo-mucosa  
Ln-PCR: *Leishmania* nested Polymerase chain reaction  
LT: Leishmaniose Tegumentar  
LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana  
LV: Leishmaniose Visceral  
LVA: Leishmaniose Visceral Americana  
LVC: Leishmaniose Visceral Canina  
LVH: Leishmaniose Visceral Humana  
LZOON: Laboratório de Zoonoses  
MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de Magnésio  
MS- Ministério da Saúde  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
PAHO: Pan American Health Organization  
PB: Pares de base  
PBH: Prefeitura de Belo Horizonte  
PBS: Tampão Fosfato Salínico  
PCLV: Programa de Controle da Leishmaniose Visceral  
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase  
PIB: Produto Interno Bruto  
PM: Peso Molecular  
PNUD: Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento  
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA  
RFC: Reação de Fixação do Complemento  
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism  
RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta  
RMBH: Região Metropolitana de Belo Horizonte  
SFM: Sistema mononuclear fagocítico  
SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação  
SLU: Superintendência de Limpeza Urbana  
SMSA: Secretaria Municipal de Saúde  
SSUrRNA: Small Subunit Ribosomal RNA

SVS: Secretaria de Vigilância em Saúde

TBE: Tris-Borate-EDTA

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

WHO: World Health Organization

## RESUMO

Este estudo foi realizado em Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil), área endêmica para Leishmaniose visceral (LV), onde a doença vem se expandindo rapidamente, com 1.612 casos registrados nos últimos 10 anos. Nossa pesquisa avaliou o perfil epidemiológico em duas Áreas de abrangência (AA) dos Centros de Saúde (CS) Miramar e Salgado Filho do município de Belo Horizonte, com transmissão recente de LV, buscando compreender a tríade envolvida na transmissão: parasito-vetor-reservatório. Cada AA foi dividida em três trechos, controle, borrifação e manejo, a fim de avaliar o impacto das medidas de controle no número mensal de *Lutzomyia longipalpis*, através da curva flebotômica. Em todos os trechos a captura de flebotômicos e o inquérito canino censitário foram realizados. Durante 24 meses (setembro/2010 a agosto/2012) foram capturados 5194 flebotômicos, distribuídos em 6 espécies, sendo *Lu. longipalpis*, vetora da LV, a espécie predominante (96,54%). Houve uma correlação entre a precipitação pluviométrica e o número de *Lu. longipalpis* capturados, mostrando que o número de espécimes de flebotômicos capturados aumentou após o período chuvoso. Através do uso da *Leishmania* Nested PCR e sequenciamento, foram analisados 93 “pools” espécie-específicos. *Leishmania infantum* e *Le. braziliensis* foram encontradas em 23 e em 2 dos 26 “pools” de *Lu. longipalpis*, respectivamente. O DNA de *Le. infantum* foi encontrado em um “pool” de cada uma das espécies *Lu. lloydi* e complexo *cortelezzii*. A taxa mínima de infecção natural de flebotômicos na área foi alta, 18,8% para *Lu. Longipalpis*, 20% para complexo *cortelezzii* e 100% para *Lu. lloydi*. Em relação às medidas de controle, observamos uma redução estatisticamente significativa no número de flebotômicos no trecho manejo ambiental, enquanto houve apenas uma tendência de queda no número de flebotômicos no trecho borrifação. Em relação ao reservatório doméstico, um total de 1408 cães foram examinados em 2011 através de testes sorológicos; 3,6% apresentaram-se soropositivos para LV canina (LVC). Biópsias de linfonodo, pele, baço e aspirado de medula óssea destes animais foram obtidos e analisados através do diagnóstico parasitológico e molecular. A positividade tanto para mielocultura como para o técnica de aposição em lâmina foi de 72.5%. Todas as amostras de baço mostraram-se positivas para *LnPCR*, indicando a presença de *Le. infantum* nas 51 amostras. O linfonodo foi o tecido menos sensível na PCR (57%) em relação aos demais. Cães sintomáticos demonstraram uma tendência a ter mais testes positivos. Nossos resultados mostram que as interfaces parasito-vetor e parasito-reservatório são ativas em áreas de médio risco para transmissão de LV, e que ações eficazes e rápidas devem ser implementadas para controlar a expansão da doença.

## ABSTRACT

This study was conducted in Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil), an endemic area for visceral leishmaniasis (VL), where the disease has been expanding rapidly, with 1,612 cases recorded in the last 10 years. Our research assessed the epidemiological profile in two coverage areas (AA) of the Miramar and Salgado Filho Health Centers (HC) in the city of Belo Horizonte, with recent transmission of VL, willing to understand the triad involved in the transmission: parasite-vector-reservoir. Each AA was divided into three sections, control, spraying and management in order to assess the impact of control measures in the monthly number of *Lutzomyia longipalpis* through the sand fly curve. In all the sections, the capture of sand flies and canine census survey was conducted. For 24 months (from September / 2010 to August / 2012), 5194 sandflies were captured and distributed into 6 species. *Lu. longipalpis*, vector of LV, was the predominant species (96.54%). There was a correlation between the precipitation and the number of *Lu. longipalpis* captured, showing that the number of captured sandflies of specimens increased after the rainy season. With the use of *Leishmania* nested PCR and sequencing, 93 species-specific "pools" were analyzed. Out of the 26 *Lu. longipalpis* positive "pools", *Leishmania infantum* was found in 23 while *Le. braziliensis* was found in 2. *Le. infantum* DNA was found in a "pool" of each species *Lu. lloydi* and *cortezzi* complex. The sand flies natural infection minimum rate in the area was high, 18.8% for *Lu. Longipalpis*, 20% for *cortezzi* complex and 100% for *Lu. lloydi*. Regarding control measures, we observed a statistically significant reduction in the number of sand flies in the environmental management section, while there was only a decreasing trend in the sand flies number in the spraying section. Concerning the domestic reservoir, 1408 dogs were examined in 2011 by serological tests; 3.6% were positive for canine visceral leishmaniasis (CVL). Lymph node biopsies, skin, spleen and bone marrow aspirate were obtained from these animals and analyzed using parasitological and molecular diagnosis. Positivity for both mielocultura as "imprint" was 72.5%. All spleen samples were positive for *Ln*PCR, indicating the presence of *Le. infantum* in 51 samples. The lymph node was the least sensitive tissue in the PCR (57%), in relation to the others. Symptomatic dogs showed a tendency to have results that are more positive on the tests. Our results show that the vector-parasite and parasite reservoir interfaces are active in areas of medium risk of VL transmission, and rapid and effective actions must be implemented to control the spread of the disease.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 As leishmanioses

As leishmanioses são consideradas de grande interesse na saúde pública mundial, com ampla distribuição geográfica, representando um complexo de doenças de caráter crônico, com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (Brasil, 2007). Sua importância levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a incluí-la entre as 6 doenças consideradas prioritárias em seu programa de controle (WHO, 1990), sendo considerada endêmica em 98 países em 5 continentes (Alvar *et al.*, 2012). De acordo com dados epidemiológicos, demográficos e o impacto da doença, o Ministério da Saúde (MS) a considera entre as sete doenças com prioridade de atuação que compõem o programa de doenças negligenciadas (MS, 2010).

Podem apresentar diversas formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da susceptibilidade do hospedeiro (Saravia *et al.*, 1989): leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT); esta última que se classifica de acordo com a manifestação clínica das lesões em leishmaniose muco-cutânea (LMC), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose cutânea (LC) (Desjeux, 2004).

Estima-se que ocorram anualmente 200 a 400 mil casos de LV e 700 mil a 1,2 milhões de LT, com 20 a 30 mil mortes neste período, o que a coloca como uma das cinco doenças infectoparasitárias e endêmicas de maior relevância. Em relação à LV, 90% dos casos ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Índia, Sudão, Sudão do Sul e Etiópia (Alvar *et al.*, 2012; WHO, 2014 a). Nas Américas ocorre desde o México até a Argentina, sendo que entre os anos de 2001 a 2011 foram notificados 38.808 casos, embora o Brasil seja o país com o maior número de casos (96,6%). Em um levantamento realizado em 2011, a maioria dos casos foram relatados em homens (61%), sendo a faixa etária mais afetada as crianças abaixo de 5 anos de idade (36,6%), seguida pela faixa entre 20 a 50 anos (30,9%) (PAHO, 2013).

A LT é mais amplamente distribuída, e cerca de um terço dos casos ocorrem nas Américas, bacia do Mediterrâneo e Ásia Ocidental (do Oriente Médio à Ásia Central) (Alvar *et al.*, 2012; WHO 2014 a). No continente americano sua distribuição vai desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina. Três países, Brasil, com 270.572 casos (42,36%), Colômbia, com 128.535 casos (20,08%) e Peru, com 85.410 casos (13,37%), contribuem com 75,8% dos casos de leishmaniose cutânea e mucosa notificados nas Américas de 2001 a 2011. Em 2011, dos 52.600 casos com informações clínicas disponíveis, 95,7% correspondiam à

forma cutânea da doença sendo que 70% dos acometidos foram homens, na faixa etária de 10 a 50 anos (PAHO, 2013).

Durante os últimos 10 anos, houve uma expansão das áreas endêmicas e um forte aumento no número de casos registrados da doença. Além disto, um número substancial de casos não é registrado, sendo a notificação obrigatória em apenas 32 dos países afetados. Assim, do total de casos estimados anualmente, somente 600 mil são oficialmente notificados, o que demonstra uma elevada taxa de sub-notificação (WHO, 2014 b).

Nas Américas, as duas formas básicas que a doença se apresenta são a LVA (leishmaniose visceral americana), mais grave e fatal em quase todos os casos, se não tratada; e a LTA (leishmaniose tegumentar americana), que apresenta forte tendência de resolução espontânea, mas causa um importante estigma social e psicológico (WHO, 2007). Dentro do amplo espectro de lesões que a LTA produz, a LC representa a manifestação clínica mais frequente, que se caracteriza pela presença de lesões exclusivamente na pele, que se iniciam no ponto de inoculação do parasito pelo vetor (Gontijo & Carvalho, 2003; Brasil, 2007). Atualmente o Brasil é o país com a mais alta prevalência de LTA em que o parasito *Leishmania braziliensis* é o agente etiológico principal (Marzochi, 2001).

Atualmente são conhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* que causam a doença humana, sendo já identificadas no Brasil 7 espécies. As três principais são: *Leishmania (Le.) amazonensis*, *Le. (V.) guyanensis* e *Le. (V.) braziliensis*. As espécies *Le. (V.) lainsoni*, *Le. (V.) naiffi*, *Le. (V.) lindenberg* e *Le. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões norte e nordeste. Em relação aos vetores, no Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei* e *Lu. migonei* (Brasil, 2007). A respeito dos hospedeiros e possíveis reservatórios naturais da doença, já foram descritos algumas espécies de roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres (Brasil, 2009).

O agente etiológico da LVA é a espécie *Le. infantum*, e no Brasil, os vetores relacionados com a transmissão da doença são *Lu. longipalpis* (Deane & Deane, 1962; Grimaldi *et al.*, 1989) e *Lu. cruzi* (Galati *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 1998) Diversos grupos de mamíferos atuam como hospedeiros, dentre eles canídeos, marsupiais e roedores (Shaw, 2002). Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é considerado a principal fonte de infecção para os vetores (Ashford *et al.*, 1998; Dantas- Torres *et al.*, 2007).

As leishmanioses encontram-se em fase de franca expansão geográfica. Análises de estudos epidemiológicos realizados nas últimas décadas demonstram mudanças no perfil de transmissão da doença, que antes era considerada uma zoonose de animais silvestres e agora está presente em zonas rurais desmatadas e regiões urbanas. Destaca-se a crescente

urbanização da LV, principalmente para grandes centros urbanos (Brasil, 2009). Pode-se explicar a maior ocorrência de surtos urbanos de leishmaniose, se comparada a outras parasitoses, pela sua capacidade de acelerada expansão quando introduzida em área não endêmica (Wijeyaratne *et al.*, 1994).

Do ponto de vista epidemiológico, diversos fatores contribuem para a modificação na distribuição da doença, como a invasão de focos zoonóticos pelo homem, a adaptação de hospedeiros e vetores, transmissão da infecção para o homem e animais domésticos, mudanças na susceptibilidade do homem à infecção, associado às mudanças ambientais. Estas características confirmam que as leishmanioses representam um modelo de doença reemergente (Ashford, 2000).

O crescimento desordenado das cidades, que culmina na destruição do meio ambiente, com aumento da crise social, tem sido apontado como principal fator causador das condições adequadas para ocorrência da leishmaniose visceral humana (LVH) na área urbana (Funasa, 2002). Além do mais, a identificação da doença nos centros urbanos é frequentemente postergada, devido à carência de informação e treinamento adequados para os profissionais da saúde.

Apesar do grande esforço realizado na execução das medidas tradicionais de controle, a doença vem se expandindo de forma muito rápida. Estas ações sistematizadas apresentam resultados satisfatórios se integradas e mantidas durante longos períodos de tempo, e mesmo assim, é frequente a reativação dos focos. Além disso, outras variáveis não estão sendo consideradas no processo de transmissão do parasito e conseqüentemente, no planejamento das ações de controle das leishmanioses. A existência de um número variado de espécies de *Leishmania*, o aumento persistente do número de casos humanos de leishmanioses tegumentar e visceral, além da colonização em áreas recentes e antigas, tem levado os órgãos competentes à adoção de diferentes estratégias no controle das leishmanioses em nosso país (Marzochi & Marzochi, 1994). As medidas gerais de controle devido a sua enorme complexidade devem ser divididas em várias frentes de ações relacionadas, especificamente, com os humanos, com o inseto vetor e com os reservatórios domésticos e silvestres. Desta forma, as características peculiares de cada elemento da cadeia de transmissão aliadas à variedade de situações epidemiológicas, têm mostrado que estratégias de controle devem ser flexíveis e designadas, especialmente, para cada área endêmica (Marzochi, 1992).

A complexidade do controle é mais evidente quando consideramos que existem lacunas no conhecimento sobre cada aspecto estudado, incluindo a distribuição geográfica do parasito, insetos vetores, fontes de infecção, fatores históricos e socioeconômicos, integração dos

serviços de saúde, técnicas utilizadas para o diagnóstico, tratamento e imunoprofilaxia (Gontijo & Melo, 2004).

Considerando os desafios do controle da LV e sua expansão para grandes centros urbanos, buscou-se avaliar a efetividade das ações de controle vetorial para LV associada à eliminação de cães soropositivos em trechos de dois distritos de Belo Horizonte, caracterizados como médio risco de transmissão de LV, sendo analisados os períodos antes e após a realização das medidas de controle, tendo como indicador o número mensal de flebotomíneos. Além disto, buscou-se avaliar os aspectos epidemiológicos em área de transmissão recente da LVH, com o objetivo de fornecer dados relacionados à tríade epidemiológica de transmissão da doença nessas áreas estudadas, podendo sugerir ações que irão auxiliar na escolha das medidas de controle da doença mais adequadas à situação atual.

## 2 JUSTIFICATIVA

A rápida expansão geográfica e a urbanização da LV traz a necessidade de estabelecer medidas mais efetivas para o seu controle. Até o momento, poucos estudos realizados no Brasil, abrangem toda a cadeia epidemiológica da LV, apesar de existirem alguns que abordam detalhadamente todo o ciclo de transmissão, mas foram publicados nas últimas décadas e podem não mais refletir a situação atual da LV. Além disto, a maioria dos estudos são realizados em áreas endêmicas, portanto não consideram áreas de transmissão recente, consideradas de baixa e média transmissão.

De acordo com o Ministério da Saúde, o município de Belo Horizonte, como um todo, é classificado como região de transmissão intensa de LV, representando bem o processo de urbanização da doença. O risco de transmissão não é homogeneamente distribuído no município, incluindo distritos de baixo a alto risco de transmissão. O município de Belo Horizonte, com o propósito de adequação às orientações do PCLV, realizou a estratificação das áreas a serem cobertas no município considerando a incidência acumulada de casos humanos, além de informações sobre a infecção canina e a situação ambiental em cada área. Apesar de Belo Horizonte ter um programa de controle bem estabelecido para LV com ações sistemáticas, como a eliminação de cães soropositivos, diagnóstico precoce e tratamento de casos humanos, e controle químico dos vetores, a incidência da doença vem aumentando ao longo dos anos, atingindo altas taxas de letalidade humana. O número de casos humanos aumentou 41% nos dois últimos quinquênios (2001 a 2005 e 2006 a 2010) avaliados. A prevalência da leishmaniose visceral canina (LVC) permaneceu em torno de 8% no mesmo período.

Neste trabalho, a atual cadeia de transmissão da LV (parasito, vetor e reservatório canino) foi avaliada a fim de traçar um perfil epidemiológico de transmissão da LV nas áreas do estudo.

Assim, tornam-se fundamentais os estudos que possam contribuir para avaliar o impacto das ações de controle implementadas no município (identificação e eliminação dos reservatórios, controle químico do vetor, manejo ambiental e educação em saúde). Além disto, as medidas de controle foram avaliadas em dois distritos de Belo Horizonte (Oeste e Barreiro), que se caracterizam por um perfil de transmissão recente, portanto, sofreram menos interferência das ações de controle.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 A Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral é uma antropozoonose crônica, causada por um protozoário intracelular do gênero *Leishmania*, cuja transmissão ocorre pela picada do vetor flebotomíneo (Cortes *et al.*, 2012) e se não tratada, pode evoluir para a morte (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006).

As primeiras observações da doença foram descritas por Cunningham (1885), na Índia, em indivíduos acometidos pelo calazar e somente alguns anos mais tarde o agente etiológico da doença foi descoberto e descrito por Leishman e Donovan (1903). Leishman descreveu o parasito, mas associando-o às formas de *Trypanosoma* (Leishman, 1903). Charles Donovan encontrou o parasito em baço de uma criança hindu com febre irregular, mas o confundiu com *Trypanosoma brucei*. Após algumas descrições equivocadas, Ross criou o gênero *Leishmania* e em homenagem a William Boog Leishman e Charles Donovan, batizou o agente etiológico do calazar de *Leishmania donovani* (Pessoa & Martins, 1988).

O primeiro registro de caso autóctone da LV no território brasileiro foi realizado por Migone, no Paraguai, em 1913, onde descreveu o caso em material de necrópsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso (Migone, 1913). Em 1934, a partir de um estudo realizado para o diagnóstico e distribuição da febre amarela no Brasil, Penna diagnosticou 41 exames positivos para *Leishmania* analisando lâminas de viscerotomia praticadas para o diagnóstico de pós- morte de febre amarela, em indivíduos oriundos das regiões Norte e Nordeste (Penna, 1934). No Brasil, o parasito foi classificado como *Leishmania chagasi* (Cunha & Chagas, 1937).

Os agentes etiológicos da LV pertencem ao complexo *Le. (Le.) donovani* (Lainson & Shaw, 1987), sendo eles: *Le. (Le.) donovani*, e *Le. (Le.) infantum* e *Le. (Le.) chagasi*.

Há dois tipos de transmissão para a LV: ciclo zoonótico, onde o vetor faz o repasto em um reservatório animal e transmite ao homem, e antroponótico, encontrado em áreas de transmissão de *Le. donovani* (Chappuis *et al.*, 2007), onde a doença é transmitida pelo vetor de homem para homem. A transmissão da *Le. infantum* se dá pelo ciclo zoonótico, sendo o homem considerado o hospedeiro acidental da doença, e os cães, os principais reservatórios do parasito (Alvar *et al.*, 2004).

Em seu ciclo epidemiológico, os hospedeiros invertebrados responsáveis pela transmissão da LV são as espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. A

espécie *Lu. longipalpis* é o principal vetor da LV no Novo Mundo. *Lu. longipalpis* é considerada um complexo de espécies crípticas, possuindo variações genéticas, no seu ciclo biológico, na morfologia e fisiologia entre as populações, podendo ser a explicação para as diferentes manifestações clínicas da LV na América Latina (revisado por Lainson & Rangel, 2005).

O cão doméstico desempenha um papel fundamental no ciclo epidemiológico da leishmaniose visceral zoonótica, sendo considerado um importante reservatório em vários focos de LV, tanto em áreas rurais como em periurbanas (Marzochi & Marzochi, 1994; Silva *et al.*, 2001). Estudos demonstram que a enzootia canina precede a ocorrência de casos humanos (Oliveira *et al.*, 2001). Ao contrário do que acontece com *Le. donovani*, responsável pela LV antroponótica em alguns países do Velho Mundo, o homem é uma fraca fonte de infecção para os flebotomíneos na transmissão de *Le. infantum* (Lainson & Shaw, 1987).

No ciclo urbano da LV, ao realizar o repasto em um cão infectado, o flebotomíneo pode sugar formas de *Leishmania* e se infectar. Na alimentação subsequente, ele poderá transmitir o parasito a um hospedeiro suscetível, como o homem, que desenvolverá ou não a doença, dependendo de fatores relacionados ao ambiente, ao hospedeiro e ao parasito (Marzochi *et al.*, 1985).

Alguns autores levantam a hipótese da transmissão entre a população canina através de ectoparasitos, sugerindo a hipótese da capacidade vetorial de pulgas e carrapatos (Coutinho *et al.*, 2005; Coutinho & Linardi, 2007; Paz *et al.*, 2010). Outros autores sugerem que a transmissão possa ocorrer através de mordeduras, cópula ou transmissão vertical entre os cães, porém não existem evidências sobre a importância epidemiológica destes mecanismos de transmissão (Santos *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009).

No Brasil, a LV está distribuída em 21 unidades federadas e atinge as cinco regiões brasileiras, sendo considerada uma doença de rápida expansão geográfica, que conta com o maior número de casos de LV (90%) nas Américas (Romero & Boelaert, 2010). Segundo dados do Ministério da Saúde, no período entre 2003 e 2009, foram registrados 34.583 casos da LV humana (LVH) no país. A doença é mais frequente no sexo masculino (63,9%) e em crianças menores de 10 anos (48%) (Brasil, 2011). A letalidade da LVH no Brasil aumentou 67,6% entre 1994 e 2009, passando de 3,4% em 1994 para 5,7% em 2009. Nos últimos quatro anos a letalidade média foi de 5,8%, e o Ministério da Saúde, com o objetivo de reduzir esta taxa tem implementado ações de vigilância e assistência ao paciente com LVH, de acordo com o manual do Ministério da Saúde (Brasil, 2011).

Deane (1956) em estudos realizados no Ceará, já alertava sobre a expansão e o fenômeno da urbanização da LV, que se efetivou em meados dos anos 80, quando foi consolidada a grande transformação na expansão geográfica da doença.

Inicialmente, a LV foi caracterizada como uma infecção endêmica de áreas rurais, ocorrendo principalmente nos estados do Nordeste do Brasil. De 1980 a 2009 o Brasil registrou 71.119 casos novos da doença, com uma média anual de 2.452 casos. Desde a década de 80 a doença vem se espalhando pelas metrópoles brasileiras, com 94% dos casos registrados na região Nordeste, sendo reduzido para 89% nos anos 90 (Brasil, 2010 a). No ano de 2009 foi confirmado o primeiro caso autóctone na região sul do país, no Rio Grande do Sul (Brasil, 2010 b). Em 2009, a região Nordeste representou 47,5% dos casos, seguida pelas regiões Norte (19,2%), Sudeste (17,4%), Centro-Oeste (7,4%) e Sul (0,2%) (Brasil, 2011).

O início do processo de urbanização da LV no Brasil se deu em Teresina (Piauí), com mais de 1000 casos relatados de 1981 a 1986 (Costa *et al.*, 1990). Analisando o perfil epidemiológico da LV nos últimos 13 anos, observa-se que houve uma mudança clara do perfil de transmissão da LV, originalmente caracterizado por um padrão rural, com casos esporádicos na periferia de algumas cidades, para um atual perfil associado a grandes cidades e algumas capitais de estados, como Campo Grande, Belo Horizonte, Palmas, Teresina e São Luís (Rangel & Vilela, 2008). Uma série de fatores estão associados à rápida expansão da LV no ambiente urbano, como modificações ambientais, ocupação desordenada do espaço urbano, condições precárias de vida da população exposta ao risco e suscetibilidade da população à infecção (Gontijo & Melo, 2004; Dantas Torres & Brandão-Filho, 2006). Além disto, a adaptação do vetor *Lu. longipalpis* às condições domésticas, sendo encontrados no intradomicílio e em abrigos de animais, somado aos seus hábitos de alimentação ecléticos, demonstra sua importância no contexto da urbanização da doença (Barata *et al.*, 2005; Rangel & Vilela, 2008; Missawa & Dias, 2007; Michalsky *et al.*, 2009a). Também é importante considerar as subnotificações da LVH devido a infecções assintomáticas (Moreno *et al.*, 2006). Em estudo transversal realizado em Sabará, região metropolitana de Belo Horizonte, as taxas de prevalência de infecção assintomática variaram de 2,4% a 5,6%, de acordo com o teste sorológico empregado, sendo a taxa de prevalência de 10,7%, quando o resultado foi positivo em pelo menos um dos testes empregados (Moreno *et al.*, 2006).

A sintomatologia da doença humana é semelhante com a de outras doenças, como febre amarela, doença de chagas, malária, toxoplasmose, esquistossomose, dificultando o diagnóstico correto e em tempo hábil para obter a cura. Quando presentes, os sintomas podem se agravar progressiva ou bruscamente: febre ondulante, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e/ou linfadenopatias e anemia, configurando-se como a forma mais severa

dentre as leishmanioses, potencialmente fatal (Borges, 2006; Silva, 2013). A LV não tratada acarreta uma mortalidade de 75 a 95%, sendo seu período de incubação variável, de 3 a 8 meses (Piscopo & Mallia, 2006).

As ações de controle da LV preconizadas pelo MS são baseadas na tríade: tratamento e diagnóstico precoce de casos humanos, controle do reservatório canino (inquérito sorológico canino e eliminação de cães soropositivos) e aplicação de inseticidas para os vetores. Adicionalmente, a Vigilância Epidemiológica, que compreende a vigilância entomológica, de casos humanos e caninos, é um dos componentes do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV). Devido às dificuldades no controle da doença, a nova proposta baseia-se em uma melhor definição das áreas de risco, incorporando estados e municípios silenciosos nas ações de vigilância. O saneamento ambiental é outra medida de controle indicada, além da borrifação, pois certamente contribui para evitar ou diminuir a proliferação do vetor, uma vez que age modificando o ambiente que propicia seu desenvolvimento (Brasil, 2006). Estas medidas devem estar sempre integradas, para que se obtenha a eficiência desejada (Gontijo & Melo, 2004). Contudo, por mais que haja investimento financeiro e recursos humanos disponíveis, as ações têm se mostrado ineficazes para controlar a doença, e a mesma vai se tornando mais uma mazela do cotidiano urbano brasileiro (Costa, 2008).

No Brasil, os medicamentos utilizados para o tratamento da LV são o antimoniato-N-metil glucamina (Glucantime), que pode ser administrado no nível ambulatorial, diminuindo os riscos relacionados à hospitalização (Costa *et al.*, 2007 a) e a anfotericina B, a única opção no tratamento de gestantes e pacientes que tenham contra-indicações ou que manifestem toxicidade ou refratariedade em relação ao uso dos antimoniais pentavalentes (Mishra *et al.*, 1994). O mecanismo de ação do antimoniato ainda não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que age nas formas amastigotas do parasito, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos. Nos casos de recidiva da doença, é indicado um segundo tratamento com a mesma dose, por um tempo mais prolongado (máximo 40 dias), antes de afirmar que o caso seria refratário ao tratamento com antimoniais pentavalentes (Brasil, 2006). A anfotericina B é a droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente; sua ação é direcionada para as formas promastigotas e amastigotas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Mishra *et al.*, 1992, 1994; Thakur *et al.*, 1993, 1997). Recomenda-se, para a escolha do medicamento para o tratamento da LV, que o perfil de toxicidade das drogas seja avaliado.

Ao final da década de 90, o número de casos de LV, tanto humana como canina, na Região Metropolitana de Belo Horizonte, aumentou de forma expressiva, indicando uma elevação da taxa de transmissão da doença na área (Silva *et al.*, 2001). Neste contexto, sabe-se que o município de Belo Horizonte é uma das grandes capitais onde a LV é endêmica. Os

primeiros cães soropositivos foram notificados em 1992, e logo após, os primeiros casos da doença humana. Inicia-se a expansão da LV no município e região (Luz *et al.*, 2001).

### 3.1.1 O parasito

A LV é uma enfermidade infecciosa antroponozoonótica, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema mononuclear fagocítico (SMF), pertencentes à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Este é dividido em dois subgêneros de acordo com o desenvolvimento no intestino do vetor, *Leishmania* e *Viannia* (Lainson *et al.*, 1979; Lainson & Shaw, 2005), compreendendo 22 espécies patogênicas ao homem, sendo 15 delas já identificadas nas Américas (PAHO, 2013). Esses protozoários são unicelulares, digenéticos e todas as espécies são morfologicamente similares, sendo diferenciados somente por métodos bioquímicos, imunológicos ou patológicos (Silva *et al.*, 2013).

A classificação taxonômica do parasito causador da LV *Leishmania (Leishmania) chagasi* foi proposta por Cunha e Chagas em 1937 (Brasil, 2006):

- Reino: Protista (Haeckel, 1866)
- Sub-reino: Protozoa (Goldfuss, 1817)
- Filo: Sarcomastigophora (Honigberg & Balamuth, 1963)
- Subfilo: Mastigophora (Deising, 1866)
- Classe: Zoomastigophorea (Calkins, 1909)
- Ordem: Kinetoplastida (Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976)
- Sub-ordem: Trypanosomatina (Kent, 1880)
- Família: Trypanosomatidae (Dofein, 1901, emend. Grobden 1905)
- Gênero: *Leishmania* (Ross, 1903)
- Sub-gênero: *Leishmania* (Saf'yanova, 1982)
- Espécie: *chagasi* (Cunha & Chagas, 1937).

Segundo Lainson & Shaw (1987), as leishmânias são classificadas taxonomicamente de acordo com a localização do parasito no aparelho digestivo dos flebotomíneos. Os parasitos que se aderem à porção anterior e média do intestino são agrupados no subgênero *Leishmania* (comportamento suprapilário) e os que apresentam uma fase de divisão que se aderem à parede do intestino posterior (desenvolvimento peripilário), pertencem ao subgênero *Viannia*.

Há duas formas principais durante o ciclo de vida do parasito: promastigotas, que são formas flageladas e extracelulares, presentes no trato digestivo de insetos e nos meios de

cultura, e amastigotas, formas não-flageladas e intracelulares obrigatórias, encontradas em monócitos e macrófagos dos hospedeiros vertebrados (Secundino *et al.*, 2005; Gossage *et al.*, 2003). Durante o repasto sanguíneo, os flebotomíneos injetam na pele do hospedeiro juntamente com a saliva, as formas promastigotas do parasito. As células do SMF (Sistema Mononuclear Fagocítico) do hospedeiro endocitam estas formas, que se transformam em amastigotas e começam a se multiplicar, infectando novas células do SMF quando a célula hospedeira original se rompe. Ao se alimentar em um hospedeiro infectado, o flebotomíneoingere os macrófagos contendo as formas amastigotas, que após atingirem o tubo digestivo se transformam em promastigotas e se multiplicam intensamente, passando por mudanças morfológicas e fisiológicas até se transformarem em formas promastigotas metacíclicas. Estas não mais se dividem, e são as formas infectivas para o hospedeiro vertebrado no momento do segundo repasto sanguíneo realizado pelo flebotomíneo (Ashford, 2000; Choi & Lerner, 2001; Bates, 2007).

Os agentes etiológicos da LV são protozoários parasitos pertencentes ao complexo *Le. donovani*: *Le. donovani* (Laveran & Mesnil 1903) Ross 1903, *Le. infantum* Nicolle 1908, e *Le. chagasi* Cunha & Chagas 1937. *Le. archibaldi* é um possível membro do grupo, porém tem se discutido se este táxon é válido (Pratlong *et al.*, 2001, Lukes *et al.*, 2007).

As duas principais espécies deste complexo são *Le. donovani*, que prevalece no subcontinente indiano, leste da África e em partes do Oriente Médio e *Le. infantum*, que se distribui na Europa, norte da África e nas Américas Central e do Sul (Lukes *et al.*, 2007).

Há duas hipóteses a respeito da origem de *Le. (Le.) chagasi*; de ser autóctone dos trópicos americanos ou da doença no Novo Mundo ser causada por *Le. (Le.) infantum*, introduzida por imigrantes ibéricos ou por seus cães, há cerca de 500 anos. A primeira hipótese segundo Lainson (2010) é subsidiada pelos seguintes argumentos: em relação à especificidade do parasito em relação ao vetor, parece improvável que *Le. infantum* introduzida pudesse dar um salto repentino do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) para *Lutzomyia* (Novo Mundo), as distinções também foram demonstradas através de digestão com enzimas de restrição, por hibridização de DNA de cinetoplasto e nos perfis de radorrespirometria dos dois parasitos, e a existência de uma antiga relação parasito-hospedeiro em relação aos reservatórios silvestres, já que se verifica uma alta taxa de prevalência da raposa *Cerdocyon thous* nativa do Brasil e *Didelphis marsupialis* na Colômbia, todas elas de natureza inaparente e benigna. Baseados na primeira hipótese, Lainson & Shaw, 2005 propuseram dividir *Le. infantum* em duas subespécies: *Le. (Le.) infantum infantum* (Velho Mundo) e *Le. (Le.) infantum chagasi* (Novo Mundo), considerando que ainda existem

muitas questões ainda a serem esclarecidas sobre a identidade, origem e epidemiologia do agente causador da LV.

A segunda hipótese, que indica que as mesmas sofreram uma separação geográfica recente, é baseada em técnicas bioquímicas (isoenzimas), sorológicas (anticorpos monoclonais) e de biologia molecular, como RAPD seguida de RFLP, sequenciamento de DNA da gp63 e hibridização com sondas de DNA (Kilick Kendrick, 1985; Grimaldi *et al.*, 1987; Rioux 1990; Maurício *et al.* 2000, 2001) sugerindo que estas espécies são indistinguíveis geneticamente, portanto que *Le. chagasi* seria considerada sinonímia de *Le. infantum*.

Um trabalho recente de Marcili et al (2014) baseado em análises das sequências dos genes V7V8 SSU rDNA confirmou a subespécie *Le. (Le.) infantum chagasi* como unidade taxonômica válida. A pequena divergência encontrada entre *Le. infantum* e *Le. chagasi*, no entanto, não explica e/ou diferencia entre as duas hipóteses sobre a origem evolucionária dessas espécies.

Levando em consideração que a denominação *Le. infantum* tem prioridade cronológica sobre *Le. chagasi*, neste trabalho, utilizaremos a denominação específica *Le. infantum*.

### **3.1.2 Biologia e ecologia de flebotomíneos: *Lu. longipalpis***

Os flebotomíneos são dípteros pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, sendo o gênero *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840 e *Lutzomyia* França, 1924 responsáveis pela transmissão das leishmanioses no Velho Mundo e no Novo Mundo, respectivamente. Os flebotomíneos se distribuem por quase todas as regiões do mundo, sendo mais abundantes na Região Neotropical; a densidade e o número de espécies flutuam de acordo com a estação climática (Sherlock, 2003).

Dentre mais de 800 espécies de flebotomíneos que especula-se existir, 98 espécies do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são atualmente vetores comprovados ou suspeitos das leishmanioses humana (revisado por Maroli *et al.*, 2013).

O gênero *Lutzomyia* nas Américas apresenta mais de 400 espécies identificadas, sendo que pouco mais de 50 espécies são consideradas envolvidas na transmissão de *Leishmania* (PAHO, 2013). No Brasil, a fauna flebotomínica é composta de mais de 230 espécies, representando 45,8% das que ocorrem na região Neotropical (Galati, 2003; Ready, 2013). A importância dos flebotomíneos para o homem e para os animais deve-se a seu papel como vetores naturais de alguns agentes etiológicos, como protozoários do gênero *Leishmania* e outros tripanosomatídeos, bactérias do gênero *Bartonella* e vários arbovírus (Sherlock, 2003).

São insetos de pequeno porte (2 a 3 mm), possuindo como característica o corpo com intensa pilosidade, hábitos de vôo crepusculares e abrigam-se em locais úmidos e sombrios. Durante o pouso, mantém suas asas em posição vertical característica. Os olhos são proeminentes, arredondados e bem separados, e as antenas são longas, formadas por 16 segmentos. Nas fêmeas, a probóscide é desenvolvida, do tipo picador-pungitivo, constituída de labro, um par de mandíbulas, hipofaringe, um par de maxilas e lábio. Os machos possuem mandíbulas rudimentares. As pernas são longas e delgadas, o que os distingue dos demais insetos desta família. As asas são bem desenvolvidas, grandes, hialinas e de aspecto lanceolado. A extremidade posterior do abdome se diferencia nos dois sexos: as fêmeas possuem estruturas internas, sobressaindo um par de espermatecas e nos machos é diferenciada em órgão copulador formado por 5 estruturas pares (Forattini, 1973).

Os machos e fêmeas necessitam de suprimentos de carboidratos na alimentação, que adquirem da seiva de plantas, secreções açucaradas, néctar de flores, frutos e outros sucos de plantas (Smith *et al.*, 1940, 1941; Pessoa & Barreto, 1948; Deane *et al.*, 1955; Sherlock & Sherlock, 1961, 1972; Alexander & Usma, 1994). Esta fonte de alimentação, além de ser utilizada na obtenção de energia e amadurecimento dos ovários da maioria de espécies de flebotomíneos, pode afetar também o desenvolvimento e infectividade das leishmânias no tubo digestivo do vetor.

Somente a fêmea necessita de sangue para a maturação dos ovários. O ciclo gonotrófico varia; algumas espécies realizam o repasto sanguíneo apenas uma vez entre as posturas, enquanto tem se observado que outras realizam múltiplas refeições sanguíneas durante um único ciclo de oviposição, aumentando o poder de transmissão de microorganismos por estes insetos (Sherlock, 2003; Brazil & Brazil, 2003). Uma grande variedade de animais já foram identificados como fonte alimentar de flebotomíneos (Tesh *et al.* 1971; Boreham, 1975; Lainson & Shaw, 1979; Christensen *et al.* 1982), inclusive infectados por alguma espécie de *Leishmania*. A presença de animais sinantrópicos e domésticos no peridomicílio contribuem para a atração de flebotomíneos, possivelmente vetores de leishmanioses, e com isso, há maior risco de transmissão da doença (Forattini, 1953; 1960, 1976, Gomes *et al.*, 1983, Brazil *et al.*, 1991).

Os flebotomíneos são holometábolos, com ciclo vital composto de uma fase de ovo, fase larval (compreende 4 estádios), fase de pupa e o adulto. As larvas dos flebotomíneos são terrestres, bastante ativas e se deslocam com rapidez para buscar alimento, provável causa de dispersão na natureza (Sherlock, 2003). Após a alimentação sanguínea das fêmeas e a oviposição concluída, as larvas de primeiro estádio emergem em 12-19 dias, as pupas em 25-59 dias e os adultos em 35 a 69 dias (Volf & Volfova, 2011).

Embora se conheça os hábitos alimentares das formas imaturas, pouco se sabe sobre os criadouros naturais das larvas de flebotomíneos no Novo Mundo. O conhecimento específico desses sítios de criação pode facilitar o controle destes vetores (Feliciangeli, 2004). Em estudo realizado em Cavunge região semi-árida da Bahia, a ocorrência de criadouros em microambientes específicos foi investigada em amostras de solo coletadas de casas, que também foram utilizadas para a amostragem de adultos. Todos os microambientes amostrados no estudo foram identificados como criadouros naturais. As formas imaturas de flebotomíneos foram encontradas nos seguintes locais: solo coberto com fezes de galinha, tronco caído e entre raízes de árvores, solo acumulado entre cavidades rochosas e em rachaduras em torno de tanques de água e no interior da residência. Flebotomíneos adultos também foram coletados nos mesmos locais, no intra e no peridomicílio (Sangiorgi *et al.*, 2012). Os flebotomíneos utilizam como abrigos uma grande diversidade de locais, como espaços existentes entre folhas caídas e o solo, tocas de animais, gretas nos troncos das árvores, etc (Aguiar *et al.*, 1985; Alexander *et al.*, 1992; Azevedo *et al.*, 1993), sendo que estes locais caracterizam-se por possuírem uma pequena variação na temperatura e umidade, favorecendo a presença destes insetos, já que os mesmos são muito sensíveis à dessecação.

Os flebotomíneos em geral, permanecem durante a maior parte do dia em seus abrigos, iniciando sua atividade durante a tarde ou à noite (Brazil & Brazil, 2003). Na região neotropical, os flebotomíneos têm sido observados com maior frequência na primeira metade da noite, principalmente entre 19 e 21 horas (Biagi *et al.*, 1966; Thatcher & Hertig, 1966; Williams, 1970; Gomes *et al.*, 1989; Aguiar *et al.*, 1985; Galati *et al.*, 1996). Entretanto, Teodoro (1993) no norte do Paraná, demonstraram que algumas espécies de flebotomíneos têm seus picos de atividade entre 16 e 17h. A espécie *L. flaviscutellata* apresenta um pico de atividade de alimentação entre 22:00 e 1:00h, raramente se alimentando durante o dia (Ward, 1977). Em estudo realizado em ambiente florestal residual e extraflorestal a atividade de *Lu. intermedia* foi avaliada havendo uma divergência quanto ao pico de atividade máxima, que variou entre 20 e 2 horas (Gomes *et al.*, 1983). A distribuição horária de *Lu. longipalpis* foi estudada no período da noite no ambiente peri e intradomiciliar na Ilha de São Luís (MA). A espécie foi encontrada ao longo de toda a noite, porém foi mais frequente no peridomicílio, entre 18h e 22h e entre 20h e 2h no intradomicílio (Rebêlo, 2001).

No ciclo de transmissão da *Le. infantum*, agente etiológico da LV no Novo Mundo, a transmissão ocorre, principalmente, através da picada de fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). Trabalhos têm demonstrado a possibilidade de *Lu. evansi* (Nuñez- Tovar, 1924) estar agindo como vetor na Colômbia (Travi *et al.*, 1996), e o encontro de fêmeas de *Lu. cruzi* (Mangabeira, 1938) infectadas em área endêmica para LV em

Corumbá, Mato Grosso do Sul, aponta a possibilidade desta espécie ser a transmissora da doença nessa área (Santos *et al.*, 1998). Outras espécies podem abrigar, mesmo que experimentalmente, a *Le. infantum*, mas sem efeito sobre a transmissão da doença, pois acredita-se na existência de certa especificidade do vetor para as leishmânias (Sherlock, 1997; Lainson & Shaw, 1998).

Nas Américas, a espécie *Lu. longipalpis* é considerada a principal transmissora do agente etiológico causador da LV e cumpre todos os critérios estabelecidos para ser considerado um vetor competente, chamando a atenção para os essenciais, como antropofilia, distribuição espacial coincidente com os casos humanos da doença e encontro de exemplares naturalmente infectados por *Le.(Le.) infantum chagasi* (Rangel & Vilela, 2008). No Brasil esta espécie ocorre nas cinco regiões geográficas do país, sendo o primeiro registro na região Sul, ocorrido em 2008 (Brasil, 2011).

Observações realizadas na região Amazônica do Brasil apontaram que a espécie *Lu. longipalpis* é primariamente silvestre, sendo ainda encontrada em florestas remotas, distante das habitações humanas (Chagas *et al.*; 1938; Lainson *et al.*, 1986; Ryan *et al.*, 1986). No entanto, a maior parte dos estudos iniciais sobre a LV no Brasil, foi realizada em estados pouco arborizados do país, como consequência do desmatamento, e com isto houve a tendência de se pensar na LV como sendo uma doença que circulava somente entre o cão e esta espécie de flebotomíneo, em um ambiente essencialmente doméstico (Lainson & Rangel, 2005).

A espécie *Lu. longipalpis* gradualmente foi colonizando o ambiente rural e no final da década de 80, começou a invadir o ambiente urbano, se instalando principalmente na periferia das cidades, onde passou a ser capturada no intradomicílio e peridomicílio. Alguns aspectos comportamentais desta espécie têm papel fundamental no contexto da urbanização da LV, principalmente devido aos seus hábitos ecléticos de alimentação e fácil adaptação ao ambiente doméstico (Rangel & Vilela, 2008), sendo o elo de transmissão entre animais domésticos e o homem (Missawa *et al.*, 2008).

As fêmeas de *Lu. longipalpis* invadem com bastante rapidez as habitações e no domicílio e peridomicílio, alimentam-se de sangue do homem, de cão, de galinha, de equídeos, suínos e caprinos (Sherlock & Guitton, 1969; Passos - Dias *et al.*, 2003). Observa-se que as fêmeas de *Lu. longipalpis* se concentram principalmente em galinheiros, o que tem considerável importância epidemiológica, já que estes ambientes não são borrifados comumente, e esta continua sendo a principal medida de controle da LV (Lainson & Rangel, 2003).

Estudos realizados em áreas endêmicas para LV no estado de Minas Gerais mostraram que a espécie *Lu. longipalpis* é a mais abundante, onde algumas características como a baixa condição sócio-econômica, o ambiente propício para a reprodução do flebotomíneo, com acúmulo de matéria orgânica e a presença de animais domésticos foram fatores determinantes para o encontro de alto número desta espécie. A maior parte destes exemplares foi encontrado no peridomicílio, mas é importante salientar a presença de considerável número de flebotomíneos no interior das casas, ilustrando o caráter endofílico desta espécie, podendo a transmissão da LV estar ocorrendo no ambiente intradomiciliar (Souza *et al.*, 2004; Barata *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2007; Michalsky *et al.*, 2009 a, Dias *et al.*, 2011).

Estudos entomológicos realizados no município de Belo Horizonte, objetivaram levantar a fauna flebotomínica em diversos distritos, mostrando as espécies predominantes em cada uma delas. Nos anos de 1997 a 1999, foram capturados um total de 397 flebotomíneos em três distritos do município; dois deles com alta prevalência da infecção canina e ocorrência de casos humanos (Leste e Nordeste) e um distrito onde a prevalência da LVC era baixa e não havia casos humanos de LV (Barreiro). As espécies predominantes foram *Lu. longipalpis* e *Lu. whitmani*, sendo a primeira encontrada em maior número no distrito Nordeste (62,7%) (Resende *et al.*, 2006). As duas espécies citadas anteriormente também foram predominantes em estudo abrangendo todos os distritos do município, no período de 2001 a 2003. Um total de 3871 flebotomíneos foram coletados, e as espécies *Lu. whitmani* e *Lu. longipalpis* foram capturadas em maior número em áreas verdes, e no intra e peridomicílio, respectivamente. *Lu. longipalpis* foi a espécie predominante nas maioria dos distritos (Souza *et al.*, 2004). No distrito Nordeste do município, entre os anos de 2006 e 2007, foram realizadas capturas entomológicas no peridomicílio de residências e em duas áreas verdes próximas a área urbana. Dos 245 espécimes coletados, houve uma predominância de *Lu. whitmani* sobre as demais espécies e *Lu. longipalpis* apresentou uma alta taxa de infecção natural (19%) (Saraiva *et al.*, 2010). A detecção de fêmeas de *Lu. longipalpis* naturalmente infectadas em áreas endêmicas de LV tem grande importância no papel desempenhado por esta espécie na transmissão da doença nestas áreas (Michalsky *et al.*, 2011).

### **3.1.3 Influência das variáveis climáticas sobre os flebotomíneos**

Muitos estudos sugerem que alguns fatores abióticos influenciam, em menor ou maior proporção, a ocorrência de determinadas espécies de flebotomíneos, seja por influência direta sobre os adultos ou pelas modificações nas condições dos criadouros. Segundo Chaniotis et

al. (1971) e Rutledge & Ellenwood (1975), a sazonalidade está relacionada aos padrões de distribuição das chuvas, uma vez que estes modificam as condições dos criadouros no solo. De acordo com esta hipótese, a chuva beneficiaria os flebotomíneos quando esta ocorresse moderadamente ao longo da estação chuvosa, mas por outro lado prejudicaria o desenvolvimento dos insetos quando inundasse o chão, destruindo seus criadouros. Rutledge & Ellenwood (1975) demonstraram que as condições do criadouro, como a quantidade de nutrientes, a umidade e a temperatura, têm uma grande influência sobre a variação populacional dos insetos adultos nos diferentes habitats.

Os estudos sobre a variação sazonal de *Lu. longipalpis* são importantes para a compreensão da dinâmica de transmissão da doença a partir do conhecimento da interação entre cada espécie e seu habitat, visando controlar a população de vetores em uma dada região (Macedo *et al.*, 2008). De acordo com a literatura, os fatores climáticos, como temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade podem influenciar, de maneira variável, o número de flebotomíneos em determinadas áreas (Dias *et al.*, 2007).

Desde seus estudos pioneiros, Deane & Deane (1955a) observaram a influência das variáveis climáticas na densidade populacional de *Lu. longipalpis*. Eles relataram que os períodos chuvosos favorecem a proliferação e sobrevivência da espécie. Após este relato inicial, vários autores observaram a relação entre pluviosidade e o número de flebotomíneos. Estudos realizados em áreas endêmicas de MG para LV demonstraram que a umidade e a pluviosidade tiveram efeito significativo no número de flebotomíneos capturados, que aumentou durante a estação chuvosa (Barata *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2011). No município de Paracatu, Dias *et al.* (2011) chama a atenção para o aumento no número do vetor, que foi precedido por um pico de temperatura quente, que ocorreu dois meses antes. Já Missawa & Dias (2007) e Michalsky *et al.* (2009a) observaram um aumento na população de flebotomíneos logo após a estação chuvosa, apesar de não ter havido uma correlação estatisticamente significativa entre as variáveis climáticas e o número de flebotomíneos. No município de Varzelândia (MG), não foi possível observar a interferência dos fatores climáticos (temperatura, umidade e pluviosidade) sobre a população de insetos adultos, porém houve uma redução de densidade de flebotomos nos meses frios e secos, possivelmente devido às condições ambientais desfavoráveis para as formas imaturas. (Dias *et al.*, 2007). Já em Montes Claros, área ativa de transmissão de LV, através de equação matemática, foi encontrada uma associação entre a densidade de *Lu. longipalpis* com as três variáveis climáticas citadas anteriormente (Michalsky *et al.*, 2009b).

Em estudo realizado em 3 distritos de Belo Horizonte entre 1997 e 1999, sobre a variação sazonal de *Lu. longipalpis*, verificou-se que o maior número de espécimes do vetor

corresponde aos períodos em que a precipitação pluviométrica é mais elevada, combinada com as mais altas temperaturas médias, atingindo os valores máximos logo após o fim da estação chuvosa. O menor número de espécimes foi observado durante os períodos secos (Resende *et al.*, 2006).

Em outro estudo realizado nos 9 distritos deste município, as médias das variáveis climáticas umidade, temperatura e pluviosidade não mostraram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o número de flebotomíneos, porém houve uma tendência de aumento logo após os períodos chuvosos (Souza *et al.*, 2004).

A correlação entre os fatores climáticos e o número de flebotomíneos vetores poderá servir de suporte para determinar as épocas do ano mais propícias para a aplicação de inseticidas, objetivando o uso racional dos recursos e a redução de danos ambientais (Resende *et al.*, 2006). Além disto, como apontado por Silva *et al.* (2007a), a associação destas informações com outros parâmetros, como taxa de picada, longevidade do vetor, percentual de insetos infectados e o período de incubação extrínseco, poderiam construir modelos mais robustos para prever a força de transmissão em determinada área.

#### **3.1.4 Reservatórios**

Shaw (1988) reconhece dois tipos principais de hospedeiros envolvidos na transmissão da leishmaniose zoonótica americana: o primeiro, chamado de hospedeiro primário (reservatório), que além de albergar o parasito no ambiente silvestre seria responsável pela sua manutenção, independente da co-existência com outro hospedeiro. O segundo, hospedeiro secundário, diferente do primário, seria um animal que alberga o parasito, porém é incapaz de manter o ciclo enzoótico indefinidamente.

Um grande número de trabalhos tem investigado a infecção por *Le. infantum* em reservatórios domésticos e silvestres (revisado por Quinnell & Courtenay, 2009). Neste contexto, os trabalhos mais completos foram realizados no Brasil, por Deane & Deane e Alencar, no estado do Ceará e Lainson e Shaw no estado do Pará (Deane & Deane, 1955b; Alencar, 1961; Lainson *et al.*, 1987).

No ciclo silvestre de *Le. infantum*, as raposas *Lycalopex vetulus* no Nordeste do Brasil, *Cerdocyon thous*, na Amazônia brasileira, e os marsupiais didelfídeos, no Brasil e na Colômbia, são considerados os reservatórios da LV. Ao contrário dos cães, a grande maioria das infecções naturais em animais silvestres parece assintomática (Quinnell & Courtenay, 2009).

O cão vem sendo apontado por vários autores como o principal reservatório em área urbana, devido ao grande número de casos de LVC, por serem altamente susceptíveis à infecção, pelo intenso parasitismo cutâneo destes animais e pelo seu convívio junto ao homem (Deane & Deane 1962; Dantas Torres & Brandão-Filho, 2006). Sua importância vem sendo observada em algumas cidades brasileiras, pelo aumento do número de casos humanos, já que estes tem correlação com a ampliação da ocorrência de casos de LVC (Bevilaqua *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2001; França-Silva *et al.*, 2003; Monteiro *et al.*, 2005).

Várias espécies de animais domésticos têm mostrado uma alta prevalência de infecção em algumas áreas (revisado por Gramiccia & Gradoni, 2005). Alguns estudos realizados no Brasil demonstraram o encontro de *Leishmania* spp. em felinos (Savani *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2005; Dantas-Torres *et al.*, 2006a; Rossi, 2007; Silva *et al.*, 2008; Serrano *et al.*, 2008). Particularmente em gatos, a maioria dos estudos detectam baixas cargas parasitárias, não sendo detectada infecção por métodos parasitológicos (Silva *et al.*, 2008).

A detecção de DNA de *Leishmania* em uma espécie animal é uma forte evidência, mas não é suficiente para determinar se um hospedeiro pode ser um reservatório da doença. Outros critérios devem ser considerados, como o encontro da espécie de flebotomíneo vetor naturalmente infectado na mesma região do suposto reservatório, a sobrevivência do hospedeiro tempo suficiente para garantir a transmissão da infecção, prevalência de infecção entre os hospedeiros acima de 20%, manutenção do parasitismo no sangue periférico ou na pele em quantidade suficiente para infectar o vetor e a mesma espécie de *Leishmania* infectando reservatórios e humanos (Silva *et al.*, 2005 a).

### **3.2 A Leishmaniose Visceral Canina**

A possível participação dos cães no ciclo epidemiológico da LV começou a ser aventada na Tunísia, a partir da detecção, nos animais, do agente etiológico do calazar (Nicolle & Comte, 1908). Na década de 30, foi demonstrada pela primeira vez a transmissão de *Le. infantum* para cães através da picada de flebotomíneos (Parrot *et al.*, 1930; Adler & Theodor, 1931). No Brasil, os estudos pioneiros que demonstraram a importância do cão como reservatório da LV foram realizados na região Nordeste, estado do Ceará, onde os aspectos básicos do ciclo epidemiológico da LV foram estabelecidos (Alencar & Coelho Neto, 1956; Deane, 1956; Genaro, 1993) e a partir daí vários estudos demonstraram que o cão representa um importante elo no ciclo de transmissão da LV (Deane, 1956), sendo considerado no ambiente urbano o principal reservatório do parasito *Le. (Le.) infantum* relacionado com os casos humanos (Monteiro *et al.*, 2005; Dantas-Torres, 2007). Dentre as

razões podem ser citados o intenso parasitismo cutâneo por formas amastigotas de *Leishmania*, que aumenta a possibilidade de transmissão, sua proximidade com o homem e suas residências, favorecendo a manutenção do ciclo doméstico de transmissão (Ashford, 1996), pelo fato de, mesmo infectados, os cães permanecerem sem sinais clínicos de LV aparentes por anos ou por toda a vida (Moreno & Alvar, 2002) e a alta prevalência de infecção por *Le. infantum* em áreas onde a LV é endêmica, com grande proporção de assintomáticos (Alvar *et al.*, 2004).

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença crônica, fatal e multisistêmica, que possui sinais clínicos muito variáveis. Os sinais clínicos iniciais da LVC são: hipertrofia do linfonodo, dermatite periorbital e nasal, pelagem opaca, onicogribose e edema das patas. Com frequência outros sinais podem estar presentes, como febre, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, perda de peso, hepatoesplenomegalia, ulceração cutânea e conjuntivite, embora nem todos os animais necessariamente apresentem (Almeida *et al.*, 2005; Baneth *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2009). Segundo Ferrer (1999), a manifestação clínica da doença dependerá da resposta imunológica do animal.

Com base na sintomatologia, Mancianti (1988) classifica a LVC em três grupos: assintomáticos, com ausência de sinais clínicos sugestivos de infecção por *Leishmania* spp., oligossintomáticos, que apresentam no máximo três sinais clínicos da doença entre eles opacificação das córneas, perda moderada de peso, alopecia localizada e/ou adenopatia linfóide e cães sintomáticos, apresentando vários sinais clássicos da doença, incluindo lesões cutâneas, perda severa de peso, onicogribose, ceratoconjuntivite, apatia, paresia dos membros posteriores, entre outros. Optou-se, no presente estudo, por usar somente as formas polares da classificação proposta por Mancianti (1988): assintomáticos e sintomáticos.

Há na literatura, vários estudos que demonstram a infecção de cães por agentes etiológicos da LT, como *Le. braziliensis* (Aguilar *et al.*, 1989; Reithinger & Davies, 1999; Madeira *et al.*, 2003, 2006a; Ryan *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2007). Nos focos domésticos e peridomésticos de transmissão (Campbell- Lendrun *et al.*, 2001; Yadon *et al.*, 2003), os cães provavelmente servem como uma fonte de infecção de pouca importância para os flebotomíneos. Travi *et al.* (2006) indicaram que, apesar da suscetibilidade do cão à *Le. braziliensis*, sua competência como reservatório pode ser baixa. Contudo, mais estudos são necessários para evitar conclusões errôneas a respeito da importância do cão na epidemiologia da LTA (Dantas-Torres, 2007).

A epidemiologia da LV tem sofrido transformações desde a década de 80, juntamente com a urbanização, porém as medidas de controle para a doença continuam as mesmas (Nunes *et al.*, 2008), sendo preconizado em uma das vertentes da tríade, a eliminação de cães

soropositivos (Brasil, 2006). De 2002 a 2007 foram realizados no Brasil mais de 2 milhões de exames e mais de 160 mil cães foram eutanasiados. Apesar deste esforço, a incidência da LV humana não diminuiu a níveis razoáveis (Lemos *et al.*, 2008).

Além de servir de fonte de infecção para o vetor, a importância epidemiológica do cão na transmissão da LV também está relacionada à sua presença, sendo uma fonte alimentar atrativa para o vetor. Borges *et al.* (2009) analisou em Belo Horizonte o risco de contrair LV e a presença de animais em residências e observou que para os proprietários de cães, o aumento no risco de contrair a LV é equivalente a 2,17 vezes e está relacionado ao número de cães no peridomicílio. Em estudo realizado neste município através de análise espacial, foi observada uma forte evidência da ocorrência de casos humanos em regiões de alta prevalência da LVC (Oliveira *et al.*, 2001; Margonari *et al.*, 2006). Contudo, esta correlação não foi encontrada por alguns autores (Sabroza *et al.*, 1992; Evans *et al.*, 1992; Dietze *et al.*, 1997; Paula, 2001), que questionam a eutanásia de cães soropositivos. Margonari *et al.* (2006) também demonstraram a maior ocorrência de casos humanos e caninos em Belo Horizonte em altitudes variando de 780 a 880 m. Esta associação com a altitude não foi observada em estudo de análise espacial posterior realizado no município (de Araújo *et al.*, 2013).

É sabido que a infecção no cão precede a ocorrência dos casos humanos, sendo a LVC mais prevalente que a doença humana (Oliveira *et al.*, 2001). No ambiente doméstico, a maioria dos cães que apresentam sorologia positiva são assintomáticos, porém são fontes de infecção para o vetor, atuando como bons reservatórios (Cosenza, 1995; Moreno & Alvar, 2002; Silva *et al.*, 2005b).

Para melhor entender o papel do cão na epidemiologia da LV, foi realizado um estudo em Montes Claros (MG), objetivando testar pelo método de xenodiagnóstico a infectividade de cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos utilizando *Lu. longipalpis* criados em laboratório. As taxas de infecção de 5,4%, 5,1% e 28,4% foram encontradas nos flebotomíneos que se alimentaram nos cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, respectivamente, indicando que em condições experimentais, os cães sintomáticos são cerca de quatro vezes mais infectivos para os vetores que os das outras formas clínicas. No entanto, apesar das taxas menores exibidas nos cães oligo e assintomáticos, estes devem ser levados em conta na epidemiologia da LVC (Michalsky *et al.*, 2007).

### 3.2.1 Diagnóstico da LVC

O diagnóstico laboratorial da LVC preconizado pelo Ministério da Saúde é baseado em exames sorológicos e parasitológicos, sendo o exame parasitológico considerado, ainda, o padrão ouro para o diagnóstico da doença, embora haja discordância entre alguns autores (Ferrer, 1999; Koutinas *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2002). Não existem testes diagnósticos que apresentam 100% de sensibilidade e especificidade para LVC (Gontijo & Melo, 2004). Os testes diagnósticos, para serem utilizados na rede pública são avaliados pelos seguintes parâmetros: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, reprodutibilidade, facilidade e exequibilidade (Brasil, 2011). Os inquéritos sorológicos realizados pelos programas de vigilância e controle visam conhecer os aspectos epidemiológicos da doença nas áreas de transmissão ou com potencial de transmissão, e identificar os cães soropositivos para posterior eutanásia (Brasil, 2006).

O diagnóstico clínico da LVC torna-se dificultado, uma vez que é grande a ocorrência de animais assintomáticos e os sinais clínicos não são patognomônicos da doença. Sendo assim, os exames laboratoriais são de grande importância para a confirmação diagnóstica (Brasil, 2006).

Até a década de 30, o diagnóstico era feito pelo método direto, através da punção de fígado, baço e raspados de pele, e também punção de medula óssea, que por ser um método invasivo, dificultou seu emprego em larga escala. Apesar da grande especificidade, estes métodos possuíam baixa sensibilidade (Gontijo & Melo, 2004), além de ser difícil a detecção do parasito em animais assintomáticos, pois possuem baixo parasitismo (Moreira *et al.*, 2007). Na década de 50, pesquisadores sugeriram a utilização da Reação de Fixação do Complemento (RFC) em inquéritos caninos, devido ao aumento na sensibilidade e especificidade em relação aos testes diretos (Alves & Bevilacqua, 2004).

A partir da década de 60, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) passou a ser utilizada. A RIFI consiste na reação de anticorpos presentes nos soros com os parasitos (*Leishmania*) fixados em lâminas de microscopia, posteriormente associado a um conjugado fluorescente. O resultado é considerado positivo se apresentar títulos iguais ou maiores que a diluição de 1:40 (ponto de corte) (Brasil, 2006). Para a realização da RIFI é necessário pessoal altamente treinado para a leitura das lâminas, é um processo dispendioso e não é adaptado para estudos epidemiológicos em larga escala (Gontijo & Melo, 2004). Além disto, a limitação deste teste é que pode apresentar reação cruzada com outros tripanosomatídeos (Madeira *et al.*, 2006b; Santos-Gomes & Fonseca, 2008). Alguns trabalhos também mostram

que a RIFI apresenta baixa sensibilidade na detecção de animais assintomáticos (Mettler *et al.*, 2005).

A partir daí, havendo a necessidade de uma técnica com alta sensibilidade e especificidade, surgiram a partir da década de 70 vários trabalhos avaliando o teste Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). O ELISA consiste na reação de soros com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de culturas *in vitro*, sendo um teste rápido, sensível, de fácil leitura, que possibilita a análise de grande quantidade de amostras em pouco tempo, sendo sua especificidade dependente do antígeno utilizado (Reithinger *et al.*, 2002), podendo apresentar níveis de especificidade baixos, principalmente quando se utilizam antígenos brutos (Reed, 1996).

Outros testes sorológicos empregados no diagnóstico da LVC são o teste de hemaglutinação direta (HA) e indireta (HAI), a reação de fixação do complemento (FC) e o DAT - teste de aglutinação direta (Oskam *et al.*, 1996). Em estudos comparativos entre ELISA, RIFI e DAT, o último demonstrou sensibilidade e especificidade semelhante quando comparado aos outros testes (Evans *et al.*, 1990; da Silva *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, vários testes imunocromatográficos têm sido testados, utilizando como antígenos proteínas recombinantes, como rK39 e rK26, como também proteínas extraídas de bactérias que fazem parte dos reagentes marcadores dos testes para LVC (Reithinger *et al.*, 2002; da Costa *et al.*, 2003; Mettler *et al.*, 2005; Bisugo *et al.*, 2007; Lemos *et al.*, 2008; de Lima *et al.*, 2010). A utilização de antígenos recombinantes e purificados de proteínas de membranas (gp63, gp72 e gp70), otimizaram a sensibilidade e especificidade da técnica de ELISA (Boarino *et al.*, 2005; Porrozzi *et al.*, 2007). Dentre as novas tecnologias para o diagnóstico sorológico da LVC inclui-se o teste rápido DPP (Dual Path Platform). Trata-se de um teste imunocromatográfico rápido qualitativo para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* que utiliza antígenos recombinantes rK26 e rK39 (Grimaldi *et al.*, 2012).

A detecção do DNA de *Leishmania* através de métodos moleculares representa uma ferramenta muito útil, em função de sua rapidez, alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da LVC (Ikonomopoulos *et al.*, 2003; Xavier *et al.*, 2006), inclusive na detecção de cães assintomáticos. Estudos usando a PCR em áreas endêmicas têm confirmado que a prevalência da infecção nos cães é muito maior do que a proporção daqueles que desenvolvem a forma sintomática da doença (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Alvar *et al.*, 2004).

Alguns estudos enfatizam a idéia da inclusão da PCR em programas de vigilância e controle da LV, uma vez que é capaz de detectar infecções subclínicas, podendo, aliado a uma técnica sorológica, diagnosticar casos inconclusivos que apresentam reação cruzada ou baixos

títulos de anticorpos (de Andrade *et al.*, 2006; Miró *et al.*, 2008; Pereira-Chiocola, 2009; Solano- Gallego *et al.*, 2009). Estudos em diferentes áreas endêmicas têm demonstrado que a combinação destas duas técnicas tem apresentado uma maior sensibilidade na detecção de animais soropositivos (Gramiccia & Gradoni, 2005). No entanto, apesar da alta sensibilidade, a PCR não possui, ainda, aplicabilidade nos programas de controle da LVC.

Em um estudo realizado em Belo Horizonte, de Andrade *et al.* (2006) demonstraram que animais com diagnóstico sorológico e parasitológico negativo apresentaram-se positivos em métodos moleculares. Esses resultados reforçam a hipótese de que métodos diagnósticos utilizados em áreas endêmicas subestimam o número de cães infectados, não detectando na sorologia convencional (ELISA e RIFI) um considerável número de cães positivos, influenciando na transmissão da doença. Outro estudo realizado em região endêmica para LV no norte de Minas Gerais, verificou a concordância de 4 testes diagnósticos para LVC, sendo RIFI e ELISA usados como testes de referência. Observou-se que 93,8% dos animais apresentaram pelo menos 1 teste positivo, e metade dos cães sintomáticos deram resultados positivos para todos os 4 testes administrados. Porém, o diagnóstico principalmente para cães assintomáticos não ofereceu resultados conclusivos (Regina-Silva *et al.*, 2014).

Os testes até recentemente recomendados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da LVC eram o ELISA, utilizado como método de triagem e a RIFI como teste confirmatório.

Segundo nota técnica do Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis de 2011 (MS, 2011), o DPP foi incorporado como um novo exame na rede pública para o diagnóstico da LVC como o exame de triagem, e o ensaio imunoenzimático (ELISA) é realizado como teste confirmatório. O antigo modelo demandava um longo período para a entrega dos resultados, havendo um período entre 30 e 80 dias entre o diagnóstico e a retirada dos cães, o que favorecia a transmissão da doença, já que os cães soropositivos permaneciam na área durante este período (Lira *et al.*, 2006). Com o emprego do DPP o diagnóstico será rápido, simples e de fácil uso, podendo ser executado no campo (Grimaldi *et al.*, 2012).

Um estudo de meta análise, que objetivou avaliar a precisão e a qualidade do diagnóstico da LVC nas Américas, demonstrou que os testes ELISA e DPP apresentam uma precisão moderada no diagnóstico da LVC, sendo urgente a necessidade de melhoria da qualidade do ensaio e da implementação e análise dos estudos de validação dos testes diagnósticos para a doença. A definição de um padrão de referência continua sendo um desafio que afeta os estudos de validação. Neste sentido, o estudo das técnicas moleculares tem grande relevância, a fim de avaliar a possibilidade de superação das limitações do diagnóstico parasitológico convencional (Peixoto *et al.*, 2014)

### 3.3 A utilização da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de *Leishmania* spp.

A partir da década de 80 iniciaram-se os estudos sobre metodologias baseadas na biologia molecular para a identificação do gênero *Leishmania*. A técnica de PCR, desenvolvida por Saiki *et al.* (1985), consiste em se ter o conhecimento prévio de uma sequência alvo, combinado a um par de iniciadores, submetidos a repetidos ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, para a síntese *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase.

Os métodos moleculares, como a PCR vêm sendo largamente utilizados nos estudos epidemiológicos a fim de elucidar animais silvestres e domésticos como hospedeiros da doença e detectar o parasito em flebotomíneos infectados experimentalmente ou naturalmente. A sensibilidade e especificidade destes métodos são as principais vantagens, sendo também rápidos e independentes do crescimento do parasito (Michalsky *et al.*, 2002; Oliva *et al.*, 2006; Pereira-Chioccola, 2009; Queiroz, 2010; Coura-Vital, 2011). Além disso, para detectar a presença de infecção atual e não passada, nos inquéritos epidemiológicos, a PCR é o método mais indicado, uma vez que o DNA persiste apenas algumas horas após a morte do parasito, ao contrário da resposta imune celular ou humoral (Disch *et al.*, 2004; Prina *et al.*, 2007).

Os métodos clássicos utilizados para detecção da presença de *Leishmania* spp. em insetos vetores, são o parasitológico após dissecação do trato digestivo do vetor e identificação dos parasitos *in situ* pela cultura do parasito, ou inoculação em animais de laboratório (Carvalho *et al.*, 2008). Os fatores limitantes destas técnicas estão no fato de elas serem demoradas, da dificuldade de processar um grande número de amostras e de sua baixa especificidade, pois as fêmeas de flebotomíneos também albergam outros tipos de parasitos, como algumas espécies de *Trypanosoma* e *Endotrypanum*, que passam por um estágio de promastigota indistinguível de *Leishmania*, dificultando o diagnóstico da doença (Barbosa *et al.*, 2006; Paiva *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008).

Os pioneiros no uso da técnica de PCR para identificação de *Leishmania*, utilizaram como alvo as moléculas do minicírculo do kDNA, demonstrando a sensibilidade do método, capaz de detectar o kDNA equivalente a um único parasito (Rodgers, 1990).

A maior sensibilidade dos métodos que utilizam como alvo regiões do kDNA em detrimento aos métodos que utilizam o DNA genômico, parece estar relacionada ao número de cópias do alvo, que no caso do DNA do minicírculo chega a 10.000 cópias. Para o RNA

ribossomal (rRNA), o número varia de 40 a 200 cópias (Lachaud *et al.*, 2002; Nasereddin *et al.*, 2006).

Outros alvos, além do kDNA tem sido descritos para identificar o DNA de *Leishmania*, como o gene “heat shock protein 70”(HSP70) (Garcia *et al.*, 2004), a região espaçadora entre os transcritos internos “internal transcribed spacer 1” (ITS1) (Nasereddin *et al.*, 2006), e o gene SSUrRNA (Van Eyes, 1992; Cruz *et al.*, 2002, 2006).

Das sequências pertencentes aos grupos de múltiplas cópias, o SSUrRNA é um dos mais bem estudados. Além disto, assim como o DNA, o RNA do SSUrRNA pode ser usado como alvo para PCR, se mostrando altamente específico e sensível na detecção de *Leishmania* (Van Eyes, 1992). O DNA nuclear contém aproximadamente 160 cópias do gene SSUrRNA (Leon *et al.*, 1978) e o citoplasma, mais de 104 moléculas do gene. Cruz *et al.* (2002) desenvolveram a técnica de Nested PCR (*LnPCR*) baseados nos iniciadores previamente utilizados para a região SSUrRNA, e obtiveram um aumento na sensibilidade (podendo detectar 0,01 promastigota de cultura de leishmânia) e na especificidade, devido ao uso de um segundo alvo de iniciadores específicos para *Leishmania* que amplificam o produto da primeira PCR, cujo alvo é específico para a ordem Kinetoplastida.

Alguns autores relatam algumas limitações da PCR, pois apesar de ser considerada uma ferramenta bastante útil devido à sua alta sensibilidade, possui alto custo e possui baixa adaptabilidade a condições de campo (Reed, 1996). A redução dos custos desta técnica permanece como um dos maiores desafios para seu uso em países em desenvolvimento (Gomes *et al.*, 2008).

### **3.4 A leishmaniose visceral em Belo Horizonte**

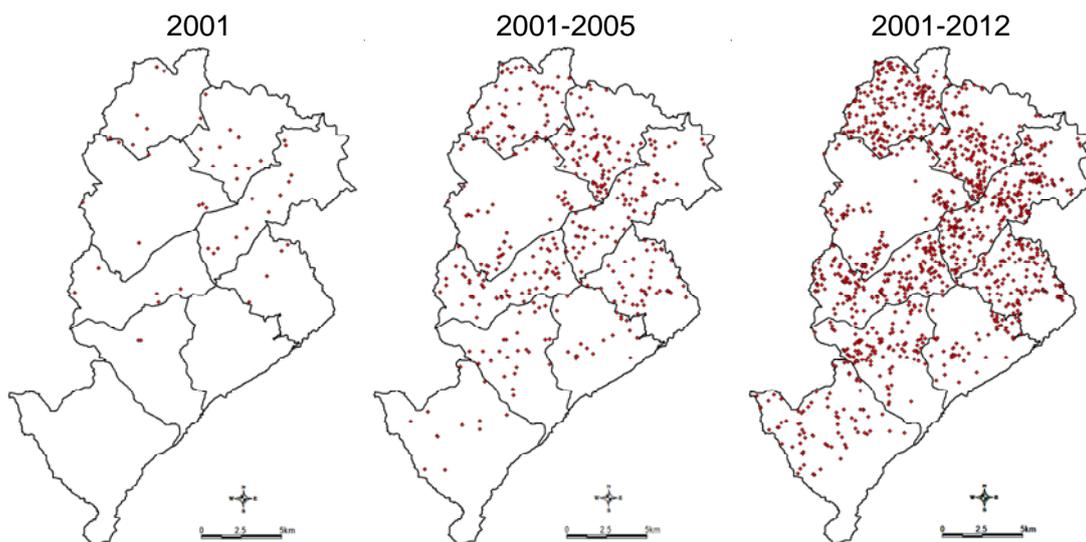
Nos anos 40 a região de Belo Horizonte inicia o processo de metropolização, período marcado por intervenções públicas definiriam os processos de expansão da capital. Os anos 50 e 60 foram marcados por intensa migração, onde houve um grande crescimento demográfico, tendo em 20 anos a população passado de 500.000 para 1.500.000 habitantes, além de relevante processo de industrialização (INCT, 2010).

O processo de urbanização se iniciou na década de 70, e a taxa de crescimento populacional em Belo Horizonte diminuiu pela primeira vez, ao passo que houve nos municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) um grande crescimento demográfico, que foi consolidado nas décadas de 80 e 90, reproduzindo-se o modelo centro-periferia, que marcou a dinâmica de crescimento da maioria das metrópoles brasileiras (INCT, 2010). Na década de 80, houve uma divisão da prefeitura em nove unidades administrativas,

denominadas regionais, sendo elas: Regional Barreiro, Centro-Sul, Leste, Nordeste, Noroeste, Norte, Oeste, Pampulha e Venda Nova, cada uma com autonomia financeira e gerencial. Logo, a administração municipal é dividida em 9 Distritos Sanitários (DS), que por sua vez se subdividem em 146 áreas de abrangência (AA), que são áreas de responsabilidade dos Centros de Saúde (CS) (Fiuza *et al.*, 2010).

O primeiro caso autóctone de LV humano em BH foi relatado em 1959, em uma criança de um ano e dez meses que nunca havia saído da cidade. O modo pelo qual a criança contraiu a infecção permaneceu obscuro (Rezende & Bastos, 1959). No ano de 1989, em Sabará, Região Metropolitana de Belo Horizonte, foi diagnosticado o segundo caso humano autóctone da doença (Genaro *et al.*, 1990).

Em 1992, também no município de Sabará, foram diagnosticados os primeiros casos de LVC, sendo a maioria dos cães provenientes do bairro Alvorada, vizinho da cidade de Belo Horizonte (Genaro *et al.*, 1990). Em dezembro do mesmo ano, foram notificados os primeiros casos de cães infectados oriundos dos distritos sanitários Nordeste e Leste ao Serviço de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte. Os primeiros casos autóctones da Leishmaniose Visceral Humana (LVH) em Belo Horizonte desde o único relato na década de 50, ocorreram em 1994, no DS Leste, limítrofe com o município de Sabará. Investimentos na estruturação do programa de controle foram realizados durante toda a série temporal da LV em Belo Horizonte (Fiuza *et al.*, 2008). A partir de 1994, em que o caso-índice de LVH foi confirmado em Belo Horizonte, a Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte (SMSA/BH) assumiu as atividades de vigilância e controle da doença. A partir daí houve uma rápida expansão da doença, com aumento significativo de casos a partir do ano de 2001. No período de 1994 a 2009, os DS Nordeste, Norte, Venda Nova e Noroeste eram responsáveis por 63,56% do total de registros da doença. Como mostra a **Figura 1**, atualmente a expansão pode ser observada de forma diferenciada em todo o município, com registro de casos nos DS Pampulha, Oeste, Centro Sul e Barreiro (Fiuza *et al.*, 2010).

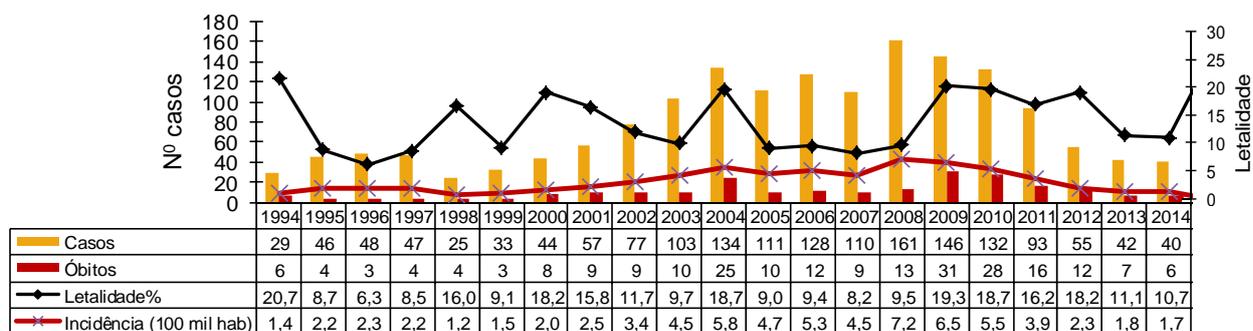


Fonte: GEEPI e GEZOZ/GVSI/SMSA

**Figura 1 - Mapa da dispersão da leishmaniose visceral humana (LVH) no município de Belo Horizonte, de 2001 a 2012.**

No ano de 2004, houve o primeiro pico na distribuição temporal da doença, com registro de 134 casos. De 2005 a 2007, o número de casos da LVH oscilou, apresentando 111, 128 e 110 casos, respectivamente. No ano de 2008, houve o maior pico desde 1994, com a confirmação de 161 casos. Entre 2004 e 2008 há uma estabilização na linha de tendência, e nos anos de 2009 a 2012 observou-se uma tendência de diminuição dos casos, com 146, 132, 93 e 55 registros, respectivamente. Esta tendência decrescente no número de casos, coincide com a dispersão das ações de controle no município, juntamente com a intensificação e continuidade destas atividades nas áreas priorizadas (Fiuza, 2010; PBH, 2011). No período entre 1994 a 2014 foram registrados 1.661 casos de LVH. Neste mesmo período ocorreram 229 óbitos (**Figura 2**).

As taxas de letalidade no município são consideradas altas se comparadas com a média no país, que segundo o Ministério da Saúde é de 6% (Brasil, 2006). No ano de 2004, a letalidade chegou a atingir 18,7%, sendo que no período entre 2005 e 2008 houve uma redução para 9,0%, 9,4%, 8,2% e 9,5%, respectivamente. No entanto, um novo aumento foi registrado nos anos seguintes, 2009- 2012, onde as taxas de letalidade se apresentaram 19,3%, 18,7%, 16,2% e 18,2%, respectivamente (PBH, 2013) (**Figura 2**). Apesar do número de casos humanos e a letalidade ter diminuído em 2013 e 2014, no primeiro ano houve uma descontinuidade das ações de controle, que persistiu em 2014, com redução de coleta dos cães e do controle químico, devido à epidemia de dengue e à greve dos agentes de combate à endemias (Boletim VS, 2013).



Fonte: GEEPI e GECOZ/GVSI/SMSA

Figura 2 - Série histórica da LVH no município de Belo Horizonte, de 1994 a 2014

Observa-se que há, em geral, uma correspondência entre o aumento da prevalência da LVC e o surgimento de casos humanos (Oliveira *et al.*, 2001; Margonari *et al.*, 2006). Nos últimos anos, assim como os casos humanos, houve um aumento das taxas de positividade canina, passando de 5,1% em 2001, para 9,3% em 2007. Houve um decréscimo nos anos de 2008 e 2009, com 7,6% e 6,8% de positividade. No ano de 2010 a taxa foi de 7,9%. No triênio subsequente (2011, 2012 e 2013), observou-se uma queda da taxa de positividade canina, sendo 5,6%, 3,2% e 4,3%, respectivamente (Figura 3). No ano de 2014 observou-se uma alta soropositividade da LVC, de 11,8%. No período de 1993 a 2014, foram analisadas 2.547.478 amostras de sangue canino no município (GECOZ/GVSI/SMSA).

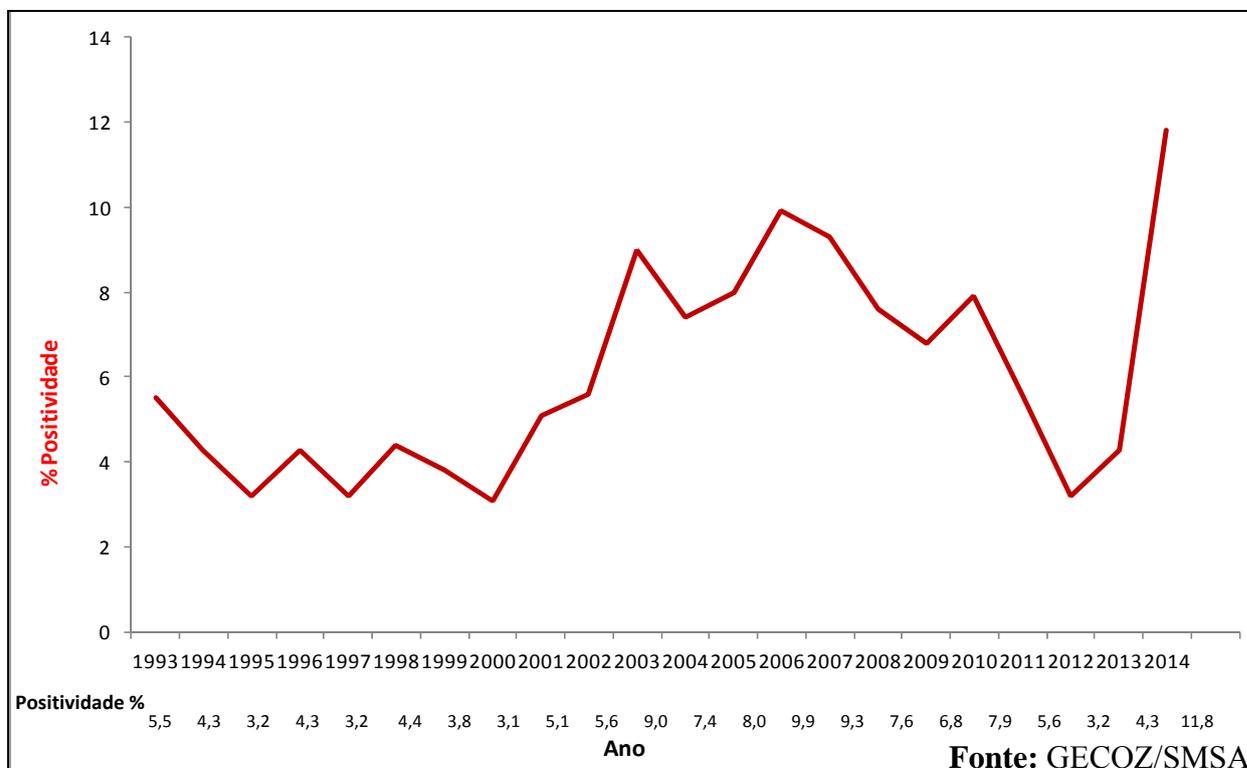


Figura 3 - Percentual de positividade da LVC em Belo Horizonte, período de 1996 a 2014.

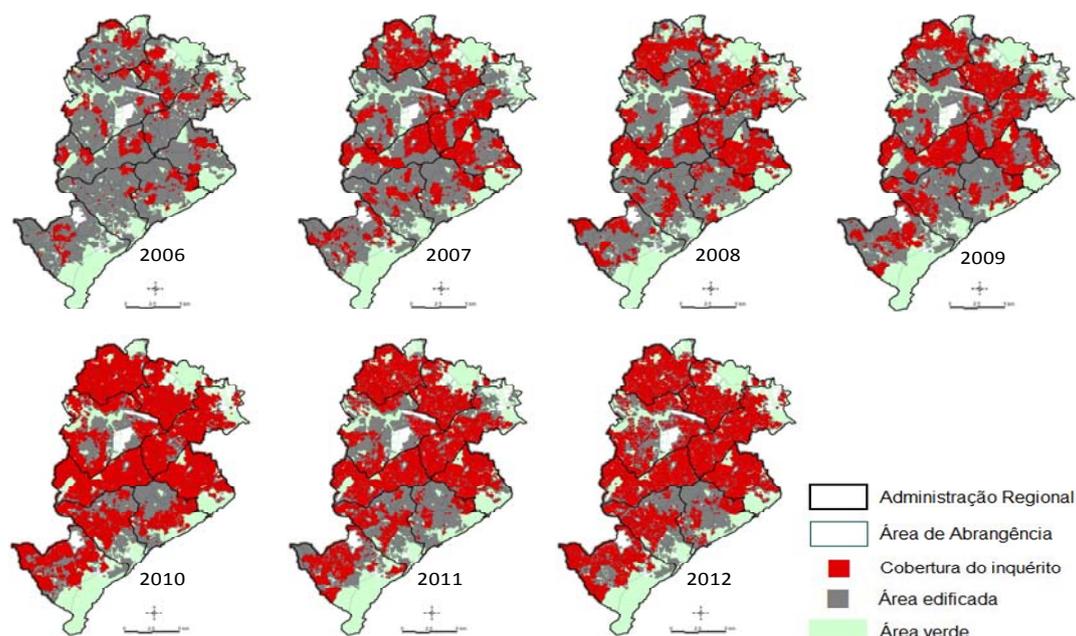
Em 2003, considerando a expansão, o aumento do número de casos e as altas taxas de letalidade da doença no município, foi elaborado um Plano Operativo pela Gerência de Controle de Zoonoses da SMSA, objetivando ampliar a capacidade de organização e de produção das atividades de controle (Fiuza *et al.*, 2010).

Em 2004, quando as atividades de controle da LV foram incluídas como prioridade de gestão no município, elaborou-se um projeto de ação ampliada que integrou as atividades das Gerências de Controle de Zoonoses, Epidemiologia, Assistência, Vigilância Sanitária e Comunicação Social (Fiuza *et al.*, 2010).

A prioridade dada pelo gestor municipal às ações de controle da LV garantiu, a partir de 2004, a implantação do Plano Operativo e a execução gradativa das metas estipuladas, como a contratação de equipes específicas para o PCLV e profissionais de laboratório. Possibilitou ainda a aquisição de equipamentos de proteção individual e de pulverizadores químicos, a reforma da área física do Laboratório de Zoonoses e a compra de equipamentos para ampliação da capacidade de processamento de exames laboratoriais com a realização de 18.000 amostras caninas/mês (Fiuza *et al.*, 2010).

A partir de 2006, com a conclusão da obra do Laboratório de Zoonoses (LZON) e aquisição de equipamentos necessários, o município pôde executar a capacidade máxima instalada do laboratório e programar 216.000 exames/ano, apesar das várias intercorrências ocorridas no período de 2001 a 2009, que influenciaram o desempenho do controle da LVC no município (Fiuza *et al.*, 2010). Além disso, Belo Horizonte trabalhou com o protocolo ELISA/RIFI até outubro de 2013 (cota de 18.000 exames /mês). Posteriormente foi implantado o protocolo DPP-TR (teste rápido) e ELISA. Devido ao repasse insuficiente de Kits DPP pelo Ministério da Saúde, desde então tem sido realizada uma cota mínima de exames (3.032 exames/mês), o que inviabiliza a realização dos inquéritos caninos censitários. A situação só será regularizada a partir de 2016 e a previsão será de realizar 13.000 exames caninos/mês para que a programação anual seja cumprida.

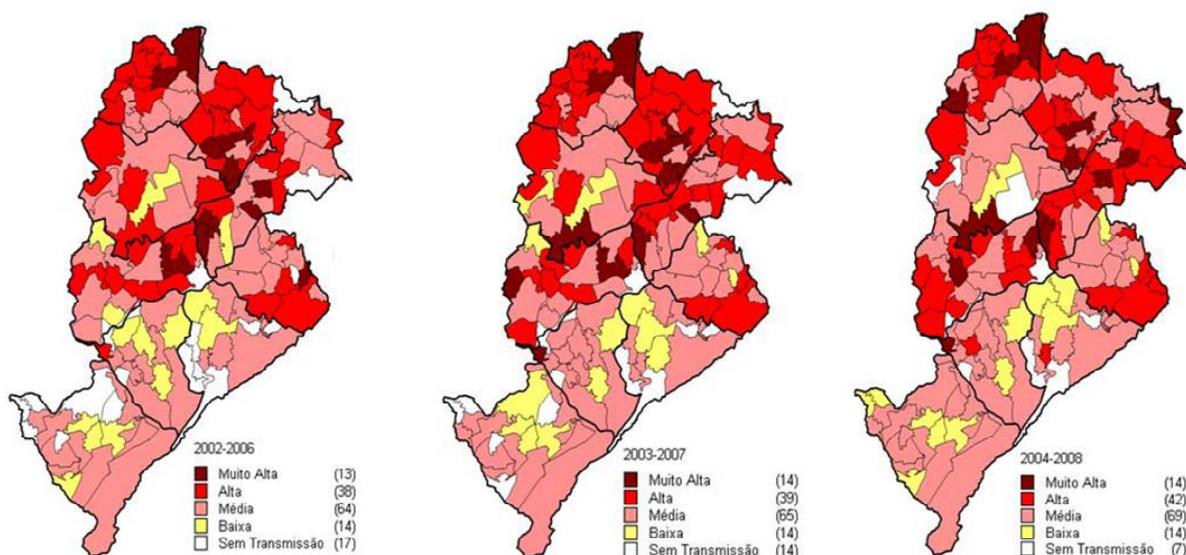
Analisando a cobertura dos inquéritos caninos censitários (ICC) no município, observa-se uma expansão do ano de 2006 até 2012 (**Figura 4**). Houve um aumento da cobertura de população canina com inquéritos caninos censitários, de 16,3% em 2006 para 68% em 2012. Além disto, houve um aumento de 68,5% da cobertura das AA priorizadas entre 2007 e 2012. Observou-se uma relação inversa entre o aumento da cobertura de exames sorológicos da população canina, com ICC anuais, e a prevalência da sororreatividade, que variou de 9,3% em 2007 a 3,2% em 2012 (GECOZ/GVSI/SMSA).



**Figura 4 - Expansão dos inquéritos caninos censitários no município de Belo Horizonte, período 2006 a 2012.**

**Fonte:** GEEPI/GECOZ/SMSA

No ano de 2003 foi adotada uma metodologia de acordo com a realidade epidemiológica do município, que estratificou as áreas de transmissão da doença baseada na incidência acumulada de casos humanos (100.000 habitantes) por AA dos CS dos últimos 5 anos, e a partir de 2009, dos últimos 3 anos. A metodologia classifica o município como de transmissão intensa alta e suas AA em cinco extratos, conforme a faixa de incidência: sem transmissão (ST), baixa transmissão (BT), média transmissão (MT), alta transmissão (AT) e muito alta transmissão (MT) (**Figura 5**). Esta divisão das AA é muito importante para o planejamento e seleção de áreas prioritárias para a realização dos inquéritos caninos censitários. Além da ocorrência de casos humanos, foi levado em conta o histórico das prevalências da LVC, as condições ambientais propícias para a ocorrência da doença e, mais recentemente, os indicadores de vulnerabilidade à saúde (Fiuza *et al.*, 2008; Moraes, 2007, 2008a e b).



**Figura 5 - Mapa da evolução dos níveis de transmissão de LVH, segundo taxa de incidência acumulada (100.000 habitantes), do município de Belo Horizonte, no período de 2002 a 2008.**

**Fonte:** GEEPI/GECOZ/SMSA (GECOZ, 2008)

Na estratificação por áreas de transmissão de LVH, de 2007 a 2009, 43,15% das áreas foram classificadas como “média transmissão”, e 34,24% como “alta e muito alta transmissão”, ou seja, em 77,39% das áreas há indicação de realização de inquéritos caninos censitários é indicada (**Tabela 1**). Um estudo realizado nos 9 Distritos Sanitários de Belo Horizonte entre os anos de 2007 e 2009, mostrou que, das 14 áreas com o maior risco relativo de contrair LV, 12 delas estão concentradas na região norte da cidade (de Araújo *et al.*, 2013).

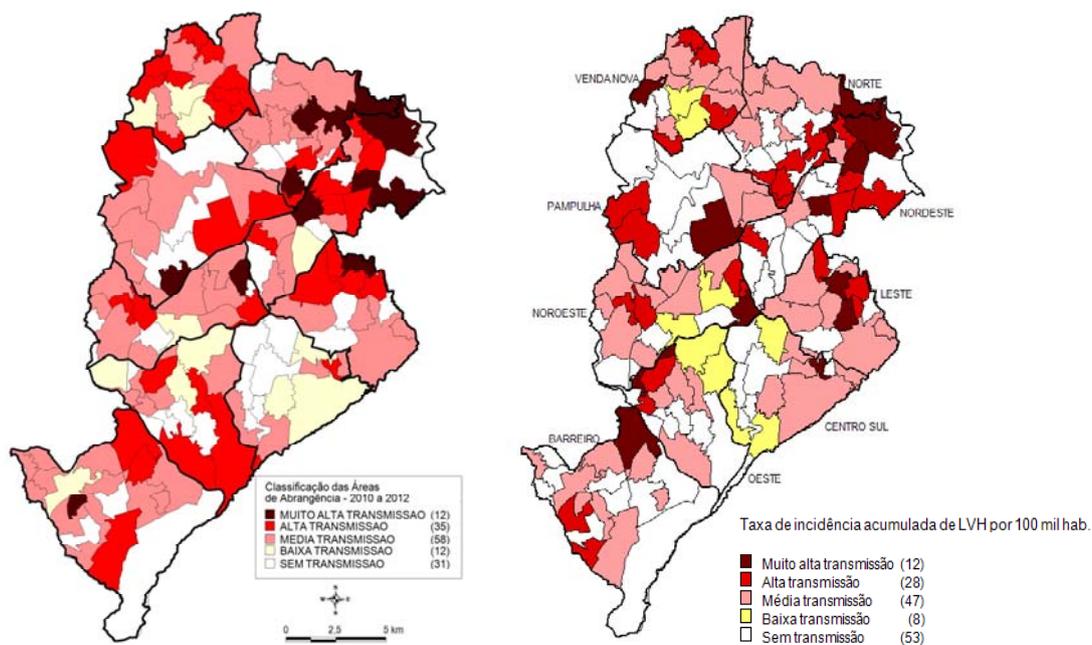
**Tabela 1- Estratificação das áreas de risco segundo taxa de incidência acumulada de casos por regional, do município de Belo Horizonte, no período de 2007 a 2009.**

Regional	Estratificação 2007-2009				
	MA	AT	MT	BT	ST
Barreiro	0	1	12	2	5
Centro Sul	1	0	6	2	3
Leste	1	3	6	2	2
Nordeste	4	10	6	1	0
Noroeste	2	8	7	1	2
Norte	1	7	10	0	1
Oeste	0	2	7	3	3
Pampulha	1	0	3	2	4
Venda Nova	3	6	6	0	0
<b>Total</b>	13	37	63	13	20
146 AA	8,90%	25,34%	43,15%	8,90%	13,70%

**Fonte:** GEEPI e GECOZ/SMSA

A **Figura 6** demonstra a classificação das áreas de transmissão no triênio 2010-2012. Comparando-se a evolução da estratificação das áreas do município, observa-se que há uma alternância de classificação entre as áreas de média, alta e muito alta transmissão, e diminuição das áreas sem transmissão, que pode ser notado principalmente nos distritos de expansão recente como os DS Barreiro e Oeste (Fiuza *et al.*, 2010).

O mapa abaixo mostra a estratificação das áreas de risco para LV, no triênio 2011-2013, que foi a referência para a programação das ações para o ano de 2014. Observa-se em relação ao último triênio, que houve uma alternância na classificação das áreas de alta, média e baixa transmissão, e um aumento das áreas sem transmissão no município em geral (**Figura 6**).



**Figura 6 - Mapa da estratificação das áreas de abrangência segundo o risco de leishmaniose visceral humana (LVH) no município de Belo Horizonte, nos triênios 2010-2012 e 2011-2013.**

Fonte: GEEPI e GECOZ/ GVSI/SMSA

### 3.5 Ações de controle para a leishmaniose visceral

As campanhas de controle no Brasil iniciaram na década de 50 e os trabalhos de Deane (1956) realizados no Ceará foram de enorme contribuição para a compreensão da doença, pois elucidaram vários aspectos da epidemiologia da mesma. Foi o primeiro que

descreveu a doença em cães na área urbana, além de sugerir as medidas profiláticas para a LV, que são mantidas até a atualidade. Relatou o flebotomíneo *Lu. longipalpis* como vetor responsável pela transmissão da doença na área estudada e observou o aumento de sua densidade na estação chuvosa. Associou também os focos endêmicos com os cães infectados e identificou o homem, o cão e a raposa como hospedeiros. Sugeriu que no litoral e em outras regiões do Brasil existiam condições para que a endemicidade da doença fosse mantida.

Apesar dos esforços para combater a doença, seu controle é complexo, em virtude das características epidemiológicas e do conhecimento ainda insuficiente sobre os elos que compõe a cadeia de transmissão da LV. Desde a década de 50 as estratégias de controle tem se mantido inalteradas e se baseiam no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, eliminação dos reservatórios caninos, redução da população de vetores e medidas de educação e saúde (Brasil, 2006). As estratégias de controle atuais não têm sido capazes de prevenir a expansão geográfica, além do aumento da incidência e da letalidade da leishmaniose visceral (Dantas Torres & Brandão Filho, 2006). Dentre as razões para a ineficiência das ações de controle, está a ausência de um sistema de vigilância permanente, com a utilização extensiva de recursos humanos e financeiros e a descontinuidade das ações de controle do vetor e do reservatório canino, por problemas orçamentários e escassez de recursos humanos (Gontijo & Melo, 2004; Costa *et al.*, 2007b; Werneck *et al.*, 2008). Além disto a possibilidade de transmissão por cães assintomáticos, atraso nos procedimentos diagnósticos, e a rápida reposição de cães em substituição aos cães eliminados são fatores que favorecem a manutenção da transmissão (Costa & Vieira, 2001; Courtenay *et al.*, 2002).

Entre os componentes do PCLV, a vigilância epidemiológica tem como objetivo reduzir as taxas de letalidade e o grau de morbidade por meio do diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, além do controle do reservatório canino, dos vetores e das situações de risco, a fim de diminuir o risco de transmissão da doença. As áreas com transmissão são estratificadas segundo critérios epidemiológicos, sendo a classificação dos municípios baseada na média de ocorrência de LVH nos últimos 3 anos. De acordo com o MS, os municípios com média de casos menor que 2,4 são classificados como transmissão esporádica, aqueles com a média de casos  $\geq 2,4$  e  $< 4,4$  são classificados como de transmissão moderada e com média de casos  $\geq 4,4$  casos, são classificados como transmissão intensa (Brasil, 2009).

A definição das medidas de controle a serem utilizadas tem como principal indicador a ocorrência de casos humanos; a caracterização da área de transmissão é muito importante no processo de investigação e adoção dessas medidas. O novo Programa de Controle propõe a incorporação de áreas silenciosas, sem casos caninos ou humanos nas ações de vigilância e

controle, visando assim evitar e minimizar a propagação da doença em áreas sem transmissão (Brasil, 2006). Para que as ações de controle da LV sejam sustentáveis nos grandes centros urbanos é de fundamental importância que se tenha planejamento, infra-estrutura operacional e disponibilidade de insumos estratégicos – kits de exame para o diagnóstico canino, e inseticidas e priorização do agravo pela instituição (Fiuza *et al.*, 2010). Além disto, segundo Dantas Torres & Brandao Filho (2006) existe a necessidade de uma melhor definição das áreas prioritárias e da implementação de um sistema de monitoramento integrado das atividades dirigidas para o controle e vigilância epidemiológica, o que permitiria uma avaliação mais eficaz do programa de controle em diversas regiões.

Poucos estudos brasileiros avaliam especificamente a eficácia da eliminação de cães soropositivos e do controle vetorial na redução da incidência da doença humana (Werneck *et al.*, 2008). Um bom exemplo de como as medidas de controle integradas podem reduzir a incidência da doença foi mostrado em estudo realizado em Porteirinha, onde foi identificada a redução da incidência da LV humana e canina, após a implementação de ações para o combate do vetor e a retirada sistemática de cães soropositivos (França- Silva, 2003). Oliveira *et al.* (2003) avaliando as ações do PCLV, observaram que houve uma correlação positiva entre o percentual de cobertura para inquérito canino e borrifação com a incidência de casos humanos. Outros estudos, avaliando a efetividade do controle vetorial e da eliminação de cães soropositivos na incidência de infecção por LV, mostraram que uma proteção maior é conferida nas áreas em que estas duas medidas de controle são realizadas em conjunto (Oliveira *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2007b; Souza *et al.* 2008; Werneck *et al.*, 2008).

Vários estudos discutem sobre a efetividade da eliminação dos cães na redução da incidência da doença humana; alguns demonstram que a eutanásia de cães tem um impacto limitado no controle da LVH, pelo menos quando utilizada separadamente do controle vetorial (Dietze *et al.*, 1997; Ashford *et al.*, 1998; Courtenay *et al.*, 2002). Algumas razões que contribuem para a ineficiência do Programa da LV são a demora entre a coleta, análise e a eutanásia dos cães soropositivos (Courtenay *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2004), as limitações dos testes sorológicos utilizados em larga escala nos inquéritos caninos (Moreira *et al.*, 2004; Rosário *et al.*, 2005) e a rápida reposição de cães susceptíveis pela população (Dye, 1996; Moreira *et al.*, 2004). Por outro lado, uma associação positiva entre a eutanásia de cães e a redução da incidência da LVH já foi demonstrada por outros autores (Ashford *et al.*, 1998; Palatinik de Souza *et al.*, 2001; Nunes *et al.*, 2010). Em estudo conduzido em Araçatuba, verificou-se que a eutanásia de cães, conduzida de forma periódica e sistemática, associada ou não ao controle dos vetores, foi capaz de controlar a força de infecção entre os cães, reduzindo a incidência da LVH (Camargo-Neves, 2004).

A estratificação das áreas a serem cobertas no município de Belo Horizonte, de acordo com o Ministério da Saúde, se baseiam na incidência cumulativa de casos humanos, além da informação sobre a prevalência da doença no cão e a situação ambiental em cada área (Oliveira *et al.*, 2008). O Laboratório de Zoonoses (LZOON), responsável pelo processamento das amostras caninas, e o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), que realiza o recolhimento e eutanásia dos cães soropositivos, atuam como unidades secundárias de apoio às ações executadas pelos DS.

Em um estudo ecológico realizado em Belo Horizonte, demonstrou-se através de análise espacial, que o risco relativo de contrair a LV está correlacionado com renda, educação e o número de cães infectados por habitantes. Neste estudo, realizado de 2007 a 2009, também foi observado que há uma sobreposição dos maiores níveis de infecção canina com as maiores taxas de incidência de LVH em pelo menos 5 dos 9 distritos sanitários (de Araújo *et al.*, 2013).

Os inquéritos censitários caninos em Belo Horizonte são realizados durante todo o ano nas áreas de alta e muito alta transmissão e o controle vetorial direcionado para setores ou micro-áreas com maior concentração de cães infectados. O intervalo entre coleta e retirada dos cães é feito em um período médio de 30 dias. O intervalo decorrido entre estas ações é um importante indicador de efetividade das ações de controle sobre os reservatórios. Observa-se que a ação continuada de retirada dos cães soropositivos contribui para a diminuição dos cães que são encaminhados para a eutanásia, pois reduz a prevalência da doença nos cães soropositivos na área ao longo do tempo. Resultados “monitorar e indeterminados” são questões importantes que devem ser observadas e discutidas no contexto do controle do reservatório urbano. Estes cães, positivos para o teste ELISA porém negativos e inconclusivos, respectivamente, para RIFI, representaram no período entre 2006 e 2012, 5,5% dos resultados obtidos (Fiuza *et al.*, 2008). Observou-se que em média, 80% dos cães com resultado indeterminado e monitorar na primeira coleta se positivaram na segunda coleta após um intervalo médio de dois meses (Menezes, 2011; Morais, 2011).

Existem alternativas promissoras no combate à doença, além das medidas tradicionais utilizadas (revisado por Alexander & Maroli, 2003). Experiências baseadas no controle do vetor direcionadas para o controle da população canina como as coleiras impregnadas com inseticidas, em particular deltametrina, têm mostrado bons resultados na proteção dos animais, com consequências na transmissão (Killick Kendrick *et al.* (1997); Reithinger *et al.* (2001); Reithinger *et al.* (2004); Gavgani *et al.* (2002)). Além disto, o efeito epidemiológico desta medida, se deve, além da redução da taxa de picada de flebotomíneos, à alta taxa de mortalidade dos flebotomíneos que se alimentam em cães com coleiras impregnadas (Killick

Kendrick *et al.*, 1997; Reithinger *et al.*, 2001). Estudo em região endêmica para LV em Minas Gerais, demonstrou que, em cães que utilizaram a coleira impregnada com deltametrina, houve uma redução significativa nas chances de aumento de títulos de anticorpos anti-*Leishmania* em 50% (Reithinger *et al.*, 2004). Gavvani *et al.* (2002) mostraram que o uso da coleira impregnada com deltametrina protege não só o cão da infecção, mas também reduz a taxa de incidência de infecção por *Leishmania* em crianças. Outra medida de controle que vem sendo testada, os mosquiteiros impregnados com inseticidas, tem mostrado uma proteção contra a picada de flebotômios (Alexander & Maroli, 2003). Em área de transmissão intensa de LT e área endêmica para LV, respectivamente, Kroeger *et al.* (2002) e Courtenay *et al.* (2007) mostraram uma clara relevância entomológica de mosquiteiros tratados com inseticidas, fornecendo um alto grau de proteção contra a transmissão intradomiciliar da doença. Em relação à imunoprofilaxia, não há até o momento uma vacina humana eficaz, sendo que as vacinas para cães descritas na literatura mostram uma eficácia ainda reduzida (Gontijo & Melo, 2004; Gradoni, 2015). Os dois únicos ensaios de campo conduzidos com as vacinas caninas comercialmente disponíveis utilizaram menos de 100 cães cada, e conferem apenas uma proteção parcial. Além disso, apenas um pequeno estudo piloto foi realizado para avaliar a infectividade de cães vacinados para os flebotômios (Gradoni, 2015).

Um dos principais desafios para o desenvolvimento da vacina para LV é a necessidade de combinar dois ou mais antígenos para conservar as propriedades antigênicas para várias espécies de leishmânia, e para as diferentes fases do parasito. Apesar de alguns relatos controversos, há uma grande possibilidade de que a investigação dos candidatos a vacinas usando de modelos experimentais bem planejados e ensaios clínicos possa resultar no desenvolvimento de uma vacina promissora para LV (Jain *et al.*, 2015).

### **3.5.1 Controle químico**

Na prática, a prevenção de doenças transmissíveis por vetores biológicos é uma tarefa árdua, pois, como no caso da LV, ainda se associa a existência de reservatórios silvestres e domésticos e condições ambientais (Gontijo & Melo, 2004).

A avaliação do controle químico consiste no método empregado pelo Ministério da Saúde (WHO, 1970) com o objetivo de verificar a persistência do inseticida nas superfícies tratadas e a efetividade do produto, mensurada pela mortalidade do vetor.

O Ministério da Saúde recomenda que o controle químico seja realizado em áreas com o primeiro registro de caso autóctone de LV humana, de transmissão moderada e intensa e com surto de LV. Os produtos mais empregados são os inseticidas pertencentes à classe dos

piretróides sintéticos, cipermetrina e deltametrina, sendo sua ação residual na superfície de paredes de aproximadamente 3 meses (Brasil, 2006). Mazzari *et al.* (1997), testando várias classes de inseticidas, observaram que as populações de campo de *Lu. longipalpis* foram suscetíveis a todas elas, demonstrando pouca ou nenhuma resistência significativa.

Estudos demonstram que a aplicação de inseticidas é bastante eficiente no controle da LV, sendo que a partir de 2002, o método foi considerado como prioridade essencial do Programa Nacional de Controle de Leishmanioses (PNCL) (Costa & Vieira, 2001). Alguns trabalhos no Brasil avaliaram a eficácia da borrifação domiciliar e peridomiciliar com deltametrina na redução do número de flebotomíneos e seu efeito residual (Falcão *et al.*, 1991; Marcondes & Nascimento, 1993; Barata *et al.*, 2011a), mostrando que há uma redução no número de flebotomíneos após a aplicação do inseticida. Feliciangeli *et al.* (2003) também demonstraram uma diminuição significativa no número de flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* na ilha de Margarita, Venezuela, após a borrifação intradomiciliar.

No município de Belo Horizonte, a média de borrifações obtida entre os anos de 2001 a 2009 foi de 115.383 procedimentos, perfazendo uma cobertura de 64%, contando que a média de borrifações programada para o período foi de 179.487 procedimentos. A meta estipulada pelo município era de realizar no mínimo 80% das borrifações programadas anualmente. Esta meta não foi atingida nos anos de 2003 (50,3%), 2004 (58,1%), 2005 (57,4%) (Fiuza *et al.*, 2010).

No ano de 2006 houve um redimensionamento da programação anual de controle químico, levando em conta uma série de fatores que interferiam na rotina de trabalho, além da indicação para o controle químico, que passou a ser realizada de forma seletiva, dando prioridade aos setores com maior concentração de cães soropositivos identificados nos inquéritos caninos censitários, sendo este mapeamento feito por técnicas de georreferenciamento. Mesmo com a reprogramação das metas, houve uma diminuição das borrifações no ano de 2007 e principalmente em 2008 e 2009, devido ao deslocamento das equipes de controle da LV para o combate da dengue, devido ao recrudescimento dos casos da doença (Fiuza *et al.*, 2010).

Ressalta-se que a descontinuidade das ações de controle vetorial compromete de maneira significativa as ações de prevenção e controle da LV no município, uma vez que o controle químico do vetor deve ser realizado de forma integrada ao manejo ambiental e às atividades de retirada do reservatório canino nas áreas de transmissão (Fiuza *et al.*, 2010). Camargo-Neves (2004) enfatiza a importância do controle químico domiciliar associado ao saneamento urbano como medida de redução de vetores no ambiente intradomiciliar.

Santana Filho *et al.* (2012) observaram que a recusa dos proprietários foi principal motivo para a não realização do controle químico no interior das residências. Além disto, o maior número de casos da LVH foi observado em quarteirões onde houve recusa pelos proprietários em receber o serviço de controle químico. Foi verificado na prática do serviço de controle vetorial que as recusas ocorrem frequentemente pelo desconhecimento sobre a doença pelos moradores. Camargo- Neves (2004), Tauil (2006) e Silva *et al.* (2007b) sugeriram que a recusa da população seja um dos empecilhos para a implementação do controle químico vetorial no Programa de Controle da LV.

### **3.5.2 Educação e Manejo Ambiental**

Sabendo-se da dificuldade em se controlar o vetor somente com a aplicação de inseticidas, recomenda-se também a realização do manejo ambiental, onde se altera as condições do ambiente para evitar que o vetor se prolifere. Ações como limpezas de terrenos, quintais, limpeza urbana, eliminação de resíduos sólidos orgânicos e destino adequado dos mesmos, eliminação de fonte de umidade, são indicadas como medidas de saneamento ambiental (Brasil, 2006). A efetividade destas ações depende de mudança de comportamento, sendo uma medida em que se espera resultados de médio e longo prazo (Oliveira *et al.*, 2008).

No estado de São Paulo, o diagnóstico ambiental, que consiste na avaliação sobre as condições sanitárias de todos os imóveis da área urbana dos municípios, é realizado pelas equipes municipais responsáveis pelo controle de vetores. Durante a visita, os moradores são orientados sobre os cuidados com a manutenção dos quintais e jardins e com a criação de animais domésticos. Assim, a partir do diagnóstico, são selecionados os imóveis “de risco” e a limpeza é de responsabilidade do morador, com o apoio da prefeitura. Em áreas com prevalência da LVC  $\geq 2\%$ , as ações direcionadas a estes imóveis são intensificadas (reforço para manutenção do peridomicílio, visitas específicas para o acompanhamento das condições sanitárias); em área de ocorrência de casos humanos, preconiza-se que sejam intensificadas as ações de manejo ambiental, precedendo a realização do controle químico (Camargo-Neves *et al.*, 2006).

Estudos para o controle de flebotomíneos em áreas endêmicas para LT (reorganização e limpeza do peridomicílio e desinsetização de edificações) têm diminuído a frequência destes insetos no intra e peridomicílio (Teodoro *et al.*, 1999; Teodoro *et al.*, 2003; Teodoro *et al.*, 2004). Trabalhos realizados no Paraná, município de Doutor Camargo, visando o controle da LT, no período de 1998 a 2000, objetivaram avaliar o impacto da reorganização e limpeza do ambiente e desinsetização dos domicílios e abrigos de animais como medidas para reduzir a

população de flebotomíneos, comparando com os dados coletados no período de 1996 a 1997 (Teodoro *et al.*, 2003). Foi observada uma redução expressiva do número de flebotomíneos. Os resultados encontrados nesta mesma localidade nos anos de 2001 a 2002 foram comparados aos dois períodos anteriores, observando-se um aumento da média horária de insetos capturados, provavelmente devido à falta de regularidade das medidas propostas para o controle do vetor (Teodoro *et al.*, 2007). Já nos anos de 2005 a 2006, houve uma queda na densidade de flebotomíneos em relação ao período 2001-2002, principalmente no domicílio (Reinhold-Castro *et al.*, 2008). Os mesmos autores, no município de Jussara, Paraná, demonstraram que a reorganização e limpeza do peridomicílio em áreas endêmicas pode diminuir a população de flebotomíneos, diminuindo assim o risco de transmissão de *Leishmania* (Teodoro *et al.*, 2004). Alguns autores demonstraram que áreas onde o solo é úmido e há matéria orgânica de origem vegetal e animal, existe a condição propícia para os criadouros dos flebotomíneos, logo para sua concentração no ambiente peridomiciliar (Forattini 1953, Casanova, 2001; Teodoro *et al.*, 1999).

Em Belo Horizonte, a associação do manejo ambiental ao controle químico é ainda um grande desafio, sendo estimulada por meio de orientação aos moradores e/ou articulação intersetorial, (Fiuza *et al.*, 2010). Além disto, o nível de conhecimento da população sobre a doença é superficial, dificultando a implementação das práticas de controle da LV (Borges *et al.*, 2008).

Em 2005, um estudo realizado em Belo Horizonte e em duas cidades da RMBH, avaliaram o potencial de panfletos como meio de divulgação de informações sobre a LV, sendo respondido um questionário antes e após a leitura dos mesmos. O conhecimento dos profissionais de controle de zoonoses foi maior do que o dos demais participantes antes (90%) e após (96%) a leitura dos panfletos. O conhecimento geral da doença nas outras categorias variou de 45% a 72%, sendo que após a leitura dos panfletos houve um aumento expressivo; os níveis aumentaram para 71% a 92%. Antes da leitura, a menor proporção de acertos em todos os grupos foi relacionada aos sintomas da doença. Os panfletos se mostraram como uma boa ferramenta educacional, devido ao aumento das respostas corretas após sua leitura. Foram avaliados seis meses depois, 65 alunos que participaram deste estudo, e, utilizando-se o mesmo questionário, a porcentagem média das respostas corretas não variou quando comparada às respostas após a leitura imediata dos panfletos. Esta ferramenta normalmente é muito útil para os programas de controle da doença, mas devem ser inseridas no processo de educação continuada (Luz *et al.*, 2005).

Também no município de Belo Horizonte, Borges *et al.* (2008) buscaram avaliar o nível de conhecimento e algumas atitudes preventivas em relação à LV. Foi observado que

50% dos indivíduos acometidos pela LV desconheciam completamente quando foram infectados, e apenas 1,2% conheciam o vetor. Em relação a estes indivíduos, 56,4% não praticam nenhum tipo de prevenção em relação à doença. Foi possível estimar que há uma diminuição de 1,94 vezes no risco de ocorrência da LV para pessoas que praticam algum tipo de medida preventiva, se comparadas àquelas que não praticam, sendo qualquer conhecimento a respeito da doença, capaz de minimizar o risco e adoecer em 2,24 vezes.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Conhecer os aspectos eco-epidemiológicos envolvidos na transmissão e controle da leishmaniose visceral no município de Belo Horizonte.

### 4.2 Objetivos Específicos

1. Determinar a fauna de flebotomíneos e o comportamento das espécies em relação à endofilia e exofilia das áreas selecionadas;
2. Estabelecer a flutuação mensal de *Lu. longipalpis* e correlacioná-la com as variáveis climáticas umidade relativa do ar, temperatura e pluviosidade;
3. Verificar por meio da flutuação mensal de *Lu. longipalpis*, o período do ano mais propício para intensificação das ações de controle (borrifação de inseticidas);
4. Estudar a infecção natural dos espécimes capturados por meio de exame molecular e caracterizar a espécie de *Leishmania* circulante nos vetores;
5. Determinar a taxa de soroprevalência da LVC nas áreas selecionadas;
6. Identificar a infecção por *Leishmania* em diferentes amostras (baço, medula, linfonodo mesentérico e pele) dos cães soropositivos através de exames parasitológicos e moleculares;
7. Avaliar o impacto das medidas de controle do vetor nas diferentes áreas propostas através do número mensal de flebotomíneos antes e após as medidas de controle empregadas (borrifação e manejo ambiental).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Área de estudo

O município de Belo Horizonte (19°55'15''S, 43°56'16''W) é a capital do estado de Minas Gerais, possui uma área de 331,4 Km<sup>2</sup>, com uma população de 2.375.151 habitantes, e segundo o censo do IBGE em 2010, é a sexta cidade mais populosa do país. Possui um índice médio de desenvolvimento humano (IDH) de 0,810, classificado como muito alto de acordo com o PNUD, e possui o quinto maior PIB entre os municípios brasileiros (IBGE, 2010). Possui uma geografia diversificada, com morros e baixadas, e seu clima é tropical de altitude. É subdividido em nove áreas administrativas regionais, que coincidem com os nove distritos sanitários. O estudo foi realizado nas AA dos CS Salgado Filho (Distrito Oeste) e Miramar (Distrito Barreiro) (**Figura 7**). A escolha das áreas selecionadas teve como critério principal a última estratificação de risco epidemiológico (2004-2008), e são classificadas como de médio risco para transmissão de LVH (SMSA/BH). Também considerou-se as características de ocupação do espaço, existência e tipo de peridomicílio. Segundo o censo IBGE 2000, o Centro de Saúde Salgado Filho, possui 8.585 imóveis e uma população de 20.445 habitantes, sendo dividido em 163 quarteirões. O Centro de Saúde Miramar é dividido em 132 quarteirões, possui 6.616 imóveis e uma população de 14.290 habitantes. Para fins deste estudo, cada AA foi subdividida em 3 trechos, aleatoriamente, sendo colocadas 3 pares de armadilhas em cada um (peri e intradomicílio) para a captura de flebotomíneos, com intervenções de controle diferenciadas:

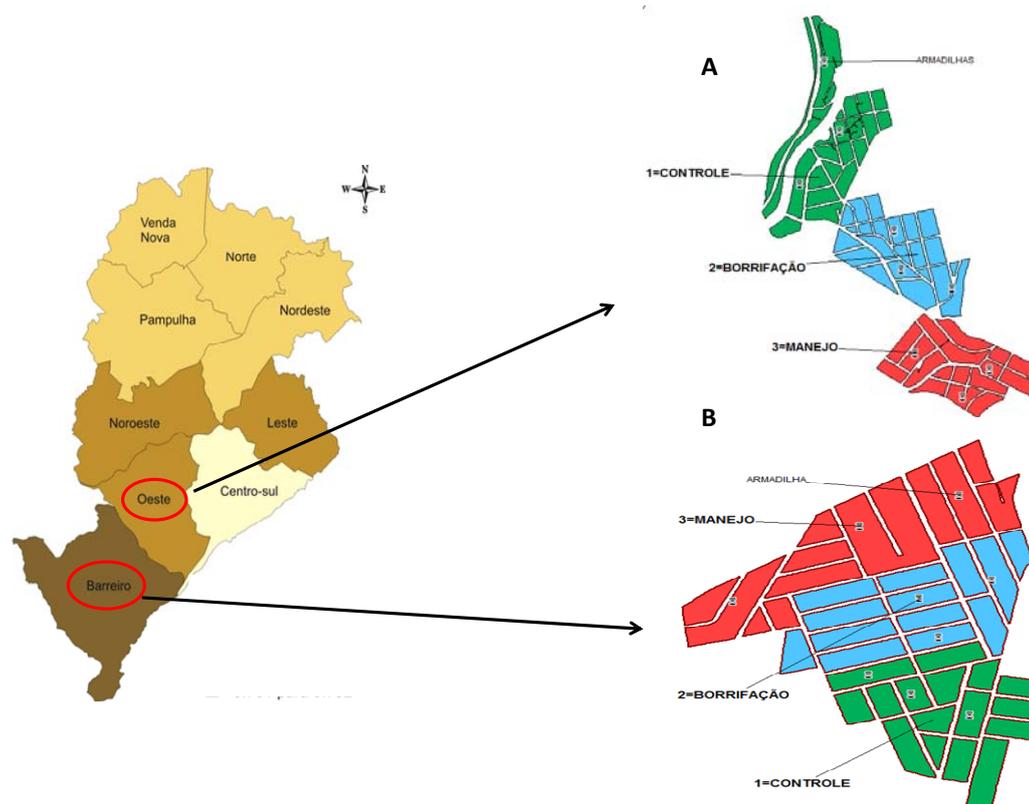
•**Trecho 1** – área controle – foi realizado o inquérito canino censitário, eliminação dos reservatórios caninos reagentes e identificação das condições sanitárias dos domicílios e possibilidades de focos de *Lu. longipalpis*.

•**Trecho 2** – foi realizado o inquérito canino censitário, eliminação dos reservatórios caninos reagentes, borrifacção residual e identificação das condições sanitárias dos domicílios e possibilidades de focos de *Lu. longipalpis*.

•**Trecho 3** – foi realizado o inquérito canino censitário, eliminação dos reservatórios caninos reagentes e manejo ambiental direcionado e identificação das condições sanitárias dos domicílios e possibilidades de focos de *Lu. longipalpis*.

Em todas as áreas foram instaladas armadilhas do tipo HP para captura de flebotomíneos. A curva de flebotomíneos foi considerada o principal indicador, sendo que durante o primeiro período do projeto (setembro/2010 a junho/2011), as coletas entomológicas foram realizadas sem as intervenções para o controle dos vetores (borrifacção

de inseticida e manejo ambiental). No período seguinte (julho/2011 a agosto/2012), as coletas foram realizadas após as intervenções citadas.



**Figura 7- Mapa do município de Belo Horizonte e os distritos do estudo com seus respectivos Centros de Saúde: Oeste (A- Salgado Filho) e Barreiro (B- Miramar), e pontos de captura de flebotomíneos nos trechos do estudo: controle, borrifação e manejo.**

## 5.2 Estudo de flebotomíneos

### 5.2.1 Captura de flebotomíneos

As capturas entomológicas sistemáticas para o levantamento da fauna flebotomínica foram realizadas nas AA dos CS Salgado Filho e Miramar, durante o período de setembro de 2010 a agosto de 2012. Foram selecionadas 18 residências como pontos de captura, sendo 9 no Salgado Filho e 9 no Miramar (3 casas por trecho); estas foram georeferenciadas através de GPS, onde foram medidas as coordenadas X e Y e a altitude do local. A escolha dos locais de captura foi baseada na ocorrência de casos humanos ou caninos da doença e o critério de inclusão foram as residências que possuíam condições favoráveis ao desenvolvimento e presença do vetor, como área sombreada, presença de animais domésticos, árvores frutíferas, e certa desorganização do ambiente. Para a realização das capturas foram utilizadas armadilhas luminosas do tipo HP (Pugedo *et al.*, 2005) durante 3 noites consecutivas por mês,

sempre na primeira semana de cada mês. Foram selecionadas 3 residências em cada um dos trechos estudados e colocadas 2 armadilhas em cada uma, 1 no intradomicílio e outra no peridomicílio, distantes aproximadamente 30 metros uma da outra, expostas das 17:00 h às 9:00 h da manhã seguinte, totalizando 36 armadilhas (18 no Salgado Filho e 18 no Miramar). As armadilhas foram instaladas de maneira sistemática e de forma pareada, para fornecer subsídios para os estudos de endofilia e exofilia (**Anexo 9.2**).

O material entomológico foi encaminhado para triagem e processamento no Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou/CPqRR. Nos 1º, 2º e 3º dias de coleta, todos os machos foram acondicionados em tubos de hemólise contendo álcool 70%. As fêmeas do 1º e 2º dias foram acondicionadas em tubos de hemólise contendo álcool 70% e as fêmeas não ingurgitadas do 3º dia foram acondicionadas em tubos de criopreservação contendo DMSO 6% e congeladas a -20° C para posterior análise molecular (Nested PCR).

### **5.2.2 Preparo, montagem e identificação de flebotomíneos**

Os flebotomíneos capturados foram preparados e montados em lâminas utilizando-se o líquido de Berlese para machos e fêmeas, de acordo com a técnica de Langeron (1949), modificada.

Os flebotomíneos capturados foram identificados através do uso de descrições específicas, chaves taxonômicas e comparações com exemplares da coleção de referência (Coleção de Flebotomíneos do CPqRR). A classificação adotada foi a proposta por (Young & Duncan, 1994). As espécies *Lu. sallesi* e *Lu. cortelezzii* foram consideradas como complexo *cortelezzii*, devido à semelhança morfológica das fêmeas. A identificação somente ao nível de gênero foi realizada no caso de algum exemplar coletado não apresentar a integridade necessária para permitir sua identificação específica.

As fêmeas capturadas para detecção de infecção natural foram dissecadas utilizando-se estiletes entomológicos, e foram retirados os últimos três segmentos abdominais e a cabeça, que foram montados entre lâmina e lamínula e identificados ao nível de espécie. O restante do flebotomíneo foi acondicionado em microtubos devidamente rotulados de acordo com os dados de coleta: bairro (AA), casa, armadilha, espécie, e armazenados a -20°C para análises moleculares posteriores. Foram formados “pools” de até 10 flebotomíneos por tubo, de acordo com a espécie, sendo os “pools” formados por flebotomíneos da mesma espécie, mesmo mês de captura e mesma armadilha (ponto de captura).

### **5.2.3 Influência das variáveis climáticas no número mensal de flebotomíneos**

Os dados climáticos de umidade relativa do ar (%), precipitação pluviométrica total (mm) e temperatura (°C), referente ao período de estudo (09/2010 a 08/2012), foram obtidos junto ao Instituto Nacional de Meteorologia – 5º Distrito Belo Horizonte, digitados no BDMEP, OMM: 83587, latitude: -19,93°; longitude: -43,93° e altitude: 915m. A estação está operante desde 03/03/1910.

Para avaliar a influência das variáveis climáticas em relação ao número de flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* capturados foram utilizados os dados climatológicos do município e a os números mensais de *Lu. longipalpis* capturados durante o período de estudo. Os valores médios dos dados climáticos e seus respectivos desvios padrão foram calculados por ano. Os meses com índice de precipitação pluviométrica mais elevado e mais baixo que a média anual foram considerados chuvosos ou secos, respectivamente. Para fins de comparação, os dados foram normalizados, tomando o valor mais elevado de precipitação pluviométrica, bem como o maior número de *Lu. longipalpis* capturados em cada ano como 100% para cada variável.

### **5.2.4 Extração de DNA das fêmeas capturadas para detecção de infecção natural**

A extração de DNA das fêmeas de flebotomíneos foi realizada em “pools” de número variável, de acordo com a espécie de flebotomíneo, para a detecção da infecção por *Leishmania* spp.

As fêmeas foram dissecadas para a confirmação da espécie, e agrupadas em “pool” de até 10 indivíduos da mesma espécie e colocadas em microtubos de fundo cônico, para a extração de DNA. A extração para detecção de infecção natural foi realizada através do Kit de Extração de Tecidos e Células da GE Amersham Biosciences e armazenados a -20° C para posterior utilização.

### **5.2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de gene constitutivo de flebotomíneo (cacofonia)**

Para a confirmação da extração de DNA das fêmeas foi utilizado um par de iniciadores que amplificam a região IV S6 do gene constitutivo específico (cacofonia) de flebotomíneos neotropicais do gênero *Lutzomyia*.

A técnica foi realizada utilizando-se os iniciadores: (5' GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3' e 5' CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC 3') (Lins *et al.*, 2002). A amplificação do gene constitutivo foi realizada em equipamento termociclador automático (Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler). O mix para a reação foi feito utilizando um kit para PCR (PureTaq Ready-To-Go PCR Beads/GE Healthcare) que contém aproximadamente 2,5 unidades de PureTaq™ DNA Polymerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dATP, dCTP, dGTP and dTTP e estabilizadores, incluindo BSA. A cada “bead” foram adicionados 1 ul de cada iniciador (20 pmol) e 21 ul de água MilliQ. Preparados os tubos, foram adicionados 2 ul de DNA (cerca de 10 ng/ml). O programa de amplificação utilizado foi: 94°C por 12 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação, 94 ° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C por 10 minutos e resfriamento a 4°C. A cada conjunto de reação de PCR foi incluído um controle negativo, utilizando H<sub>2</sub>O destilada estéril como “template”, e um controle positivo, contendo DNA purificado de flebotomíneo do gênero *Lutzomyia*.

#### **5.2.6 Detecção de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania* spp.**

Para determinar a taxa de infecção natural, as amostras de DNA extraídas dos “pools” de fêmeas de flebotomíneos foram analisadas através da técnica Nested PCR (*LnPCR*) dirigida ao gene SSUrRNA, que amplifica um fragmento deste gene que é uma região conservada entre todas as espécies de *Leishmania* (Van Eys *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 2002, 2006).

Esta metodologia, adaptada e modificada de Cruz *et al.* (2002) foi realizada a partir de uma amplificação inicial de um fragmento de aproximadamente 603 pb, utilizando-se os iniciadores R1: 5' GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG 3' e R2: 5' GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG 3', seguida da amplificação de um fragmento de aproximadamente 353 pb, a partir do produto amplificado da primeira reação, utilizando-se os iniciadores R3: 5' TCC CAT CGC AAC CTC GGT T 3' e R4: 5' AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3'.

O mix para a reação foi preparado para um volume final de 25 ul utilizando um kit para PCR (PureTaq Ready-To-Go PCR Beads/GE Healthcare) que contém aproximadamente 2,5 unidades de PureTaq™ DNA Polymerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dATP, dCTP, dGTP and dTTP e estabilizadores, incluindo BSA. A cada “bead” foram adicionados 1 ul de cada iniciador (20 pmol) e 13 ml de água MilliQ. Preparados os tubos, foram adicionados 10 μl de DNA (cerca de 10 ng/ml). Em tubos contendo 1 ml de H<sub>2</sub>O foram diluídos 25 μl de produto da primeira reação, para serem

utilizados como “template” na segunda PCR. Esta foi preparada utilizando o mesmo kit de PCR Bead, para um volume final de 25 µl contendo 10 µl do produto amplificado diluído.

A amplificação foi processada em aparelho termociclador automático (Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler) utilizando o seguinte ciclo para a primeira reação: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 repetições de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Para a segunda reação, o ciclo se deu com desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 repetições de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. A extensão final foi a 72°C por 5 minutos para ambas as reações e resfriamento a 4°C.

Em todas as reações foi utilizado controle positivo com 20 ng de DNA extraído de cultura de *Le. infantum*, e como controle negativo foi utilizado H<sub>2</sub>O destilada estéril como “template”.

### **5.2.7 Análise dos produtos amplificados pela PCR**

Os produtos amplificados pelas PCR's utilizando iniciadores que amplificam fragmentos do gene constitutivo de flebotomíneos (cacofonia) e do gene do SSUrRNA foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 2% corados com brometo de etídio e examinados no capturador de imagens L-PIX EX (Loccus biotecnologia).

### **5.2.8 Sequenciamento para determinação da espécie de *Leishmania* spp.**

Para a identificação das espécies de *Leishmania* presente nos flebotomíneos, foi realizado o sequenciamento do produto amplificado pela segunda reação da LnPCR (fragmento esperado de aproximadamente 353pb).

Todas as bandas de 353 pb com intensidade considerável foram cortadas e purificadas utilizando o kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), de acordo com as especificações do fabricante. O produto amplificado e purificado, eluído em 20 µl de H<sub>2</sub>O destilada e estéril foi utilizado como “template” para outra reação de PCR, anterior ao processo de sequenciamento.

A reação de PCR para o sequenciamento foi preparada para um volume final de 10 µl, formada por 1 µl do PRE MIX (BigDye® Terminator v3.1 Cycle), 1 µl de Tampão do BigDye, 1 µl dos iniciadores (R3 e R4 para *Leishmania*) na concentração de 3,2 pmol, 5 µl de H<sub>2</sub>O e cerca de 1 µl do produto purificado. Este mix foi colocado em um termociclador com o

seguinte programa: 94°C por três minutos, seguido de 30 ciclos de: 96°C por um segundo, 65°C por 5 segundos (esta temperatura depende da temperatura de anelamento do iniciador utilizado) e 60°C por quatro minutos. O sequenciamento propriamente dito foi posteriormente realizado em sequenciador automatizado ABI 3730 (Life Technologies) pela Rede de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas René Rachou/ Fiocruz.

O alinhamento das sequências editadas foram comparadas com as três principais espécies de interesse na área de estudo, depositadas no GenBank: *Le. braziliensis*, *Le. amazonensis* e *Le. infantum*. A análise bioinformática das sequências obtidas foi realizada utilizando-se o programa BioEdit ([www.mbio.ncsu.edu/BioEdit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit.html)). Estas análises incluem a edição e o alinhamento das sequências estudadas. Isto nos permitiu identificar a espécie de *Leishmania* circulante nos vetores e reservatórios domésticos.

### 5.2.9 Cálculo da taxa mínima de infecção natural

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

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

### 5.2.10 Controle Químico e Manejo Ambiental

O controle químico foi realizado nas áreas selecionadas com dois ciclos de borrifação em 2011 com intervalo de três meses, sendo o primeiro em julho e o segundo em novembro. Em maio de 2012, um novo ciclo de borrifação foi realizado. Os ciclos foram realizados em área delimitada, envolvendo 16 quarteirões (954 imóveis) na AA do CS Miramar, onde foram borrifadas 400 casas durante o projeto, e 17 quarteirões (1.148 imóveis) da AA do CS Salgado Filho, onde foram borrifadas 320 casas.

A metodologia utilizada baseou-se nas recomendações do Ministério da Saúde, consistindo na aplicação de inseticidas de ação residual da classe dos piretróides (alfacipermetrina) no peri e intradomicílio. As paredes internas e externas dos imóveis e os abrigos de animais ou anexos recebem, pela técnica de painel, a impregnação dos inseticidas por meio de equipamentos de compressão constante (pulverizadores costais manuais).

O manejo ambiental foi executado em área delimitada, envolvendo 12 quarteirões (984 imóveis) da AA do CS Miramar e 25 quarteirões (886 imóveis) da AA do CS Salgado Filho.

A ação de manejo ambiental foi realizada nos meses de outubro de 2011 e março de 2012, concomitantemente nos trechos das AA dos CS Miramar e Salgado Filho.

Foram realizados mutirões de limpeza, com a retirada de material das casas (excluindo entulho de construção) que favorecesse condições para a proliferação dos flebotomíneos. Panfletos para orientação à população foram distribuídos com o objetivo de retirar qualquer tipo de matéria orgânica acumulada assim como outros materiais que possam servir de nicho para *Lu. longipalpis*. Este trabalho foi realizado pelos Agentes de Combate a Endemias (ACE) com apoio da Superintendência de Limpeza Urbana (SLU). Em caso de áreas públicas e condições críticas de transmissão da leishmaniose o Serviço de Limpeza Pública Urbana foi acionado. No mutirão de outubro/2011, foram recolhidas 10 toneladas e 19 toneladas de materiais, e em março/2012 foram retiradas 12 toneladas e 9 toneladas de materiais, respectivamente, nos trechos do Miramar e Salgado Filho.

As armadilhas de captura de flebotomíneos foram instaladas durante os 24 meses do desenvolvimento do projeto em todos os trechos das microáreas estudadas, a fim de, através do número mensal de flebotomíneos capturados, avaliar o impacto das medidas de controle nas diferentes áreas propostas (trechos 2 e 3).

### **5.2.11 Análise estatística**

A influência das variáveis climáticas sobre a densidade populacional de *Lu. longipalpis* foi avaliada e os resultados expressos pelo coeficiente de correlação de Spearman, para cada par de variáveis.

Em relação aos dados das ações de controle, a transformação logarítmica foi utilizada a fim de normalizar os dados, aplicando-se a fórmula  $\log(n+1)$  (Sampaio, 2007). Para a análise dos trechos, foram realizados os testes estatísticos paramétricos de análise de variância (ANOVA) e o teste “t” de Student não pareado bicaudal, com correção de Welch. Estas análises foram feitas com intervalo de confiança de 95%.

Os “outliers” foram confirmados pelo método de Grubbs, que avalia a presença de valores extremos em observações amostrais. Foi usado o alpha máximo (0.0001) que identifica o outlier com o mínimo de incerteza.

Como as ações de controle (borrifração e manejo ambiental) não foram realizadas nos mesmos meses, sendo dois ciclos de manejo e três ciclos de borrifração, os dados foram tratados como período pré-ação e pós-ação.

Os seguintes códigos foram utilizados para representar as análises estatísticas temporais:

- Trecho borrifacão: pré-borrifacão (período P1), compreende os meses antes de qualquer ação de borrifacão (10); pós-borrifacão (período P2), compreende os meses a partir da primeira ação de borrifacão (14).

- Trecho manejo: pré-manejo (período P1'), compreende os meses antes de qualquer ação de manejo (13) e pós-manejo (período P2'), compreende os meses a partir da primeira ação de manejo (11).

Os seguintes códigos foram estabelecidos para o trecho controle:

- Controle P1: trecho controle, nos meses correspondentes ao período pré-borrifacão (P1).

- Controle P2: trecho controle, nos meses correspondentes ao período pós-borrifacão (P2).

- Controle P1': trecho controle, nos meses correspondentes ao período pré-manejo (P1').

- Controle P2': trecho controle, nos meses correspondentes ao período pós-manejo (P2').

Toda a análise estatística foi realizada utilizando o software Prism 6 (GraphPad Inc., EUA) com 5% de nível de significância.

### **5.3 Estudo da leishmaniose visceral em cães**

#### **5.3.1 Procedimentos éticos**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA / FIOCRUZ) com a licença de número LW-21/11 (protocolo no. P-85/10-2). Todos os procedimentos seguiram as normas técnicas estabelecidas pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV resolução no. 714/2002). A eutanásia foi realizada no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Belo Horizonte, de acordo com o procedimento recomendado pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde. Os proprietários de cães foram informados sobre os objetivos do projeto e foi assinado voluntariamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) sobre a coleta de amostras para biópsia.

### 5.3.2 Coleta das amostras para o diagnóstico sorológico

Foram realizados 3 inquéritos sorológicos censitários na população canina pela SMSA/BH nos anos de 2010, 2011 e 2012, visando determinar a taxa de positividade da LVC nas AA dos CS do projeto (**Anexos 9.3 e 9.4**). Os inquéritos de 2011 e 2012 servirão de base para a determinação da taxa de infecção canina após as intervenções de controle programadas.

Os cães soropositivos provenientes do inquérito sorológico canino realizado em 2011 foram utilizados para fins deste estudo. Neste ano, no total, foram examinados 799 e 609 cães nos CS Salgado Filho e Miramar, respectivamente. Foram selecionados para a necrópsia e posterior realização dos diagnósticos parasitológico e molecular, uma amostra de 51 cães dos CS Salgado Filho e Miramar, de ambos os sexos e de raças variadas. Todos os cães tinham o diagnóstico sorológico positivo para LVC. Foi realizada uma avaliação clínica dos cães por um médico veterinário, e estes foram classificados em dois grupos: assintomáticos e sintomáticos. A eutanásia foi realizada conforme normas preconizadas pelo Ministério da Saúde. A presença de ectoparasitos, bem como os achados de necrópsia foram observados e anotados em ficha clínica individual, e posteriormente, as informações foram organizadas em um banco de dados contendo: número do cão, nome, sexo, localidade, diagnóstico clínico e sinais clínicos (**Anexos 9.5 e 9.6**).

As amostras de sangue foram coletadas por punção na veia marginal auricular e transferidas, por capilaridade, para lâminas de papel de filtro. As lâminas foram separadas por papel celofane, para evitar a contaminação das amostras, e devidamente identificadas com o nome do animal, código da amostra e data de coleta. No momento da coleta, foram utilizados os formulários de rotina do Programa de Controle da LV de Belo Horizonte: Boletim Diário de Inquérito Canino com identificação das amostras, responsável pela coleta, nome e endereço dos proprietários e nome do cão; Protocolo de Coleta de Sangue para LV contendo código da amostra, dados do proprietário e dados do cão. Após a coleta o material foi enviado para o Laboratório de Zoonoses da SMSA de Belo Horizonte. Foram realizados, como métodos diagnósticos, os testes ELISA (Ho *et al.*, 1983) e RIFI (Duxbury & Sadun, 1964) utilizando os kits produzidos por Biomanguinhos (Fiocruz, RJ), em eluatos de sangue dessecado em papel filtro, segundo normas técnicas editadas no Manual de Controle da LV pela SVS/MS. O diagnóstico sorológico foi realizado no laboratório de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte.

Cães que apresentaram valores de absorbância iguais ou superiores a três desvios-padrões do ponto de corte do resultado do controle negativo para ELISA e que foram positivos a uma diluição  $\geq 1:40$  na RIFI foram considerados soropositivos para LV, de

acordo com os parâmetros de diagnóstico adotados pelo MS. A retirada dos cães infectados foi realizada no prazo de 10 dias úteis a partir do resultado do exame, mediante o agendamento prévio, assinatura do TCLE e o recolhimento domiciliar pelo CCZ de Belo Horizonte.

Para os cães indeterminados (ELISA positivo e RIFI duvidoso), foi orientado que o exame fosse feito novamente 45 dias após a primeira coleta. No caso dos cães “monitorar” (ELISA positivo e RIFI negativo), a segunda coleta foi realizada em certas situações, quando os cães eram sintomáticos, por solicitação do proprietário ou quando havia alguma demanda específica do distrito.

### **5.3.3 Necrópsia dos cães soropositivos e coleta das amostras biológicas**

Para os estudos parasitológicos e moleculares, foram necropsiados 26 cães do CS Miramar e 25 cães do CS Salgado Filho, de acordo com o seguinte protocolo: primeiramente foi realizada uma inspeção ectoscópica objetivando preencher um boletim epidemiológico, onde os cães foram caracterizados quanto aos sinais clínicos sugestivos de LVC e definido o status clínico (assintomático e sintomático) de cada um, baseado na ausência ou presença de sinais sugestivos da infecção por *Leishmania*. Após o exame clínico, os cães foram anestesiados com Thiopentax® e foi realizada a coleta de sangue na veia radial. Posteriormente, foi feita a tricotomia do local e realizada a punção de medula óssea. Para a punção foi feita a assepsia do local com álcool 70% e em seguida introduzida a agulha na região da articulação fêmur-tíbio-patelar, perfurando o intercôndilo da crista tibial.

Após obtidas as amostras de sangue e medula, os cães foram eutanasiados através de uma injeção letal à base de solução saturada de cloreto de potássio (KCl). Confirmado o óbito, foram iniciados os procedimentos de necrópsia.

Com uma amostra de cada tecido (baço, linfonodo, pele e medula), foram confeccionados dois esfregaços por aposição em lâminas de microscopia para posterior realização do exame direto. Os tecidos foram armazenados em microtubos a -20° C para realização de diagnóstico molecular (Nested PCR). O restante da amostra de medula óssea foi semeado em meio de cultura para o isolamento do parasito.

#### **5.3.4 Isolamento e manutenção das cepas de *Leishmania* spp.**

Após realização da necrópsia, as 51 amostras de medula foram colocadas em meio de cultura ágar sangue de NOVY & MCNEAL modificado por NICOLLE- NNN/LIT (2 tubos por amostra), para o crescimento dos parasitos.

As culturas foram examinadas a cada 7 dias e foram feitos repiques para a manutenção das cepas.

Após o crescimento, as amostras positivas foram isoladas e repicadas para mais tubos e posteriormente para “erlenmeyers”, possibilitando assim a obtenção da massa de promastigotas. As mesmas foram armazenadas a -20°C para análises moleculares e a -70% para análises bioquímicas, se necessário.

#### **5.3.5 Pesquisa dos parasitos em esfregaços corados**

A pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* foi realizada por exame do esfregaço por aposição em lâmina dos tecidos coletados e do aspirado de medula óssea. As amostras foram coradas utilizando-se Giemsa e analisadas por microscopia óptica. O critério de positividade foi a presença de um resultado positivo em qualquer um dos 4 tecidos analisados.

#### **5.3.6 Extração de DNA de tecidos e medula óssea**

Os fragmentos de pele, linfonodo mesentérico e baço foram processados usando o kit de isolamento de DNA de células e tecidos Genomic Prep™ (GE Healthcare). Para extração de DNA de medula óssea e sangue foi utilizado o Kit de Cromatografia em Coluna - GFX™ Genomic Blood DNA Purification (GE Healthcare), conforme especificações dos fabricantes.

#### **5.3.7 Diagnóstico molecular (Reação em Cadeia da Polimerase)**

A pesquisa de DNA do parasito foi realizada nas amostras de tecidos (baço, linfonodo mesentérico, pele e medula óssea), utilizando a técnica de *Ln*PCR e posteriormente o sequenciamento para caracterização da espécie de *Leishmania* spp., como descrito para flebotomíneos.

### 5.3.8 Análise estatística

A metodologia padrão de sorologia RIFI/ELISA para LVC foi considerada referência, sendo selecionados somente cães positivos no teste sorológico, portanto a performance dos testes diagnósticos adicionais foi avaliada em relação a ele. Utilizamos como medida de desempenho para comparar os desempenhos dos testes a acurácia (total de classificações corretas) que nesse caso, de ausência de casos negativos para o padrão ouro, equivale à sensibilidade. O termo co-positividade (sensibilidade relativa) foi utilizado, considerando que o padrão empregado foram outros testes considerados de referência para a doença.

As taxas de positividade canina nos 3 inquéritos foram analisadas pelo teste do qui quadrado. A co-positividade total dos testes adicionais foi comparada pelo teste do qui quadrado, enquanto a co-positividade nos dois grupos de cães – sintomáticos e assintomáticos- e a positividade dos tecidos pela LnPCR foram comparadas pelo teste exato de Fisher. O teste de Mann-Whitney foi empregado para comparar o número de testes positivos nos três testes, nos grupos sintomático e assintomático.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Prism 6 (GraphPad Inc., EUA) com 5% de nível de significância.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Flebotomíneos

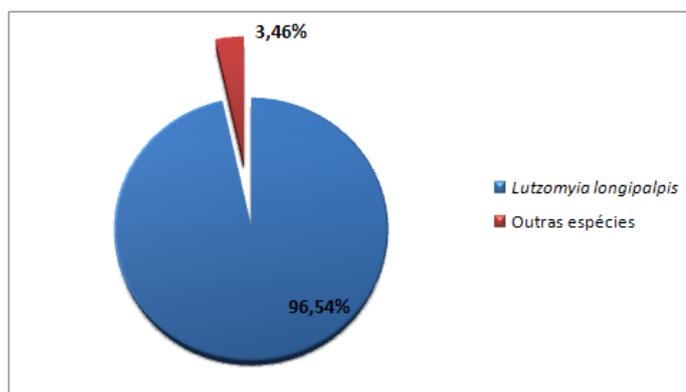
#### 6.1.1 Fauna

A fauna de flebotomíneos durante os 24 meses de estudo foi constituída de 5.194 espécimes, distribuída em 7 espécies, sendo 2 espécies pertencentes ao complexo *cortelezzi*, *Lu. sallesi* (Galvão & Coutinho, 1939) e *Lu. cortelezzii* (Brèthes, 1923). As fêmeas destas espécies são morfologicamente indistinguíveis, logo a identificação foi realizada associada aos machos capturados na mesma coleta. A fauna flebotomínica foi a seguinte: complexo *cortelezzii*, *Lu. intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), *Lu. ischyraantha* Martins, Falcão & Silva, 1962, *Lu. lloydi* (Antunes, 1937), *Lu. longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lu. whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939). Foram capturados 4581 machos (88,20%) e 613 fêmeas (11,80%) (**Tabela 2**).

**Tabela 2 - Flebotomíneos capturados, utilizando armadilha luminosa HP, nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012.**

Espécie	Macho	Fêmea	Total	%
complexo <i>cortelezzii</i>	36	69	105	2,02
<i>Lutzomyia intermedia</i>	4	3	7	0,13
<i>Lu. ischyraantha</i>	0	2	2	0,04
<i>Lu. lloydi</i>	0	1	1	0,02
<b><i>Lu. longipalpis</i></b>	<b>4516</b>	<b>498</b>	<b>5014</b>	<b>96,54</b>
<i>Lu. whitmani</i>	2	5	7	0,13
<i>Lutzomyia</i> spp.	23	35	58	1,12
<b>Total</b>	<b>4581</b>	<b>613</b>	<b>5194</b>	<b>100</b>
<b>%</b>	<b>88,20</b>	<b>11,80</b>	<b>100</b>	

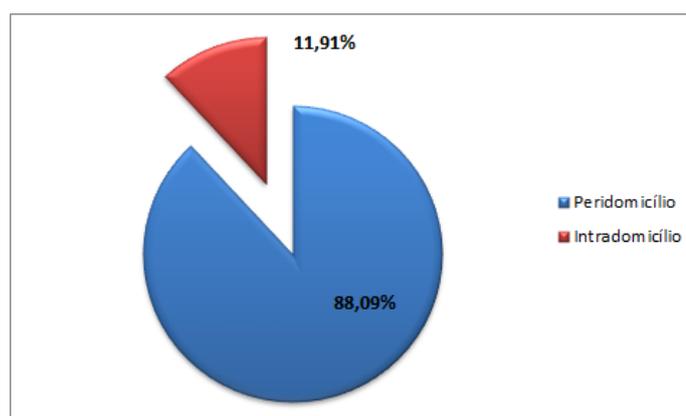
A espécie *Lu. longipalpis* foi a mais encontrada (5014 exemplares), totalizando 96,54% dos exemplares capturados (**Figura 8**). Na **Tabela 3**, observa-se que *Lu. longipalpis* foi encontrada nas 2 AA dos CS estudados e que o Salgado Filho (Distrito Oeste) apresentou o maior índice desta espécie (95,73%). Dos 5014 exemplares de *Lu. longipalpis* capturados, 4516 (90,07%) eram machos e 498 (9,93%) eram fêmeas (**Tabela 3**). Quanto ao comportamento de *Lu. longipalpis*, 597 (11,91%) foram capturados no intradomicílio e 4417 (88,09%) no peridomicílio (**Figura 9**).



**Figura 8- Porcentagem de *Lu. longipalpis* em relação às demais espécies capturadas, utilizando armadilha luminosa HP, nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012.**

**Tabela 3 -Número de *Lu. longipalpis* capturados, utilizando armadilha luminosa HP, de acordo com o sexo, nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012.**

Áreas de abrangência	Machos	Fêmeas	Total	%
Salgado Filho	4368	432	4800	95,73
Miramar	148	66	214	4,27
<b>Total</b>	<b>4516</b>	<b>498</b>	<b>5014</b>	<b>100</b>
<b>%</b>	<b>90,07</b>	<b>9,93</b>	<b>100</b>	



**Figura 9- Porcentagem de *Lu. longipalpis* em relação ao comportamento (endofilia e exofilia) capturadas utilizando armadilha luminosa HP nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012.**

A relação de *Lu. longipalpis* capturados mensalmente de acordo com as áreas de abrangência está apresentada na **Tabela 4**; esta espécie foi encontrada em todos os meses de captura, durante os meses de estudo.

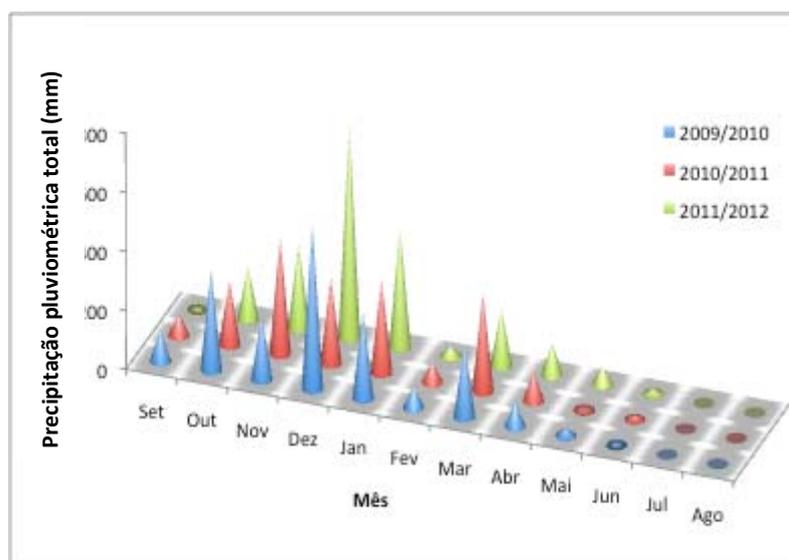
**Tabela 4 - Número mensal de *Lu. longipalpis*, capturados utilizando armadilha luminosa HP, nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012.**

<b>Ano</b>	<b>Mês</b>	<b>Salgado Filho (Distrito Oeste)</b>	<b>Miramar (Distrito Barreiro)</b>	<b>Total</b>
<b>2010</b>	Set	60	3	63
	Out	147	17	164
	Nov	296	5	301
	Dez	566	15	581
<b>2011</b>	Jan	315	33	348
	Fev	972	16	988
	Mar	204	3	207
	Abr	403	20	423
	Mai	380	20	400
	Jun	90	5	95
	Jul	29	2	31
	Ago	47	6	53
	Set	92	4	96
	Out	70	2	72
	Nov	51	2	53
	Dez	85	1	86
<b>2012</b>	Jan	78	12	90
	Fev	155	14	169
	Mar	226	3	229
	Abr	257	14	271
	Mai	172	7	179
	Jun	46	2	48
	Jul	10	5	15
	Ago	49	3	52
<b>Total</b>		4800	214	5014

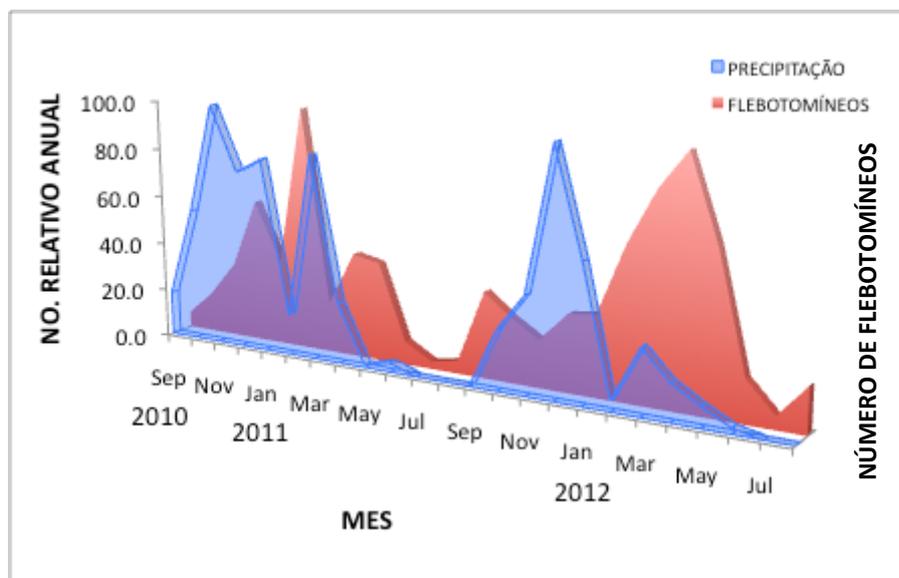
### 6.1.2 Influência das variáveis climáticas na população de flebotomíneos

Durante os dois anos do estudo, a temperatura oscilou de 24°C a 31°C, com uma média de 27 +/- 1,6°C. A umidade relativa do ar variou entre 48 a 78%, com média de 63 +/- 7,8%. As maiores variações ocorreram na precipitação pluviométrica total ao longo de cada ano, com uma média de 151,3 +/- 143,8 mm no primeiro ano e 167,9 +/- 216,8 mm no segundo ano.

Foram encontradas correlações positivas entre as densidades populacionais mensais de *Lu. longipalpis* e as três variáveis climáticas com coeficientes de correlação de 0,4177 para precipitação, 0,5430 para temperatura e 0,3480 para umidade. Contudo, foi verificada uma diferença significativa somente para precipitação ( $p = 0,0422$ ) e temperatura ( $p = 0,0061$ ). Devido aos menores coeficientes de variação observados para umidade (12,3%) e temperatura (5,9%), e à estreita relação entre umidade e precipitação, somente a precipitação pluviométrica anual foi levada em consideração para a análise. Entre os três períodos observados, a variação da precipitação pluviométrica foi pequena, e a concentração das chuvas ocorreu normalmente nos mesmos meses destes anos. Cinco meses chuvosos (outubro, novembro, dezembro, janeiro e março), e sete meses de seca foram bem identificados em cada ano (**Figura 10**). O número de *Lu. longipalpis* claramente aumentou após os picos de precipitação pluviométrica (**Figura 11**).



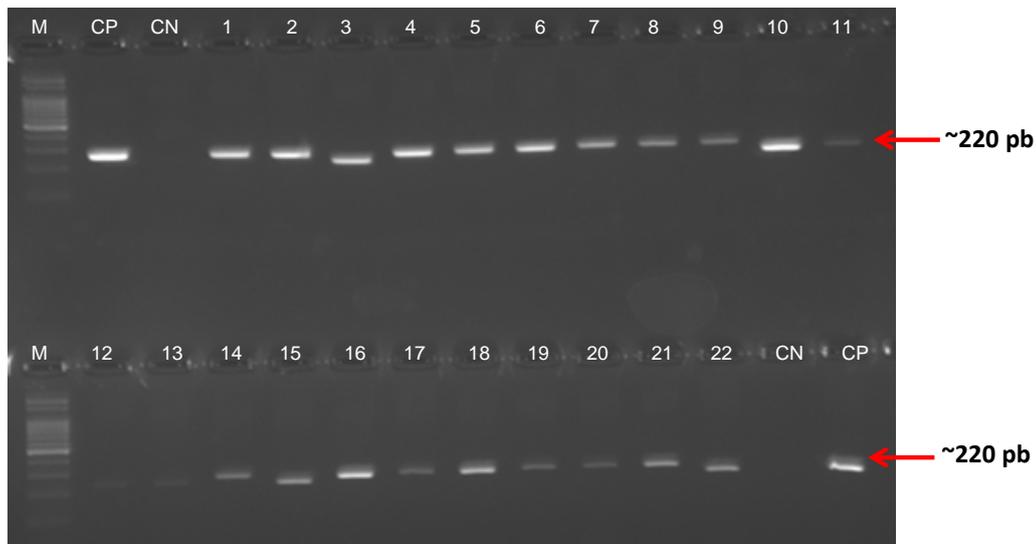
**Figura 10- Índice pluviométrico total no período de setembro/2009 a agosto/2012 nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012.**



**Figura 11- Índice pluviométrico e flutuação populacional de *Lu. longipalpis* no período de setembro/2010 a agosto/2012 nas áreas de abrangência estudadas, nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil.**

### 6.1.3 Detecção de DNA de *Leishmania* spp.

Foram selecionadas 152 fêmeas de flebotomíneos para a pesquisa de infecção por *Leishmania* spp., distribuídas em 93 “pools”. A **Tabela 5** resume as taxas de infecção por *Leishmania* e a identificação das espécies nas amostras de *Lutzomyia* testadas. A positividade para *Leishmania* spp. significa que não foi possível identificar a amostra a nível específico. A preparação dos “pools” foi aplicável para as espécies *Lu. longipalpis* e *Lu. whitmani*; em relação às demais espécies, as amostras foram analisadas individualmente (**Tabela 5**). Através da técnica de cacofonia (gene constitutivo do DNA de flebotomíneos), foi possível obter o fragmento de 220 pares em todas as amostras, validando tanto o processo de extração como os resultados negativos (**Figura 12**).



**Figura 12-** Produtos de amplificação de DNA de flebotomíneos obtidos com iniciadores para o gene da cacofonia, visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio. Canaletas: M- Marcador de peso molecular 100 pb; Amostras: 1 a 22. Controle Positivo da Reação (*Lu. longipalpis*). CN: Controle Negativo a Reação (sem DNA).

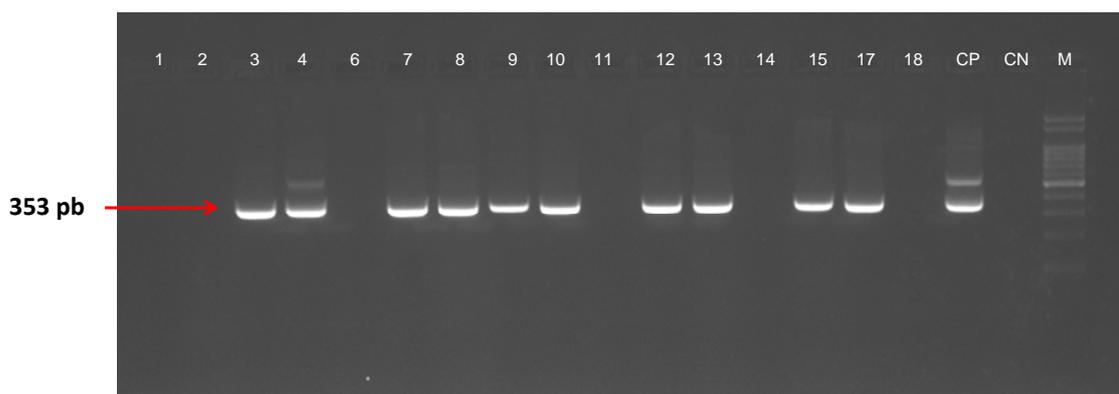
O DNA de *Leishmania* spp. foi detectado em 29 dos 93 “pools” de flebotomíneos, sendo possível demonstrar o fragmento de 353 pares de base através da técnica de *LnPCR* (Figura 13).

Através do alinhamento das sequências de DNA das amostras positivas para *Leishmania* spp. com as depositadas no GenBank, foi confirmada a presença de DNA de *Le. infantum* em 23 dos 26 “pools” de *Lu. longipalpis* (Anexo 9.7). Dos 26 “pools” positivos, 4 eram do CS Miramar e 22 do CS Salgado Filho. Em dois “pools” desta mesma espécie de flebotomíneo, *Le. braziliensis* foi a espécie encontrada (Anexo 9.7), ambos do CS Miramar. *Le. infantum* também foi confirmada em 1 “pool” do complexo *cortezzezii* e 1 “pool” de *Lu. lloydi*.

A taxa mínima de infecção natural (TMI) encontrada para *Leishmania* spp. foi de 18,8%, 20% e 100% em *Lu. longipalpis*, complexo *cortezzezii* e *Lu. lloydi*, respectivamente. A TMI de *Lu. longipalpis* em relação à *Le. infantum* foi de 16,7%. Apenas 1 espécime de *Lu. lloydi* foi capturado, sendo este, positivo. Além disto, em dois “pools”, correspondentes às espécies *Lu. longipalpis* e complexo *cortezzezii* não foi possível identificar a espécie de *Leishmania*.

**Tabela 5 - Espécies de flebotomíneos capturados para detecção de DNA de *Leishmania* spp., nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012.**

Espécies	Número de fêmeas		Número de amostras	Número de amostras positivas para cada espécie de <i>Leishmania</i>		
	Capturadas	Por amostra		<i>Le. infantum</i>	<i>Le. braziliensis</i>	<i>Leishmania</i> sp.
<i>cortelezzii</i> complex	10	1	10	1	0	1
<i>Lu. intermedia</i>	1	1	1	0	0	0
<i>Lu. lloydi</i>	1	1	1	1	0	0
<i>Lu. longipalpis</i>	138	1 a 10	80	23	2	1
<i>Lu. whitmani</i>	2	2	1	0	0	0
<b>Total</b>	152		93	25	2	2



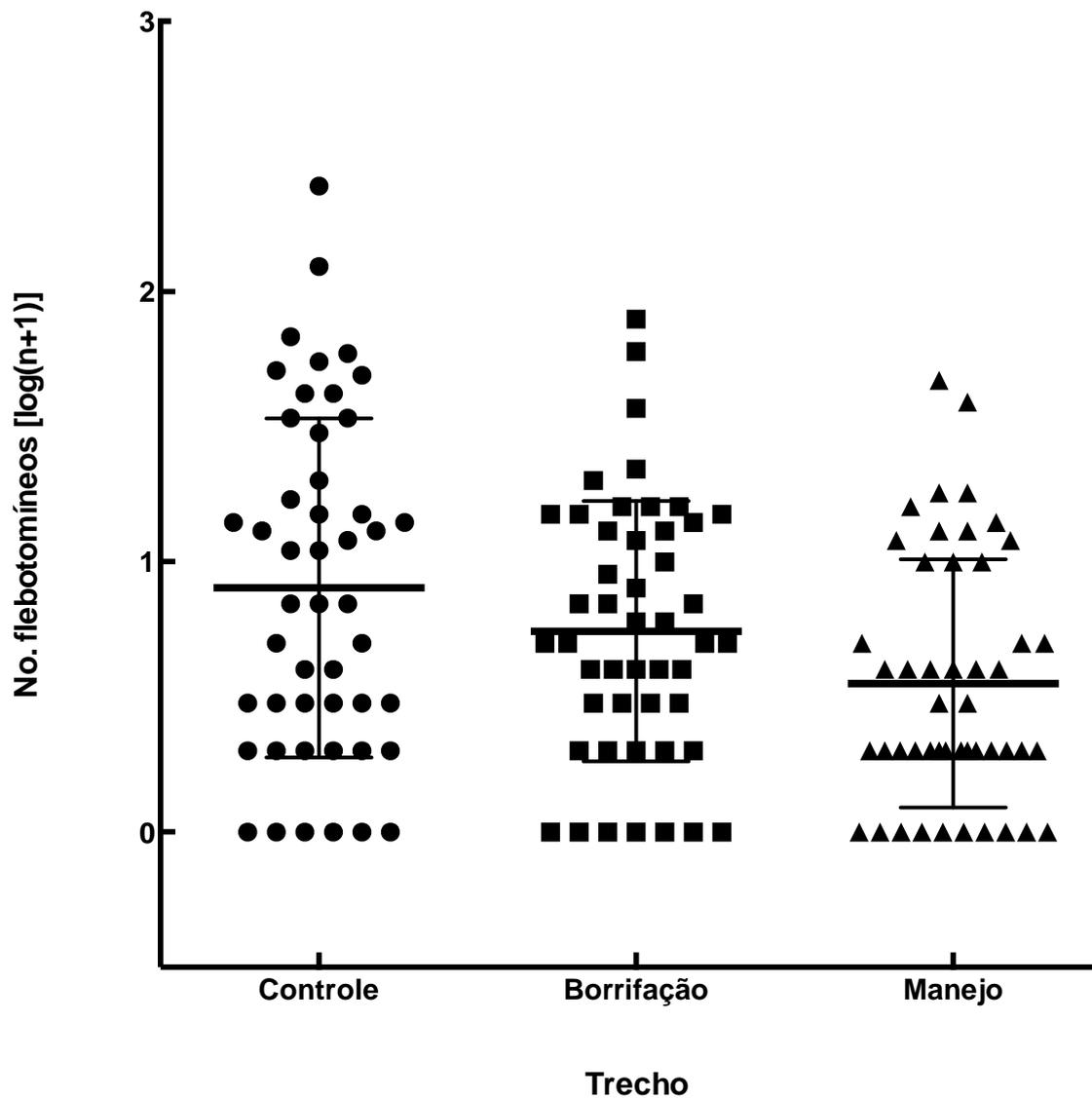
**Figura 13- Exemplo de produtos de amplificação de DNA de flebotomíneos obtidos com iniciadores para o gênero *Leishmania* (SSUrRNA), visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio. Canaletas: M- Marcador de peso molecular 100 pb; Amostras: 1 a 18; CP- Controle Positivo da Reação (*Le. braziliensis*/M2903); CN- Controle Negativo da Reação (sem DNA).**

#### 6.1.4 Controle Químico e Manejo Ambiental

O gráfico seguinte mostra os trechos controle, borrifação e manejo, com os 48 pontos referentes a cada mês do estudo (2 anos). Análise de variância (ANOVA) mostrou diferença significativa entre as médias dos três trechos ( $p = 0.0248$ ) (**Figura 14**).

No trecho borrifação, quando os dados por casa foram analisados, a casa 6 foi considerada um “outlier”. Logo, a casa 6 foi substituída por uma casa fictícia, que considerou o número de flebotomíneos capturados como a média das duas outras casas do mesmo trecho.

Quando comparamos os trechos dois a dois não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as médias dos trechos borrifação e controle ( $p = 0.161$ ), embora visualmente observamos uma tendência de queda no número de flebotomíneos capturados. Já entre os trechos manejo e controle ( $p = 0,002$ ) e manejo e borrifação ( $p = 0,047$ ) houve uma diferença estatisticamente significativa entre as médias, indicando que a ação manejo foi eficiente na redução da população de flebotomíneos.



**Figura 14-** Gráfico referente aos meses dos trechos controle, borrifação e manejo, nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012.

Quando os períodos dos trechos controle (P1, P2, P1' e P2') e os períodos pré-ação (pré-borrifação P1 e pré-manejo P1'), foram analisados em conjunto (ANOVA), não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,703$ ) entre as médias dos trechos.

Quando apenas o trecho pós borrifação foi incluído na análise (comparação de sete trechos por ANOVA), a diferença entre as médias manteve-se não significativa ( $p=0,062$ ). Entretanto, a substituição do trecho pós-borrifação pelo trecho pós-manejo, no mesmo tipo de análise (comparação de sete trechos por ANOVA), gerou diferença significativa entre as médias ( $p=0,021$ ) (**Figura 15**).

Confirmando a análise global anterior, na qual foram comparados os três trechos, as ações de manejo ambiental mostraram uma redução estatisticamente significativa na população de flebotomíneos.

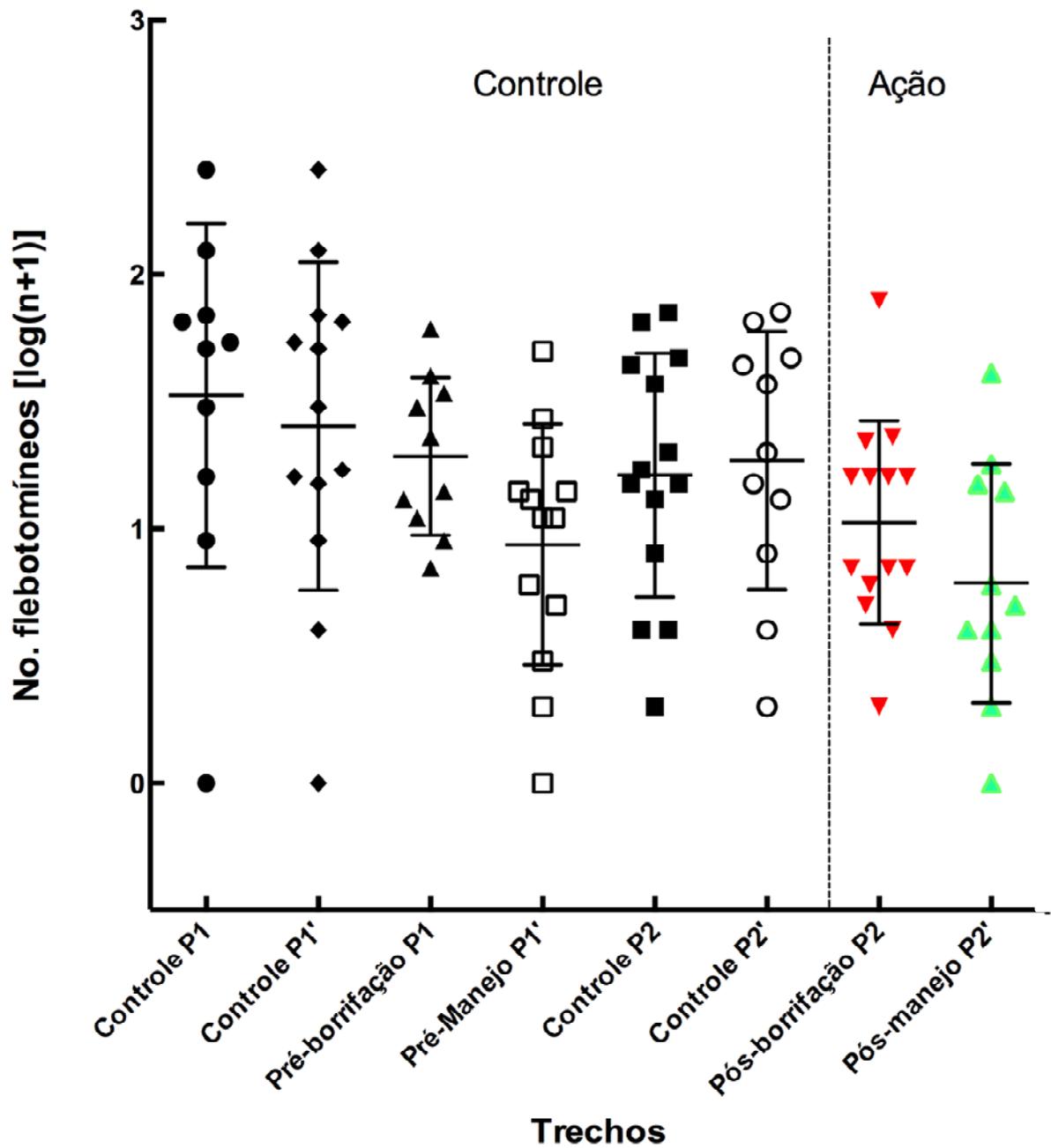


Figura 15- Gráfico referente aos trechos controle, pré-tratamento e pós-tratamento (borrifação e manejo ambiental), nos CS Salgado Filho e Miramar, Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012.

## 6.2 Cães

### 6.2.1 Determinação da taxa de soropositividade canina

A **Tabela 6** mostra o total de cães examinados nos inquéritos de 2010, 2011 e 2012 nos CS do estudo, para determinação da prevalência da LVC. No CS Miramar a prevalência decresceu nos 3 anos, ficando em 7,97%, 3,78% e 2,38% nos anos de 2010, 2011 e 2012, respectivamente. No CS Salgado Filho, a prevalência foi de 4,88%, 2,25% e 4,20% nos anos de 2010, 2011 e 2012, respectivamente. As taxas médias de prevalência para o Miramar e Salgado Filho foram de 4,71% e 3,77%, respectivamente. Nos dois CS do estudo, o valor  $p < 0,01$  tanto para Miramar como para o Salgado Filho demonstra que houve uma diferença estatisticamente significativa da prevalência da LVC ao longo dos anos. Os cães soropositivos do inquérito de 2011 foram recolhidos para fins deste estudo ( $n=41$ ), sendo que 10 cães indeterminados, deste mesmo ano, se positivaram em uma segunda coleta e foram incluídos na amostra, totalizando 51 cães. Um total de 1418 cães foram examinados em 2011, apresentando uma soroprevalência de 3,6%.

**Tabela 6 - Inquérito canino realizado em cães domiciliados dos CS Miramar e Salgado Filho, município de Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012.**

#### Sorologia para LV canina, 2010-2012

##### MIRAMAR

RESULTADO	2010		2011		2012	
	N	%	N	%	N	%
INDETERMINADO	14	1,86	6	0,99	1	0,17
NÃO REATIVO	679	90,17	580	95,24	574	97,45
REATIVO	60	7,97	23	3,78	14	2,38
<b>Total</b>	<b>753</b>	<b>100,0</b>	<b>609</b>	<b>100,0</b>	<b>589</b>	<b>100,0</b>

Fonte: SCZOO (GECOZ/GVSI/SMSA)

p valor < 0,01

##### SALGADO FILHO

RESULTADO	2010		2011		2012	
	N	%	N	%	N	%
INDETERMINADO	19	2,44	12	1,50	3	0,47
NÃO REATIVO	721	92,67	769	96,25	613	95,33
REATIVO	38	4,88	18	2,25	27	4,20
<b>Total</b>	<b>778</b>	<b>100,0</b>	<b>799</b>	<b>100,0</b>	<b>643</b>	<b>100,0</b>

Fonte: SCZOO (GECOZ/GVSI/SMSA)

p valor < 0,01

## 6.2.2 Pesquisa direta e indireta do parasito

Dentre os 51 cães presentes na amostra, 28 foram classificados como sintomáticos, e 23 como assintomáticos. Na realização dos exames parasitológicos diretos para LVC, *Leishmania* spp. foi detectada em 37 (72,5%) das 51 amostras, tanto da técnica de aposição em lâmina como de mielocultura, sendo que não necessariamente os mesmos animais foram positivos em ambos os exames (**Tabela 7**). Foi considerado parasitológico final, quando a amostra era positiva por um ou outro exame parasitológico, perfazendo 90,2% dos cães.

No diagnóstico molecular, as amostras de baço, submetidas à *Ln*PCR apresentaram 100% de co-positividade com RIFI/ELISA, em ambas as condições clínicas. Os resultados da técnica de aposição em lâmina não apresentaram diferença estatisticamente significativa para os dois grupos clínicos ( $p= 1,000$ ). Já a mielocultura apresentou 89,3% de co-positividade para os cães sintomáticos, comparado com 52,2% dos assintomáticos ( $p=0,0045$ ) (**Tabela 8**).

A co-positividade dos métodos baseados na visualização do parasito foi significativamente menor ( $p= 0,0002$ ), quando comparada à *Ln*PCR das amostras de baço.

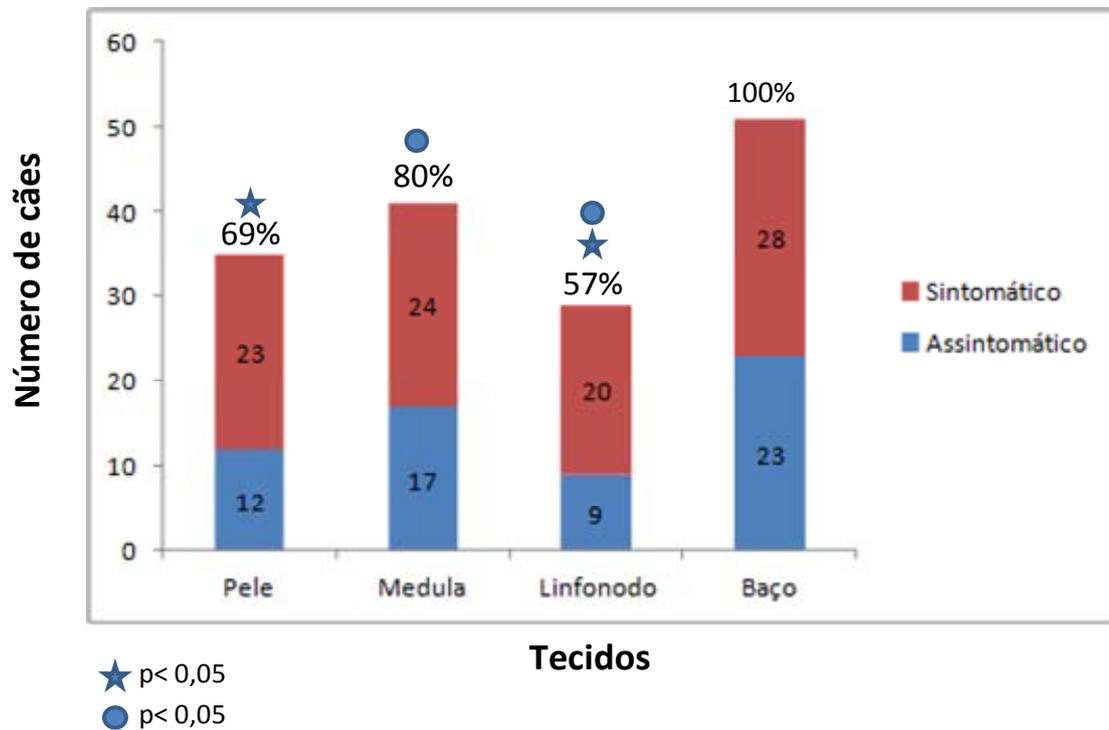
**Tabela 7 - Tabela de contingência das co-positividades (sensibilidade relativa) de testes diagnósticos de LVC. A referência foi o resultado RIFI/ELISA, adotado pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde, no período do estudo.**

Teste		RIFI-ELISA			
		Negativo		Positivo	
		No.	%	No.	%
<i>Ln</i> PCR	Negativo	-	-	0	0
	Positivo	-	-	51	100
Aposição em lâmina	Negativo	-	-	14	27.5
	Positivo	-	-	37	72.5
Mielocultura	Negativo	-	-	14	27.5
	Positivo	-	-	37	72.5

**Tabela 8– Tabela de contingência das co-positividades de testes diagnósticos de LVC de acordo com o grupo clínico. A referência foi o resultado RIFI/ELISA, adotado pelo Ministério da Saúde no período do estudo (2010-2012). A *LnPCR* para o baço, apresentou 100% de co-positividade em ambos os casos, e não foi incluído.**

Teste			Assintomático	Sintomático	p-valor	
Técnica de aposição em lâmina	Negativo	6	26.1%	8	28.6%	1.000
	Positivo	17	73.9%	20	71.4%	
Mielocultura	Negativo	11	47.8%	3	10.7%	0.0045
	Positivo	12	52.2%	25	89.3%	

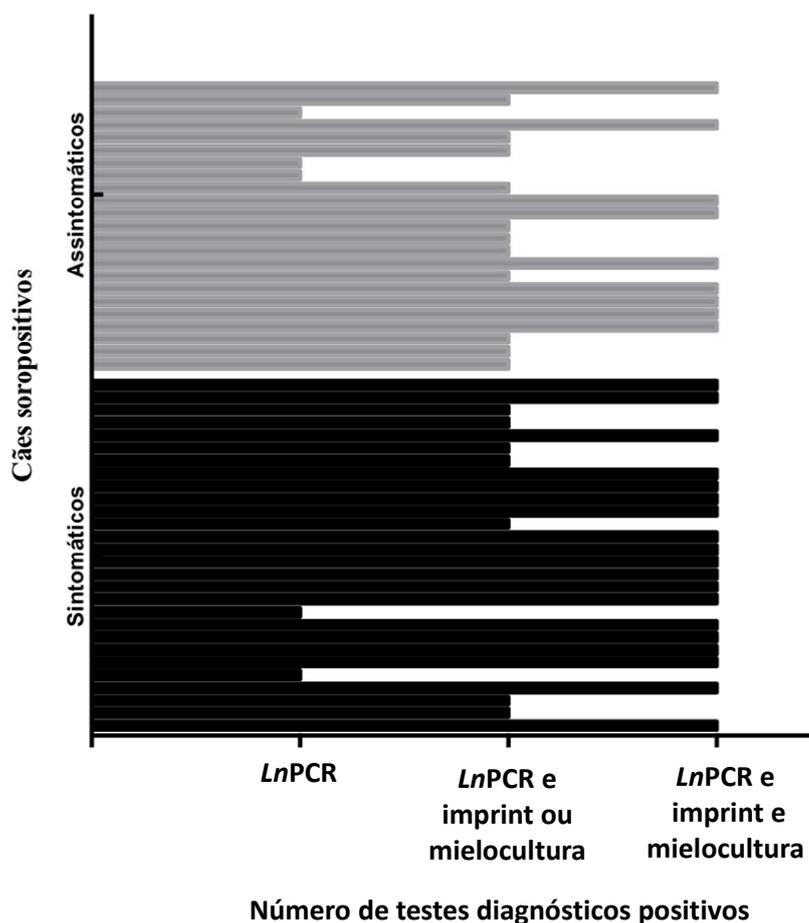
O diagnóstico molecular, realizado através da *LnPCR* com amostras de pele, linfonodo, medula óssea e baço, mostrou positividade em 100% das amostras de baço. Para os demais tecidos as respectivas positivities foram: 80% para medula óssea, 69% para pele e 57% para linfonodo. A diferença da positividade se mostrou estatisticamente significativa quando o linfonodo foi comparado com a medula óssea ( $p= 0,001$ ) e pele ( $p= 0,031$ ), mas não na comparação entre medula óssea e pele. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de sintomáticos e assintomáticos para pele ( $p= 0,034$ ) e linfonodo ( $p= 0,026$ ) (**Figura 16**).



**Figura 16-** Distribuição da frequência absoluta do teste de PCR por tecido, de acordo com o grupo clínico. O estudo foi desenvolvido nos CS Miramar e Salgado Filho, município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012.

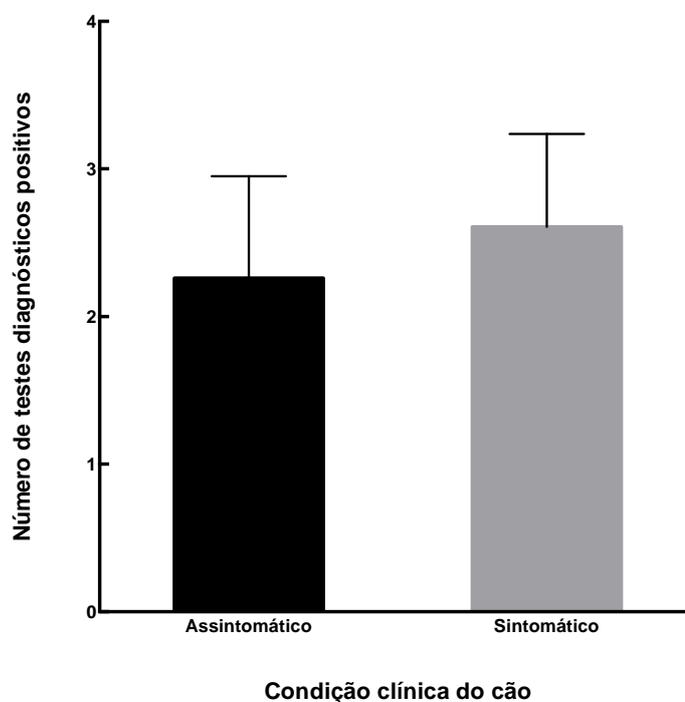
### 6.2.3 Comparação entre os testes diagnósticos

Foram comparados os resultados dos três exames diagnósticos realizados para LVC, dois baseados na visualização do parasito (técnica de aposição em lâmina e mielocultura) e um molecular (*LnPCR*). Dos 51 animais testados, 28 (54,9%) foram positivos para os três exames. 18 cães (35%) foram positivos para o exame molecular e para um dos testes parasitológicos. Em 5 cães (9,8%), não se conseguiu demonstrar a presença do parasito, sendo positivos somente para o teste molecular (**Figura 17**). Apesar do número pequeno da amostra impedir uma análise estatística mais apurada, houve uma tendência dos cães sintomáticos apresentarem um maior número de testes positivos para LV.



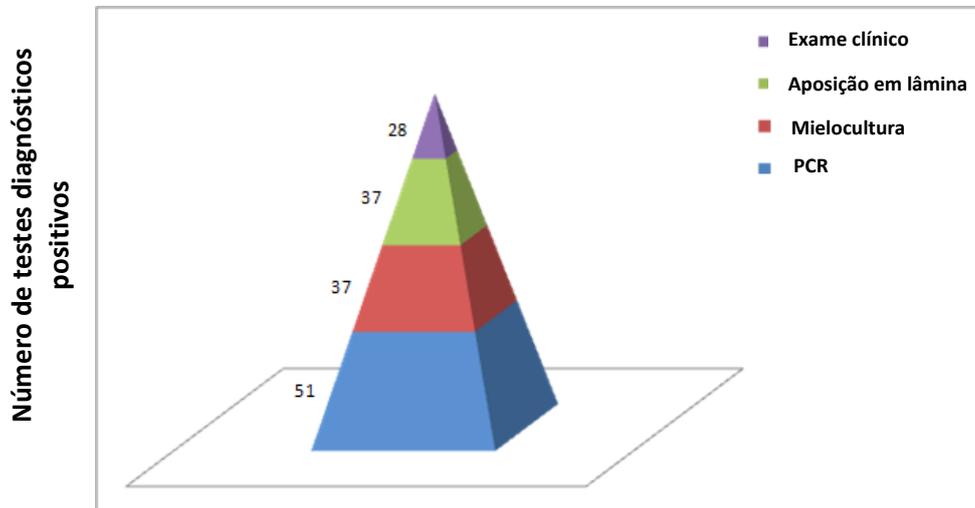
**Figura 17- Frequência cumulativa absoluta dos testes molecular, técnica de aposição em lâmina e mielocultura em cães soropositivos (RIFI/ELISA) para LV, de acordo com o grupo clínico. O estudo foi desenvolvido nos CS Miramar e Salgado Filho, município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012.**

O número médio de exames positivos por cão analisado foi de 2,44. Quando o grupo clínico de cães foi analisado separadamente, o número médio diminuiu para  $2,261 \pm 0,689$  no grupo assintomático e aumentou para 2,607 com um desvio padrão de 0,629 no grupo sintomático. A diferença no total dos exames positivos, de acordo com o grupo clínico, não foi estatisticamente significativa ( $p=0,066$ ) (**Figura 18**).



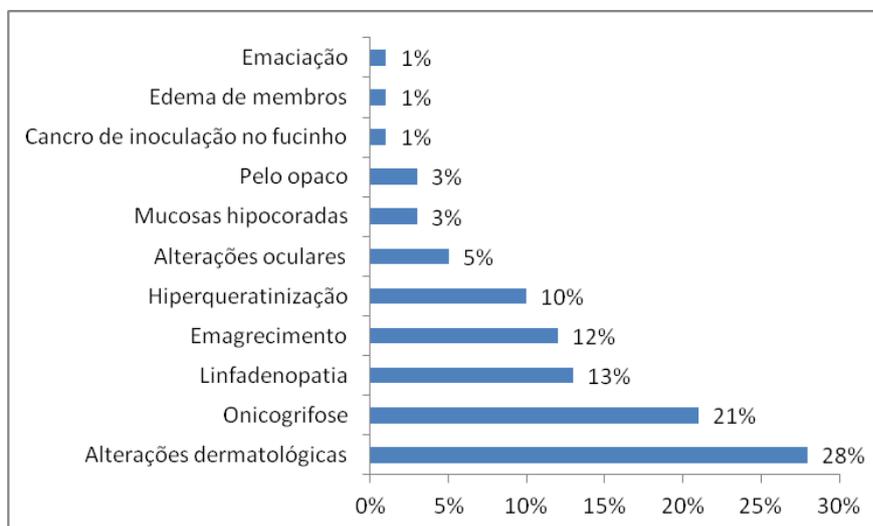
**Figura 18-** Número de diagnósticos positivos de acordo com o grupo clínico de cães soropositivos (RIFI/ELISA) para LV. O estudo foi desenvolvido nos CS Miramar e Salgado Filho, município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Período do estudo: setembro de 2010 a agosto de 2012.

A **Figura 19** compara os métodos diagnósticos utilizados no estudo na amostra de 51 cães soropositivos para LVC. A *Ln*PCR foi capaz de detectar o DNA do parasito em 100% das amostras, enquanto a técnica de aposição em lâmina e mielocultura detectaram o parasito igualmente em 72,5% dos cães. Através do exame clínico, 28 cães (55%) foram classificados como sintomáticos.



**Figura 19-** Comparação entre testes diagnósticos de cães sintomáticos e assintomáticos dos CS Miramar e Salgado Filho, Belo Horizonte, 2010 a 2012.

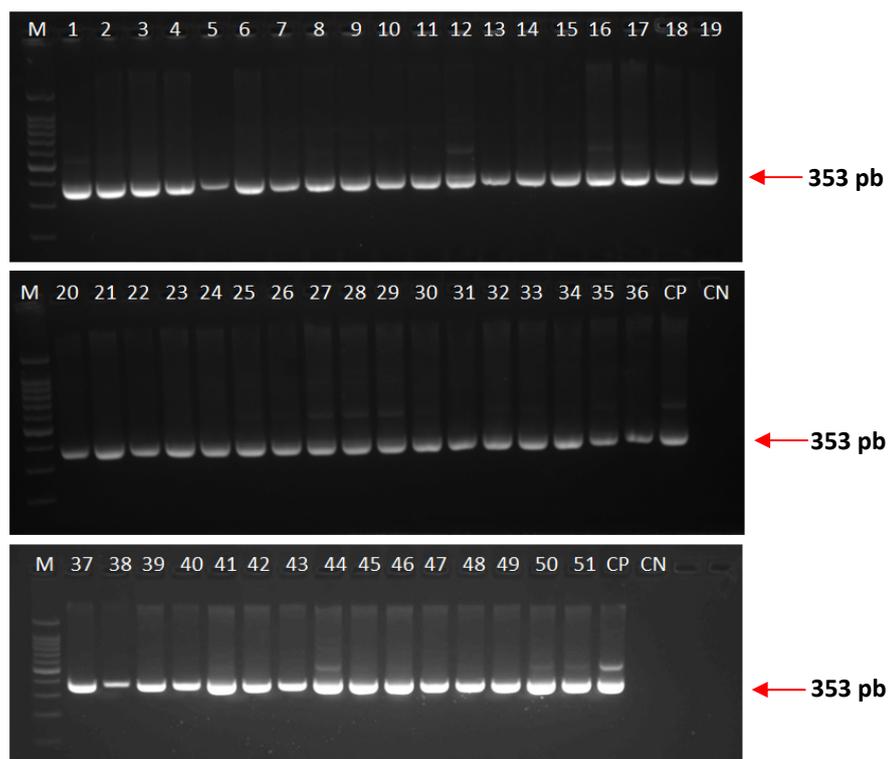
Em relação aos sinais clínicos sugestivos para LVC entre os cães sintomáticos, as alterações dermatológicas foram encontradas com mais frequência (28%), enquanto a emaciação, edema de membros e cancro de inoculação no fucinho foram igualmente os sinais menos frequentes encontrados nos cães (1%) (**Figura 20**).



**Figura 20-** Frequência de sinais clínicos sugestivos entre cães sintomáticos dos CS Miramar e Salgado Filho, Belo Horizonte, 2010 a 2012.

#### 6.2.4 Detecção de DNA de *Leishmania* spp. pela LnPCR

Através do diagnóstico molecular, foi possível observar a positividade pela LnPCR em todas as amostras de baço (n=51), podendo ser visualizado o fragmento de 353 pb característico de *Leishmania* spp. (**Figura 21**). Este foi submetido ao sequenciamento de DNA, e indicou que *Le. infantum* é a espécie circulante nos cães das áreas estudadas (**Anexo 9.7**).



**Figura 21-** Produtos de amplificação de amostras de baço obtidas de cães necropsiados utilizando-se iniciadores para o gênero *Leishmania* visualizados em gel de agarose 2% corado por brometo de etídio. M: marcador de peso molecular (100pb). 1 a 51: amostras de baço. CP: Controle Positivo (*Le. braziliensis*/M2903); CN: Controle Negativo (sem DNA).

## 7 DISCUSSÃO

Belo Horizonte é hoje o município com alta densidade populacional que mais sofre com a ocorrência da leishmaniose visceral (LV) e também o que mais investe em ações de controle e prevenção da doença. As ações são direcionadas de acordo com a realidade epidemiológica existente, com realização de ações programadas visando atingir principalmente áreas de maior ocorrência de casos humanos e caninos.

O presente estudo foi realizado em AA de dois CS localizados em grandes regiões urbanas de transmissão recente de LV, classificados como médio risco de transmissão. Nosso objetivo foi avaliar a atual situação epidemiológica do vetor, do parasito e do reservatório canino nesses locais, os quais sofreram menos intervenções de controle, e avaliar a efetividade das ações de controle direcionadas aos vetores e aos cães.

A fauna flebotomínica coletada nas duas AA dos CS pertencentes aos distritos Oeste e Barreiro, apresentou-se diversificada, com a presença de 7 espécies, sendo três delas responsáveis pela transmissão das leishmanioses no Novo Mundo: *Lu. longipalpis*, *Lu. intermedia* e *Lu. whitmani*. A espécie de flebotomíneo predominantemente capturada foi *Lu. longipalpis* (96,5%), principal espécie vetora da *Le. infantum* no Brasil, o que confirma a elevada adaptação desta espécie a ambientes urbanos, incluindo o intradomicílio (Barata *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2007a; Dias *et al.*, 2011; Michalsky *et al.*, 2009a, 2011).

No município de Belo Horizonte, Souza *et al.* (2004) relataram, entre 2001 e 2003, o encontro de 68% dos espécimes coletados pertencentes à espécie *Lu. longipalpis*, predominante nos distritos Leste, Nordeste, Noroeste, Oeste, Pampulha e Venda Nova. No mesmo município, esta espécie foi predominante, sendo que do total de exemplares, 69%, 30% e 1% foram coletados nos distritos Leste, Nordeste e Barreiro, respectivamente (Resende *et al.*, 2006).

Nossos dados revelaram uma elevada razão de machos sobre fêmeas de *Lu. longipalpis* (M/F= 9,0), corroborando com estudos prévios que indicam que há uma preponderância numérica de machos em áreas urbanas, incluindo o município de estudo (Souza *et al.*, 2004; Resende *et al.*, 2006).

A espécie *Lu. longipalpis* foi capturada em maior número no peridomicílio das residências (88,1%), como observado também em outros estudos (Missawa & Dias, 2007; Michalsky *et al.*, 2009a; Barata *et al.*, 2013, entre outros). Do ponto de vista epidemiológico, o encontro de 11,9% dos exemplares no intradomicílio serve de alerta, pois sugere que a transmissão possa estar ocorrendo também no interior das residências. A distribuição peridoméstica pode ser justificada pela alta concentração de flebotomíneos em abrigos de

animais, onde formam abundantes “leks” ou agregados (Ximenes *et al.*, 1999; Lainson & Rangel, 2003). Devido à produção de feromônios masculinos, ambos os sexos são atraídos para os locais de alimentação e reprodução.

As espécies *Lu. intermedia* e *Lu. whitmani*, vetoras de espécies de *Leishmania* causadoras da LT, foram capturadas em menor número (0,13%). Apesar de estudos demonstrarem a antropofilia e a adaptação destas espécies ao peridomicílio (Rangel *et al.*, 1986; Gontijo *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2002; Saraiva *et al.*, 2006), a LT ocorre com baixa frequência em Belo Horizonte, com a predominância dos casos notificados, residentes de outros municípios. Souza *et al.* (2004) realizaram coletas em parques e áreas verdes de Belo Horizonte e dentre os 579 espécimes coletados, a espécie *Lu. whitmani* foi predominante (60,6%), enquanto *Lu. longipalpis* contou somente com 2,6%. No mesmo município, *Lu. whitmani* foi a espécie predominante em áreas verdes e foi relatado o encontro de DNA de *Le. infantum* em 3,8% dos exemplares desta espécie (Saraiva *et al.*, 2010). Saraiva *et al.* (2011) coletaram no distrito nordeste do município, 97% dos exemplares pertencentes à espécie *Lu. whitmani* em áreas verdes, e somente 3% em áreas urbanas. Enquanto *Lu. longipalpis* foi capturada em sua maioria em áreas urbanas (94%) e 6% em áreas verdes. Percebe-se que o perfil de distribuição muda consideravelmente quando as áreas verdes são analisadas, havendo uma maior diversidade de espécies, ora nas áreas verdes (Saraiva *et al.*, 2011), ora na área urbana (Souza *et al.*, 2004).

Camargo-Neves (2001), considera importante o estudo do comportamento do vetor, tomando por base a correlação da densidade do mesmo com aspectos do peridomicílio, tais como a presença de vegetação, raízes e troncos de árvores e matéria orgânica no solo, que representam os possíveis abrigos e criadouros do vetor, e presença de animais domésticos, que são fonte de alimentação para os flebotomíneos. Na região metropolitana de Belo Horizonte, estudos foram conduzidos a fim de avaliar potenciais fatores de risco para contrair LV e mostraram que a frequência e variedade de animais domésticos, matéria orgânica abundante, armazenamento de lixo de forma inadequada, empilhamento de tijolos e pedras, presença de árvores, hortas são características relevantes para sua ocorrência (Moreno *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006). Já no estudo de Saraiva *et al.* (2011) realizado no distrito nordeste de Belo Horizonte, não foi possível estabelecer uma correlação entre as variáveis biogeográficas analisadas e a incidência de LV humana e canina ou a ocorrência de flebotomíneos. Os resultados indicaram que a proximidade com áreas de vegetação, vilas, favelas e cursos d’água exercem pequena influência na incidência da LV.

O elevado número de flebotomíneos capturados na AA do CS Salgado Filho, em relação ao Miramar, pode ser explicado pelo fato de que, em uma das residências de captura

no SF, possuir um vasto terreno com um lago de criação de peixes, favorecendo a manutenção da umidade do ambiente, além da presença de cães, galinheiro e vários tipos de árvores frutíferas. Apesar de todas as residências escolhidas em ambos os CS apresentarem condições favoráveis à presença do vetor, o número de flebotomíneos coletados na residência citada no Salgado Filho, foi surpreendentemente maior em todos os meses de captura.

A ocorrência de flebotomíneos pode estar também relacionada às variáveis climáticas: umidade relativa do ar, pluviosidade e temperatura (Scorza *et al.*, 1968; Miscevic, 1981). Desde seus estudos pioneiros Deane & Deane (1955) já haviam relatado a interferência das estações climáticas na densidade populacional de *Lu. longipalpis*. Deane (1956) também no Ceará, demonstrou a associação da densidade de flebotomíneos com a pluviometria. De acordo com a literatura, as variáveis climáticas podem interferir de maneira variável na população de flebotomíneos, de acordo com a área analisada (Dias *et al.*, 2007). Comumente, a maior densidade desses insetos pode ser observada nos meses quentes e úmidos (Aguiar & Saoucasaux, 1984; Gomes & Galati, 1987; Gomes *et al.*, 1980) ou em meses mais secos, como observado na Costa Rica (Zeledon *et al.*, 1984) e no estado do Mato Grosso do Sul (Galati *et al.*, 1996). No presente estudo, a precipitação pluviométrica e a temperatura foram as variáveis que mais interferiram na densidade de *Lu. longipalpis*. Estes achados corroboram com estudos já realizados em Belo Horizonte e em Campo Grande (Resende *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008). Embora tenha havido uma variação nos números absolutos desta espécie nos dois anos do estudo, o número de *Lu. longipalpis* aumentou após os picos de precipitação, possivelmente refletindo sua biologia reprodutiva. Na literatura, há muitas controvérsias a respeito desta resposta às chuvas. Alguns autores descrevem o aumento de flebotomíneos ao longo do período das chuvas (Gomes *et al.*, 1980; Aguiar & Saoucasaux, 1984; Gomes & Galati, 1987; Salómon *et al.*, 2002; Barata *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2011), enquanto outros mostram que os números aumentam logo após os picos das chuvas (Deane & Deane, 1956; Resende *et al.*, 2006; Michalsky *et al.*, 2009a). Esta diferença pode refletir as interpretações de dados diferentes em relação ao período chuvoso e aos picos de chuvas. Outros estudos não encontraram uma correlação entre as variáveis climáticas e a densidade de flebotomíneos, embora alguns tenham demonstrado uma tendência de aumento no número de flebotomíneos após o período chuvoso (Souza *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2007; Missawa & Dias *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2012). Souza *et al.* (2004) também observaram uma tendência de aumento de número de casos de LV e LT logo após os picos no número dos vetores no período estudado. Outro estudo realizado no município de Belo Horizonte, distrito nordeste, observou que a presença de um maior número de flebotomíneos coincidiu com os períodos

antes e após as chuvas, caracterizados por baixa umidade relativa do ar e temperaturas mais amenas (Saraiva *et al.*, 2011).

O acompanhamento do perfil climático é importante, pois pode fornecer dados que auxiliam na proposição de medidas de controle para os vetores, principalmente em relação ao controle químico. Analisando a curva de sazonalidade no período de estudo, recomenda-se a aplicação de inseticidas quando a densidade de flebotomíneos é elevada e os índices pluviométricos são baixos, a fim de impedir a reprodução dos adultos e consequente elevação dos índices de transmissão no período pós-chuva. Logo, sugerimos que o controle químico seja realizado em dois ciclos anuais, antes do começo das chuvas, em setembro, e após o período chuvoso, no mês de maio.

Grande parte dos trabalhos correlacionam as variáveis climáticas, principalmente precipitação pluviométrica, ao número de flebotomíneos capturados (Resende *et al.*, 2006; Michalsky *et al.*, 2009a,b), no entanto, não avaliam a associação entre a variável climática e a infecção de flebotomíneos. Um estudo realizado em Teresina, no Piauí, investigou a infecção natural de flebotomíneos através de dissecação, e chegaram à conclusão que o mês com o maior percentual de positividade de flebotomíneos ocorreu 4 meses após a maior média de precipitação pluviométrica (Silva *et al.*, 2007a). Ressalta-se para a avaliação da sazonalidade, a necessidade de uma análise de no mínimo dois anos consecutivos, pois reduz a possibilidade de erros provocada por anos atípicos (Dias *et al.*, 2007). A associação entre as variáveis climáticas e outros parâmetros, como a porcentagem de insetos infectados, o tempo de incubação extrínseco, a longevidade do vetor e o percentual de insetos infectados pode auxiliar na construção de modelos mais robustos na predição da força de transmissão em determinada área (Silva *et al.*, 2007a).

A taxa de infecção natural de flebotomíneos é considerada baixa na natureza, mesmo em áreas endêmicas (Miranda *et al.*, 2002, Silva *et al.*, 2007a, Michalsky *et al.*, 2011). A taxa de infecção de *Lu. longipalpis* encontrada no estudo foi muito maior (18%), e está de acordo com um estudo realizado no município, no distrito Nordeste, onde a taxa de infecção desta espécie por *Le. infantum* foi de 19% (Saraiva *et al.*, 2010). Além disto, 92% dos parasitos encontrados em *Lu. longipalpis* foram *Le. infantum*, o agente etiológico da LV. A elevada densidade deste flebotomíneo apresentando alta infecção por *Le. infantum*, indica que há condições favoráveis para a rápida expansão da LV, sugerindo que a interface vetor-parasito seja ativa na área do estudo. Em comparação com estudos utilizando técnicas moleculares em outras regiões brasileiras, a taxa de infecção encontrada neste estudo foi muito maior. No estado do Mato Grosso do Sul, a taxa de infecção por *Le. infantum* foi de 3,9%. em *Lu. longipalpis* (Paiva *et al.*, 2006). A mesma taxa de infecção nesta espécie de flebotomíneo por

*Le. infantum* foi observada no município de Janaúba, Minas Gerais (Michalsky *et al.*, 2011), enquanto no estado do Mato Grosso, uma taxa de 0,71% foi observada em *Lu. longipalpis* por esta espécie de *Leishmania* (Missawa *et al.*, 2010). O estudo de Souza *et al.* (2004) mostrou que em amostra de flebotomíneos coletada em parques e áreas verdes de Belo Horizonte, não foi possível detectar DNA de *Leishmania*, utilizando-se a técnica de PCR. O DNA de *Le. infantum* também foi detectado em flebotomíneos pertencentes à espécie *Lu. lloydi* e ao complexo *cortezzei*. A detecção de DNA de *Le. infantum* e *Le. braziliensis* neste complexo já foi relatada anteriormente em Lassance (MG) (Saraiva *et al.*, 2009) e Santa Luzia (MG) (Carvalho *et al.*, 2008). No único exemplar capturado da espécie *Lu. lloydi*, foi detectado pela primeira vez o DNA da espécie *Le. infantum*. Houve também outro relato de encontro de DNA de *Le. braziliensis* nesta espécie de flebotomíneo, no estado de Minas Gerais (Quaresma *et al.*, 2012).

Foi encontrado no estudo, em dois “pools” de *Lu. longipalpis*, o DNA de *Le. braziliensis*. No estado do Mato Grosso do Sul, a presença do DNA de *Le. braziliensis* e *Le. amazonensis* foi detectada nesta mesma espécie de flebotomíneo (Paiva *et al.*, 2010; Paiva *et al.*, 2006). Savani *et al.* (2009) encontraram o DNA de *Le. infantum*, *Le. amazonensis* e *Le. (V.) sp.* em *Lu. longipalpis* também neste estado. Com a aplicação cada vez maior de técnicas moleculares em diferentes áreas, tem havido frequentemente um grande número de relatos de agentes etiológicos de LT em vetores de LV e vice-versa (Paiva *et al.*, 2010). A presença do DNA de *Leishmania* em uma dada espécie de flebotomíneo, no entanto, não implica em competência vetorial para a doença, já que o flebotomíneo deve cumprir uma série de outros critérios, como já citado anteriormente.

A alta taxa de infecção natural de *Lu. longipalpis* não foi seguida por uma prevalência igualmente expressiva da LVC. A taxa de soropositividade canina nas áreas selecionadas do estudo foi de 3,6%. Estudos mostram que esta taxa em áreas urbanas é bastante variável (Dantas-Torres *et al.*, 2006b; Almeida, 2009; Naveda, 2006; entre outros), havendo controvérsias a respeito do real significado das taxas de prevalência da LVC maiores ou menores em termos de risco de transmissão para o homem. Estudos realizados neste município mostraram uma alta correlação positiva entre o número de casos humanos e as taxas de prevalência da LV canina (Oliveira *et al.*, 2001; Margonari *et al.*, 2006). Em estudos anteriores realizados em áreas endêmicas de Minas Gerais, foram observadas prevalências de LVC entre 1 e 2%, com a média de prevalência de 4,5% em todo o município (Michalsky *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2011). Distritos sem casos humanos de LV mostraram uma prevalência da doença canina de 28,3% (Michalsky *et al.*, 2009a), enquanto prevalências em torno de 1,5% foram encontradas, independentemente da presença ou ausência de casos humanos de

LV (Barata *et al.*, 2004). A densidade populacional mensal de flebotomíneos também foi correlacionada com a prevalência da LVC, mostrando uma associação positiva (França- Silva *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2005). De fato, os cenários de transmissão da LV em áreas urbanas são complexos, altamente heterogêneos e envolvem uma série de variáveis (Werneck, 2008). Mesmo que esta abordagem não seja objetivo do nosso estudo, acreditamos que uma prevalência de cerca de 4% e uma infecção confirmada por diagnóstico sorológico e molecular dos 51 cães examinados por *Le. infantum*, indica que a interface reservatório-parasito de LV também é ativa na área.

Em nosso estudo, possíveis reservatórios sinantrópicos para LV não foram investigados. Em Belo Horizonte, estudos relatam uma alta taxa de infecção de roedores pertencentes a várias espécies de *Leismania* com a utilização da PCR, apresentando uma prevalência de 30% a 67,7%, sendo que as espécies *Le. braziliensis*, *Le. infantum* e infecção mista por ambas as espécies foram encontradas (Ferreira, 2010; Melo, 2008; Marcelino *et al.*, 2011; Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, 2012). Em relação aos marsupiais do gênero *Didelphis*, observou-se uma soroprevalência que variou de 8% a 22% (Schallig *et al.*, 2007), e a taxa de infecção por PCR de 25% e 23,5%, sendo encontrado o agente etiológico pertencente a ambos os complexos *Le. braziliensis* e *Le. donovani* (Melo, 2008; Schallig *et al.*, 2007). No entanto, mais estudos são necessários para determinar se potenciais reservatórios, que não o cão, podem estar agindo como fontes de infecção para os flebotomíneos na área de estudo.

No período do estudo, os testes de triagem e confirmatório adotados pelo Ministério da Saúde nos ensaios sorológicos para LVC foram ELISA e RIFI, respectivamente (Brasil, 2006). Atualmente, o Dual-Path Platform (DPP) foi implementado como teste de triagem e ELISA como teste confirmatório, em um esforço para aumentar a especificidade e precisão no diagnóstico da LV. Embora nenhuma abordagem molecular, dependente de biópsia de tecidos, seja aplicável aos inquéritos caninos, nossos resultados confirmaram que 100% das amostras positivas para ELISA/RIFI continham o DNA de *Le. infantum*. Em relação aos exames parasitológicos, não houve confirmação em 10% dos 51 cães soropositivos. Este achado pode ser devido à presença de uma infecção pré patente (Quinnell & Courtenay, 1997; Maia, 2008).

O método parasitológico é considerado o padrão ouro para o diagnóstico da LV, cuja especificidade é de 100% e a sensibilidade varia de acordo com o tecido analisado. A sensibilidade do método depende de algumas variáveis, dentre elas o grau do parasitismo, o tipo de material biológico coletado, processamento e coloração e observador treinado (Laurenti, 2009). Em casos de baixa carga parasitária, especialmente em animais

assintomáticos, pode tornar-se mais difícil e duvidoso (Ferrer 1999; Ashford 2000; Laurenti 2009). O diagnóstico parasitológico realizado em meio de cultura é menos utilizado na rotina diagnóstica, mas também é útil no isolamento e identificação do parasito. A eventual contaminação por bactérias e fungos, pode impedir o crescimento de *Leishmania* spp., diminuindo a sensibilidade do exame (Laurenti, 2009). A positividade de ambos os exames parasitológicos (mielocultura e técnica de aposição em lâmina) no nosso estudo foi de 72,5%, demonstrando um alto índice de positividade e confirmando o valor diagnóstico da sorologia como teste de triagem. Em contrapartida, em estudo similar, realizado no norte de Minas com uma amostra de 44 cães, a mielocultura demonstrou a menor co-positividade em relação aos demais testes adicionais realizados (Regina-Silva *et al.*, 2014).

Por outro lado, sabe-se que os testes moleculares são rápidos, altamente sensíveis e independentes do crescimento do parasito (Almeida, 2013; Pereira-Chioccola, 2009; Queiroz *et al.*, 2010; Oliva *et al.*, 2006; Coura-Vital *et al.*, 2011), constituindo-se uma alternativa prática e vantajosa, utilizada na detecção de DNA de *Leishmania* spp. em vetores, reservatórios animais e amostras clínicas (Rodrigues *et al.*, 2002; Brandão-Filho *et al.*, 2003; Oliveira-Pereira *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2007). De fato, a amplificação por PCR apresentou 100% de positividade para pelo menos, um dos quatro tecidos testados. Estudos realizados em áreas endêmicas para LV confirmam que a prevalência da infecção é muito maior que a proporção de cães que desenvolvem a forma sintomática da doença (Solano-Gallego *et al.*, 2001, Alvar *et al.*, 2004). Estes resultados diferem de um estudo realizado em área endêmica para LV, onde cães assintomáticos e sintomáticos foram analisados através de 4 testes diagnósticos para LVC, e foi observado que a PCR utilizando o alvo kDNA foi capaz de identificar apenas 64% das amostras como positivas (Regina-Silva *et al.*, 2014).

O recente estudo do nosso grupo citado acima foi realizado com cães dos municípios de Paracatu e Montes Claros, e comparou testes diagnósticos adicionais para LV com os testes sorológicos adotados pelo MS. O teste imunocromatográfico alcançou a maior co-positividade em relação ao RIFI/ELISA (77,3%). Embora a amostra canina tenha sido limitada (44 cães), esses dados reforçam a necessidade do desenvolvimento de testes mais sensíveis e específicos antes que o diagnóstico eficiente da LV canina possa ser realizado (Regina-Silva *et al.*, 2014).

Ainda há controvérsias sobre a melhor amostra biológica a ser utilizada no diagnóstico da LVC (Manna *et al.*, 2004; Teles *et al.*, 2012; Lombardo *et al.*, 2012). A amplificação por PCR foi positiva em 100% das amostras de baço, enquanto a menor co-positividade (57%) foi obtida nas amostras de linfonodo. Regina-Silva *et al.* (2014), analisando a concordância do teste molecular, utilizando diferentes tecidos, também observou que o linfonodo foi o tecido que apresentou a menor co-positividade em relação aos testes sorológicos RIFI/ELISA.

Apesar da alta sensibilidade relatada no diagnóstico parasitológico para aspirados de baço (Gontijo & Melo, 2004; Barrouin-Melo *et al.*, 2004) nossos resultados discordam de outros que utilizaram a PCR para amplificar diferentes amostras de tecidos; nestes, a maior taxa de positividade foi obtida em amostras de linfonodo (Manna *et al.*, 2004; Teles *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2013).

Adicionalmente, os cães sintomáticos mostraram uma tendência a um maior número de testes positivos em comparação aos assintomáticos. No nosso estudo, o número médio de testes positivos no grupo de cães sintomáticos e assintomáticos foi 2,607 e 2,261, resultando em uma diferença estatisticamente não significativa.

Outro estudo que avaliou 4 testes diagnósticos para LVC, de acordo com o grupo de cães, mostrou uma diferença significativa no número médio de testes positivos, de 3,16 e 2,28 nos grupos sintomático e assintomático, respectivamente (Regina-Silva *et al.*, 2014). Uma correlação positiva entre o número de testes sorológicos e parasitológicos e a severidade da LVC já foi demonstrada antes em um estudo realizado utilizando-se 40 cães naturalmente infectados com *Le. infantum* do município de Belo Horizonte (Reis *et al.*, 2006). Estes autores concluíram que a evolução clínica da LVC em cães infectados naturalmente origina alterações aparentes nos parâmetros sorológicos, parasitológicos e bioquímicos/ hematológicos, sendo a evolução destes parâmetros de acordo com o estado clínico da LVC.

Os cães soropositivos assintomáticos para LV representaram 45% da amostra, e mostraram resultados positivos para mielocultura (52,2%), técnica de aposição em lâmina (73,9%) e PCR (100%). Embora estudos moleculares prévios em áreas endêmicas para LV tenham confirmado que a prevalência da infecção é muito maior que o número de cães que efetivamente desenvolvem a forma sintomática da doença (Solano Galego *et al.*, 2001; Alvar *et al.*, 2004), estas altas taxas de positividade denotam a importância epidemiológica dos cães assintomáticos no ciclo epidemiológico da LV. Outros estudos nos fornecem dados sobre a infectividade e o papel que estes cães desempenham no ciclo da doença. Um trabalho realizado em área endêmica para LV demonstrou, através de xenodiagnóstico, uma taxa de infectividade de 33,3% para cães assintomáticos (Michalsky *et al.*, 2007). A presença de *Leishmania* spp. em diversos tecidos, principalmente na pele, confirma a potencial infectividade desses animais assintomáticos para o vetor (Madeira *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005b).

Um teste ideal para o diagnóstico da LVC deve ter alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, ser de simples execução e ter baixo custo, ser viável para utilizar em laboratórios regionais e condições de campo, ser capaz de detectar infecção assintomática (Regina-Silva *et al.*, 2014) e usar amostras que possam ser coletadas de forma não invasiva

(Maia, 2008). A efetividade da eutanásia de cães soropositivos para o controle da LV, depende de testes diagnósticos precisos, que sejam capazes de identificar de modo seguro todos os cães infectados, principalmente àqueles no período de latência, entre a infecção e o desenvolvimento da infecciosidade (Courtenay *et al.*, 2002).

Em geral, os estudos epidemiológicos da LV são realizados em regiões endêmicas e não consideram as áreas de transmissão recente, correspondentes a baixo e médio risco de transmissão. No presente estudo, nós nos concentramos nestas últimas áreas, sem casos de LV humana nos últimos cinco anos, mas com interfaces ativas parasito-vetor e parasito-reservatório. Como já foi apontado por Baneth *et al.* (2008) em áreas com condições favoráveis para o LV, como alta densidade de vetor e alta concentração de cães, a infecção por *Leishmania* spp. irá se espalhar rapidamente e extensivamente entre a população canina. Na área aqui estudada, esta situação é agravada pelas altas taxas de infecção do vetor e cães com *Le. infantum*. Portanto, a vigilância epidemiológica contínua deve ser estendida a regiões de baixo e médio risco, a fim de minimizar as chances de surtos de LV.

Dentre as medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde, a aplicação de inseticidas tem se mostrado bastante eficaz na redução da população de flebotomíneos e conseqüentemente da transmissão de *Leishmania* spp., apesar de ser um método que muitas vezes é dificultado pela recusa da população (Souza *et al.*, 2008; Barata *et al.*, 2011a; Santana-Filho *et al.*, 2012).

Alguns trabalhos avaliam a incidência de infecção por LV mediante diferentes ações de intervenção. No município de Feira de Santana, Bahia, Oliveira & Araújo (2003) objetivando avaliar o PCLV, considerando-se a periodicidade e cobertura, e a evolução da incidência nas áreas trabalhadas, observaram que não houve associação entre prevalência da LVC e casos humanos. As variáveis que se mostraram efetivas foram percentual de prédios trabalhados para inquérito e borrifação e número de ciclos de inquérito canino, responsáveis por 40% de incidência de casos humanos. No mesmo município, observou-se que nas áreas de intervenção as taxas de incidência da LV foram menores onde houve borrifação de inseticidas, tanto isoladamente como em combinação com a triagem e eliminação de cães soropositivos, se comparado à área controle (Souza *et al.*, 2008).

Em um estudo em área de intensa transmissão de LV foi feita uma intervenção comunitária para avaliar a eficácia da eliminação de cães infectados e do controle vetorial na incidência de infecção por *Le. chagasi* (Werneck *et al.*, 2008). Houve uma grande variabilidade da positividade do teste de Montenegro, de acordo com a localidade e área de intervenção, sendo considerados alguns vieses, como a não comparabilidade das áreas em relação às taxas basais de transmissão.

Costa *et al.* (2007 b) apontam um efeito protetor da eliminação de cães infectados adicionalmente ao efeito protetor da borrifação intradomiciliar na incidência da infecção por *Le. infantum*, mostrando que em comparação com os lotes que receberam apenas borrifação intradomiciliar, a eliminação dos cães soropositivos diminuiu em 80% a incidência da infecção. Já a borrifação de anexos juntamente com a borrifação intradomiciliar sem ou com a eliminação de cães sororreativos não esteve significativamente associada à redução da soroconversão. No município de Montes Claros, área endêmica de transmissão de LV em Minas Gerais, Barata *et al.* (2011a) mostraram que houve uma redução do número de flebotomíneos capturados no intra e peridomicílio, com um efeito residual de quatro meses após o segundo ciclo de borrifação, sugerindo uma aplicação anual de três a quatro ciclos de borrifação para alcançar um controle mais efetivo.

Em nosso estudo, objetivamos avaliar o impacto das medidas de controle do vetor nas diferentes áreas propostas através do número mensal de flebotomíneos. Quando a área controle foi comparada às áreas borrifação e manejo, observou-se uma redução importante no número de flebotomíneos, demonstrando a efetividade de uma ou ambas as ações de controle. As análises das áreas, mostraram que o conjunto de dados do trecho controle e dos pré-tratamentos (antes do início das ações) foi homogêneo, assim, pudemos avaliar qual (is) da (s) ação (ões) pós tratamento (borrifação e manejo ambiental) teriam efetividade.

Em relação à área pós-tratamento (borrifação), houve uma diminuição no número do vetor no período após a aplicação do inseticida. Esta redução, porém, apontou somente uma tendência, já que não foi significativa, se comparado à área controle. No nosso estudo, a borrifação das áreas foi feita de acordo com as recomendações e em número limitado de imóveis. Uma possível explicação para os nossos resultados, é que o controle químico, de forma geral, é bastante complexo na sua execução, devido a uma série de fatores, como baixo período residual do inseticida, falhas na aplicação da técnica do painel, dificuldades em realizar a borrifação intra-domiciliar, falta de supervisão operacional em campo, entre outros.

Alguns autores apontam uma baixa eficácia das medidas de controle empregadas para a LV. No município de Porteirinha, um resultado semelhante ao do nosso estudo foi relatado, havendo somente uma tendência de redução no número de vetores após o início da intervenção. Os autores apontam como explicação para este achado, a realização de somente um ciclo de borrifação, não atingindo o total de residências borrifadas, além da falta de recursos humanos e financeiros, associada à resistência de moradores durante as ações de aplicação do inseticida (Barata *et al.*, 2011b). No município de Lobato, no Paraná, área com ocorrência de casos de LT humana, os autores demonstraram que não houve diferença entre o número de flebotomíneos coletados no primeiro e no segundo período, após as ações. As

medidas de controle utilizadas foram telar as janelas das edificações, a desinsetização com cipermetrina e o manejo ambiental, que consistiu em retirar todo o tipo de matéria orgânica existente no peridomicílio. A possível explicação para a falha das medidas é que no primeiro período houve uma ocupação da áreas pelo capim colônio, atuando como uma barreira física e impedindo que os flebotomíneos alcançassem o ambiente do peridomicílio. Já no segundo período, com o corte do capim, as residências ficaram mais expostas, atraindo um maior número de flebotomíneos (Teodoro *et al.*, 2006).

Em nosso estudo, as ações de manejo ambiental tiveram um impacto positivo na redução de *Lu. longipalpis* nas áreas estudadas. Esta redução foi estatisticamente significativa, quando comparada à área controle e aos pré-tratamentos. Este resultado foi animador, já que a diminuição no número de flebotomíneos pôde ser usada para mensurar a efetividade das ações de manejo ambiental, e demonstra como estas ações, que visam impedir a formação dos criadouros de flebotomíneos, destruindo o local de manutenção das formas imaturas, puderam auxiliar no controle do vetor nos trechos do estudo.

Em um estudo preliminar para avaliar a eficácia das ações de controle, a resposta individual de cada ação no período estudado nos dá um direcionamento e nos coloca em reflexão sobre as possíveis limitações que incidem sobre cada uma delas. Futuramente, dando continuidade a esta linha, uma quarta área, onde ambas as ações fossem aplicadas, a borrifação e o manejo ambiental, poderia ser avaliada, a fim de determinar a eficácia do conjunto das ações de controle na redução do vetor.

Em relação às ações de manejo ambiental, acompanhadas ou não das ações de desinsetização, estudos de Teodoro e colaboradores no estado do Paraná, onde a LT persiste de forma endêmica, evidenciam o impacto positivo das alterações introduzidas no ambiente para a redução do número de flebotomíneos, como limpeza do peridomicílio, remoção de matéria orgânica, poda de árvores e separação dos abrigos de animais domésticos das habitações humanas (Teodoro *et al.*, 1999; 2003; 2004). Outros trabalhos, do mesmo grupo, demonstraram que apesar das medidas de reorganização ambiental propostas, houve uma descontinuidade das ações de controle, e as condições ambientais retomaram os padrões do início do trabalho, culminando no aumento da população flebotomínica (Teodoro *et al.*, 2004; 2007). O uso de galinheiros como barreiras zooprofiláticas também tem dado bons resultados, já que o grande número de flebotomíneos capturados nos galinheiros diminui o número capturado nos demais ambientes, especialmente nos domicílios (Teodoro *et al.*, 2007; Reinhold-Castro *et al.*, 2008).

Borges *et al.* (2009) em um estudo realizado no município de Belo Horizonte, observaram que a presença de aves, principalmente de galinhas, nos arredores dos domicílios

representa um fator de risco para a ocorrência de casos de LV, principalmente pela sua maior frequência nos domicílios, sendo fonte de alimentação e também pela criação de ambiente favorável à procriação dos flebótomos, devido aos resíduos orgânicos produzidos. Este fato é corroborado por Moreno *et al.* (2005), que afirmaram, além disto, que a presença de lixo urbano ou domiciliar pode resultar no aumento da incidência da LV humana e canina.

Sugerimos que seja incorporado ao PCLV, a identificação das residências com características mais sugestivas para a presença do vetor (presença de animais domésticos, peridomicílio amplo, vegetação e acúmulo de matéria orgânica no solo), como uma das prioridades de indicação para a realização do controle químico e manejo ambiental, pois estas residências, que apresentam todas as características para a presença do vetor, são focos potenciais para a manutenção do ciclo da leishmaniose. A casa número 6, localizada no CS Salgado Filho, é um exemplo que ilustra esta situação. O diagnóstico ambiental seria uma boa alternativa para a seleção destes imóveis de “risco”.

As ações de manejo ambiental, descritas no tópico “Saneamento Ambiental” no Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral do Ministério da Saúde, se resumem em dois pequenos parágrafos e não fornecem as diretrizes para sistematizar as ações de orientação e vigilância sanitária voltadas aos proprietários dos imóveis, nem quais as áreas devem ser priorizadas. Percebe-se claramente que há uma dificuldade em se ter parâmetros que possam medir a eficiência do manejo ambiental.

Em São Paulo, as atividades de vigilância epidemiológica dirigidas ao vetor presentes no Manual de Vigilância e Controle da LVA do estado de São Paulo são de responsabilidade do Estado e devem ser realizadas pelos serviços regionais da SUCEN. No tópico Manejo Ambiental, é sugerido que se faça o diagnóstico ambiental, ou seja, a avaliação das condições sanitárias de todos os imóveis da área urbana dos municípios, a fim de mapear os locais favoráveis à proliferação do vetor. A orientação aos moradores quanto aos cuidados com os quintais e jardins, criação de animais domésticos também deve ser realizada durante a visita. Assim, após o registro das informações obtidas em campo, os imóveis “de risco” serão selecionados a partir do diagnóstico ambiental e a limpeza deverá ser feita pelo próprio morador, com o apoio da prefeitura. Reuniões periódicas devem ser realizadas pelas secretarias municipais, para definição das medidas de saneamento em domicílios e diversos espaços públicos. Em residências com prevalência da doença canina  $\geq 2\%$  e áreas com ocorrência de casos humanos, as ações de manejo ambiental devem ser intensificadas, precedendo, no segundo caso, à aplicação de inseticida (Camargo-Neves *et al.*, 2006).

Adicionalmente, na cartilha “Manejo Ambiental para Controle de Leishmaniose Visceral Americana”, do estado de São Paulo, criada para orientar gestores, coordenadores de

secretarias e/ou departamentos de vigilância epidemiológica, sanitária e ambiental sobre o controle de vetores dos municípios do estado de São Paulo, é previsto o controle integrado, que se baseia nas condições ambientais e na dinâmica populacional do vetor, incorporando a noção de manejo. Assim, os componentes do controle integrado incluem: controle ambiental por meio da vigilância entomológica, manejo ambiental, armadilhas, controle biológico e controle químico. A elaboração do Plano de manejo ambiental (PMA), que estabelece o planejamento para o controle do vetor da LVA, conta com os seguintes pontos: diagnósticos setoriais, definição de metas de curto, médio e longo prazo, propostas de ações e intervenções baseadas na análise de diagnósticos, programação física, financeira e institucional da implantação das ações definidas, programação de acompanhamento e monitoração das ações e avaliação do impacto das ações.

Foi desenvolvido um estudo objetivando a implantação de uma proposta de visita domiciliar integrada na região de Presidente Prudente, estado de São Paulo, com ênfase no manejo ambiental, apoiada em um protocolo de orientação aos moradores de imóveis em situação mais crítica. A viabilidade na implementação dessas atividades, observada pela boa resolução a partir das recomendações estabelecidas, se baseou principalmente no compromisso das lideranças municipais em todo o processo, além do importante papel do Estado, na assessoria e avaliação das ações (Sucen, 2007).

No período do estudo, poucos casos isolados de LVH foram encontrados no entorno dos trechos trabalhados, sendo que estes compartilham a mesma ocupação humana e as características ambientais de qualquer outra área urbana de Belo Horizonte. A ocorrência de infecção assintomática humana, na área estudada, é uma possibilidade. Em estudo realizado na região metropolitana de Belo Horizonte, Moreno *et al.* (2006) relataram a ausência de sintomas clínicos da LVH em área com prevalência da doença humana de 2,4 a 5,6% e com 5% a 10% de prevalência da LV canina. Em estudos semelhantes realizados com crianças no nordeste do Brasil, observou-se casos assintomáticos e subclínicos sem evolução para fase aguda da doença (Jeronimo *et al.*, 2000; Caldas *et al.*, 2002; Gama *et al.*, 2004).

Percebe-se claramente, que o controle da leishmaniose visceral é mais complexo e intrigante, tornando-se um grande problema de saúde pública. Trata-se de uma doença em que ainda persistem muitas lacunas no seu controle, sendo necessária uma vigilância constante e integrada. A manutenção da transmissão e a reincidência de casos humanos são um reflexo da descontinuidade das ações, relacionadas tanto ao cão como ao vetor, em especial o manejo ambiental (Camargo-Neves *et al.*, 2003, 2007). Além disso, necessita-se avaliar o impacto das medidas de controle aplicadas, pois se estas forem empregadas isoladamente sem uma análise, acabam não atingindo o efeito desejado (Camargo-Neves *et al.*, 2001).

Como recentemente assinalado por outros autores, mais de 30 anos após o início do processo de urbanização da LV, os cenários de transmissão da LV ainda são pouco entendidos e mais estudos são necessários até compreendermos todas as variáveis determinantes envolvidas na transmissão da LV (Belo *et al.*, 2013). Em conclusão, a densidade populacional de *Lu. longipalpis* e a presença de *Le. infantum* em ambos os vetores e principais reservatórios, fornecem condições favoráveis à rápida propagação da infecção humana nos trechos do estudo. Mesmo estes CS sendo locais onde a doença humana ainda não se instalou, ações de saúde são urgentemente necessárias para evitá-la.

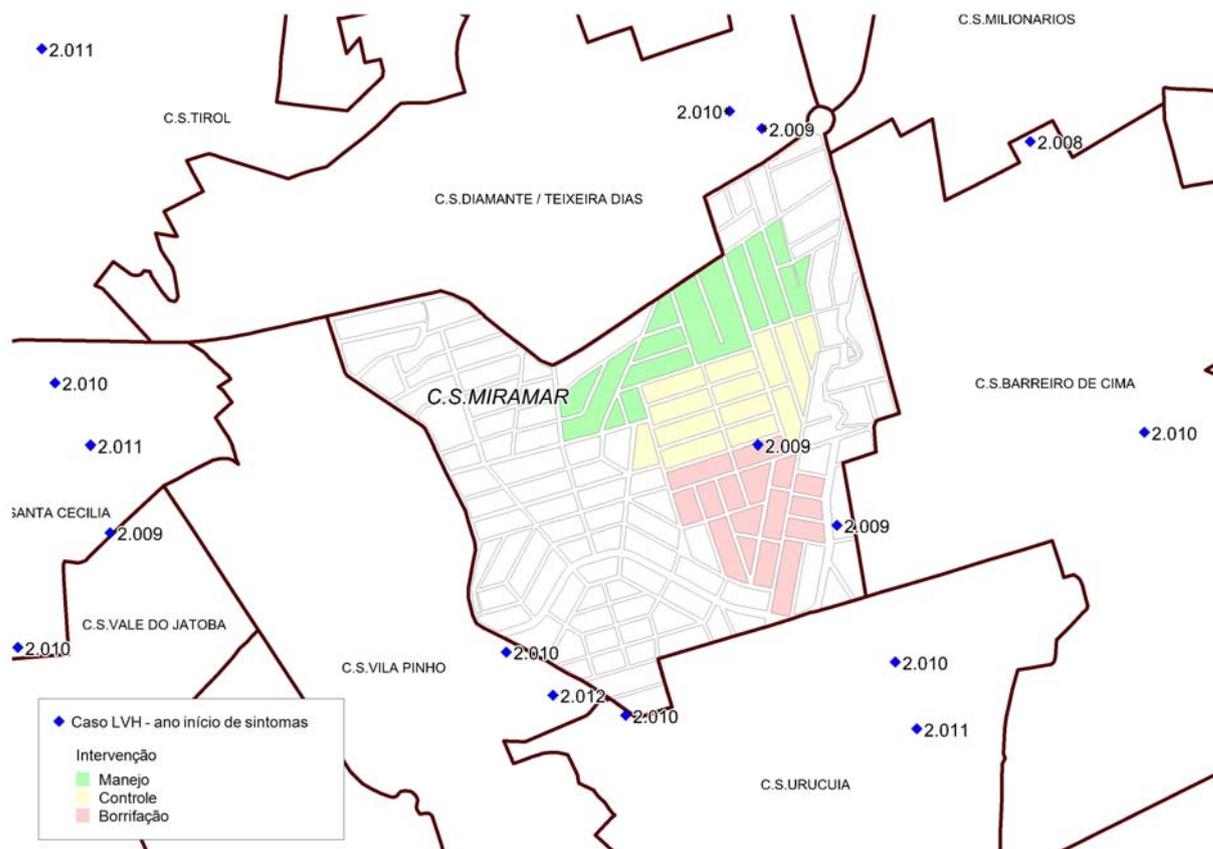
## 8 CONCLUSÕES

1. A fauna flebotomínica da área estudada apresentou 7 espécies. A espécie predominante foi *Lu. longipalpis* (96,54%), apresentando uma alta taxa de infecção por *Le. infantum* (16,7%). Os achados corroboram com outros estudos realizados no município, demonstrando sua importância como a principal espécie vetora do parasito causador da LV na área;
2. Estudos futuros são necessários acerca da detecção de DNA de *Le. infantum* em *Lu. lloydi* e no complexo *cortezii*, e de DNA de *Le. braziliensis* em *Lu. longipalpis*, já que somente o encontro do DNA do parasito não é suficiente para considerá-las vetoras destas espécies de leishmânia;
3. O encontro de 11,91% dos exemplares de *Lu. longipalpis* no intradomicílio demonstra sua adaptação ao ambiente antrópico e sugere que a transmissão possa ocorrer no interior das residências.
4. De acordo com as análises entre a densidade de flebotomíneos e os dados climáticos, os meses de setembro e maio são os mais indicados para o controle químico vetorial no intra e peridomicílio dos bairros estudados no município;
5. A soropositividade canina diminuiu ao longo dos anos (2010 a 2012), nos Centros de Saúde analisados;
6. A detecção de *Leishmania* spp. em 90,2% dos cães soropositivos, por pelo menos um dos métodos parasitológicos, confirma os resultados da metodologia antes adotada pelo Ministério da Saúde (ELISA e RIFI);
7. A detecção do parasito na maioria dos animais e o encontro do DNA de *Le. infantum* em todos os 51 cães, confirma a presença do reservatório doméstico infectado em área urbana;
8. O baço mostrou o maior percentual de positividade na *Ln*PCR (100%), sendo o diagnóstico pelo método molecular mais sensível em relação aos métodos parasitológicos realizados (técnica de aposição em lâmina e mielocultura), como já demonstrado na literatura.

9. O manejo ambiental foi eficiente na redução de flebotomíneos dos trechos estudados, enquanto a borrifação mostrou apenas uma tendência na diminuição dos insetos vetores;
10. O encontro de *Lu. longipalpis* em elevada densidade, com uma alta taxa de infecção, a alta prevalência da LV canina e a presença de *Le. infantum* em ambos os reservatórios e vetores, indica que a interface parasito-reservatório-vetor está ativa no trechos do estudo. Considerando que as áreas de estudo possuem um perfil recente de transmissão, a doença pode se expandir rapidamente nestes locais.

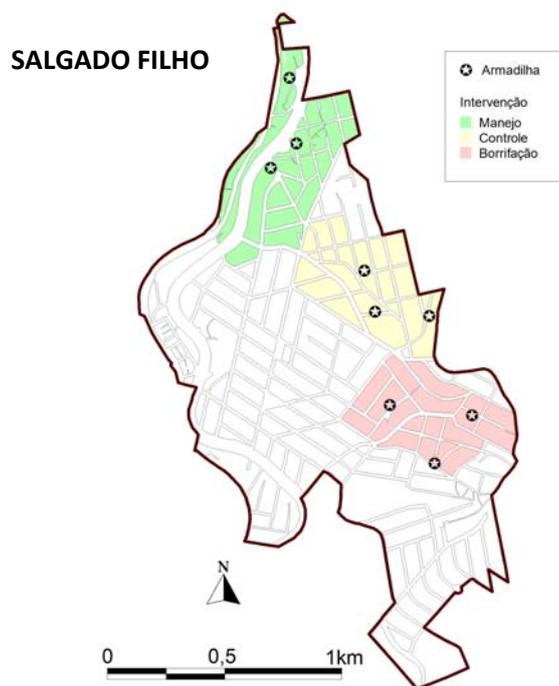
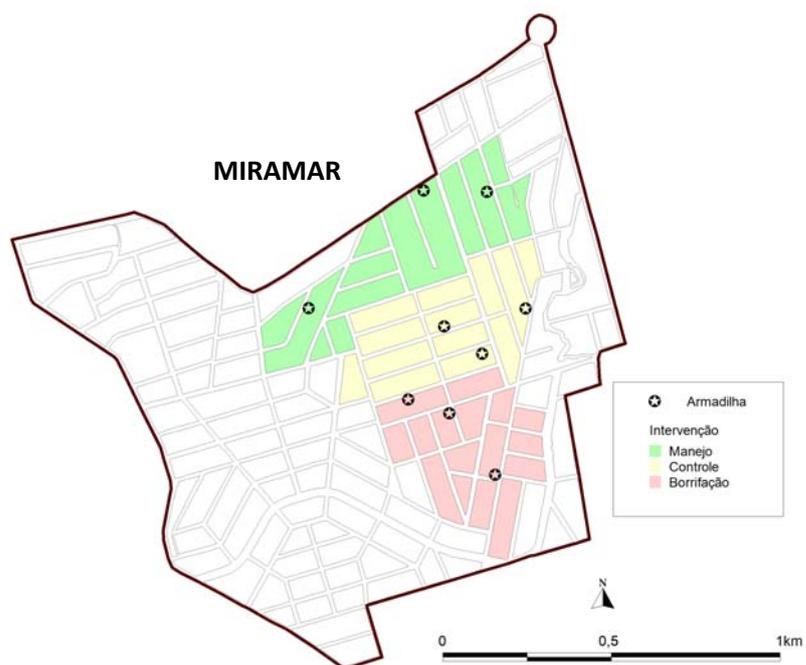
## 9 ANEXOS

### 9.1 Distribuição dos casos de LVH nos CS Miramar e Salgado Filho e nos CS vizinhos, nos anos de 2008 a 2013, município de Belo Horizonte.

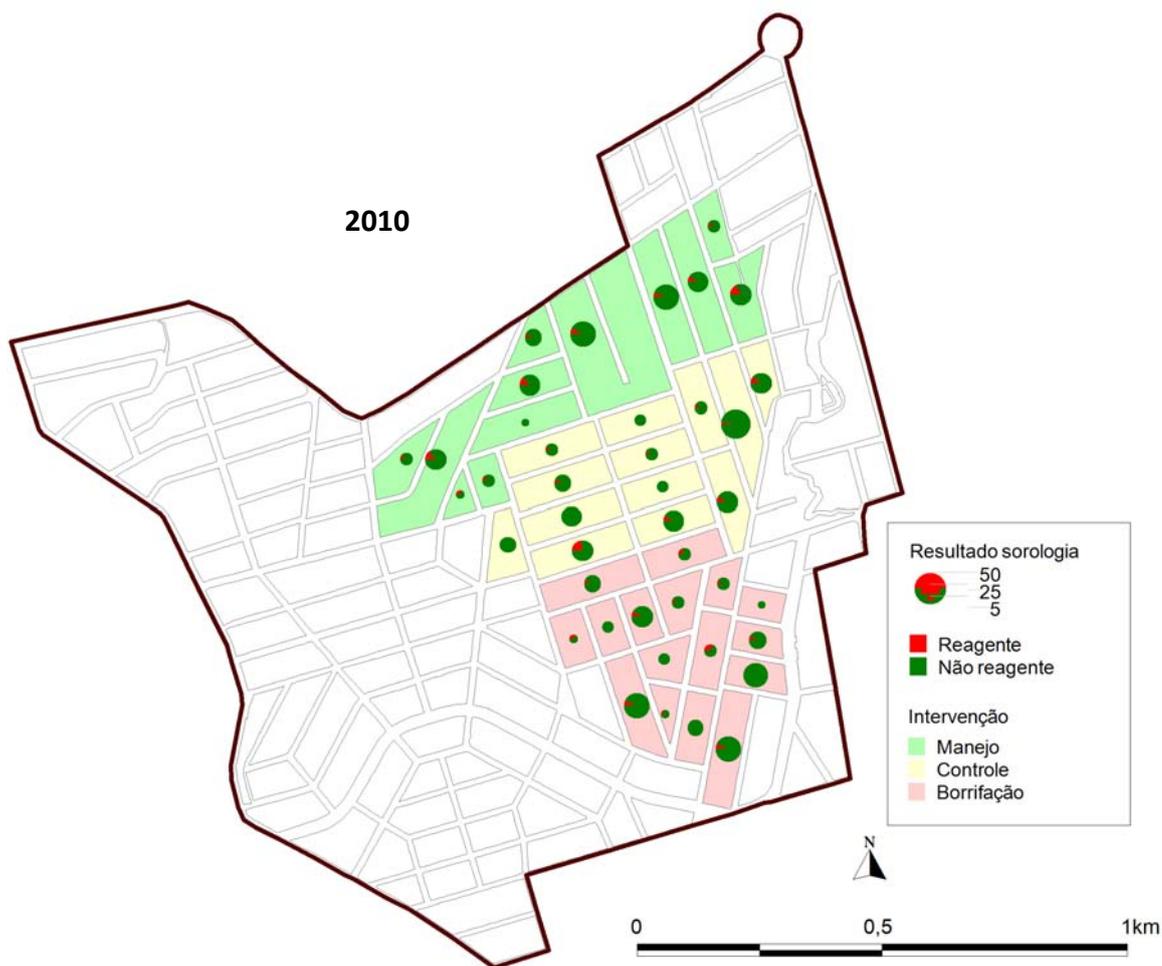


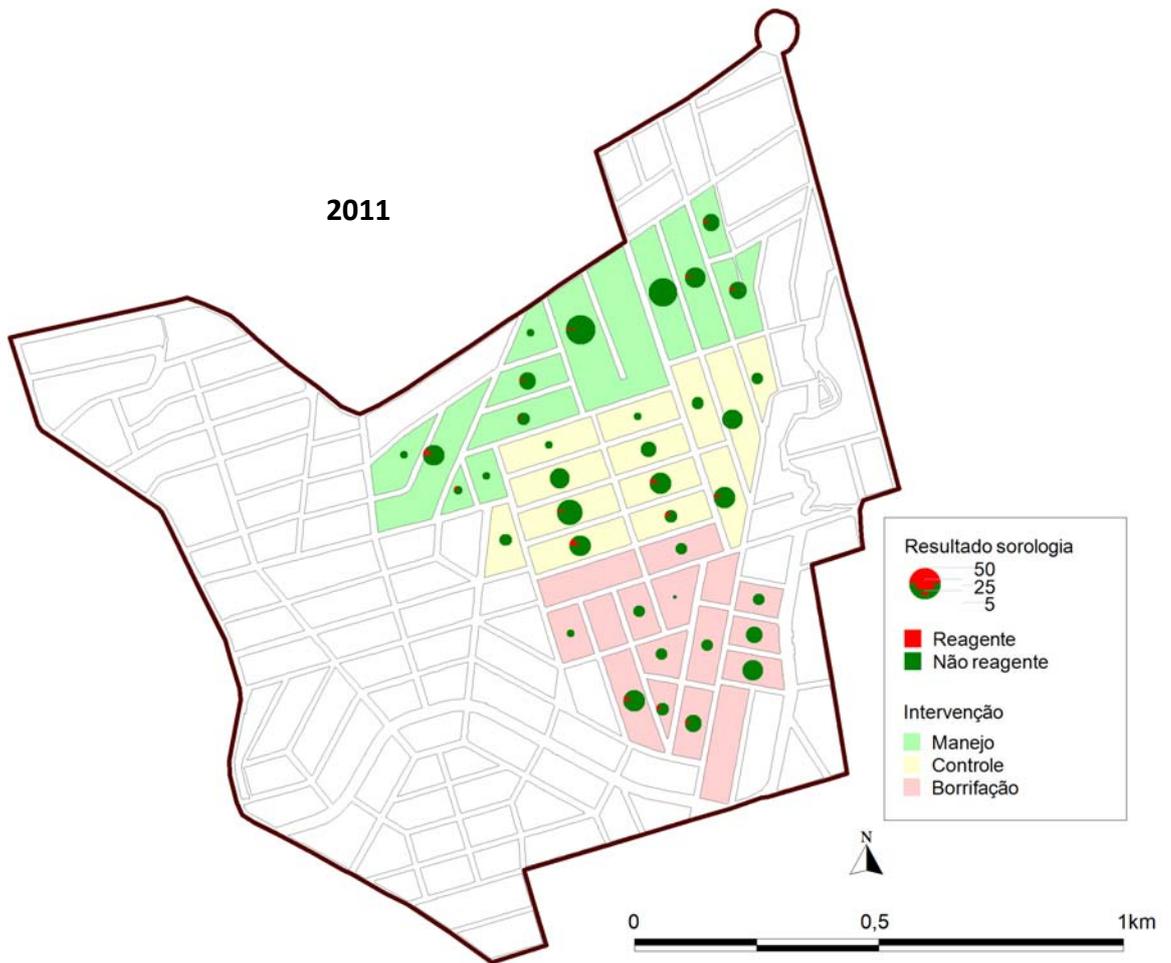


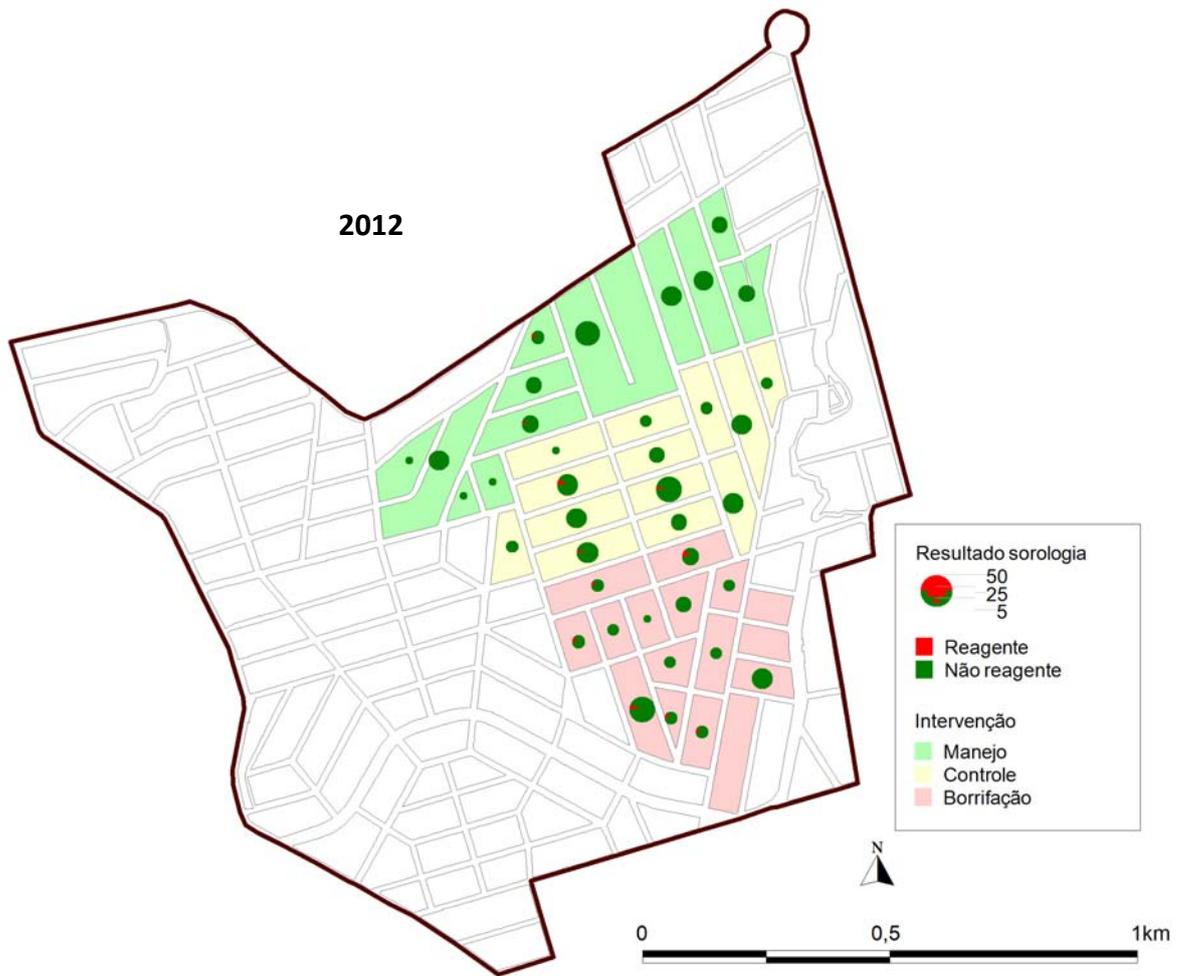
**9.2** Distribuição das armadilhas para captura de flebotomíneos nos trechos controle, manejo e borrifação dos CS Miramar e Salgado Filho, município de Belo Horizonte.



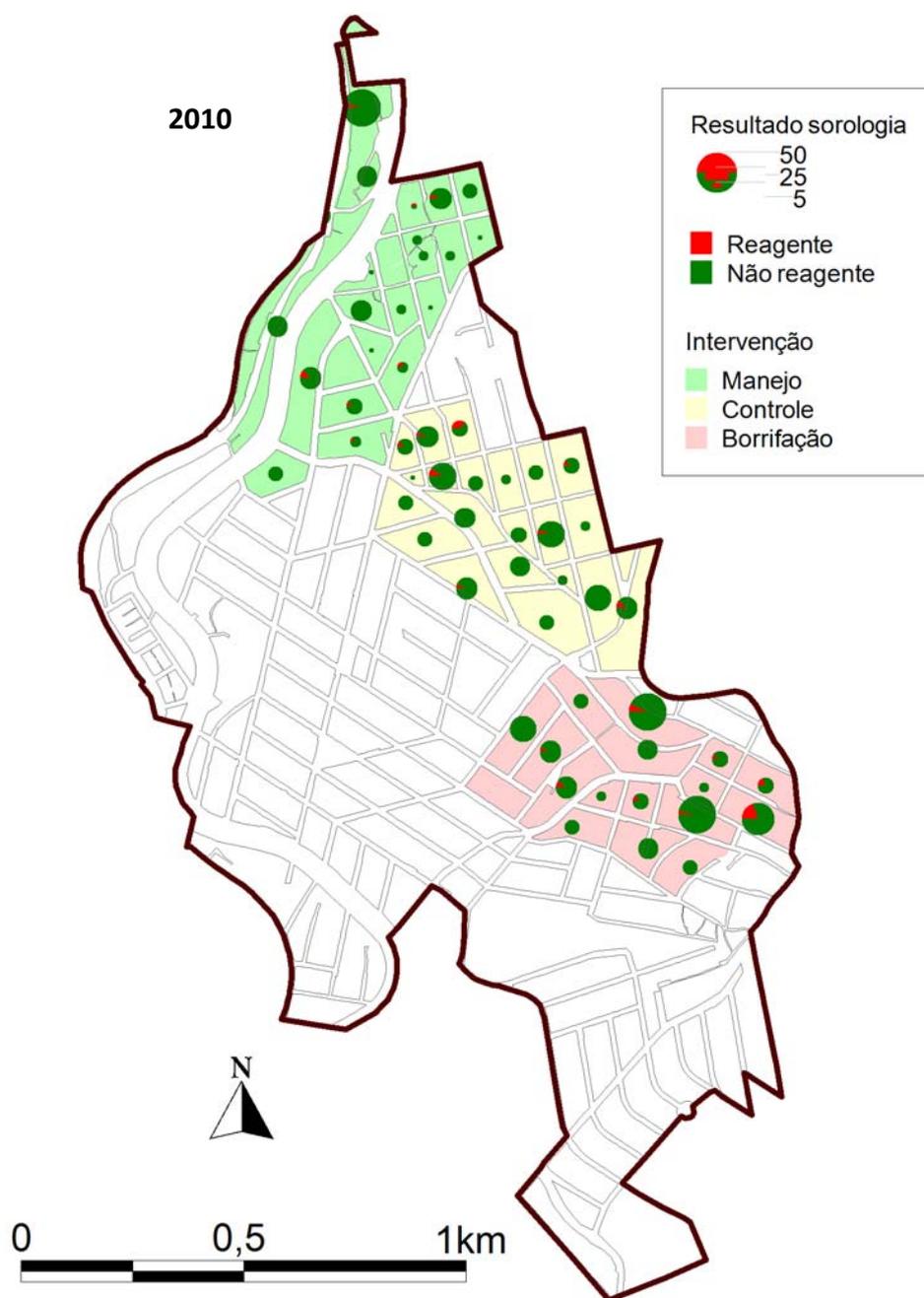
**9.3** Inquérito canino censitário realizado nos trechos do estudo no CS Miramar, município de Belo Horizonte, nos anos de 2010, 2011 e 2012.

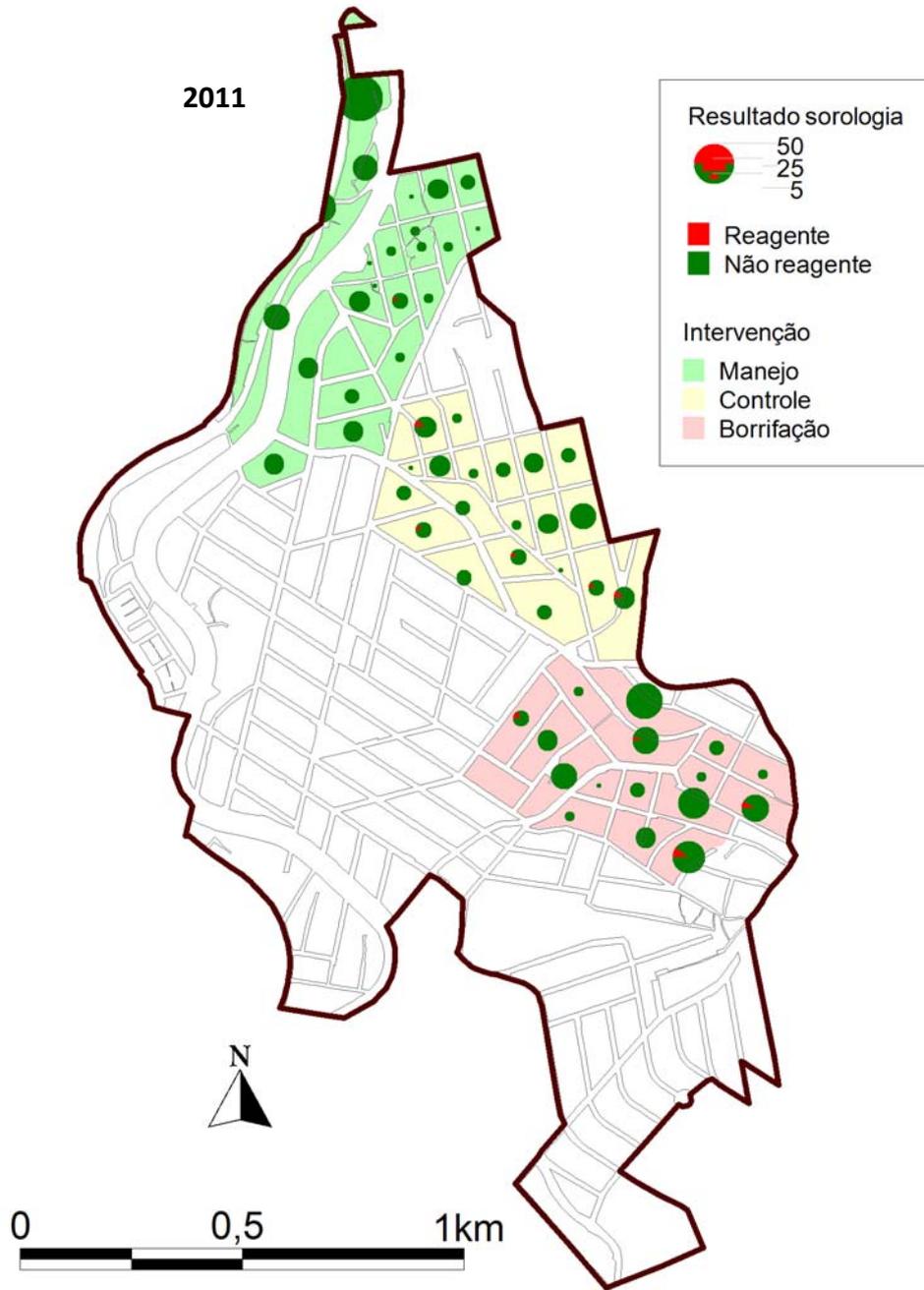


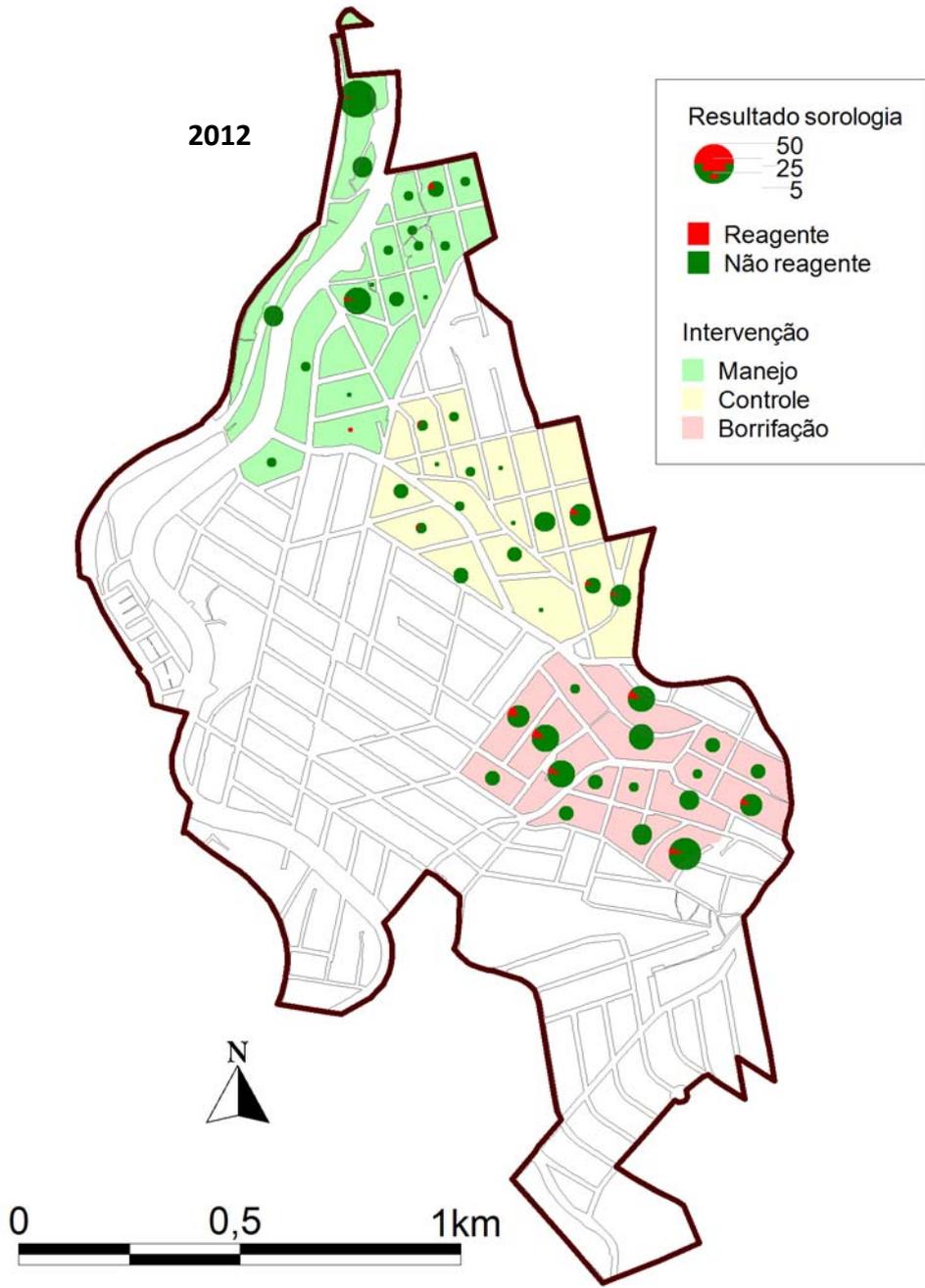




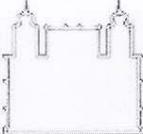
**9.4** Inquérito canino censitário realizado nos trechos do estudo no CS Salgado Filho, município de Belo Horizonte, nos anos de 2010, 2011 e 2012.







**9.5** Ficha clínica dos cães soropositivos dos CS Miramar e Salgado Filho selecionados para necrópsia



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



CPqRR/FIOCRUZ

**Roteiro para necropsia de cães com leishmaniose visceral**

Número do animal: *109*  
Endereço: *rua...*

1) Dados do animal

- Raça: *...*
- Sexo: *...*
- Idade: *...*
- Cor: *...*

2) Sintomatologia clínica

- Ceratoconjuntivite ( )
- Opacificação de córnea ( )
- Hiperqueratinização do focinho ( )
- Hiperqueratinização de coxins ( )
- Dermatite de ponta de orelha ( )
- Dermatite ( ) localizada ( ) generalizada
- Alopecia ( ) localizada ( ) generalizada
- Mucosas hipocoradas ( )
- Emagrecimento ( ) leve ( ) moderado ( ) acentuado
- Úlceras de decúbito ( )
- Ascite ( )
- Paresia de membros posteriores ( )
- Onicogribose ( )

- Emaciação ( )
- Infecções secundárias ( )
- Linfadenopatia (x)

Ectoparasitos ( ) pulgas ( ) carrapatos

Classificação geral

Assintomático( ) Oligossintomático( ) Sintomático( )

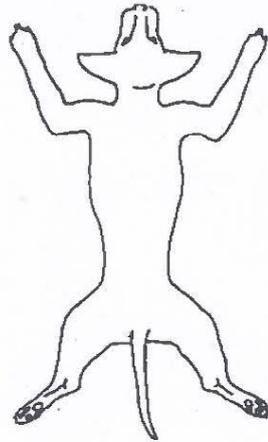
Achados de necropsia

Fígado: normal(x) alterado( )

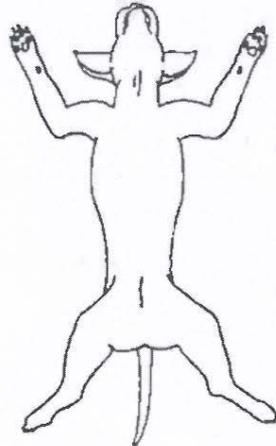
Baço: normal( ) alterado( )

Linfonodo mesentérico: normal( ) alterado( )

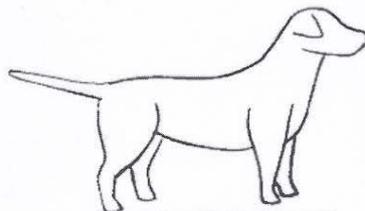
Exame dermatológico – localização e número de lesões



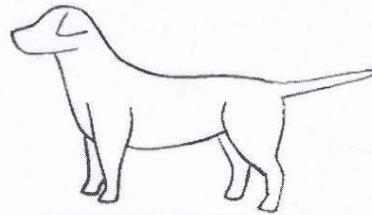
Dorsal



Ventral



Direito



Esquerdo

**EXAMES:**

**DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO:**

Leitura de lâmina de fragmento de lesão: \_\_\_\_\_

Cultura de medula: \_\_\_\_\_

Cultura de aspirado de lesão: \_\_\_\_\_

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO:** \_\_\_\_\_

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR:** \_\_\_\_\_

## 9.6 Banco de dados dos cães dos CS Miramar e Salgado Filho

Clinica	Sexo	Nome	Sintomas clínicos
Sintomático	F	Laura	Dermatite de ponta de orelha, emagrecimento leve, onicogribose e linfadenopatia.
Sintomático	M	Lupi	Ceratoconjuntivite, úlcera na córnea, dermatite de ponta de orelha, dermatite generalizada descamativa, alopecia localizada e emagrecimento moderado.
Assintomático	F	Tieta	
Sintomático	M	Zé bob	Úlcera de coxins, lesão de ponta de orelha, dermatite localizada, dermatite descamativa e linfadenopatia.
Assintomático	F	Xuxa	
Sintomático	M	Pitico	Dermatite localizada, onicogribose, secreção ocular, tártaro e linfadenopatia.
Sintomático	M	Preto	Hiperqueratinização do focinho, emagrecimento moderado, onicogribose, pêlo opaco e linfadenopatia.
Sintomático	M	Negão	Dermatite de ponta de orelha, dermatite localizada, emagrecimento leve, onicogribose, descamação e linfadenopatia.
Sintomático	F	Florzinha	Ceratoconjuntivite, hiperqueratinização de focinho, emagrecimento moderado, onicogribose, pêlo opaco e linfadenopatia.
Assintomático	F	Luna	
Sintomático	M	Tango	Hiperqueratinização do focinho, emagrecimento acentuado, onicogribose
Sintomático	M	Leco	Emagrecimento moderado, onicogribose
Sintomático	F	Lory	Onicogribose
Assintomático	M	Bino	
Assintomático	M	Isnup	
Assintomático	M	Nike	
Assintomático	M	Pingo	
Assintomático	F	Rebeca	
Assintomático	M	Safira	
Assintomático	M	Negão	
Assintomático	M	Bay	
Sintomático	M	Didu	Hiperqueratinização do focinho, dermatite de ponta de orelha, emagrecimento moderado, onicogribose e linfadenopatia.
Sintomático	M	Bidu	Hiperqueratinização do focinho, emagrecimento moderado, pêlo opaco, úlcera de focinho e descamação.
Assintomático	M	Bady	
Sintomático	M	Zangado	Onicogribose
Sintomático	M	Pingo	Dermatite generalizada, dermatite de ponta de orelha, onicogribose
Sintomático	M	Duck	Hiperqueratinização do focinho
Assintomático	M	Kifer	
Assintomático	M	Neguinho	
Sintomático	F	Princesa	Onicogribose e linfadenopatia
Sintomático	F	Chulipa	Hiperqueratinização do focinho com úlcera, dermatite generalizada e onicogribose.
Sintomático	F	Malu	Hiperqueratinização do focinho e dermatite de ponta de orelha, emagrecimento moderado.
Sintomático	F	Duda	Onicogribose, cancro de inoculação no focinho e linfadenopatia.
Sintomático	F	Shadow	Dermatite descamativa, mucosas hipocoradas, emagrecimento moderado e linfadenopatia.
Sintomático	F	Samir	Dermatite localizada na cabeça e no focinho, emagrecimento moderado, onicogribose, secreção vaginal, tumor de mama e linfadenopatia.
Sintomático	M	Hudo	Hiperqueratinização do focinho, dermatite de ponta de orelha, dermatite localizada (focinho), edema de membros e linfadenopatia.
Sintomático	F	Meg	Hiperqueratinização do focinho, dermatite de ponta de orelha
Assintomático	F	Pit	
Sintomático	F	Fiona	Onicogribose e linfadenopatia.
Assintomático	M	Buti	
Sintomático	M	Jorge	Dermatite de ponta de orelha, dermatite localizada e onicogribose
Assintomático	M	Bidu	
Sintomático	M	Charopinho	Onicogribose e secreção ocular.
Sintomático	M	Bob pequeno	Mucosas hipocoradas, dermatite periocular, onicogribose e lesões de pele.
Sintomático	F	Miúcha	Dermatite de ponta de orelha, dermatite localizada, mucosas hipocoradas, onicogribose, emaciação e secreção ocular.
Assintomático	F	Laila	
Assintomático	F	Sacha	
Assintomático	M	Zé Bof	
Assintomático	M	Léo	
Assintomático	F	Sarita	
Assintomático	F	Pretinha	

## 9.7 Alinhamento das sequências das amostras positivas de *Lu. longipalpis* e dos cães com as sequências de *Leishmania* depositadas no Gen Bank

### Alinhamento amostra 1 (*Lu. longipalpis*) e amostra 1 (cão) – *Le. infantum*

*L. amazonensis* (M80293) TCCCATCGCAACTTCGGTTCGGTGTGTGGCGCCTTTGGAGGGGTTTAGTGCGTCCGGTGCGAGI  
*L. braziliensis* (M80292) .....G.  
*L. infantum* (M81430) .....C.....A.....  
 Amostra 1 *L. longipalpis* .....C.....A.....  
 e amostra 1 cão  
 CCGGTTTCGTCCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCACGGCCTCTAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCI  
 .....  
 .....  
 :GTTTCGGGGGAGAACGTACTGGGGCGTCAGAGGTGAAATTCTTAGACCGCACCAAGACGAACTF  
 .....  
 .....  
 :TACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGAGATCGAAGA  
 .....  
 .....  
 GATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGATCTTATGC  
 .....  
 .....  
 .....

### Alinhamento amostra 2 (*Lu. longipalpis*) - *Le. braziliensis*

*L. amazonensis* (M80293) TCCCATCGCAACTTCGGTTCGGTGTGTGGCGCCTTTGGAGGGGTTTAGTGCGTCCGGTGCGAGI  
*L. braziliensis* (M80292) .....G.  
*L. infantum* (M81430) .....A.....  
 Amostra 2 *L. longipalpis* .....G.....  
 CCGGTTTCGTCCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCACGGCCTCTAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCI  
 .....  
 .....  
 :GTTTCGGGGGAGAACGTACTGGGGCGTCAGAGGTGAAATTCTTAGACCGCACCAAGACGAACTF  
 .....  
 .....  
 :TACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGAGATCGAAGA  
 .....  
 .....  
 GATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGATCTTATGC  
 .....  
 .....  
 .....



## Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil



Fabiana de Oliveira Lara-Silva<sup>a,1</sup>, Érika Monteiro Michalsky<sup>a,1</sup>,  
 Consuelo Latorre Fortes-Dias<sup>b</sup>, Vanessa de Oliveira Pires Fiuza<sup>c</sup>,  
 José Eduardo Marques Pessanha<sup>c</sup>, Shara Regina-Silva<sup>d</sup>, Daniel Moreira de Avelar<sup>a</sup>,  
 Maíara Alves Silva<sup>a</sup>, Ana Cristina Vianna Mariano da Rocha Lima<sup>a</sup>,  
 Ailton Junior Antunes da Costa<sup>a</sup>, George Luiz Lins Machado-Coelho<sup>d</sup>,  
 Edelberto Santos Dias<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Leishmanioses, Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Parasitologia e Doenças Infecciosas, Fundação Coarquel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte, SMSU/RSU, Brazil

<sup>d</sup> Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
 Received 24 June 2014  
 Received in revised form 4 March 2015  
 Accepted 6 April 2015  
 Available online 14 April 2015

**Keywords:**  
 Canine visceral leishmaniasis  
*Lutzomyia longipalpis*  
*Leishmania infantum*  
*Leishmania braziliensis*

### ABSTRACT

About 97% of the human cases of the American visceral leishmaniasis (VL) occur in Brazil. In the last few years, the disease expanded to medium- and large-sized cities, in which surveillance and control actions have been intensified, in an effort to control VL spreading. Our two-year study was conducted in Belo Horizonte, the sixth most populous city in Brazil, which is endemic for VL. We focused in two particular districts of recent transmission of the disease, with no reported human cases and submitted to minor surveillance and control actions. Our aim was to draw an epidemiological profile of the local situation concerning *Lutzomyia* vector, *Leishmania* parasites, and the main domestic reservoirs (dogs). *Lutzomyia longipalpis* comprised 96.5% of the total phlebotomine sand flies captured and displayed an expressive minimal infection rate by *Leishmania infantum* (16.7%). Positive correlations were found between the population densities of *L. longipalpis*, rainfall and temperature. *L. infantum* was also detected in the carlotentil complex and, for the first time, in *Lutzomyia floydii*. *Leishmania braziliensis*, an etiological agent of the American cutaneous leishmaniasis, was also identified in *L. longipalpis*. Among the 1408 dogs serologically tested by standard enzyme-linked and fluorescence immune assays (ELISA/IFA) 3.6% were positive for VL. *L. infantum* DNA and *Leishmania* parasites were identified in 100% and 72.5% of the seropositive dogs, respectively. The co-positivity of other diagnostic tests for VL—*Leishmania*-nested PCR, imprint and myeloculture—was compared to the standard serology. Both symptomatic or asymptomatic dogs displayed an equal average number of positive diagnostic tests for VL. The districts studied display favorable conditions for the rapid spreading of human infection, in terms of *L. longipalpis* population density, and presence of *L. infantum* in both vector and main reservoir.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Leishmaniasis are present in four out of the five continents and are endemic in 98 countries, with more than 350 million

individuals currently at risk. The visceral form of leishmaniasis (VL) causes large-scale and tenacious epidemics, with high fatality rates (WHO, 2014). About 97% of the human cases of VL in the Americas occur in Brazil, where more than 70,000 official notifications and more than 3800 deaths were recorded over the last three decades (Werneck, 2010; PAHO, 2013). The epidemiological triad of VL in the country involves *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) parasites as the etiological agents, *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies as the main vectors, and dogs (*Canis familiaris*)

\* Corresponding author. Tel.: +55 31 32460748.  
 E-mail address: edel@cpqrr.fiocruz.br (E.S. Dias).  
<sup>1</sup> Lara-Silva, F.O. and Michalsky, E.M. equally contributed to this study.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.002>  
 0001-7060/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

as the principal domestic reservoirs (Deane and Deane, 1955). It has been observed that canine VL usually precedes human cases of VL (Brazilian Ministry of Health, 2009). Other synanthropic reservoirs of VL are foxes (*Dusicyon vetulus* and *Gentooxyn thous*), opossums (*Didelphis albiventris* and *Didelphis marsupialis*) and rodents (*Rattus rattus*, *Necomys squamipes*, *Trichomys apereoides*, *Proechimys concolor*, *Coendou prehensilis*) (Quinnell and Courtenay, 2009), although the epidemiological role played by the latter in the urban transmission remains uncertain.

Originally, VL was limited to rural environments; however, in the course of time, the disease underwent a clear epidemiological transition, with increasing incidences in urban areas. In Brazil, it reached medium- and large-sized cities (Brazilian Ministry of Health, 2006). This expansion was due to a set of socioeconomic, physical, and biological factors induced by human activities, which culminated in the adaptation of vectors and reservoirs to urban areas (Laimson, 1989; Sangel and Maurício, 2008).

Most of the extant studies conducted in Brazil do not address the entire epidemiological chain of VL (see Cabrera et al., 2003; Guerra et al., 2004 for exceptions). On the other hand, those that do provide a detailed analysis of the full transmission cycle are not recent, and thus may not reflect the current disease characteristics and prevalence (Deane, 1956; Matzochi et al., 1985). Moreover, most of these studies were performed in endemic regions, where the transmission cycle is fully active and the epidemiological transmission risk (ETR) of VL is high. The actions of the Surveillance and Control Program of VL of the Brazilian Ministry of Health vary according to the local ETR and are generally more intense in the areas with high ETR, where the VL has been established for a number of years. The ETR classification is based on the average number of reported human cases in the last three years ( $n$ ), and varies from sporadic ( $n < 2.4$ ), to medium ( $2.4 \leq n < 4.4$ ) or intense ( $n \geq 4.4$ ) (Brazilian Ministry of Health, 2009).

Our study was conducted in Belo Horizonte, the sixth most populous city in Brazil, which is an area of intense ETR for VL, as a whole. However, the average number of human cases varies from district to district and it has been noted that VL is spreading from the Northern to the Southern districts of the city [unpublished data]. The actions of the Surveillance and Control Program of VL concentrate in the districts with intense or medium ETR. Despite the application of systematic control actions—such as the continuous removal of seropositive dogs, early diagnosis/treatment of human cases, and chemical vector control—the VL is still in expansion in the urban areas of Brazil. In the last two quinquennia (2001–2005 and 2006–2010), the prevalence of canine VL remained stable around 18%, despite intensive screening and culling actions. During the same period, the overall number of human cases increased by 41% [unpublished data]. There is no consensus about the efficacy of these control actions adopted, particularly the canine culling (Dye, 1996; Courtenay et al., 2002; Ribeiro et al., 2013).

The two districts presently studied are located in the South of Belo Horizonte. Despite the presence of canine cases of VL, no human cases have been reported therein. Our aim was to evaluate the current epidemiological status of vector, parasite, and canine reservoir in those districts with recent transmission of VL. Due to their sporadic ETR, they have been submitted to minor actions of the Surveillance and Control Program of VL.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Ethical procedures

The present study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ) under the license no. LW-21/11 (protocol no.

P-85/10-2). All the procedures followed the technical norms established by the Federal Board of Veterinary Medicine (CFMV resolution no. 714/2002). Euthanasia was performed at the Zoonosis Control Center in Belo Horizonte, according to the screening-culling procedure of the Program for Visceral Leishmaniasis Control of the Brazilian Ministry of Health. The dog owners were informed of the project objectives and voluntarily signed the Statement of Informed Consent regarding the sample collection for biopsy.

### 2.2. Study area

Our study was developed in two districts of Belo Horizonte (19°55'15" S, 43°56'16" W), the capital of the Brazilian state of Minas Gerais (Fig. 1). Belo Horizonte occupies an area of 331.4 km<sup>2</sup> with population of 2,375,151 inhabitants and an average human development index (HDI) of 0.810 (UNDP, 2013). The two districts, namely Salgado Filho and Miramar, were selected due to the absence of reported human cases of VL. Hence, minor control actions of the Surveillance and Control Program of VL have been applied therein.

### 2.3. Entomological survey

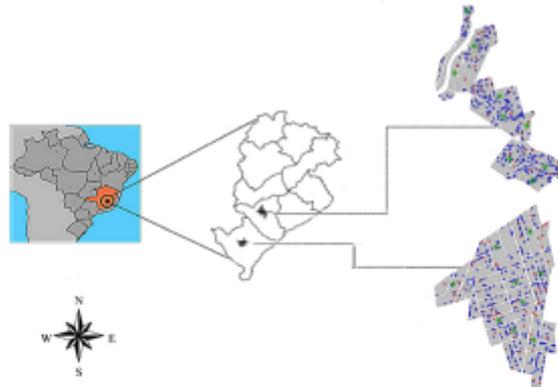
Entomological captures were performed from September 2010 to August 2012, during three consecutive nights from 5:00 pm to 9:00 am, always in the first week of each month, and included nine houses per district (Fig. 1). The houses were selected based on previous canine cases of VL in the neighborhood, in 2010, as well as on environmental conditions that favor the rearing of phlebotomine sand flies such as shadowed areas, presence of domestic animals, and fruit trees. Two HP light traps (Pugedo et al., 2005) were mounted in the peri- and intradomiciles of the houses.

The phlebotomine sand flies of both genders were stored in 70% ethanol until species identification. The non-engorged females from the third day of capture per month, in particular, were preserved in 6X DMSO instead. The head and the last three abdominal segments of every female were removed and slide-mounted with Berlese liquid for species identification. The remaining body parts of the females from the third days of capture were used for natural infection assays.

The captured phlebotomine sand flies of both sexes were identified using specific descriptions, taxonomic keys, and comparison with specimens from the Reference Collection of Phlebotomine Sand Flies of the Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ. We adopted the species classification proposed by Young and Duncan (1994). Due to their morphological similarity, *Lutzomyia setleri* and *L. cortelezzi* species were considered as *cortelezzi* complex. Specimens with missing or incomplete characters that impaired their identification were considered *Lutzomyia* sp.

### 2.4. Climate data

Monthly climate data (maximum temperature, relative humidity, and total rainfall) were collected at a meteorological station of the Fifth District of the Brazilian Institute of Meteorology, located in Belo Horizonte, Minas Gerais state. Average values of each climate variable and their respective standard deviations were calculated on annual basis. Concerning rainfall, months with precipitation indices higher and lower than the annual average were considered rainy or dry, respectively. For comparison purposes, we normalized the data by taking the highest precipitation value, in each year, as 100%. Similarly, the highest number of *L. longipalpis* specimens captured per year was also taken as 100% for the respective year.



**Fig. 1.** Geographical localization of the two studied districts (top right – Salgado Filho; top bottom – Mirante) in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil. Phlebotomine sand fly capture sites (nine per district) are indicated by green asterisks. Period of capture: September 2010 to August 2012. Seropositive and seronegative dogs from the canine census survey denoted by red and blue dots, respectively. One dot may represent more than one dog. (For interpretation of the references to color in this figure caption, the reader is referred to the web version of this article.)

#### 2.5. DNA extraction from phlebotomine sand flies and dogs

Total DNA was extracted from the phlebotomine sand fly females captured every third day per month, using commercial kits (Puragene® Core KitA from QIAGEN). When appropriate, up to ten specimens from the same species, capture site and date were combined as a single test sample for DNA extraction. The reliability of the extraction was verified by the amplification of the IV S6 region from a constitutive gene (cacophony) for *Lutzomyia* (Lins et al., 2002) and the DNA was used as template in a nested PCR reaction for *Leishmania* (LnPCR). Negative (no DNA) and positive (DNA from *Lutzomyia*) controls were run in parallel. Total DNA was also extracted from canine spleen, mesenteric lymph node, and skin by the Cell and Tissue Genomic Prep™ kit (GE Healthcare). The GFX™ Genomic Blood DNA Purification kit (GE Healthcare) was used to extract DNA from bone marrow aspirates. The extracted canine DNA served as template in LnPCR. All the amplification fragments were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels followed by ethidium bromide staining and UV visualization.

#### 2.6. Nested PCR for *Leishmania* (LnPCR)

Total DNA from phlebotomine sand flies and dogs was submitted to LnPCR for the SSU18S rDNA gene that amplifies a conserved fragment for *Leishmania* (van Eys et al., 1992; Cruz et al., 2002, 2006). Negative (no DNA) and positive (DNA extracted from *L. infantum* MHOM/BR/4/PP75) controls were run in parallel.

#### 2.7. Minimal infection rate of *L. longipalpis* by *L. infantum*

The minimal infection rate (MRI) by *L. infantum* was estimated using the formula  $MRI = \text{number of positive test samples of } L. \text{ longipalpis} \times 100 / \text{total number of } L. \text{ longipalpis} \text{ specimens captured}$  (Paiva et al., 2006).

#### 2.8. *Leishmania* identification

The fragments amplified by LnPCR were purified from agarose gels using the QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN) and submitted to DNA sequencing, in both directions, using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle kit and the ABI 3730 analyzer (Life Technologies). The nucleotide segments were aligned with *Leishmania braziliensis* (M80292.1), *L. amazonensis* (M80293.1), and *L. infantum* (M81430.1) DNA sequences deposited in the GenBank® database. BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html), BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), and MacVector NTI® tools were employed in sequence editing and alignment.

#### 2.9. Collection of canine samples

A census survey of the local population of dogs was performed in 2011. After collection in filter paper, the blood eluates were tested by immunofluorescence indirect assay (IFA) (Camargo and Rebonato, 1969) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Volter et al., 1979), using the appropriate kits produced by Biomanguinhos (Fiocruz, RJ, Brazil). Dogs for which absorbance values were equal to or higher than three times the standard deviation of the cutoff value in ELISA and that were positive at  $\geq 1:40$  dilution in IFA were considered seropositive for VL, according to the diagnostic parameters adopted by the Brazilian Ministry of Health. The seropositive dogs were examined by veterinary physicians and classified as asymptomatic or symptomatic, depending on the absence or presence of signs and symptoms suggestive of *Leishmania* infection. The signs and symptoms observed were lymphoid adenopathy, slight decrease of weight and/or opaque hair, cutaneous alterations (depilation, furfuraceous eczema, ulcers), onychogryphosis, keratoconjunctivitis and rigidity of posterior limbs (Mancianti et al., 1988). Oligosymptomatic cases were considered as a part of the symptomatic group, rather than separately.

After bone marrow aspiration, the seropositive dogs were euthanized at the Zoonosis Control Center in Belo Horizonte. Spleen,

**Table 1**  
Phlebotomine sand flies captured in two districts of Belo Horizonte, in the Brazilian state of Minas Gerais, with recent transmission profile and no reported cases of human leishmaniasis. Study period: September 2010–August 2012.

Species	Male	Female	Total	%
<i>orlitzkii</i> complex	76	90	166	2.02
<i>Lutzomyia intermedia</i>	4	3	7	0.13
<i>L. achyrocerathis</i>	0	2	2	0.04
<i>L. boydi</i>	0	1	1	0.02
<i>L. longipalpis</i>	4516	498	5014	96.54
<i>L. whitmani</i>	2	5	7	0.13
<i>Lutzomyia</i> spp.	23	25	58	1.12
<b>Total</b>	<b>4581</b>	<b>613</b>	<b>5194</b>	<b>100.0</b>
<b>%</b>	<b>88.20</b>	<b>11.80</b>	<b>100.0</b>	

mesenteric lymph node, and skin fragments were collected and used for preparation of imprints by slide apposition. Slide smears were prepared with bone marrow aspirates. All the slides were examined for the presence of *Leishmania* parasites, after Giemsa staining. The DNA extracted from canine tissues was used as a template in InPCR and the bone marrow aspirates were also seeded in NNN/UT culture medium for *Leishmania* isolation attempts.

### 2.10. Statistical analysis

The influence of climate variables on the population density of *L. longipalpis* was evaluated and the results expressed as simple Spearman correlation coefficient ( $r_s$ ), for each pair of variables.

The standard ELISA/IFA serological methodology for canine visceral leishmaniasis was taken as reference and the performance of the additional diagnostic tests was evaluated relative to that. Since all the dogs were positive by the standard method, the performance of other diagnostic tests was measured by their precision or accuracy, which express the total of correct classifications. In addition, given that the reference was not the certainty of absence of the disease but a serological result, we used the term co-positivity (that is equivalent to relative sensitivity). The overall co-positivity of the additional diagnostic assays was compared by the chi-square test whereas the co-positivity in the two clinical groups of dogs—symptomatic and asymptomatic—and tissue positivity by InPCR were compared by the Fisher's exact test. The Mann–Whitney test was employed to compare the number of positive tests among the three tests, in the two clinical groups of dogs.

All the statistical analysis was performed using the Prism 6 software (GraphPad Inc., USA) with 5% of significance level.

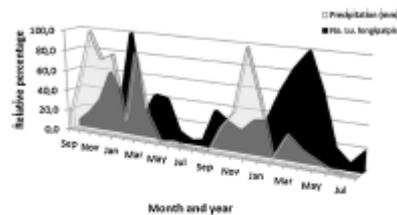
## 3. Results

### 3.1. Phlebotomine sand flies survey

During the study period, a total of 5194 phlebotomine sand flies belonging to six species were captured (Table 1). *L. longipalpis* was the most prevalent among them. *Lutzomyia whitmani* and *Lutzomyia intermedia*—proven vectors of the American cutaneous leishmaniasis (ACL)—were also present, albeit at lower rates. *L. longipalpis* males were more abundant than females, with an overall male/female ratio of 9:1. *L. longipalpis* specimens were mostly captured (88.1%) in the peridomestic (data not shown).

### 3.2. Climate and fluctuation of *L. longipalpis* population

During the two years of study, the temperature varied from 24 °C to 31 °C with an average of  $27.0 \pm 1.6$  °C. Humidity ranged between 48.0% and 78.0%, averaging at  $63.0 \pm 7.8$ %. Major variations occurred in the total precipitation along each year, as expressed by the high standard deviations and the respective variation coefficients:  $151.3 \pm 143.8$  mm (CV = 95.0%) for the first year



**Fig. 2.** Pluviometry and population fluctuation of *L. longipalpis* phlebotomine sand flies in the two districts with no reported cases of VL in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Period of study: September 2010 to August 2012.

and  $167.9 \pm 216.8$  mm (CV = 129.1%) for the second year. Five rainy (October, November, December, January, and March) and seven dry months were readily identified in each year and the population densities of *L. longipalpis* markedly increased after rainfall peaks (Fig. 2).

Positive correlations were found between the monthly population densities of *L. longipalpis* and the three climate variables with correlation coefficients ( $r_s$ ) of 0.4177 for rainfall, 0.5430 for temperature and 0.3480 for humidity. However, statistical significance was found only for rainfall ( $P$ -value = 0.0422) and temperature ( $P$ -value = 0.0061).

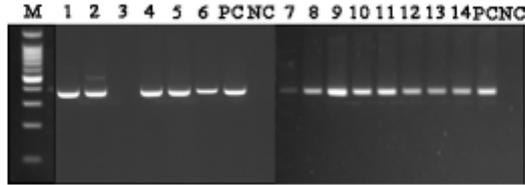
### 3.3. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomine sand flies

The presence of *Leishmania* DNA was investigated in 93 test samples prepared with 152 *Lutzomyia* females. The preparation of pooled samples was applicable for *L. longipalpis* and *L. whitmani*; otherwise, single specimens were employed as test samples. All the test samples displayed the expected 220 bp fragment for the *Lutzomyia* *caophony* gene (data not shown). *Leishmania* DNA was detected in 29 of the 93 test samples, as indicated by the presence of a 353 bp fragment following InPCR (Fig. 3A).

Table 2 summarizes the *Leishmania* infection ratios and species identification in the *Lutzomyia* test samples. Positivity for *Leishmania* sp. means that species identification attempts were unsuccessful. The MRI of *L. longipalpis* by *L. infantum* was estimated as 16.7%.

### 3.4. Canine serology and co-positivity of other diagnostic tests for VL

Among the 1408 dogs tested for VL, 51 (3.6%) were seropositive by ELISA/IFA. The seropositive dogs were distributed throughout the two districts, with no clusterization (Fig. 1). The dogs were also

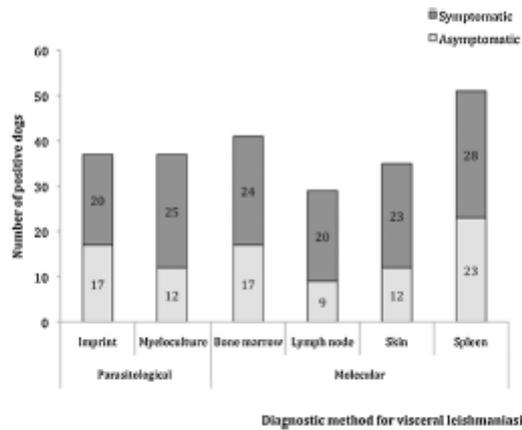


**Fig. 3.** Representative agarose gel of *Leishmania* nested PCR (LnPCR) products of phlebotomine sand fly (A) and seropositive dog (B) DNA, amplified with primers for the *Leishmania* genus, after ethidium bromide staining. Samples: M, 100 bp DNA ladder (the strongest band in the gel corresponds to 500 bp); phlebotomine sand fly DNA (1–6); canine DNA (7–14); PC, Positive control *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M002); NC, negative control (no DNA).

**Table 2**  
*Leishmania* parasites identified in *Lutzomyia* DNA after *Leishmania*-nested PCR (LnPCR) and nucleotide sequencing. Total DNA was extracted from non-engorged females from the third day of capture per month. The study was developed in two districts with recent transmission profile and no reported cases of human visceral leishmaniasis, in Belo Horizonte, state of Minas Gerais (Brazil). Study period: September 2010 and August 2012.

Species	Number of females		Number of test samples	<i>Leishmania</i> species in positive samples		
	Available	Per test sample		<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>Leishmania</i> sp.
cuticulate complex	10	1	10	1	0	1
<i>L. intermedia</i>	1	1	1	0	0	0
<i>L. boydi</i>	1	1	1	1	0	0
<i>L. longipalpis</i>	138	1–30	80	23	2	1
<i>L. whitmani</i>	2	2	1	0	0	0
Total	152	–	93	25	2	2

tested by one molecular-based (LnPCR) assay and two parasite-based (imprint and myeloculture) assays. A representative result of LnPCR is shown in Fig. 3B. The number of positive dogs and the positivity rates varied according to the canine tissue analyzed: 51 dogs (100%) for the spleen, 41 dogs (80%) for the bone marrow, 35 dogs (69%) for the skin, and 29 dogs (57%) for the mesenteric lymph node (Fig. 4). While the difference in positivity was significant when lymph node was compared to bone marrow ( $P=0.001$ ) and to skin ( $P=0.031$ ), this was not the case for bone marrow comparison to skin. The number of positive dogs by imprint or



**Fig. 4.** Frequency distribution of asymptomatic and symptomatic seropositive dogs for canine visceral leishmaniasis ( $n=51$ ), according to the diagnostic methods employed herein. The numbers inside the bars indicate the number of positive dogs per diagnostic method and clinical group. Molecular diagnosis was performed by *Leishmania* nested PCR (LnPCR) with DNA from the tissue samples specified as templates.

**Table 3**

Contingency table of the co-positivities (relative sensitivity) for diagnostic tests of canine visceral leishmaniasis. The reference was the ELISA-IFAT result, as adopted by the Surveillance and Control Program of visceral leishmaniasis of the Brazilian Ministry of Health, at the time of our study. The fifty-one sero-positive dogs (n=51) were sampled from two districts with recent transmission profile and no human cases of leishmaniasis in Belo Horizonte, in the Brazilian state of Minas Gerais.

Test		IFAT-ELISA			
		Negative		Positive	
		No.	%	No.	%
InPCR	Negative	–	–	0	0
	Positive	–	–	51	100
Imprint	Negative	–	–	14	27.5
	Positive	–	–	37	72.5
Myeloculture	Negative	–	–	14	27.5
	Positive	–	–	37	72.5

myeloculture was the same (37 dogs). The co-positivity of these parasite-based methods—72.5% in both cases—was significantly lower ( $P$ -value=0.0002), when compared to canine spleen InPCR (Table 3).

Among the 51 seropositive dogs in our sample, 28 were clinically symptomatic whereas 23 were asymptomatic. InPCR with canine spleen tissue, in particular, gave 100% of co-positivity with the ELISA/IFA, for both clinical conditions. The imprint results were not statistically different for the two clinical groups ( $P$ -value=1.000) (Table 4). Differently, the myeloculture displayed 89.3% of co-positivity for the symptomatic dogs compared to 52.2% in the asymptomatic ones. These percentages were significantly different with  $P$ -value=0.0045.

The presence of *Leishmania* assessed by either of the two parasite-based methods was confirmed in 72.5% of the seropositive dogs (Fig. 5). However, the identified dogs were not necessarily the same in both tests. A combined analysis of the results of the three additional tests showed that 28 dogs (54.9%) were positive in all three tests, 18 dogs (35%) were positive by InPCR and one of the parasite-based tests, and 9.8% were identified as positive by InPCR but with no confirmation of the presence of *Leishmania* parasites (Fig. 5).

The average number of positive tests in the symptomatic canine group was 2.607 with a standard deviation of 0.629. This value decreased to 2.261 ± 0.689 in the asymptomatic group (data not shown). The difference in the total of positive tests, according to the clinical canine group, was not statistically significant ( $P$ -value=0.066).

### 3.5. Infecting *Leishmania* in dogs

*L. infantum* was identified as the infecting parasite in the spleen tissue of all the seropositive dogs.

## 4. Discussion

Regarding the phlebotomine sand fly fauna, *L. longipalpis*—the main vector of American VL—was the predominant species (96.5%) in our study, thus confirming the high adaptation of this phlebotomine species to urban environments (Barata et al., 2004; Silva et al., 2007; Michalsky et al., 2009, 2011). *L. longipalpis* was more abundant (88.1%) in the peridomicile of the houses, as observed in other studies (Michalsky et al., 2009; Missawa and Dias, 2007; Barata et al., 2013, among others). The predominance of *L. longipalpis* males over females (M/F=9.0) was expressive (Michalsky et al., 2009; Ximenes et al., 1999; Souza et al., 2004).

Increased *L. longipalpis* population density was correlated to increased rainfall and temperature, consistently to previous reports (Michalsky et al., 2009; Souza et al., 2004; Dias et al., 2007; Oliveira et al., 2008). This effect may help in planning more effective chemical spraying actions to control *L. longipalpis*, which is one of the

main strategies employed to limit the VL spreading in Brazil (Silva et al., 2007).

The minimal rate of infection (18.8%) of *L. longipalpis* by *Leishmania* was surprisingly high compared to average values reported in the literature (Missawa et al., 2010). However, it is close to that reported before (19%) for an endemic district for VL in Belo Horizonte (Saraiva et al., 2010). Mostly (92.0%) of the infecting *Leishmania* was *L. infantum*, the etiological vector of VL. The high rate of natural infection by *L. infantum* associated to the expressive population density of *L. longipalpis* indicates very favorable vector conditions for the rapid spreading of VL. *L. infantum* was also found in the *coriellii* phlebotomine complex which was—together with *L. braziliensis* DNA—reported previously (Saraiva et al., 2009; Carvalho et al., 2008). In addition, we detected *L. infantum* DNA in *L. longipalpis*, which is a novel finding.

Recently, several reports have been published on the presence of genetic material of etiological agents of cutaneous leishmaniasis in visceral leishmaniasis vectors and vice versa. These findings might be explained by variations in permissivity of the sand fly species to *Leishmania* infection. *L. longipalpis*, which was found infected by *L. braziliensis* (present study, Paiva et al., 2010) has been considered a permissive species (reviewed by Kamhawi, 2006). Obviously, vector competence for leishmaniasis is a complex matter and cannot be ascertained solely on the presence of *Leishmania* DNA in a given phlebotomine species.

The high rate of natural *Leishmania* infection in *L. longipalpis* was not followed by equally expressive prevalence of canine visceral leishmaniasis (CVL). The prevalence of CVL varies widely in urban areas (Dantas-Torres et al., 2006; Almeida et al., 2009; Naveda et al., 2006, among others) and there is no minimum prevalence that could be used as a marker of human risk. In previous studies performed in endemic cities of Minas Gerais state, we observed CVL prevalences between 1% and 2% in certain districts, with average prevalence around 4.5% for the whole city (Michalsky et al., 2007; Dias et al., 2011). Districts with no human cases of the VL, showed canine prevalence of 28.3% (Michalsky et al., 2009), whereas prevalences about 1.5% were found, independently of the absence or presence human cases of VL (Barata et al., 2004). A variable that was previously shown to correlate with CVL prevalence is vector population density (França-Silva et al., 2005) and in Montes Claros (Monteiro et al., 2005). Those studies, however, were based on monthly population density and CVL prevalence. In conclusion, the transmission scenarios of VL in urban areas are complex, highly heterogeneous and involve a network of variables (Wernick, 2008).

In our study, we did not investigate any other possible zoonotic reservoir for VL. However, *Leishmania* infection up to 67.7% and around 25% were reported for rodents and marsupials, respectively, in Belo Horizonte (Technical notes on Veterinary and Zootecnia, 2012; Marcelino et al., 2011; Schallig et al., 2007). Although further studies will be needed to assess the role played by

**Table 4**

Contingency table of the co-positivity of diagnostic tests of canine leishmaniasis, according to clinical group. The reference was the ELISA-IFA result, as adopted by the Brazilian Ministry of Health at the time of our study (2010–2012). LnPCR with spleen tissue gave 100% co-positivity, in both cases, and was not included. The dogs (9–51) were sampled from two districts with recent transmission profile and no human cases of visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, in the Brazilian state of Minas Gerais.

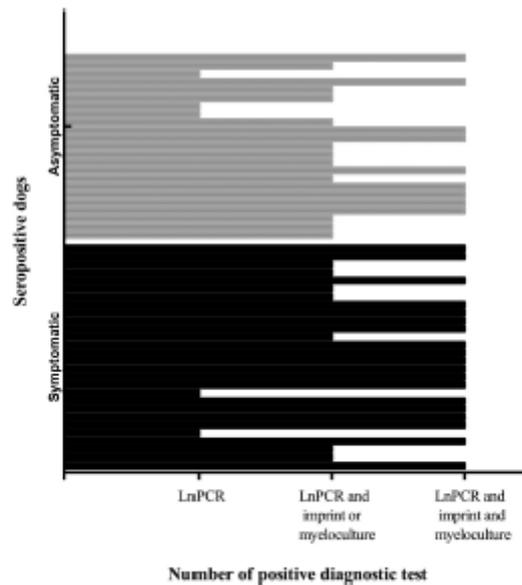
Test		Asymptomatic		Symptomatic		P-value
Imprint	Negative	6	26.1%	8	28.6%	1.000
	Positive	17	73.9%	20	71.4%	
Myeloculture	Negative	11	47.8%	3	10.7%	0.0045
	Positive	12	52.2%	25	89.3%	

other synanthropic reservoirs, they might be important to maintain the zoonotic cycle of VL in Belo Horizonte.

At the time of the present study, the screening and confirmatory tests adopted by the Brazilian Ministry of Health in the canine serological surveys for VL were ELISA and IFA, respectively (Brazilian Ministry of Health, 2006). Although none of the molecular approaches dependent on invasive tissue biopsy would be applicable to canine surveys, our findings confirm that 100% of the seropositive samples by ELISA/IFA carried *L. infantum* DNA. Of the 51 sero- and molecularly positive dogs, only 10% showed no parasitological confirmation by imprint or myeloculture analysis, which are considered the gold standard methods for VL diagnosis. However, 100% carried *Leishmania* DNA in their spleen. It is worth noting that spleen was the best tissue sample for PCR amplification, reaching 100% positivity, while the lowest positivity (57%) among the

four tissues tested was obtained for lymph nodes. Spleen was also shown to be a better choice than lymph node when tissue aspirates were used as samples (Barrouin-Melo et al., 2004). Currently, the Brazilian Ministry of Health replaced the ELISA/IFA set by the rK28-based immunochromatography (Dual Path Platform CVL, produced by the Biomanguinhos Institute at Fiocruz, RJ, Brazil) and ELISA, in an effort to increase the specificity and precision in the diagnosis of VL. In a recent comparison of diagnostic tests for VL, by our group, the immunochromatography reached up to 77.3% of co-positivity compared to ELISA-IFA. Although the canine sample was limited to 44 dogs, those data reinforced that more sensitive and specific tests need to be developed before the efficient diagnosis of canine VL can be performed (Regina-Silva et al., 2014).

Asymptomatic dogs represented 45% of our seropositive sample. *L. infantum* DNA was confirmed in all of them. Using parasite-based



**Fig. 5.** Frequency of positive molecular (LnPCR with spleen tissue) and parasitological (imprint and/or myeloculture) results in seropositive dogs (ELISA/IFA) for visceral leishmaniasis, according to the clinical condition. Our study was developed in two districts with no reported human cases of the disease in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Period of study: September 2010 to August 2012.

methods, 52.2% were confirmed positive by myeloculture and 73.5% by imprint. Although previous molecular studies in endemic areas of VL have confirmed that the prevalence of infection is much higher than the number of dogs that actually develop the symptomatic form of the disease [Sofano-Gallego et al., 2001; Alvar et al., 2004], those expressive positivity rates indicate the epidemiological importance of asymptomatic dogs in the transmission cycle of VL. Using xenodiagnoses, an infectivity rate of 33% was reported before for asymptomatic dogs [Michalsky et al., 2007]. Hence, the presence of *Leishmania* in various tissues of this clinical group, particularly in the exposed skin, suggests that the animals may be acting as VL reservoirs [Michalsky et al., 2007; Madeira et al., 2004].

Although our data do not support any prediction of the local VL transmission strength, the districts under study display favorable conditions for the rapid spreading of *Leishmania* infection, in terms of *L. longipalpis* population density, and presence of *L. tjijunham* in both vector and main reservoir. The reason why no human cases have been reported, so far, is unknown. The districts studied share the same human occupation and environmental characteristics of any other urban area in Belo Horizonte. The occurrence of human asymptomatic infection, in the studied area, is a possibility. Moreno et al. (2005) reported no human cases of VL in area with 5–10% of canine VL prevalence, except for eight bad-nourished children that did not develop the disease. Asymptomatic cases with no evolution to acute phase were also observed in the Northeast of Brazil [Jerônimo et al., 2000; Caldas et al., 2002; Gama et al., 2004].

In conclusion, both population density and natural *Leishmania* infection of vectors as well as CVL prevalence are favorable to outbreaks of human VL, in the districts under study. Even with the actual absence of human cases, control actions are urgently needed to avoid it. As recently pointed out by other authors, more than 30 years after the beginning of the process of visceral leishmaniasis' urbanization, transmission scenarios of VL are still poorly understood and further studies will be needed until we comprehend all the determining variables involved in the transmission of VL [Belo et al., 2013].

#### Conflict of interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

FOLS—phlebotomine experiments, including identification, molecular biology assays, data preparation an article writing; EMM—canine infection experiments, including necropsies, imprints, molecular biology assays, data analysis, article writing; CLFD—sequence alignments, data analysis, article writing and critical review; VOPF—project planning and supervision; JEMP—databank and experimental data analysis; SRS—canine necropsies and tissue biopsies; DMA—parasitological diagnosis; MAS—data collection and organization of entomological and canine databank; ACVMRL—myelocultures; AJAC—entomological captures, specimens preparation and figure preparation; CILMC—data interpretation and statistical analysis; ESD—project planning and supervision, general data analysis, article review. All the authors approved the submitted version of the article.

#### Acknowledgements

We wish to express our gratitude to Dr. França-Silva for collaborating in canine necropsies. We acknowledge the financial support of the Brazilian funding agency Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG, grant PPSUS 09/2009).

#### References

- Almeida, A.R.P.F., Faria, R.F., Pimentel, M.F.A., Dabrog, M.A.A., Turbino, N.C.M.R., Souza, V.R.F., 2006. Seroprevalence of canine leishmaniasis in endemic areas of Curitiba, State of Mato Grosso. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42, 156–158.
- Alvar, J., Cafarave, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57, 1–88.
- Barata, R.A., França-Silva, J.C., Costa, R.T., Fortes-Dias, C.L., Silva, J.C., de Paula, E.V., Prata, A., Monteiro, E.M., Dias, E.S., 2004. Phlebotomine sandflies in Portofelicia, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 401–407.
- Barata, R.A., Pinheiro, J.C., Tanabe, A., Gomes, M.E., Apolinário, E.C., Baduram, E.C., Araújo, H.S., Dias, E.S., Pinheiro, A.C., 2013. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a re-emerging focus of intense transmission in Minas Gerais state, Brazil. *Biomol. Res. Int.*, 2013.
- Barros-Melo, S.M., Larangeira, D.F., Trigo, J., Aguiar, F.R.P., dos-Santos, W.L., Nosten-de-Carvalho, L., 2004. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 195–197.
- Belo, V.S., Wierneck, G.L., Barbosa, D.S., Sandoz, T.C., Nascimento, R.W.L., da Silva, E.S., Strachiner, C.J., 2013. Factors associated with visceral leishmaniasis in the Americas: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2182.
- Brazilian Ministry of Health, 2006. Manual of Surveillance and Control of Visceral Leishmaniasis, first edition. Ministry of Health, Brasília, Brazil.
- Brazilian Ministry of Health, 2009. Guide of Epidemiological Surveillance, seventh edition. Ministry of Health, Brasília, Brazil.
- Cabrera, M.A.A., Paula, A.A., Casarcho, L.A.B., Marrocho, M.C.A., Xavier, S.C., da Silva, A.V.M., James, A.M., 2001. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio-de-Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 43, 79–83.
- Caldan, A.J.M., Costa, J.M.L., Silva, A.A.M., Vishan, V., Barata, A., 2002. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 21–28.
- Canargo, M.E., Reboredo, C., 1999. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18, 500–505.
- Carvalho, G.M., Andrade-Filho, J.D., Falcão, A.L., Rocha-Lima, A.C., Gonçalo, C.M., 2008. Naturally infected *Latrodectus* sand flies in a *Leishmania* endemic area of Brazil. *Vect. Borne Zoonotic Dis.* 8, 407–414.
- Coaracy, O., Quinzell, R.J., Garoto, L.M., Shaw, J.J., Dye, C., 2002. Infectionless in a cohort of Brazilian dogs: why cooling tails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J. Infect. Dis.* 185, 1214–1220.
- Cruz, I., Cafarave, C., Baldo, J.M., Morales, M.A., Chicarro, C., Laguna, F., Jiménez-Mejías, M., Sierra, G., Videla, S., Alvar, J., 2002. A nested polymerase chain reaction (n-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 185–188.
- Cruz, I., Chicarro, C., Nieto, J., Baldo, B., Cafarave, C., Riquelme, M.C., Alvar, J., 2006. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2243–2247.
- Dantas-Torres, F., Brito, M.F.F., Brandão-Filho, S.P., 2006. Seroprevalence survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet. Parasitol.* 140, 54–60.
- Dantas, L.M., 1956. *Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará (Visceral leishmaniasis in Brazil: studies on reservoirs and transmitters conducted in the state of Ceará)*. Serviço Nacional de Educação Sanitária.
- Dantas, L.M., Deane, M.P., 1955. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*ycalopes setulus*) como reservatório de *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará (Preliminary observations on the comparative importance of man, dog and fox (*ycalopes setulus*) as reservoirs of *Leishmania donovani* in an endemic area of leishmaniasis in Ceará). *O Hospital* 48, 61–76.
- Dias, E.S., França-Silva, J.C., da Silva, J.C., Monteiro, E.M., de Paula, R.M., Gonçalves, C.M., Barata, R.A., 2007. Sandflies (Diptera: Phlebotomidae) in an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40, 40–52.
- Dias, E.S., Regina-Silva, S., França-Silva, J.C., Pat, G.F., Michalsky, E.M., Araújo, S.C., Valadão, J.L., Laro-Silva, F.O.L., Oliveira, F.S., Pacheco, R.S., Fortes-Dias, C.L., 2011. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.* 176, 101–111.
- Dye, C., 1996. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 125–130.
- França-Silva, J.C., Barata, R.A., da Costa, R.T., Monteiro, E.M., Machado-Coelho, G.L., Vieira, E.P., Prata, A., Mayrink, W., Nascimento, E., Fortes-Dias, C.L., Silva, J.C., Dias, E.S., 2005. Importance of *Latrodectus longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Portofelicia Municipality, Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.* 131, 213–220.
- Gama, M.E.A., Costa, J.M.L., Gomes, C.M.C., Corbett, C.E.P., 2004. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 886–893.
- Gueria, J.A.D., Barros, M.L.H., de N.F., Guerra, M.V.F., Castellan, E., Fiam, M.G., Sherrlock, L.A., 2004. Visceral leishmaniasis among Indians of the State of Tocantins, Brazil: clinical and epidemiologic aspects of the cases observed from 1986 to 1993. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37, 305–311.

- Jacobsen, S.M., Teixeira, M.J., de Queiroz-Souza, A., Thielking, P., Pearson, R.D., Evans, T.G., 2000. Natural history of Leishmania (Leishmania) chagasi infection in North-eastern Brazil: long-term follow-up. *Clin. Infect. Dis.* 30, 608–609.
- Kardoskiewicz, S., 2006. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 23, 430–440.
- Lainson, R., 1980. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In: Michal, W.S. (Ed.), *Demography and Vector-Borne Diseases*. CRC Press, Florida, p. 85.
- Lima, R.M.M.A., Oliveira, S.G., Souza, N.A., de Queiroz, R.G., Justiziano, S.C.B., Ward, R.D., Kyriacou, C.P., Pivoto, A.A., 2002. Molecular evolution of the cacophony T559 region in sandflies. *Insect Mol. Biol.* 11, 117–122.
- Madeira, M.F., Schuchack, A.D., Schuchack, T.M.P., Lutz, C.A., Marzochi, M.C.A., 2004. Identification of Leishmania (Leishmania) chagasi isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs susceptible for leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 8, 440–444.
- Mancianti, P., Grazziana, M., Gradoni, L., Pileri, S., 1988. Studies on canine leishmaniasis. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 566–567.
- Marcosini, A.P., Ferreira, E.C., Azevedo, J.S., Costa, C.F., Chiarelli, D., Almeida, G., Moreira, E.C., Leite, R.C., Reis, J.A.P., Gontijo, C.M., 2011. Molecular detection of Leishmania braziliensis in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Acta Parasitol.* 103, 54–58.
- Marzochi, M.C.A., Guedes, S.G., de Souza, W.J.S., de Toledo, L.M., Cotrim, P., G. Moraes, H., Pacheco, R.S., Sobrosa, F.C., de Souza, M.A., Rangel, J., F.B., Trancoso, N.C., 1985. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical, parasitological, therapeutic and epidemiological findings (1977–1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 80, 349–357.
- Michaluk, E.M., Rocha, M.F., da Rocha Lima, A.C.V.M., França-Silva, J.C., Pires, M.O., Oliveira, F.S., Pacheco, R.S., Santos, S.L., Barata, R.A., Romarinho, A.J., Fortes-Dias, C.L., Dias, E.S., 2007. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet. Parasitol.* 147, 67–76.
- Michaluk, E.M., França-Silva, J.C., Barata, R.A., Lara-Silva, F.O., Loureiro, A.M.F., Fortes-Dias, C.L., Dias, E.S., 2008. Phlebotomine distribution in Jaraguá, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 56–61.
- Michaluk, E.M., Guedes, K.S., Lara-Silva, F.O., França-Silva, J.C., Dias, C.L., Barata, R.A., Dias, E.S., 2011. Natural infection with *Leishmania infantum* chagasi in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sand flies captured in the municipality of Jaraguá, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44, 58–62.
- Minawa, N.A., Dias, E.S., 2007. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Vitória Grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 403–408.
- Minawa, N.A., Michaluk, E.M., Fortes-Dias, C.L., Santos, D., 2010. *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania [L.] chagasi* in Vitória Grande, Mato Grosso State, Brazil, an area of intense transmission of visceral leishmaniasis. *Cad. Saude Publica* 26, 2414–2419.
- Moreira, E.M., Silva, J.C.F.D., Costa, R.T.J., Costa, D.C., Barata, R.A., Paula, E.V.D., Machado-Coelho, G.L.L., Rocha, M.F., Fortes-Dias, C.L., Dias, E.S., 2005. Visceral leishmaniasis: study on phlebotomine and canine infection in Montes Claros, Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38, 147–152.
- Moreno, E.C., Melo, M.N., Lambertucci, J.R., Serrão, J.C., Andrade, A.S., Antunes, C.M.F., Gensari, D., Carneiro, M., 2006. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39, 421–427.
- Naveia, L.A.B., Moreira, E.C., Machado, J.C., Moraes, J.R.C., Marcosini, A.P., 2006. Epidemiologic aspects of canine visceral leishmaniasis in Pedro Leopoldo district, Minas Gerais, 2003. *Ang. Bras. Med. Vet. Zootech.* 58, 988–993.
- Oliveira, A.G., Galati, E.A., Fernandes, C.C., Dorsal, M.E., Brazil, R.P., 2008. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in endemic area of visceral leishmaniasis, Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Trop.* 109, 65–65.
- Pan American Health Organization, 2013. Report Leishmaniasis No 1-2013, April. [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=270&Itemid=270&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=270&Itemid=270&lang=en) [accessed on 04.12.13].
- Paiva, B.R., Secundino, M.F.C., Nascimento, J.C., Pereira, P.F.P., Galati, E.A.B., Junior, H.F., Malafreite, R.S., 2006. Detection and identification of leishmaniasis species in blood-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop.* 98, 297–298.
- Paiva, B.R., Oliveira, A.G., Dorsal, M.E., Galati, E.A., Malafreite, R.S., 2010. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Acta Trop.* 115, 126–130.
- Pagotto, H., Barata, R.A., França-Silva, J.C., Silva, J.C., Dias, E.S., 2006. IIP: an improved model of suction light trap for the capture of small insects. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39, 70–72.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., 2000. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 120, 1015–1024.
- Rangel, E.F., Maucilio, L.V., 2008. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad. Saude Publica* 24, 2046–2052.
- Ribeiro-Silva, S., Fortes-Dias, C.L., Michaluk, E.M., França-Silva, J.C., Queiroz, P.F., da Rocha Lima, A.C., Teixeira-Neto, R.G., Dias, E.S., 2014. Evaluation of parasitological examination, kDNA polymerase chain reaction and rK39-based immunochromatography for the diagnosis of visceral leishmaniasis in seropositive dogs from the screening-culling program in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47, 462–468.
- Ribeiro, V.M., da Silva, S.M., Meza, I., Tabares, P., dos Santos Nogueira, F., Wertheimer, M., Fonseca, A.L.S., Dias-Torres, F., 2013. Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brazilian Parasit. *Vectors* 6, 8.
- Saravia, L., Carralho, C.M., Gontijo, C.M., Queiroz, P.F., Lima, A.C., Falcão, A.L., Andrade-Filho, J.D., 2006. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum* chagasi in Brazil. *J. Med. Entomol.* 43, 1159–1163.
- Saravia, L., Andrade-Filho, J.D., Silva, S.O., Andrade, A.S., 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. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 1029–1030.
- Schädlig, H.D., da Silva, R.S., van der Meide, W.F., Schoone, G.J., Gontijo, C.M., 2007. *Diptera* municipalities (common exposure): a potential new vector host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Veter. Res. Zoonotic Dis.* 7, 387–393.
- Silva, J.C.D., Wernick, G.L., Cruz, M.S.P., Costa, C.R.N., Mendonça, I.L., 2007. Natural infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* sp. in Teresina, Piauí State, Brazil. *Cad. Saude Publica* 23, 1715–1720.
- Solano-Calleja, L., Morelli, F., Arbois, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2005. Prevalence of *Leishmania infantum* infections in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.* 39, 560–563.
- Souza, C.M., Pimental, J.T., Barata, R.A., Moreira, 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. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 785–803.
- Technical notes on Veterinary and Zootechnics, 2012. Teaching and Research Foundation in Veterinary Medicine and Zootechnics, FIP MDV Publishing house.
- United Nations Development Programme, Brazil. <http://www.pnud.org.br/> [accessed 11.12.13].
- van Eyn, G.J.M., Schoone, G.J., Kroon, N.C.M., DeJong, S.B., 1980. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Med. Insect. Parasitol.* 51, 123–142.
- Volter, A., Bidwell, D.E., Bartlett, A., 1978. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): A guide with abstracts of microplate applications. Gurney, Great Britain.
- Wernick, G.L., 2008. Foratic geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. *Cad. Saude Publica* 24, 2037–2040.
- Wernick, G.L., 2010. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad. Saude Publica* 26, 644–645.
- World Health Organization, 2014. <http://www.who.int/leishmaniasis/epidemiology/epidemiology/index.html> [accessed 28.01.14].
- Ximenes, M.F.F.M., Souza, M.F., Castellón, E.G., 1989. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 427–432.
- 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). *Mem. Ann. Entomol. Inst.* 54, 1–881.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler S & Theodor O. Investigations on Mediterranean Kala Azar. II.--*Leishmania infantum*. Proc R Soc Lond. B, Containing Papers of a Biological Character. 1931;108 (759):453-463.

Aguiar GMD & Soucasaux T. Ecological aspects of Phlebotomus of the Parque Nacional da Serra dos Orgaos, Rio de Janeiro. I-Monthly frequency in human baits (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984; 79(2):197-209.

Aguiar GM, Schuback PA, Vilela ML, Azevedo ACR. Aspectos da Ecologia dos Flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. II- Distribuição vertical (Dipetra, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz.1985;80:187-194.

Aguiar CM, Rangel EF, Garcia L, Fernandez E, Momen H, Grimaldi Filho G, et al. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989; 84(1): 19–28.

Alencar JE & Coelho Neto B. Leishmaniose canina no Ceará. XXII Congr Bras Hyg. 1956.

Alencar JE. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1961;3:175-180.

Alexander B, Ferro C, Young DG, Morales A, Tesh RB. Ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a focus os *Leishmania (Viannia) braziliensis* in northeastern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992;87(3):387-395.

Alexander B & Usma MC. Potential source of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. Ann Trop Med Parasitol. 1994;88(5):543-549.

Alexander B, Maroli M. Control of phlebotomine sandflies. Med Vet Entomol. 2003;17(1):1–18.

Almeida MAO, Jesus EEV, Souza-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet parasitol.* 2005;127(3):227-232.

Almeida ADBPF, Faria RP, Pimentel MFA, Dahroug MAA, Turbino NCMR, Souza VRF. Seroepidemiological survey of canine leishmaniasis in endemic areas of Cuiabá, State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42(2):156–159.

Almeida ABPF, Sousa VRF, Gasparetto ND, Da Silva GFR, Figueiredo FB, Dutra V, et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;76(3):321–4.

Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004;57(04):1–88.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012;7(5).

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

Ashford R. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol.* 1996;14:523–32.

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

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 2000;30(12-13):1269–81.

Azevedo ACR, Luz SLB, Vilela ML, Rangel EF. Studies on the sandfly fauna of Samuel ecological station, Porto Velho Municipality, Rondônia state, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1993;88(4): 509-512.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 2008;24(7):324-330.

Barata RA, Silva JCF da, Costa RT da, Fortes-Dias CL, Silva JC da, Paula EV de, et al. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(5):481–7.

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

Barata RA, Michalsky EM, Fujiwara RT, França-Silva JC, Rocha MF, Dias ES. Assessment of sand fly (Diptera, Psychodidae) control using cypermethrin in an endemic area for visceral leishmaniasis, Montes Claros, Minas Gerais State, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2011a;27(11):2117–23.

Barata RA, Silva JCF da, Silva JC da, Almeida SN De, Teixeira LDAS, Dias ES. Control of visceral leishmaniasis in the town of Porteirinha, state of Minas Gerais, Brazil, from 1998 to 2003. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011b;44(3):386–8.

Barata RA, Peixoto JC, Tanure A, Gomes ME, Apolinário EC, Bodevan EC, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. *Biomed Res Int.* 2013;2013.

Barbosa AF, Oliveira SMP, Bertho AL, Franco AMR, Rangel EF. Single and concomitant experimental infections by *Endotrypanum* spp. and *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(8):851- 856.

Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, Trigo J, Aguiar PHP, Dos-Santos WLC, Pontes-De-Carvalho L. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(2):195–7.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 2007;37(10):1097–106.

Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simões TC, Nascimento BWL, da 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), e2182.

Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte; Urbanization of visceral leishmaniose in Belo Horizonte, Brazil. *Arq Bras Med Vet. Zootec.* 2001; 53(1):1-8.

Biagi F, de Biagi AM & Beltrán HF. Actividad horaria de *Phlebotomus antropofílicos* en la península de Yucatan. *Rev Inv Salud Publica.* 1966,26:73- 77.

Bisugo MC, Araújo MFL, Taniguchi HH, Acunha E, Santos AA, Junior MS, et al. Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização de teste rápido com antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas do estado de São Paulo. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2007;66(2):185-193.

Boarino A, Scalone A, Gradoni L, Ferroglio E, Vitale F, Zanatta R, et al. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(5):647–53.

Boletim da Vigilância em Saúde. Avaliação do controle de leishmaniose visceral em Belo Horizonte. 2013.

Boreham PF. Some applications of bloodmeal identifications in relation to the epidemiology of vector-borne tropical diseases. *J Trop Med Hyg.* 1975;78(4):83-91.

Borges BKA. Fatores de risco para Leishmaniose Visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

Borges BKA, Silva JA, Haddad JPA, Moreira EC, Magalhães DF de, Ribeiro LML, et al. Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2008;24(4):777–84.

Borges BKA, Silva JA, Haddad JPA, Moreira EC, Magalhães DF, Ribeiro LML, et al. Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2009;61(5):1035–43.

Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, et al. 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(3):291-296.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ed.MS, 2006. 120 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. atualizada. Brasília: Ed.MS, 2007.180 p.

Brasil. Guia de Vigilância Epidemiológica/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde. 2009. 816p.

Brasil. Leishmaniose Visceral – Situação epidemiológica. In: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2010a.

Brasil. Nota técnica conjunta da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul sobre a situação da Leishmaniose Visceral na fronteira do Estado do Rio Grande do Sul com a Argentina. In CGDDT Departamento de Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2010b.

Brasil. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade/ Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília- Ministério da Saúde. 2011. 78p.

Brazil RP, de Almeida DC, Brazil BG, Mamede SM. Chicken house as a resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitologia*. 1991;33:113.

Brazil RP & Brazil BG. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: Rangel EF & Lainson R, editores. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz; 2003. p. 257-274.

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia da UFMG. Nº65. ISSN 1676-6024. 2012.

Caldas ADJM, Costa JML, Silva AAMD, Vinhas V, Barral A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96(1):21–28.

Camargo-Neves VLF De, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spínola RMF, et al. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana - Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. *Cad Saude Publica*. 2001;17(5):1263–7.

Camargo-Neves VLF, de Castro Gomes A. Controle da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;35:90-96.

Camargo-Neves VLF. Aspectos epidemiológicos e avaliação das medidas de controle da leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo, Brasil [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública, 2004.

Camargo-Neves V, Glasser CM, Cruz LL, de Almeida RG. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do Estado de São Paulo. 2006; Disponível em: [ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/zoo/lva06\\_manual.pdf](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/zoo/lva06_manual.pdf)

Camargo-Neves V. A leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo: situação atual. *Boletim Epidemiológico Paulista*. 2007;4(48):12–4.

Campbell-Lendrum DH, Dujardin JP, Martinez E, Feliciangeli MD, Perez JE, Silans LNMPD, et al. Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(2):159–162.

Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcao AL, Rocha Lima ACVM, Gontijo CMF. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008;8(3):407–14.

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

Castro EA, Thomaz-Soccol V, Augur C, Luz E. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the state of Paraná (Brazil). *Exp Parasitol*. 2007;117(1):13–21.

Chagas E, Cunha AMCFL, Ferreira LC, Deane L, Deane G, Guimarães FN, et al. Leishmaniose visceral americana (Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão Encarregada do Estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1938;33(1):89- 229.

Chaniotis BN, Neely JM, Correa MA, Tesh RB, Johnson KM. Natural population dynamics of phlebotomine sandflies in Panama. *J Med Entomol*. 1971; 8(4):339- 352.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(11):873–82.

Choi CM, Lerner E a. Leishmaniasis as an emerging infection. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2001;6(3):175–82.

Christensen HA, Arias JR, Vasquez AM, Freitas RA. Hosts of sandfly vectors of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Central Amazon of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1982;31:239-242.

Cortes S, Vaz Y, Neves R, Maia C, Cardoso L, Campino L. Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Vet Parasitol.* 2012;189(2):189-196.

Cosenza GW. Leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Boletim epidemiológico.* 1995;4:4-6.

Costa CHN, Pereira HF, Araújo MV. Epidemia de Leishmaniose Visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Rev Saude Publica.* 1990; 24(5):361- 372.

Costa CHN, Vieira JBF. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001;34(2): 223-228.

Costa CHN et al. Kala-azar is a slow-motion systemic inflammatory response syndrome: lessons from death. 13th International Congress of Immunology. Aug. 21-25, Rio de Janeiro, Brazil. 2007a.

Costa CHN, Tapety CMM, Werneck GL. Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007b;40(4):415–9.

Costa CHN. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad saude publica.* 2008;24(12):2959–63.

Coura-Vital W, Marques MJ, Veloso VM, Roatt BM, de Oliveira Aguiar-Soares RD, Reis LES, et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(8).

Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis.* 2002;186(9):1314–20.

Courtenay O, Gillingwater K, Gomes P a F, Garcez LM, Davies CR. Deltamethrin-impregnated bednets reduce human landing rates of sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* in Amazon households. *Med Vet Entomol.* 2007;21(2):168–76.

Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A., Fujiwara RT, Botelho JR, Maria MD. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2005; 128:149–155.

Coutinho MTZ, Linardi PM. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet Parasitol.* 2007;147(3): 320–325.

Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales M a, Chicharro C, Laguna F, et al. A nested polymerase chain reaction (*Ln*-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96 Suppl 1:S185–9.

Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Cañavate C, Figueras MC, et al. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric mediterranean visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2006;44(7):2343–7.

Cunningham DD. On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue of a specimen of Delhi Boil. *Sci Mere reed Offrs Army India.* 1885;1:21-31.

Da Costa RT, França JC, Mayrink W, Nascimento E, Genaro O, Campos-Neto A. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens k39 and k26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97(6):678-682.

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

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(4):352–6.

Dantas-Torres F, Simões-Matos L, Brito FDC, Figueiredo LA, Faustino MDG. Leishmaniose felina: revisão de literatura. *Rev Clín Vet.* 2006a;61: 32-40.

Dantas-Torres F, de Brito, MEF, Brandão-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet Parasitol.* 2006b;140(1),54–60.

Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol.* 2007;149(3-4):139–46.

De Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini ÂC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol.* 2006;140(3-4):231–8.

De Araújo VEM, Pinheiro LC, Almeida MCDM, de Menezes FC, Morais MHF, Reis IA, et al. Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(11):e2540.

De Lima VMF, Fattori KR, de Fátima Michelin A, da Silva Neto L, Vasconcelos RDO. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet parasitol.* 2010;173(3):330-333.

Deane LM, Deane MP, Alencar JE. Observações sobre o combate ao *Phlebotomus longipalpis* pela desinsetização domiciliária, em focos endêmicos de calazar no Ceará. *Rev Bras Malar Doen Trop.* 1955;7:131-141.

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

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

Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores no Estado do Ceará. Serviço Nacional de Educação Sanitária. 1956.

Deane LM, Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographic distribution and transmission. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1962;4(1):198–212.

Desjeux P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27(5):305–18.

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

Dias ES, Regina-Silva S, França-Silva JC, Paz GF, Michalsky ÉM, Araújo SC, et al. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol.* 2011;176(2-3):101–11.

Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis.* 1997;25(5):1240-1242.

Disch J, Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Rapid clearance of circulating *Leishmania* kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis. *Acta Trop.* 2004;92(3):279–83.

Donovan C. The etiology of the heterogeneous fevers in India. *Br Med J.* 1903; ii: 1401.

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

Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;55(2): 125-130.

Evans TG, Vasconcelos AB, Vasconcelos AW. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 42:118-23.

Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos IDAB, Vasconcelos AW, de Queiroz Souza A, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Infect Dis.* 1992;166(5):1124-1132.

Falcão AL, Falcão AR, Pinto CT, Gontijo CMF, Falqueto A. Effect of deltamethrin spraying on the sandfly populations in a focus of American cutaneous leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1991;86(4): 399-404.

Feliciangeli MD, Mazzarri MB, Blas SS, Zerpa O. Control trial of *Lutzomyia longipalpis* s.l. in the Island of Margarita, Venezuela. Trop Med Int Heal. 2003;8(12):1131-6.

Feliciangeli MD. Natural breeding places of Phlebotomine sandflies. Med Vet Entomol. 2004;18(1): 71-80.

Ferreira ED. Estudo dos hospedeiros de *Leishmania* em área de ocorrência das leishmanioses no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil [tese]. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou, 2010.

Ferrer L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: International Canine Leishmaniasis Forum. 1999;1:6-10.

Fiuzza VOP, Brandão ST, Pessanha JEM, Menezes FC, Costa IO, Mesquita DR, et al. Perspectives for the production of strategic inputs for monitoring and controlling leishmaniasis. The situation and the needs of large urban centers in Brazil: the case of Belo Horizonte. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41:82-88.

Fiuzza VOP, Brandão ST, Pessanha JEM, Menezes FC, Bessa AMS, Morais MHF, et al. A experiência do município de Belo Horizonte, Minas Gerais, no planejamento e execução das atividades de diagnóstico sorológico canino e de controle químico do vetor do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral Canina, no período de 1994 a 2009. [Relatório Interno]; 2010.

Forattini OP. Nota sobre criadouros naturais de flebotomos em dependências peridomiciliares, no Estado de São Paulo. Arq Faculdade Hig Saúde Pública. 1953;7(2):157-168.

Forattini OP. Sobre os reservatórios naturais da Leishmaniose Tegumentar Americana. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1960;2(4): 195-203.

Forattini OP. Entomologia Médica. São Paulo: Ed. Blücher, 1973.658p.

Forattini OP. Observações feitas sobre a transmissão da Leishmaniose Tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde Pública. 1976;10(1):31-43.

França-Silva JC. Estudo retrospectivo da prevalência e da incidência da Leishmaniose Visceral Canina na cidade de Porteirinha, Minas Gerais, Brasil [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

Franca-Silva JC, da Costa RT, Siqueira a M, Machado-Coelho GL, da Costa C a, Mayrink W, et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. Vet Parasitol. 2003;111(2-3):161–73.

França-Silva JC, Barata RA, Da Costa RT, Monteiro ÉM, Machado-Coelho GLL, Vieira EP, et al. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. Vet Parasitol. 2005;131(3-4):213–20.

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. Leishmaniose Visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. Bol eletrônico Epidemiol. 2002;8(6):1–11.

Galati EA, Nunes VLB, Dorval MEC, Oshiro ET, Cristaldo G, Espíndola MA, et al. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Saude Publica. 1996;30(2):115-128.

Galati, EAB, Nunes VLB, Rego Jr FA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Saude Publica. 1997;31(4):378-90.

Galati, EAB. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF, Lainson R, editores. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz; 2003. p. 23-51.

Gama MEA, Costa JML, Gomes CMC, Corbett CEP. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(8):889–893.

Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. J Clin Microbiol. 2004;42: 2294–2297.

Gavgani ASM, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: A matched-cluster randomised trial. Lancet. 2002;360(9330):374–9.

Genaro O, Costa AC, Williams P, Silva JE, Rocha NM, Lima SL, et al. Ocorrência de Calazar em área urbana da Grande Belo Horizonte. Rev Soc Bras Med Trop. 1990; 23(2):121.

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

Gomes ADC, Rabello EX, Santos JL, Galati EA. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 1. Estudo experimental da frequência de flebotomíneos em ecótopos artificiais, com referência especial a *P. intermedius*. Rev Saúde Pública. 1980;14:540-56.

Gomes ADC, Rabello EX, Santos JLF, Galati EAB. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana: 3. Observações naturais sobre o ritmo diário de *Psychodopygus intermedius* em ambiente florestal e extraflorestal. Rev Saude Publica. 1983;17(1):23-30.

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

Gomes AC, Barata JMS, Silva EOR & Galati, EAB. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 6- Fauna flebotomínica antropófila de matas residuais situadas na região centro-nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1989;31:32-39.

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

Gontijo CMF, da Silva ES, de Fuccio MB, de Souza MCA, Pacheco RS, Dias ES, et al. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop.* 2002;81(2):143-150.

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

Gontijo CMF & Melo ML. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev bras epidemiol.* 2004;7(3):338-49.

Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol.* 2003;33(10):1027-1034.

Gradoni L. Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. *Vet Parasitol.* 2015;208(1):94–100.

Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol.* 2005;35(11-12):1169–80.

Grimaldi Jr G, John RD, Diane MP. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;36(2):270-287

Grimaldi G, Tesh RB, MacMahon-Pratt D. A review of geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;41(6):687-725.

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

Guimarães VCFV, Costa PL, Silva FJ Da, Silva KT Da, Silva KG Da, Araújo AIF De, et al. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Férrer, a sympatric area to

cutaneous and visceral leishmaniasis in the state of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45(1):66–70.

Ho M, Leeuwenburg J, Mbugua G, Wamachi A, Voller A. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1983; 32:943-946

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

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT). III. Região Metropolitana de Belo Horizonte. 2010. Disponível em: [http://www.observatoriodasmetrosoles.ufrj.br/como\\_anda/como\\_anda\\_RM\\_belo Horizonte.pdf](http://www.observatoriodasmetrosoles.ufrj.br/como_anda/como_anda_RM_belo Horizonte.pdf)

Jain K, Jain NK. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. *J Immunol Methods.* 2015.

Jeronimo SM, Teixeira MJ, de Queiroz Sousa A, Thielking P, Pearson RD, Evans TG. Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in North-eastern Brazil: long-term follow-up. *Clin Infect Dis.* 2000;30(3):608–609.

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereube J, Puch MP, Cadiergues C. Protection of dogs from bites of phlebotomines sandflies by deltamethrin collars for control of canine. *Med Vet Entomol.* 1997;11(2):105-11.

Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C, et al. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2001;98:247-61.

Kroeger A, Avila EV, Morison L. Insecticide impregnated curtains to control domestic transmission of cutaneous leishmaniasis in Venezuela: cluster randomised trial. *BMJ.* 2002;325(7368):810–3.

Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, Dedet JP, et al. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitol.* 2002;125(03):197-207.

Lainson R & Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden WAR & Evans, editores. *Biology of the Kinetoplastida*. London: Academic Press. 1979; p. 1-116.

Lainson R, Ready PD, Shaw JJ. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian “uta”, as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Proc Royal Soc of London Series B: Biological Sciences*. 1979; 206(1164):307-318.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR, Ryan L, Pova MM, et al. *Leishmania* and leishmaniasis. Instituto Evandro Chagas: 50 Anos de Contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical. 1986;1:83-124.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographic distribution. W Peters, R Killick-Kendrick editors, *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Academic Press, London. 1987; p. 1-120.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Trans R Soc Trop Med. Hyg.* 1987;81(3):517.

Lainson R, Shaw JJ. New World leishmaniasis the neotropical *Leishmania* species. L Collier, A Balows, M Sussman editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology*. Arnold, London. 1998; p. 241-266.

Lainson R & Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* e a ecoepidemiologia da leishmaniose visceral americana (LVA) no Brasil. In: Rangel EF & Lainson R, editores. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz. 2003; p. 311–336.

Lainson R, & Shaw JJ. New world leishmaniasis. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*;2005.

Lainson R, Rangel Elizabeth FR. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100(8):811-827.

Lainson R. Especies neotropicales de *Leishmania*: una breve revisión histórica sobre su descubrimiento, ecología y taxonomía. Revista Pan-Amaz Saude. 2010;1(2):13-38.

Laurenti MD. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. Boletim Epidemiológico Paulista. 2009;6(67):13–23.

Leishman WB. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. Br Med J. 1903;1(2213):1252-4.

Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MAB, Reis AB, Giunchetti RC, Raychaudhuri S, et al. Canine visceral leishmaniasis: Performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect™) in dogs with and without signs of the disease. Acta Trop. 2008;107(2):205–7.

Leon W, Fouts DL, Manning J. Sequence arrangement of the 16S and 26S rRNA genes in pathogenic haemoflagellate *Leishmania donovani*. Nucleic Acids Res. 1978;5(2):491 504.

Lins RMMA, Oliveira SG, Souza NA, de Queiroz RG, Justiniano SCB, Ward RD, et al. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. Insect Mol Biol. 2002;11(2):117-122.

Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira a GP, Silva ED, Abath FGC, et al. Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. Vet Parasitol. 2006;137(1-2):11–6.

Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Migliazzo A, Capri A, Solano-Gallego L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. Vet Parasitol. 2012;184(1):10–17.

Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin J-C, Soteriadou K, Dedet J-P, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(22):9375–80.

Luz ZMP, Pimenta DN, Cabral a. L, Fiúza VO, Rabello a. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. Rev Soc Bras Med Trop. 2001;34(3):249–54.

Luz ZMP, Schall V, Rabello A. Avaliação de um folheto sobre leishmaniose visceral como instrumento para fornecer informações a profissionais de saúde e leigos. Cad Saude Publica. 2005;21(2):608-621.

Macedo ITF, Bevilaqua CML, Morais NB, Souza LC, Linhares FE, Amore SSA. Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. Ciência Animal. 2008;18(2).

Madeira MF, Uchoa CM, Leal CA, Macedo Silva RM, Duarte R, Magalhães CM, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36:551–555.

Madeira MDF, Schubach ADO, Schubach TMP, Leal CA, Marzochi MCDA. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. Braz J Infect Dis. 2004;8(6):440–4.

Madeira MF, Schubach A., Schubach TM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006a;100:442–445.

Madeira MF, De A, Schubach TMP, Pereira S a., Figueiredo FB, Baptista C, et al. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. Vet Parasitol. 2006b;138(3-4):366–70.

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

Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(4):566–7.

Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte R Della, et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2004;125(3-4):251–62.

Marcelino AP, Ferreira EC, Avendanha JS, Costa CF, Chiarelli D, Almeida G, et al. 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 MDF, Soares HS, de OCC Sanches, et al. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. *Infect Genet Evol.* 2014;25:44-51.

Marcondes CB & Nascimento JA. Avaliação da eficiência de dentametrina (K-Othrine CE) no controle de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), no Município de Santa Rita, Paraíba, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1993;26:15-8.

Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(1):31–8.

Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol.* 2013;27(2):123–47.

Marzochi MCA, Sabroza PC, Toledo LM, Marzochi KBF, Tramontano NC, Rangel Filho FB. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saude Publica.* 1985;1(1):5-17.

Marzochi MCA. Doenças infecto-parasitárias: leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. J Bras Med. 1992;63(5/6):82-104.

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

Marzochi MCA. Epidemiologia e possibilidade de controle das leishmanioses no Brasil. Perspectivas Tecnológicas em saúde: os desafios da leishmaniose e da febre amarela. Fiocruz. Bio-Manguinhos. 2001;1:24-6.

Maurício IL, Stothard JR, Miles M a. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitol Today. 2000;16(5):188–9.

Maurício IL, Gaunt MW, Stothard JR, Miles M a. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. Parasitology. 2001;122(Pt 4):393–403.

Mazzarri MB, Feliciangeli MD, Maroli M, Hernandez A, Bravo A. Susceptibility of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to selected insecticides in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Venezuela. J Am Mosq Control Assoc. 1997;13(4):335-341.

Melo LA. Detecção de *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos no município de Belo Horizonte, MG [Dissertação]. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou, 2008.

Menezes FC. Sistema de Informação de Leishmaniose Visceral (LV) em Belo Horizonte – Minas Gerais: avaliação do subcomponente Inquérito Canino no período de 2006 a 2010 [Dissertação]. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou, 2011.

Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays , an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests

(immunochromatographic-dipstick and gel tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania* Infections in Dogs. J Clin Microbiol. 2005;43(11):5515-19.

Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFP, Secundino NFC, Dias ES. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2002;44(5):255-9.

Michalsky ÉM, Rocha MF, da Rocha Lima ACVM, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. Vet Parasitol. 2007;147(1-2):67-76.

Michalsky EM, França-Silva JC, Barata RA, Loureiro AMF, Fortes-Dias CL, Dias ES. Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009a;104(1):56-61.

Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, França-Silva JC, Rocha MF, Barata RA, Dias ES. Association of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) population density with climate variables in Montes Claros, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009b;104(8):1191-3.

Michalsky EM, Guedes KD, França-Silva JC, Dias CLF, Barata RA, Dias ES. Natural infection with *Leishmania infantum chagasi* in *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sandflies captured in the municipality of Janaúba, State of Minas Gerais, Brazil. Revista Soc Bras Med Trop. 2011;44(1):58-62.

Migone LE. Um caso de kala-azar à Assuncion (Paraguay). Bulletin de la Société Pathologie Exotique. 1913;6:118-120.

Ministério da Saúde. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. Rev Saude Publica. 2010;44(1):200-2.

Ministério da Saúde. Nota técnica conjunta nº 01/2011-CGDT- CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Secretaria de Vigilância em

Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Gonçalves M, Reis MG, Carvalho L, et al. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(2):185–8.

Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniasis-new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. Trends Parasitol. 2008;24(8): 371-377.

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

Mishra M, Biswas UK, Jha DN, Khan AB. Amphotericin versus pentamidine in atimony-unresponsive kala-azar. Lancet. 1992;340(8830):1256-1257.

Mishra M, Biswas UK, Jha AM, Khan AB. Amphotericin versus sodium stibogluconate in first-line treatment of Indian kala-azar. Lancet. 1994;344(8937):1599-1600.

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

Missawa NA, Lorosa ES, Dias ES. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(4):365-368.

Missawa NA, Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Dias ES. *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania (L.) chagasi* in Várzea Grande, Mato Grosso State, Brazil, an area of intense transmission of visceral leishmaniasis. Cad Saude Publica. 2010;26(12):2414-2419.

Monteiro ÉM, França Da Silva JC, Da Costa RT, Camargos Costa D, Andrade Barata R, De Paula EV, et al. Leishmaniose visceral: Estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38(2):147–52.

Morais MHF, Fiúza VOP, Pessanha JEM, Menezes FC, Ribeiro AA, Jardim CCC. Uso de ferramentas espaciais para aprimorar as ações de vigilância e controle da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. Anais da 7ª Expoepi Mostra Nacional de Experiências bem sucedidas em epidemiologia, prevenção e controle de doenças. Ministério da Saúde. Brasília; 2007. p. 74.

Morais MHF. Uso de ferramentas espaciais no direcionamento de ações de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral (LV) em Belo Horizonte. XVIII Congresso Mundial de Epidemiologia e VII Congresso Brasileiro de Epidemiologia. Porto Alegre; 2008a.

Morais MHF, Magalhães DF, Fiúza VOP, Araújo VEM. Sustentabilidade das ações de controle da leishmaniose visceral e as implicações da priorização de áreas de risco na expansão da doença no Distrito Sanitário Noroeste de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006 a 2008. Anais da 24ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e 12ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses. Universidade Federal do Triangulo Mineiro. Uberaba; 2008b. p. 235.

Morais MHF. Avaliação das atividades de controle da leishmaniose visceral na Regional Noroeste de Belo Horizonte, 2006 a 2010 [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

Moreira MAB, Luvizotto MCR, Nunes CM, Silva TCC, Laurenti MD, Corbett CEP. Application of direct immunofluorescence technic for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in lymph nodes aspirate. Braz J Vet Res Anim Sci. 2002;39(2):103-6.

Moreira ED, Mendes De Souza VM, Sreenivasan M, Nascimento EG, Pontes De Carvalho L. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. Vet Parasitol. 2004;122(4):245–52.

Moreira MAB, Luvizotto MCR, Garcia JF, Corbett CEP, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. Vet Parasitol. 2007;145(3-4):245–52.

Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 2002;18(9):399–405.

Moreno EC, Melo MN, Genaro O, Lambertucci JR, Serufo JC, Silva A, et al. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. Fatores de risco para infecção por *Leishmania chagasi* em uma área urbana do Estado de Minas Gerais. 2005;38(6):456–63.

Moreno EC, Melo MN, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade a. SR, Antunes CMF, et al. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(5):421–7.

Nascimento JC, Paiva BR, Malafronte RS, Fernandes WD, Galati EAB. Natural Infection of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a Visceral Leishmaniasis Focus in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Int Med Trop Sao Paulo.* 2007;49(2):119-122.

Nasereddin A, Ereqat S, Azmi K, Baneth G, Jaffe CL, Abdeen Z. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. *J Parasitol.* 2006;92(1):178-83.

Naveda LAB., Moreira EC, Machado JG, Moraes JRC, Marcelino AP. Epidemiologic aspects of canine visceral leishmaniasis in Pedro Leopoldo district, Minas Gerais, 2003. *Arq Bras Med Vet Zootech.* 2006;58:988–993.

Nicolle C, Comte C. Origine du Kala azar. *Academy of Science.* 1908;146: 789.

Nunes CM, Lima VMFD, Paula HBD, Perri SH V, Andrade a. MD, Dias FEF, et al. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol.* 2008;153(1-2):19–23.

Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Gonçalves Filho J, Perri SHV. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Vet parasitol.* 2010;170(1):131-133.

Oliva G, Scalone A, Manzillo VF, Gramiccia M, Pagano A, Muccio T Di, et al. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. J Clin Microbiol. 2006;44(4):1318–22.

Oliveira CL, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. Cad Saude Publica. 2001;17(5):1231–9.

Oliveira SS & Araújo TM. Evaluation of control measures for visceral leishmaniasis (kala azar) in an endemic area in Bahia, Brazil (1995-2000). Cad Saude Publica. 2003;19(6):1681–90.

Oliveira CI, Báfica A, Oliveira F, Favali CBF, Correa T, Freitas L a R, et al. Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. Clin Infect Dis. 2003;37(11):e149–53.

Oliveira CDL, Morais MHF, Machado-Coelho GLL. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. Cad Saude Publica. 2008;24(12):2953–8.

Oliveira-Pereira YN, Rebêlo JMM, Moraes JLP, Pereira SRF. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp. na Amazônia maranhense. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39(6):540–3.

Oskam L, Slappendel RJ, Beijer EGM, Kroon NCM, Ingen CW, Ozensoy S, et al. Dog-DAT: direct agglutination test using stabilized, freeze-dried antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996;16(3-4):235-239.

Paiva BR, Secundino NF, Nascimento JC, Pimenta PF, Galati EA, Junior HF, et al. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. Acta Trop. 2006;99:252-259.

Paiva BR, Secundino NFC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade Junior HFD, Malafronte RDS. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em

flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. Cad Saude Publica. 2007;23:87- 94.

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

Palatnik-De-Sousa CB, Dos Santos WR, França-Silva JC, Da Costa RT, Barbosa Reis a., Palatnik M, et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2001;65(5):510–7.

Pan American Health Organization (PAHO). Regional Office of the World Health Organization. Report Leishmaniasis. nº 1. 2013.

Parrot L, Donatien A, Lestoquard F. Sur le développement du parasite de la leishmaniose canine viscérale chez *Phlebotomus major* var. *perniciosus* Newstead. Bull Soc de Pathol Exot. 1930;23(7):724-726.

Passos-Dias FO, Lorosa ES, Rebêlo JMM. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodiade, Phlebotominae). Cad Saude Publica. 2003;19:1373-1380.

Paula AA. Aspectos macro e microecológicos da leishmaniose visceral americana canina em Barra da Guaratiba, Rio de Janeiro [Dissertação]. 2001.

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

Peixoto HM, de Oliveira MRF, Romero GAS. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. Trop Med Int Heal. 2015;20(3):334–52.

Penna HA. Leishmaniose visceral no Brasil. Brasil-Medico. 1934;48:949-50.

Pereira-Chioccola VL. Diagnóstico molecular das leishmanioses : contribuição ao Programa de Vigilância e Controle da LVA no Estado de São Paulo Molecular diagnosis of leishmaniasis : contribution to the American Visceral Leishmaniasis Surveillance Program in Sao Paulo State. *Biologia (Bratisl)*. 2009;6(68):4–13.

Pessoa SB & Barreto MP. *Leishmaniose Tegumentar Americana*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional/São Paulo: Serviço de Parasitologia, Departamento de Medicina, Faculdade de São Paulo 1948.

Pessoa SB, Martins AV. *Parasitologia médica*. 11a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 872.

Piscopo TV & Mallia AC. *Leishmaniasis*. *Postgrad Med J*. 2006; 82:649-57.

Porrozzi R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, Santos CD, et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(5): 544-548.

Pratlong F, Dereure J, Bucheton B, El-Safi S, Dessein A, Lanotte G, et al. Sudan: the possible original focus of visceral leishmaniasis. *Parasitol*. 2001;122(6): 599-605.

Prefeitura Municipal de Belo Horizonte - PBH. Informações sobre Leishmaniose Visceral 2011. Disponível em: <http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/contents.do?evento=conteudo&idConteudo=44314&chPlc=44314&&pIdPlc=&app=salanoticias>

Prefeitura Municipal de Belo Horizonte - PBH. Informações sobre Leishmaniose Visceral 2013. Disponível em: <http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/contents.do?evento=conteudo&idConteudo=95512&chPlc=95512&&pIdPlc=&app=salanoticias>

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

Pugedo H, Barata R a, França-Silva JC, Silva JC, Dias ES. HP: an improved model of suction light trap for the capture of small insects. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(1):70–2.

Quaresma PF, Carvalho GMDL, Ramos MCDNF, Filho JDA. Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(4):480–5.

Queiroz NMGP, Assis JD, Oliveira TMFS, Machado RZ, Nunes CM, Starke-Buzetti WA. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. *Revista Bras Parasitol Vet.* 2010;19(1):34-40.

Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitol.* 1997;115:143-156.

Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2009;136(14):1915–34.

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

Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saúde Pública.* 2008;24(12):2948–52.

Ready P. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annual Rev Entomol* 2013;58:227-250.

Rebêlo JMM. Freqüência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. *Cad Saude Publica.* 2001;17(1):221–7.

Reed SG. Diagnosis of leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 1996;14(5):471-8.

Regina-Silva S, Fortes-Dias CL, Michalsky EM, França-Silva JC, Quaresma PF, da Rocha Lima ACVM, et al. Evaluation of parasitological examination, kDNA polymerase chain reaction and rK39-based immunochromatography for the diagnosis of visceral leishmaniasis in seropositive dogs from the screening-culling program in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(4):462-468.

Reinhold-Castro KR, Scodro RBDL, Dias-Sversutti a. DC, Neitzke HC, Rossi RM, Kühl JB, et al. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(3):269-76.

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

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;128(1-3):87-95.

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):530-41.

Reithinger R, Teodoro U, Davies CR. Topical insecticide treatments to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(5):872-6.

Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs: Comparative Study Using an Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40(7):2352-6.

Reithinger R, Coleman PG, Alexander B, Vieira EP, Assis G, Davies CR. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *Int J Parasitol.* 2004;34(1):55-62.

Resende MC De, Camargo MCV, Vieira JRM, Nobi RCA, Porto MN, Oliveira CDL, et al. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39(1):51–5.

Rezende CL, Bastos O. Calazar Infantil - Relato de 1 caso ocorrido em Belo Horizonte. Jornal de Pediatria. 1959;24:323-331.

Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. Ann Parasitol Hum Comp. 1990;65(3):111–25.

Rodgers MR, Stephen JP, Dyann FW. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. Exp Parasitol. 1990;71(3):267-275.

Rodrigues EHG, Brito MEF, Mendonça MG, Werkhauser RP, Coutinho EM, Souza WV, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in an área of endemicity in northeastern Brazil. J Clin Microbiol. 2002; 40: 3572-3576.

Romero G a S, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(1).

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

Ross R. (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. (2) Further notes on *Leishman's* bodies. Brit Med J. 1903;2(2237):1261.

Rossi CN. Ocorrência de *Leishmania* sp. em gatos do município de Araçatuba-São Paulo – Brasil [Dissertação]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2007.

Rutledge LC & Ellenwood DA. Production of plebotomine sandflies on the open forest floor in Panama: The Species. Environ Entomol. 1975;4:71-77.

Ryan Lee, Lainson R, Shaw JJ, Fraiha H. Ecologia de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na região Amazônica. In: Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Fundação Serviços de Saúde Pública, 1986. p. 307-20.

Ryan PR, Arana BA, Ryan JR, Wirtz RA., Wortmann GW, Rizzo NR. The domestic dog, a potential reservoir for *Leishmania* in the Peten region of Guatemala. *Vet Parasitol.* 2003;115: 1–7.

Sabroza PC, Toledo LM, Osanai CH. A organização do espaço e os processos endêmico-epidêmicos. In: Saúde, ambiente e desenvolvimento: processos e consequências sobre as condições de vida. São Paulo: Hucitec- Abrasco. 1992(2):57-77.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich H a, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985;230(4732):1350–4.

Salómon OD, Rossi GC, Spinelli GR. Ecological aspects of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) in an endemic area of tegumentar leishmaniasis in the Northeastern Argentina, 1993-1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:163-168.

Sampaio IBM. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 3 ed. 2007. 264p.

Sangiorgi B, Miranda DN, Oliveira DF, Santos EP, Gomes FR, Santos EO, et al. Natural breeding places for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a semiarid region of Bahia State, Brazil. *J Trop Med.* 2012;2012.

Santana-Filho FC, Silva J a., Magalhães DF, Meneses JNC, Haddad JP a, Morais MHF, et al. Recusas de borrifação de imóveis e ocorrência de casos de leishmaniose visceral na Regional Noroeste de Belo Horizonte. *Arq Bras Med Vet e Zootec.* 2012;64(4):899–908.

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

Santos RL, Costa EA, Amarilla SP, Cino AG, Silva TMA, Paixão TA, et al. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Vet. Parasitol.* 2009;165(3-4):327-31.

Santos-Gomes G, Fonseca IP. *Leishmaniose canina*. Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, 1 ed. 2008.

Saraiva L, Lopes JDS, Oliveira GBM, Batista FDA, Falcão AL, Andrade Filho JD. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(1):56-63.

Saraiva L, Carvalho GML, Gontijo CMF, Quaresma PF, Lima ACVMR, Falcão AL, et al. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J Med Entomol.* 2009;46(5):1159–63.

Saraiva L, Filho JD a, de Oliveira Silva S, de Andrade a. SR, Melo MN. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(8):1033–9.

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

Saravia NGL, Valderrama M, Labrada AF, Holguín C, Navas G, Palma A, et al. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in new World leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1989;159:725-735.

Savani ESMM, de Oliveira Camargo MCG, de Carvalho MR, Zampieri RA, dos Santos MG, D'Auria, SRN, et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania*

(*Leishmania infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, Sao Paul State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2004;120(3):229–233.

Savani ESMM, Nunes VLB, Galati E a B, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Vet Parasitol.* 2009;160(1-2):18–24.

Schallig HD, da Silva ES, van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CM. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2007;7:387–393.

Scorza JV, Ortiz I, Gomez I. Observaciones biológicas sobre algunos flebotomos de “Rancho Grande” (Venezuela). Sobre los factores microclimáticos que determinan la endemicidad de la flebotomofauna de “Rancho Grande”. *Acta Biol Venez.* 1968;6:76-83.

Secundino NFC, Eger Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PFP. *Lutzomyia longipalpis* Peritrophic Matrix: Formation, Structure, and Chemical Composition. *J Med Entomol.* 2005;42(6): 928-938.

Serrano ACM, Nunes C, Savani ESM, D’auria SRN, Bonello FL, Vasconcelos RO, et al. Leishmaniose em felino na zona urbana de Araçatuba - SP - relato de caso. *Clínica Veterinária.* 2008;(76):36-40.

Shaw JJ. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988;83:486-490.

Shaw, JJ. New World leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. *Leishmania.* Springer US. 2002;11-31.

Sherlock IA & Sherlock VA. Sobre a infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* pela *Leishmania donovani*. *Rev Bras Biol.* 1961;21:409- 418.

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

Sherlock IA & Sherlock VA. Métodos práticos para criação de flebotomíneos em laboratório. Rev Bras Biol. 1972;32:209–217.

Sherlock IA. Há especificidade dos flebotomíneos para as leishmânias? Rev Soc Bras Med Trop. 1997;30:151-155.

Sherlock IA. A importância dos flebotomíneos. In: Rangel EF & Lainson R., editores. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz; 2003. p. 15- 21.

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

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

Silva AVM Da, Paula AA De, Cabrera MAA, Carreira JCA. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. Cad Saude Publica. 2005b;21(1):324–8.

Silva JGDE, Werneck GL, Cruz MDSPE, Costa CHN, Mendonça IL De. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Teresina, Piauí, Brasil. Cad Saude Publica. 2007a;23(7):1715–20.

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

Silva AVM, de Souza Candido CD, de Pita Pereira D, Brazil RP, Carreira JCA. The first record of american visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. Acta Trop. 2008;105(1):92-94.

- Silva FL, Oliveira RG, Silva TM a, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009;160(1-2):55–9.
- Silva KLO, Santos DP, Coelho NMD, da Silva DC, Okamoto AC, Junior EGJ. Vacinas Contra Leishmaniose: Uma Revisão. *Archieives of health Investigation.* 2013;2(4).
- Smith ROA, Halder KC, Ahmed I. Further investigations on the transmission of kalaazar. Part HI: The transmission of kala-azar by the bite of the sandfly *P. argentipes*. *Indian J Med Res.* 1940;28:585-591.
- Smith ROA, Halder KC, Ahmed I. Further investigations on the transmission of kalaazar. Part VI: A second series of transmissions of *L. donovani* by *P. argentipes*. *Indian J Med Res.* 1941;29:799-802.
- Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):560-563.
- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009;165(1/2):1-18.
- Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(6):759–65.
- Souza CM De, Pessanha JE, Barata RA, Monteiro EM, Costa DC, Dias ES. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(8):795–803.
- Souza AI, Barros EM, Ishikawa E, Ilha IM, Marin GR, Nunes VL. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2005;128(1):41–45.

Souza VMM, Julião FDS, Neves RCS, Magalhães PB, Bisinotto TV, Lima ADS, et al. Ensaio comunitário para avaliação da efetividade de estratégias de prevenção e controle da leishmaniose visceral humana no Município de Feira de Santana, Estado da Bahia, Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2008;17(2):97-106.

SUCEN- Superintendência de Controle. Manejo integrado para prevenção da proliferação de vetores de dengue e leishmaniose e de escorpiões. *Rev Saúde Pública* 2007;41(2):317-20.

Tauil PL. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39:275-277.

Teles NMM, Agostini MAP, Bigeli JG, Noletto RV, Oliveira JD, Oliveira Junior WP De. Molecular and parasitological detection of *Leishmania* spp. in dogs caught in Palmas, TO, Brazil. *Rev Bras Parasitol Veterinária*. 2012;21(3):278–82.

Teodoro U, La Salvia Filho V, de Lima EM, Spinosa RP, Barbosa OC, Ferreira MEMC, et al. Flebotomíneos em área de transmissão de leishmaniose tegumentar na região norte do Estado do Paraná-Brasil: variação sazonal e atividade noturna. *Rev Saude Publica*. 1993;27(3):190-4.

Teodoro U, Balduino J, Thomaz-Soccol V, Barbosa OC, Ferreira MEMC, Lozovei AL, et al. Environmental sanitation and peri-domiciliar organisation as auxiliary practices for the control of phlebotomines in Paraná State, southern Brazil. *Brazilian Arch Biol Technol*. 1999;42(3):307–14.

Teodoro U, Silveira TGV, Santos DR Dos, Santos ES Dos, Santos AR Dos, Oliveira O De, et al. Influência da reorganização, da limpeza do peridomicílio e a da desinsetização de edificações na densidade populacional de flebotomíneos no Município de Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. *Cad Saude Publica*. 2003;19(6):1801–13.

Teodoro U, Thomaz-Soccol V, Kühl JB, Dos Santos DR, Dos Santos ES, Dos Santos AR, et al. Reorganization and cleanness of peridomiciliar area to control sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in south Brazil. *Brazilian Arch Biol Technol*. 2004;47(2):205–12.

Teodoro U, dos Santos DR, dos Santos AR, de Oliveira O, dos Santos ES, Neitzke HC, et al. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos no Município de Lobato, Estado do Paraná, Sul do Brasil Evaluation of sandfly control in Lobato municipality, Paraná State, southern Brazil. *Cad. Saude Publica*. 2006;22(2):451-455.

Teodoro U, dos Santos DR, dos Santos AR, de Oliveira O, Poiani LP, Kühl JB, et al. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos no norte do Estado do Paraná, Brasil Evaluation of sandfly control measures in northern Paraná State, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2007;23(11):2597-2604.

Tesh RB, Chaniotis BN, Aronson MD, Johnson KM. Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. *Am J Trop Med Hyg*. 1971;20:150-6.

Thakur CP, Sinha GP, Sharma V, Pandey AK, Kumar M, Verma BB. Evaluation of amphotericin B as a first line drug in comparison to sodium stibogluconate in the treatment of fresh cases of kala-azar. *Indian J Med Res*. 1993;97: 170-175.

Thakur CP, Narain S, Kumar N, Hassan SM, Jha, DK, Kumar ANDA. Amphotericin B is superior to sodium antimony gluconate in the treatment of Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*. 1997;91(6):611-616.

Thatcher VE & Hertig M. Field studies on the feeding habitats and diurnal shelters of some *Phlebotomus* sandflies (Diptera: Psychodidae) in Panama. *Ann Entomol Res*. 1966;59:637-646.

Travi BL, Montoya J, Gallego J, Jaramillo C, Llano R, Velez ID. Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Columbia. *J Med Entomol*. 1996;33(3):278-85.

Travi BL, Tabares CJ, Cadena H. *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in two Colombian dogs: a note on infectivity for sand flies and response to treatment. *Biomedica*. 2006;26:249-53.

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

Volf P & Volfova V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. J Vector Ecol. 2011;36(s1): S1-S9.

Ward RD. New World leishmaniasis: a review of the epidemiological changes in the last three decades. 1977.

Werneck GL. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. Cad Saude Publica. 2008;24(12):2937-40.

Werneck GL, Pereira TJCF, Farias GC, Silva FO, Chaves FC, Gouvêa MV, et al. Avaliação da efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral na cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil: resultados do inquérito inicial-2004. Epidemiologia e Serviços de Saúde. 2008;17(2):87-96.

Wijeyaratne PM, Arsenault J, Murphy CJ. Endemic disease and development: the leishmaniasis. Acta Trop. 1994;56:349-364.

Williams P. On the vertical distribution of phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in British Honduras (Belize). Bull Entomol Res. 1970;59:637- 646.

World Health Organization. Insecticide resistance and vector control. Seventeenth Report of the WHO Experts Committee on Insecticides. Technical Report Series. 1970;443:1-279.

World Health Organization, Control of the Leishmaniasis. Geneva, WHO, (Technical Report Series 703), 1990. 158p.

World Health Organization. Sixtieth World Health Assembly. Control of Leishmaniasis. 2007.

World Health Organization. Leishmaniasis. 2014a Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.

World Health Organization. Leishmaniasis. Magnitude of the problem. 2014b Disponible em: [http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/).

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

Ximenes MFF, Souza MF, Guillermo Castellón, E. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94(4):427-432.

Yadon ZE, Rodrigues LC, Davies CR, Quigley MA. Indoor and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis in northwestern Argentina: a retrospective case– control study. Am J Trop Med Hyg. 2003;68,519–526.

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

Zeledon R, Murrillo J, Gutierrez H. Observaciones sobre la ecología de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) y posibilidades de existencia de leishmaniasis visceral en Costa Rica. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984;79:455-459.