

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

ECOEPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE
IPATINGA, REGIÃO METROPOLITANA DO VALE DO AÇO, ESTADO DE
MINAS GERAIS, BRASIL

por

Rosana Silva Lana

Belo Horizonte

2018

TESE

DSC-IRR

R. S. LANA

2018

ROSANA SILVA LANA

ECOEPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE
IPATINGA, REGIÃO METROPOLITANA DO VALE DO AÇO, ESTADO DE
MINAS GERAIS, BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou
como requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Ciências – área de concentração -
Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Dr. Edelberto Santos Dias

Belo Horizonte

2018

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

S586e
2018

Lana, Rosana Silva

Ecoepidemiologia da leishmaniose visceral no município de Ipatinga, região metropolitana do Vale do Aço, estado de Minas Gerais, Brasil/ Lana, Rosana Silva. – Belo Horizonte, 2018.

XIX, 153 f: il.; 210 x 297 mm.

Bibliografia: 103-123

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

1. Avaliação de Danos/etiologia 2. Leishmaniose visceral/etiologia 3. Leishmaniose visceral/prevenção e controle 4. Lutzomyia longipalpis 5. Leishmania infantum I. Título. II. Dias, Edelberto Santos (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.9364

ROSANA SILVA LANA

ECOEPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE
IPATINGA, REGIÃO METROPOLITANA DO VALE DO AÇO, ESTADO DE
MINAS GERAIS, BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou,
como requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Ciências – área de concentração
Doenças Infecciosas e Parasitárias

Banca examinadora:

Dr. Edelberto Santos Dias (IRR/FIOCRUZ) Presidente

Dr. Daniel Moreira de Avelar (IRR/FIOCRUZ) Titular

Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares (IRR/FIOCRUZ) Titular

Dr. Ricardo Andrade Barata (UFVJM) Titular

Dra. Patrícia Flávia Quaresma (UFMG) Titular

Dra. Sílvia Ermelinda Barbosa Leite (IRR/FIOCRUZ) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte em: 26/11/2018

“Alguns homens veem as coisas como são,
e dizem ‘Por quê?’
Eu sonho com as coisas que nunca foram
e digo ‘Por que não?’”
(George Bernard Shaw)

DEDICATÓRIAS

Este trabalho é dedicado a todos que
contribuíram para sua realização

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me dá saúde, sabedoria e fé para ser perseverante para alcançar todas as minhas metas;

Ao meu orientador Dr. Edelberto Santos Dias, agradeço imensamente por essa outra oportunidade concedida de trabalhar com o que eu gosto. Muito obrigada pelo apoio, incentivo, ensinamentos, dedicação e atenção mais que especial nas revisões e sugestões. Sempre foi um prazer trabalhar com você!

A Dra. Érika Michalsky pela amizade que temos construído, pelo carinho, ajuda e sugestões sempre oportunas e, conseqüentemente, pela colaboração em minha formação profissional. Estará sempre em meu coração!

Ao veterinário Joãozinho -João Carlos- pela colaboração nas necropsias que foi fundamental para realização deste trabalho. Pela alegria contagiante que nos permite trabalhar com mais entusiasmo.

A Dra. Fabiana Lara, exemplo de profissional e pessoa, além de colega de trabalho, se tornou uma grande amiga, que levarei para sempre em minha vida. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela amizade, pelas conversas e pelo carinho que sempre demonstrou comigo.

Aos amigos de colaboração e de laboratório: Nathi, Dani, Josie, Jú, Greice, Adão, Fabi Preta, Maiara, Andreza, Lara, Agnes, Tina, Daniel, que de alguma forma me auxiliaram nos trabalhos de campo ou de laboratório. Em especial agradeço à Livia e Jeiza, que foram tão dedicadas a esse trabalho e me ajudaram tanto! Vocês têm muito potencial!

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

Agradeço imensamente à bióloga Mardeildes pela ajuda e amizade desde os trabalhos de campo até à escrita da tese e artigo; à Shara Regina, veterinária

que sempre sanou minhas “dúvidas caninas”, a ajuda de vocês foi indispensável. Aos Agentes de Saúde do município, Igor e Alisson, por me acompanharem nas visitas, pela companhia agradável, e à veterinária Sonale que auxiliou quando foi necessário.

À Ipatinga, cidade quente e acolhedora que sempre fez parte da minha vida. À Secretaria de Saúde por disponibilizar os funcionários, agradeço especialmente à Telma Semirames e Eliane Lana pelo apoio e presteza.

À Consuelo Latorre e Letícia Pinheiro pelo auxílio na confecção de gráficos, figuras e análises estatísticas.

Ao Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz, FAPEMIG, pela oportunidade concedida no curso de doutorado, apoio financeiro e logístico; e aos professores pelo conhecimento transmitido.

Agradeço à minha mãe, Angela, que confiou em mim em todos os momentos e me aos meus irmãos, Rejane e Rodrigo, pelo apoio e torcida incessante. Ao meu pai, que por vezes foi minha fonte inspiradora apesar de não estar aqui mais, eu agradeço porque me deu forças para continuar quando lembrei de sua batalha, sei que estaria orgulhoso de mim. Amo vocês!

À minha tia Maria, querida (quanta saudade) que me incentivou a continuar os estudos e me concedeu o aconchego do seu lar, se tornando minha segunda mãe. Mas hoje, infelizmente, não está mais aqui para ver que sua confiança foi edificadora em minha formação. Sempre me lembrarei de você com carinho.

Aos meus primos Ronan e Elisangela que me deram o prazer de sua companhia diária e estiveram comigo em momentos difíceis. Obrigada por poder contar com vocês e por tantas risadas juntos.

A todas as pessoas que torceram por mim e me incentivaram durante este período, em especial: Andiara, Vivian, Mônica, Viviane pelos gestos de carinho e incentivo para seguir adiante e pelo desejo da minha felicidade e sucesso.

RESUMO

O município de Ipatinga, MG, foi caracterizado pelo Ministério da Saúde como área de intensa transmissão de leishmaniose visceral (LV), inclusive com ocorrência de óbitos. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar os aspectos ecoepidemiológicos da LV (fauna flebotomínica, infecção natural, reservatório doméstico e casos humanos). Para o estudo entomológico, foram selecionados 10 bairros com maior ocorrência de casos humanos de LV. As capturas entomológicas foram realizadas durante 12 meses (03/2015 a 02/2016) e todas as fêmeas capturadas foram submetidas à Nested/PCR e sequenciamento para detecção e identificação da espécie de *Leishmania*. Para o estudo canino, foi realizado inquérito sorológico utilizando como diagnóstico o Dual Path Platform (DPP) (triagem) e o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (confirmatório). 44 cães soropositivos foram necropsiados e com amostras de pele e medula foram realizados imprints/esfregaços, mielocultura e PCR. Todos os casos humanos e caninos de LV ocorridos no período de estudo foram georreferenciados e construídos mapas de distribuição, visando identificar as áreas de risco para LV. Foram capturados 1.501 exemplares de flebotomíneos, distribuídos em 16 espécies. Ressaltamos o encontro de *Lutzomyia longipalpis* (61,9%), *Nyssomyia whitmani* (1,2%) e *Nyssomyia intermedia* (0,9%), espécies de importância médica. A taxa mínima de infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos ficou em 0,3%. Foram examinados 9.136 cães, destes 1.355 foram soropositivos para LV (14,8%). Nos estudos moleculares e parasitológicos, a pele apresentou maior positividade (95,5% e 54,5%) em relação à medula (68,2%, e 50,0%), já na mielocultura a positividade foi de 66,67%. Após o sequenciamento confirmamos que a espécie encontrada nos flebotomíneos e reservatórios foi *Leishmania infantum*. Portanto, devido à alta densidade vetorial, infecção por *Leishmania*, expressiva taxa de infecção canina e registros de casos humanos de LV, é importante intensificar/modificar as ações de controle, principalmente nos bairros com maior risco de transmissão.

Palavras-chave: Ecoepidemiologia, leishmaniose visceral, *Lutzomyia longipalpis*, *Leishmania infantum*.

ABSTRACT

The municipality of Ipatinga, MG, was characterized by the Ministry of Health as an area of intense transmission of visceral leishmaniasis (VL), including deaths. Thus, the objective of this work was to study the ecoepidemiological aspects of VL (phlebotomine fauna, natural infection, domestic reservoir and human cases). For the entomological study, 10 neighborhoods with the highest occurrence of human cases of VL were selected. The entomological catches were carried out for 12 months (03/2015 to 02/2016) and all the females captured were submitted to Nested/PCR and sequencing for detection and identification of the *Leishmania* species. For the canine study, a serological survey was performed using Dual Path Platform (DPP) (screening) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (confirmatory). 44 seropositive dogs were necropsied and with skin and marrow samples imprints/smears, myeloculture and PCR were performed. All human and canine VL cases occurred during the study period were georeferenced and distribution maps were constructed, aiming to identify the risk areas for VL. 1,501 specimens of sand flies were captured, distributed in 16 species. We highlight the finding of *Lutzomyia longipalpis* (61.9%), *Nyssomyia whitmani* (1.2%) and *Nyssomyia intermedia* (0.9%), species of medical importance. The minimum rate of natural infection by *Leishmania* in sandflies was 0.3%. 9,136 dogs were examined, of which 1,355 were seropositive for VL (14.8%). In the molecular and parasitological studies, the skin presented a higher positivity (95.5% and 54.5%) in relation to the bone marrow (68.2%, and 50.0%); in myeloculture, positivity was 66.67%. After sequencing we confirmed that the species found in sandflies and reservoirs was *Leishmania infantum*. Therefore, due to the high vector density, *Leishmania* infection, significant canine infection rate and human case records of VL, it is important to intensify/modify control actions, especially in neighborhoods with a higher risk of transmission.

Keywords: Ecoepidemiology, visceral leishmaniasis, *Lutzomyia longipalpis*, *Leishmania infantum*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Município de Ipatinga, Minas Gerais (MG), Brasil.....42
- Figura 2: Delimitação de bairros e Regionais de Planejamento de Ipatinga, de acordo com o Plano Diretor da Prefeitura Municipal de Ipatinga, MG,(2014)...44
- Figura 3: Exemplos dos ecótopos peridomiciliares onde foram expostas armadilhas entomológicas, no município de Ipatinga, MG.....50
- Figura 4: Número de *Lu. longiplapis* capturados em relação às demais espécies, em Ipatinga, MG, utilizando armadilhas luminosas HP, no período de março de 2015 a fevereiro de 2016.....63
- Figura 5: Número de flebotomíneos em relação ao local de captura, em Ipatinga, MG, utilizando armadilhas luminosas HP, no período de março de 2015 a fevereiro de 2016.....63
- Figura 6: Interferência climática mensal na densidade populacional de flebotomíneos em Ipatinga, MG, entre março de 2015 a fevereiro de 2016.....71
- Figura 7: Porcentagem de espécies mais numerosas capturadas, por mês e ano, em Ipatinga, MG72
- Figura 8: Exemplos de produtos de amplificação de DNA de *Leishmania* spp. em “pools” de flebotomíneos, utilizando iniciadores para o gene SSUrRNA da PCR R3R4 (353 pb), visualizados após gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio.....74
- Figura 9: Diagnóstico parasitológico de amostras de pele e medula óssea dos cães analisados no estudo, mostrando o número de cães positivos e negativos em cada um dos tecidos, no “imprint”/esfregaço e miolocultura.....77

Figura 10: Exemplos de produtos de amplificação de DNA de *Leishmania* spp. em amostras de cães soropositivos para LVC, utilizando iniciadores para o gene SSUrRNA da PCR R3R4 (353 pb), visualizados após gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio.....78

Figura 11: Diagnóstico molecular (Nested PCR) de amostras de pele e medula óssea dos cães analisados no estudo, mostrando o número de cães positivos e negativos em cada um dos tecidos.....78

Figura 12: Mapas do município de Ipatinga, MG, mostrando as taxas de infecção canina e humana de LV por bairro.....82

Figura 13: A leishmaniose visceral em Ipatinga: casos em números absolutos e taxa de incidência (por 10.000 habitantes), no período de 2011 a 2017.....83

Figura 14: Mapa de Kernel mostrando a distribuição de casos humanos de LV em Ipatinga, MG.....84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Protocolo de preparação de flebotomíneos para montagem e identificação	51
Tabela 2: Espécies de flebotomíneos capturados no município de Ipatinga, MG, utilizando armadilhas luminosas HP, de março de 2015 a fevereiro de 2016.....	62
Tabela 3: Espécies de flebotomíneos capturados no peridomicílio e intradomicílio, de acordo com o sexo, utilizando armadilhas luminosas HP, no período de março de 2015 a fevereiro de 2016 em Ipatinga, MG.....	64
Tabela 4: Flebotomíneos capturados no peridomicílio e intradomicílio, de acordo com o sexo, em cada bairro de estudo, utilizando armadilhas luminosas HP, no período de março de 2015 a fevereiro de 2016.....	65
Tabela 5: Espécies de flebotomíneos capturados por bairro no município de Ipatinga, MG, utilizando armadilhas luminosas HP, de março de 2015 a fevereiro de 2016.....	67
Tabela 6: Distribuição de flebotomíneos capturados por mês e bairro no município de Ipatinga, utilizando armadilhas luminosas HP, no período de março de 2015 a fevereiro de 2016.	69
Tabela 7: Variáveis climáticas mensais no município de Ipatinga, MG, entre os meses de março de 2015 a fevereiro de 2016.....	70
Tabela 8: Amostras de “pools” positivos para Le. infantum de acordo com a espécie de flebotomíneo capturado no período de março de 2015 a fevereiro de 2016, no município de Ipatinga, MG.....	73

Tabela 9: Inquérito canino/demanda espontânea realizados em cães domiciliados na área urbana do município de Ipatinga, MG, de março de 2015 a fevereiro de 2016.....75

Tabela 10: Discriminação de resultados do inquérito canino e demanda espontânea realizado em cães domiciliados na área urbana do município de Ipatinga, MG, de março de 2015 a fevereiro de 2016.....75

Tabela 11: Detecção de positividade através de diagnóstico molecular (PCR) e parasitológico (imprint/esfregaço e cultura) de amostras de biópsias de cães soropositivos, provenientes de Ipatinga, MG.....79

Tabela 12: Distribuição dos casos de LVH, georreferenciados na cidade de Ipatinga, MG, em 2015 e 2016.....85

Tabela 13: Distribuição do número de flebotomíneos capturados por bairro estudado, do número de cães reagentes nos dois testes sorológicos, e dos casos de LVH e óbitos por ela causados, ocorridos em Ipatinga, MG, em 2015 e 2016.....86

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a.C: antes de Cristo
AM IL: antimoniato de meglumina intralesional
 μ L: microlitro
CCZ: Centro de Controle de Zoonoses
CE: Ceará
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DPP: Dual Path Plataform
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz
FML: ligante manose-fucose
FUNASA: Fundação Nacional de Saúde
FUNED: Fundação Ezequiel Dias
GPS: Sistemas de Posicionamento Global
HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana
IDH-M: Índice de Desenvolvimento Humano Municipal
IBAMA: Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICA: Índice de cobertura arbórea
INMET: Instituto Nacional de Meteorologia
IRR: Instituto René Rachou
KDNA: Kinetoplast DNA
Km²: Quilômetro quadrado
LnPCR: Leishmania Nested PCR
LT: Leishmaniose Tegumentar
LDPC: leishmaniose dérmica pós-calazar
LV: Leishmaniose Visceral
LVC: Leishmaniose Visceral Canina
LVH: Leishmaniose Visceral Humana
MG: Minas Gerais

MS: Ministério da Saúde
MS: Mato Grosso do Sul
MT: Mato Grosso
OMS: Organização Mundial de Saúde
Pb: pares de bases
PCLV: Programa de Controle da Leishmaniose Visceral
PCA: Porcentagem de cobertura arbórea
PCR: Polimerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PNUD: Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
PI: Piauí
PM: Peso molecular
pmol: pico mols
RIF: Reação de Imunofluorescência Indireta
RJ: Rio de Janeiro
RMBH: Região Metropolitana de Belo Horizonte
SBAU: Sociedade Brasileira de Arborização Urbana
SIG: Sistema de Informação Geográfica
SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SMF: Sistema Mononuclear Fagocitário
SP: São Paulo
SRD: Sem raça definida
TMI: Taxa mínima de infecção natural
TO: Tocantins
SSUrRNA: Small subunit Ribossomal RNA
UF: Unidades da Federação
UV: ultravioleta
WHO: World Health Organization
ZPAM: Zonas de Proteção Ambiental

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Leishmaniose Visceral Visceral	21
1.2 O vetor	23
1.2.1 Fatores que influenciam a transmissão da LV	26
1.3 Reservatórios	29
1.4 Leishmaniose Visceral Canina	31
1.5 Epidemiologia e controle da LV	33
1.6 Geoprocessamento como ferramenta de monitoramento e controle de doenças parasitárias	36
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo Geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Área de estudo	40
4.2 Critérios de inclusão para exposição das armadilhas entomológicas	42
4.3 Descrição Epidemiológica dos bairros estudados	44
4.4 Estudo da fauna de flebotomíneos	49
4.5 Análise estatística das variáveis climáticas na densidade vetorial	51
4.6 Estudo da infecção natural dos flebotomíneos	52
4.6.1 Extração de DNA total das fêmeas de flebotomíneos capturadas	52
4.6.2 Detecção da taxa de infecção natural de flebotomíneos por <i>Leishmania</i> spp	52
4.6.3 Análise dos produtos amplificadas pela PCR	54
4.6.4 Sequenciamento SSUrRNA para determinação da espécie de <i>Leishmania</i> nos flebotomíneos	54
4.6.5 Cálculo da taxa mínima de infecção natural	55

4.7 Inquérito sorológico canino	55
4.8 Diagnóstico sorológico canino, eutanásia e necropsia dos cães soropositivos	56
4.8.1 Cálculo da taxa de soropositividade da LVC	57
4.9 Diagnóstico parasitológico direto das amostras de cães soropositivos	57
4.9.1 Cultura em ágar sangue de Novy & Mc Neal, modificado por Nicolle (NNN/LIT)	57
4.9.2 Aposições em lâminas de biópsias obtidas de cães soropositivos	58
4.9.3 PCR para Leishmania spp. em tecidos de cães soropositivos	58
4.9.4 Sequenciamento SSUrRNA para determinação da espécie de Leishmania nos cães soropositivos	59
4.10 Georreferenciamento dos casos humanos, caninos e pontos de capturas entomológicas	59
4.10.1 Levantamento, caracterização e georreferenciamento de casos caninos	59
4.10.2 Levantamento, caracterização e georreferenciamento de casos humanos	60
4.10.3 Georreferenciamento dos pontos de capturas entomológicas	60
4.11 Análise estatística dos testes diagnósticos caninos	60
5 RESULTADOS	61
5.1.1 Fauna	61
5.1.2 Influência das variáveis climáticas na densidade vetorial	70
5.1.3 Estudo da infecção natural de flebotomíneos	72
5.2 Inquérito sorológico	74
5.2.1 Taxa de soropositividade da LVC	74
5.2.2 Retirada dos cães com LVC em Ipatinga	76
5.3 Análise do diagnóstico parasitológico	76
5.3.1 Cultura em ágar sangue de Novy & Mc Neal, modificado por Nicolle (NNN/LIT)	76

5.3.2 Detecção de Leishmania em posições de biópsias de cães soropositivos em lâminas	77
5.4 Análise do diagnóstico molecular	78
5.4.1 Detecção de Leishmania através da PCR	78
5.5 Análise simultânea dos métodos diagnósticos utilizados	79
5.6 Sequenciamento SSUrRNA para determinação da espécie de Leishmania nos flebotomíneos e nos cães soropositivos	79
5.7 Análise estatística dos testes diagnósticos caninos	79
5.8 Georreferenciamento e Análise espacial	80
5.8.1 Distribuição espacial dos domicílios com casos caninos e humanos de LV e os pontos de capturas entomológicas em Ipatinga	80
5.8.2 Distribuição espacial dos casos humanos de LV em Ipatinga	83
5.9 Síntese dos dados entomológicos, caninos e humanos	85
6 DISCUSSÃO	86
7 CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS	103
ANEXOS	124
Anexo 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	124
Anexo 2 – Licença do Comitê de Ética no uso de animais	125
Anexo 3 – Ficha epidemiológica de necrópsia	126
Anexo 4 – Informações do banco de dados	129
Anexo 5 – Exemplos de alinhamentos de amostras positivas de flebotomíneos e de cães com sequências de Leishmania depositadas no GenBank	133
Anexo 6 – Artigo científico: “Ecoepidemiological aspects of visceral leishmaniasis in an endemic area in the Steel Valley in Brazil: an ecological approach with spatial analysis”	134

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças de grande importância no contexto da saúde pública mundial, levando a Organização Mundial da Saúde (OMS) a incluí-la entre as seis doenças consideradas prioritárias em seu programa de controle (WHO, 1990).

Trata-se de uma zoonose que acomete os seres humanos e outras espécies de mamíferos, sendo transmitida através da picada de flebotomíneos infectados com parasitos do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Somente as fêmeas participam diretamente do processo de transmissão, uma vez que são hematófagas (FORATTINI, 1973).

De acordo com Killick-Kendrick (1991), os flebotomíneos são dípteros da família Psychodidae; subfamília Phlebotominae, e os de importância médica pertencem aos gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo. Entretanto, existe outra proposta de classificação que inclui uma diversidade de gêneros envolvidos na transmissão das leishmanioses (GALATI, 2003).

Neste trabalho iremos adotar a abreviação das espécies de acordo com Marcondes et. al (2009), na qual escreve-se as duas primeiras letras do epíteto genérico para abreviação de espécie, ao invés de somente uma letra.

No Novo Mundo, são descritas duas formas clínicas básicas: a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV), cada uma com um perfil epidemiológico distinto. Os sintomas clínicos das leishmanioses variam consideravelmente, dependendo da espécie de *Leishmania*, da resposta individual, da distribuição geográfica, dos hospedeiros e vetores envolvidos, dentre outros fatores (MARZOCHI & MARSDEN, 1991). A LV é a forma considerada mais grave devido a sua ampla distribuição geográfica e alta letalidade, sendo uma doença crônica grave e potencialmente fatal para o homem, quando não se institui o tratamento adequado (GONTIJO & MELO, 2004).

Nas Américas, as leishmanioses ocorrem desde o México até a Argentina, sendo que o Brasil está entre os seis países que concentra mais de 90% dos casos no mundo (SOUZA GOMES, 2017). A LV está notificada em quase todos os estados brasileiros, exceto o Acre (SINAN, 2018). Em 2009, o Rio Grande do Sul registrou o primeiro caso de leishmaniose visceral humana (LVH) em São Borja (Nota Técnica conjunta Nº 01/2014 – CEVS – IPB-LACEN – SES/RS Leishmaniose Visceral no estado do Rio Grande do Sul); em 2015, houve o primeiro caso autóctone no Paraná, em Foz do Iguaçu (Nota técnica NT/SESA/CEVADVDTV/2018. Vigilância Epidemiológica da leishmaniose visceral humana no Paraná); em 2017, Santa Catarina registrou o primeiro caso autóctone de LVH (Nota Técnica Conjunta de Leishmaniose Visceral Humana Nº03/SMS/DVS/GVE/2017). Nesses estados, até poucos anos atrás, não havia registros de casos humanos autóctones de LV.

Sob o ponto de vista epidemiológico, diversos fatores contribuem para a modificação na distribuição da doença, como invasão de focos zoonóticos pelo homem, 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, AFONSO et al., 2010).

Além disso, o crescimento desordenado das cidades, que culmina na destruição do meio ambiente, tem sido apontado como principal causa das condições adequadas para ocorrência da LVH na área urbana (FUNASA, 2002), e por último, a carência de informação e treinamento adequados para os profissionais da saúde, levando atraso na identificação de casos.

1.1 Leishmaniose Visceral (LV)

A forma clínica da leishmaniose onde ocorre a visceralização do parasito é conhecida por leishmaniose visceral (LV) ou calazar, uma enfermidade de evolução crônica, caracterizada por febre irregular, hepatoesplenomegalia,

linfadenopatia, anemia e uma debilidade progressiva, que pode levar o paciente à morte se este não receber o tratamento específico (WHO/TDR, 2007). A leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC), uma forma distinta comum na Índia, se caracteriza por manifestações cutâneas que surgem após o tratamento e cura da leishmaniose visceral clássica (ASHFORD, 2000).

A LV foi descrita primariamente na Grécia em 1835, quando então foi denominada “ponos” ou “hapoplinacon”. Em 1869, na Índia, recebeu o nome de “kala-jwar” ou Kala-azar, em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele nos acometidos, sendo essa característica o tipo clássico da doença, denominada doença negra. William Leishman (1900) identificou um protozoário no baço de um soldado que faleceu na Índia, em decorrência de uma febre local conhecida como febre “Dum-dum” ou “Kala-azar. Donovan (1903) encontrou o mesmo parasito em outro paciente. Porém, o nome do gênero *Leishmania* foi criado pelo médico inglês Ronald Ross em homenagem a seu descobridor (PESSOA, 1958).

No mundo existem dois ciclos de transmissão da LV: o zoonótico, no qual o vetor realiza o repasto em um reservatório animal e transmite o parasito ao homem; e o antroponótico, encontrado em áreas de transmissão de *Leishmania donovani* (CHAPPUIS et al., 2007), onde a doença é transmitida pelo vetor de homem para homem, que é o caso da Índia. Nas Américas, 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 domésticos do parasito (ALVAR et al., 2004).

O primeiro registro de caso autóctone da LV no território brasileiro foi realizado por Migone, em 1913, onde descreveu o caso em material de necrópsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso (MIGONE, 1913). Em 1934, Penna relatou o primeiro caso de LV no Brasil quando foram observados cortes histológicos de fígado de pessoas que vieram a óbito com suspeita de febre amarela. Em 1955, Deane & Deane, publicaram um estudo clássico sobre a epidemiologia da doença no estado do Ceará, quando houve o primeiro surto da doença.

No Brasil, a transmissão da LV se dá através da picada das fêmeas de *Lu. longipalpis* infectados pela espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*. Entretanto, em 1998, *Lutzomyia cruzi* foi considerada a espécie vetora de LV nos municípios de Ladário e Corumbá (MS) (SANTOS et al., 1998; ELKHOURY, 2005; LAINSON & RANGEL, 2005). Alguns autores acreditam na transmissão entre cães através de ectoparasitos, sugerindo a capacidade vetorial de pulgas e carrapatos (COUTINHO & LINARDI, 2007; PAZ et al., 2010). Outros autores sugerem que a transmissão possa ocorrer através de mordeduras, cópula ou transmissão vertical entre os cães, porém não existem evidências sobre a importância epidemiológica destes mecanismos de transmissão (SILVA et al., 2009).

A sintomatologia da doença humana é semelhante a de outras doenças, como febre amarela, doença de chagas, malária, toxoplasmose, esquistossomose, o que dificulta o diagnóstico correto e em tempo hábil para obtenção da cura. Quando presentes, os sintomas podem se agravar progressiva ou bruscamente: febre intermitente, 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 et al., 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).

1.2 Vetor

Os flebotomíneos são insetos cor-de-palha ou castanho-claro, de pequeno porte (2 a 3 mm), olhos proeminentes, arredondados e bem separados, e as antenas são longas, formadas por 16 segmentos. O corpo é coberto de cerdas, sendo facilmente reconhecidos pela posição de pouso, asas se mantêm divergentes em posição semiereta, conferindo-lhe característica peculiar (FORATTINI et al., 1973).

Vários nomes populares podem ser atribuídos aos vetores, segundo os países, estados e regiões, como: mosquito palha, asa dura, asa branca,

tatuquira, birigui, cangalha, cangalhinha, ligeirinho, pela égua, arrupiado (REBÊLO, 1999). Taxonomicamente pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, e a vários gêneros de importância médica (GALATI, 2003).

O ciclo de vida dos flebotomíneos é constituído de ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto, sendo, portanto, holometábolos. As larvas são terrestres e bastante ativas, movimentando-se com rapidez para buscar alimento, com isso, provavelmente, se disseminam em uma grande área (SHERLOCK, 2003). Apesar de se conhecer os hábitos alimentares das formas imaturas, pouco se sabe sobre os criadouros naturais das larvas de flebotomíneos no Novo Mundo. O conhecimento específico desses locais de criação pode facilitar o controle destes vetores, respondendo algumas lacunas existentes (FELICIANGELI, 2004).

Atualmente existem duas classificações taxonômicas dos flebotomíneos das Américas. A primeira foi proposta por Young & Duncan (1994), intitulada "Guia para identificação e distribuição geográfica de *Lutzomyia* no México, América do Sul e Central e oeste da Índia". Nesta proposta, os autores subdividem aproximadamente 400 espécies do gênero *Lutzomyia* em 15 subgêneros e 11 grupos de espécies. Esta classificação é bastante prática e prioriza a identificação a partir da observação de estruturas essenciais como: genitália masculina, genitália feminina e espermateca, cibário em fêmeas, presença ou não de espinhos femurais, tamanho dos segmentos da antena, entre outras. Já Galati, em 2003, propôs uma nova abordagem para classificação de flebotomos do Novo Mundo, onde são relatadas aproximadamente 264 espécies de flebotomíneos sul-americanos, sendo que mais de 243 já foram registradas no Brasil. Nesta, a autora utiliza caracteres morfológicos, priorizando o uso das cerdas ao longo do corpo do inseto, além das outras estruturas para uma melhor distribuição entre os grupos. Alguns grupos e subgêneros anteriores à classificação foram elevados a gênero, mas a maior mudança ficou na fragmentação do gênero antes conhecido como *Lutzomyia* (BEATI et al., 2004). Esta recente classificação publicada em

“Flebotomíneos do Brasil” (RANGEL & LAINSON, 2003), traz alterações na classificação de quase todas as espécies em relação à publicação anterior.

Das espécies encontradas no Brasil, 19 delas são vetoras de leishmanioses no país (SANTOS et al., 1998; RANGEL & LAINSON, 2003). Em apenas nove anos após esta publicação, o número de espécies descritas de flebotomíneos no mundo praticamente dobrou, atingindo o patamar de 927 espécies conhecidas, sendo que 260 delas ocorrem no Brasil (SHIMABUKURO & GALATI, 2011).

Os flebotomíneos utilizam como abrigos uma grande variedade de locais, com pequena variação de temperatura e umidade, pouca ou nenhuma luminosidade e movimentação de ar, o que favorece a presença destes insetos (AGUIAR & MEDEIROS, 2003). Podemos encontrá-los em espaços existentes entre folhas caídas e o solo, tocas de animais, etc (AGUIAR et al., 1985; ALEXANDER et al., 1992; AZEVEDO et al., 1993).

Em estudo realizado na região semiárida da Bahia, a ocorrência de criadouros em microambientes específicos foi investigada em amostras de solo coletadas de casas, que foram utilizadas também para o levantamento da população de adultos. Todos os microambientes amostrados no estudo foram identificados como criadouros naturais. As formas imaturas de flebotomíneos foram encontradas em 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 das residências. Flebotomíneos adultos também foram capturados nos mesmos locais, tanto no intra como no peridomicílio (SANGIORGI et al., 2012).

Os flebotomíneos em geral, permanecem durante a maior parte do dia em seus abrigos, iniciando sua atividade durante à tarde ou à noite (BRAZIL & BRAZIL, 2003). Sabe-se que existe uma variação entre espécies, sendo que umas preferem o fim da tarde, outras o início da noite ou mesmo a madrugada (GALATI et al., 1996; TEODORO et al., 1993). Em função de sua hematofagia para maturação dos ovários, as fêmeas possuem probóscide desenvolvida, do tipo picador-pungitivo, constituída de um labro e um par de mandíbulas,

hipofaringe, um par de maxilas e um lábio. Já os machos possuem mandíbulas rudimentares (GALATI, 2003).

A espécie *Lu. longipalpis* é considerada a principal vetora de *Le. infantum* no Novo Mundo, embora as espécies *Lu. evansi* (Nuñez-Tovar, 1924) (ZULUETA et al., 1999; TRAVI et al., 1990) e *Lu. cruzi* (Mangabeira, 1938) (SANTOS et al., 1998) sejam implicadas como possíveis vetoras em áreas restritas, na Colômbia e no Brasil, respectivamente. 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).

Muitas espécies têm sido incriminadas na transmissão da LT, porém somente algumas têm sido consideradas importantes vetoras, com base no grau de antropofilia, infecção natural por *Leishmania* e distribuição espacial coincidente com a da doença (RANGEL & LAINSON, 2003). Os principais flebotomíneos transmissores da LT no Brasil são *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Lutz & Neiva, 1912); *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939); *Lutzomyia migonei* (França, 1920); *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *umbratilis* (Ward & Fraiha, 1977); *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) *wellcomei* (Fraiha, Shaw & Lainson, 1971); *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *flaviscutellata* (Mangabeira, 1942). Embora ainda não tenha sido comprovado o papel da *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* e *Lutzomyia* (*Pintomyia*) *fisheri* como vetores da LT, estas espécies têm sido encontradas com frequência em ambientes domiciliares em áreas de transmissão da doença (BRASIL, 2010a).

1.2.1 Fatores que influenciam a transmissão da LV

As variáveis climáticas podem influenciar na densidade vetorial, e consequentemente na transmissão da LV. Assim, o padrão de sazonalidade dos flebotomíneos vem sendo estudado há bastante tempo. Segundo Dias-Lima et al. (2003), os flebotomíneos apresentam uma nítida variação sazonal,

sendo que as chuvas em níveis moderados, temperatura, insolação e evaporação mais baixos e umidade alta, favorecem o aumento da densidade de flebotomíneos. Nos estados do Ceará, Bahia, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais foram observadas maiores densidades populacionais de flebotomíneos durante a estação chuvosa (DEANE, 1956; SHERLOCK & GUITTON, 1969; GALATI et al., 1997; BARATA et al., 2004; MONTEIRO et al., 2005). Outros autores observaram que há um aumento na densidade desses insetos após o período de chuvas (MISSAWA & DIAS, 2007; DIAS et al., 2007; MICHALSKY et al., 2009a).

Em áreas tropicais, a densidade populacional de flebotomíneos aumenta durante ou após períodos chuvosos, pois é a alta umidade resultante das primeiras chuvas que proporciona a eclosão dos ovos, como também há maior atividade destes insetos fora de seus abrigos nesse período (ALMEIDA et al., 2010). Em contrapartida, é comum haver uma redução populacional durante longos períodos secos (TESH, 1998), o que configura um complexo dependente de fatores bióticos, físicos e ambientais (LEWIS, 1974).

O estudo da variação sazonal da fauna flebotomínica se faz necessário para melhor compreensão da biologia do vetor, da sua importância epidemiológica na transmissão da LV, da relação entre a espécie e seu hábitat, podendo contribuir no estabelecimento de medidas de controle da leishmaniose, visando a redução da densidade populacional de flebotomíneos em determinados locais (MACEDO et al., 2008).

Outro fator que influencia a transmissão da LV é a abundância de *Lu. longipalpis* em áreas urbanas. Esta espécie é encontrada em abundância em áreas de alta vulnerabilidade (VIANNA et al., 2016). Diversos fatores são determinantes para o encontro de alto número de flebotomíneos capturados, como: baixa condição socioeconômica da população, ambiente propício para reprodução dos flebotomíneos, com acúmulo de matéria orgânica, árvores frutíferas e presença de animais domésticos (LIMA, 1986; XIMENES et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2012).

A presença de *Lu. longipalpis* no meio urbano se deve principalmente a

sua alta adaptabilidade ao ambiente modificado pelo homem, o que lhe confere um papel importante na epidemiologia da LV. Além disso, esta espécie tem ampla distribuição geográfica ao longo do país, que em geral, coincide com a da LV (GALATI, 2003; MISSAWA & DIAS, 2007).

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 (LAINSON & RANGEL, 2003). Sabe-se que existe uma correlação entre a densidade de *Lu. longipalpis* e as condições observadas no peridomicílio e que esta espécie de flebotomíneo é frequentemente associada à presença de animais domésticos (LIMA, 1986; XIMENES et al., 1999; CAMARGO-NEVES et al., 2001; MORENO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2012).

Geralmente, a maior parte dos exemplares é encontrada no peridomicílio, mas é importante salientar a presença de um número considerável de flebotomíneos no interior das residências, ilustrando o caráter endofílico desta espécie, indicando que a transmissão da LV pode estar ocorrendo no ambiente intradomiciliar (SOUZA et al., 2004; BARATA et al., 2005; MONTEIRO et al., 2005; MICHALSKY et al., 2009 a, DIAS et al., 2011).

Já o caráter antropofílico de *Lu. longipalpis* pode ser evidenciado pelo seu hábito alimentar eclético, pois as fêmeas desta espécie invadem o domicílio e peridomicílio das habitações com facilidade e rapidez, alimentando-se de sangue do homem, de cão, de galinha, de equídeos, suínos e caprinos (SHERLOCK & GUITTON, 1969; PASSOS-DIAS et al., 2003; MISSAWA et al., 2008). O caráter oportunista, podendo sugar ampla variedade de vertebrados, foi também relatado em Porteirinha, MG, (BARATA et al., 2005), onde foi observada a preferência de fêmeas de *Lu. longipalpis* por aves e cavalos, mas também se alimentando de sangue de roedores, cães, bois e do homem.

Diversos inquéritos entomoepidemiológicos realizados em Minas Gerais (MG) revelaram a predominância de *Lu. longipalpis* em áreas endêmicas para LV, mostrando sua alta adaptação ao ambiente modificado pelo homem (DIAS et al., 2007; MONTEIRO et al., 2005, LARA-SILVA et al., 2015; VIANNA et al.,

2016). Semelhantemente, Garcez et al. (2010) em Juruti, Pará, revelaram a presença de reservatórios domésticos infectados e alta abundância de *Lu. longipalpis*. Em outro estudo, no mesmo município, *Lu. longipalpis* foi a espécie mais abundante e sua distribuição sazonal foi correlacionada com o aumento da precipitação. Além disso, esta espécie foi encontrada no intradomicílio infectada por *Leishmania* sp., sugerindo que a LV estava sendo transmitida dentro da residência (CHAGAS et al., 2016).

1.3 Reservatórios

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

No ambiente silvestre, os reservatórios da *Leishmania infantum* são principalmente raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) (DEANE, 1956; LAINSON et al., 1990) e marsupiais (*Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis*) (SHERLOCK, 1996; CORREDOR et al., 1989). Nas regiões rurais, periurbanas e urbanas, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é o principal reservatório do parasito para o homem (DEANE & DEANE, 1955; ABRANCHES et al., 1991; RAMIRO et al., 2003; ALVAR e al., 2004; REIS et al., 2009).

Os

cães apresentam elevado parasitismo cutâneo observado até mesmo nos animais assintomáticos que são considerados, dessa maneira, importantes

reservatórios domésticos do parasito (DEANE & DEANE, 1955; MADEIRA et al., 2004; GIUNCHETTI et al., 2006; MICHALSKY et al., 2007; NUNES et al., 2010; DE QUEIROZ et al., 2011).

A alta prevalência da infecção canina em áreas endêmicas, estreita convivência entre humanos e cães e mesma identidade dos parasitos isolados de casos humanos e caninos, reforçam a participação destes animais como reservatórios da infecção (Oliveira et al., 2001).

Segundo CALDAS et al. (2002), os roedores constituem um dos grupos de animais sinantrópicos mais procurados pelos flebotomíneos. Um estudo em uma área endêmica de LT e LV mostrou que as espécies *Rattus rattus* e *Thrichomys apereoides* foram encontrados naturalmente infectados por espécies de *Leishmania* (OLIVEIRA et al., 2005). Evidências epidemiológicas indicam roedores em geral, como possíveis reservatórios de *Le. infantum*, constituindo um importante elo entre o ambiente silvestre e o domiciliar (CORREDOR et al., 1989). *R. rattus* foi encontrado naturalmente infectado por *Le. donovani* e *Le. infantum* no Velho Mundo (IBRAHIM et al., 1992; DI BELLA et al., 2003); e por *Le. mexicana*, *Le. braziliensis*, e *Le. complexus donovani* no Novo Mundo (ALENCAR et al, 1990; LARA-SILVA et al, 2014; OLIVEIRA et al, 2005; ZULUETA et al, 1999). Assim, os resultados sugerem que *R. rattus* é um potencial reservatório para leishmânias que causam tanto LT e LV. Gatos também têm sido encontrados naturalmente infectados (SAVANI et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2009), mas pouco se sabe sobre a importância epidemiológica desses felinos como reservatórios da *Le. infantum*.

A cadeia epidemiológica da LV inclui, numa área endêmica, a presença concomitante do vetor, do reservatório e do hospedeiro susceptível. O papel do cão na transmissão da LV no Brasil foi elucidado com os trabalhos de Deane & Deane (1954, 1955, 1956) em Sobral, Ceará, onde descreveram a leishmaniose visceral canina urbana e o papel definitivo do cão como reservatório doméstico. Mais tarde, diversos trabalhos reforçaram a importância do cão desempenhando tal papel (MADEIRA et al., 2004; GIUNCHETTI et al.,

2006; MICHALSKY et al., 2007; NUNES et al., 2010; DE QUEIROZ et al., 2011).

1.4 Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

O primeiro foco de leishmaniose visceral canina no mundo ocorreu em Túnis. Em 1908, na Tunísia, após Nicolle anunciar que havia conseguido infectar um cão jovem com o parasito da LV e verificar numerosos parasitos na medula dos mesmos, foi realizado um inquérito com 145 cães através do exame de esfregaços da medula óssea, onde foram encontrados três animais positivos. Dessa forma, ficou evidenciado que a doença ocorria naturalmente entre estes animais, fato este consolidado pelo encontro posterior de outros focos em outras regiões (GENARO, 1993).

Classicamente, a LVC inicialmente é acompanhada por febre, descamação e eczema, especialmente, no espelho nasal e na orelha. Muitas vezes apresentam pêlo opaco, pequenas úlceras rasas localizadas, frequentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações. Com a evolução da doença é comum ocorrer esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, onicogribose, ceratoconjutivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema das patas, vômito, além do aparecimento de áreas de hiperqueratose, especialmente na ponta do espelho nasal. Em geral, na fase final da infecção ocorrem a paresia das patas posteriores, caquexia, inanição e morte (DEANE & DEANE, 1955; GENARO, 1993; BRASIL, 2006).

Em função da variedade de sinais clínicos, os animais podem ser classificados em assintomático (ausência de sinais e sintomas clínicos sugestivos de infecção por Leishmania), oligossintomático (com até três dos sinais clínicos característicos da infecção) e polissintomático (mais de três sinais clínicos característicos da infecção). Porém esta classificação tem valor limitado, pois os pesquisadores a utilizavam com base nos resultados apenas de exame físico (MANCIANTI et al., 1988), não sendo considerada anormalidades e patologias clinicopatológicas nos cães que têm disfunção

orgânica generalizada sem manifestações aparentes (SOLANO-GALLEGO & BANETH, 2008). Assim, cães com infecção subclínica, ou cães infectados clinicamente saudáveis, são definidos como aqueles que não apresentam sinais clínicos no exame físico nem anormalidades clinicopatológicas nos testes de rotina (hemograma, butalbital e urinálise), mas têm infecção por *Le. infantum* confirmada.

A história natural e a evolução do calazar canino variam amplamente entre os animais infectados. Muitos cães nunca evoluem para doença, através de mecanismos não muito bem conhecidos de autocura, outros ficam gravemente afetados progredindo rapidamente para morte (GENARO, 1993). Geralmente, os cães infectados apresentam um acentuado emagrecimento; por outro lado, algumas vezes, apresentam-se aparentemente normais, mas com alto grau de parasitismo na pele íntegra e vísceras (DEANE & DEANE, 1955).

No Brasil, a prevalência da LVC vem aumentando, não só em número de casos, mas também na dispersão geográfica. No Brasil, do ponto de vista epidemiológico, normalmente a doença canina antecede o acometimento de casos humanos (MADEIRA et al., 2004; NUNES et al., 2010), sendo a infecção nos cães mais prevalente que nos humanos (DEANE & DEANE, 1955; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; GALIMBERTTI et al., 1999). Estudos destacam o cão no ciclo de transmissão da LV para o homem associados a altas taxas de soropositividade canina e presença de LV humana, numa determinada área (DEANE & DEANE, 1955; DYE et al., 1992).

O diagnóstico da LVC compreende a associação entre dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. Os testes laboratoriais são utilizados para evidenciar o parasito ou para detectar componentes da resposta imune, como anticorpos específicos ou reações do tipo celular. Os testes disponíveis incluem os métodos parasitológicos, imunológicos (sorológicos) e moleculares, cada um apresentando vantagens e desvantagens. Para o diagnóstico parasitológico de cães, o parasito é obtido a partir de aspirado de medula óssea, de baço, de fígado, de linfonodos, e em alguns casos, biópsias de pele íntegra. Entre os métodos sorológicos, existe uma grande variedade de métodos que empregam

diversos antígenos. Porém, ainda não está disponível um antígeno altamente específico e que seja de fácil execução.

Em 2011, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) preconizou a técnica de imunocromatografia rápida de duplo percurso Dual Path Plataform (DPP®), visando ao diagnóstico da LVC (Ministério da Saúde, 2011). Este teste consiste em uma proteína recombinante rK28 (uma quimera combinando os antígenos K9, K26 e K39) de *Le. infantum* (PATTABHI et al., 2010). Apesar dessas características e da facilidade de aplicação, a discussão sobre a precisão do DPP® persiste, especialmente quanto à sensibilidade para detecção de infecção assintomática dos animais (GRIMALDI et al., 2012). Ainda assim, é o teste de triagem preconizado pelo Ministério da Saúde, sendo os reagentes neste enviados para confirmação através do Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Em 2011, foram realizados trabalhos de validação desta técnica para diagnóstico da LVC, que se mostrou eficaz (SCHUBACH, 2012; QUEIROZ-JÚNIOR, 2011).

De acordo com Figueiredo et al. (2018) o desempenho do teste é dependente da sintomatologia canina. Resultados favoráveis para sensibilidade e especificidade podem ser obtidos mesmo em animais assintomáticos; no entanto, é preciso cautela nessas avaliações, uma vez que o teste imunocromatográfico pode ser melhorado para uma investigação mais adequada em cães assintomáticos. Em seus resultados, esses autores confirmaram a utilidade do DPP® para aplicação em pesquisas sorológicas.

1.5 Epidemiologia e controle da LV

Apesar de sua ampla distribuição, a notificação da LV só é obrigatória em 32 países (WHO, 2010). Colômbia, Bolívia, Equador, Peru, Venezuela e Brasil apresentam as prevalências mais elevadas (AGUILLAR et al., 1998; DAVIES et al., 2000).

Estima-se que a LV tem uma incidência de 500.000 novos casos e 60.000 mortes por ano (BELO et al, 2013), sendo que 90% dos casos ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Índia, Sudão, Sudão do Sul e Etiópia (Alvar et al., 2012; WHO, 2014a). Em um levantamento realizado em 2011, a maioria dos casos foi relatada em homens (61%), sendo a faixa etária mais afetada as crianças abaixo de cinco anos de idade (36,6%), seguida pela faixa entre 20 a 50 anos (30,9%) (PAHO, 2013).

Nas últimas décadas estudos demonstraram mudanças no perfil de transmissão da doença, que antes era considerada uma zoonose de animais silvestres e desde a década de 80, aproximadamente, está presente em zonas rurais desmatadas e regiões urbanas, sendo encontrada em bairros bastante urbanizados de grandes cidades como Teresina (PI), São Luís (MA), Belo Horizonte e Montes Claros (MG), Campo Grande (BRASIL, 2009). Fortaleza (CE) apresentou grande número de casos em 2009 (309), contribuindo com a elevada letalidade da LV no estado (5,6% em 2008 e 5% em 2009) (CEARÁ, 2009; CEARÁ, 2011). 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).

Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos notificados de LV ocorreram na Região Nordeste. À medida que a doença se expandiu para as outras regiões e atingiu áreas urbanas e periurbanas, esta situação se modificou e, no período de 2000 a 2002, a Região Nordeste apresentou uma redução para 77% dos casos do país (BRASIL, 2006). A proporção dos casos confirmados de LV no país aumentou nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Norte. A região Sul, embora com aumento, mantém um número pequeno de casos autóctones de LV (BRASIL, 2010b).

De acordo com o Ministério da Saúde as ações de controle para LV devem ser baseadas em uma 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.

Além disso, a vigilância epidemiológica é um dos componentes do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV), ela compreende a vigilância entomológica, de casos humanos e caninos.

No Brasil, o tratamento de primeira escolha para todas as formas da doença se faz através de antimoniais pentavalentes, de forma sistêmica. O antimoniato-N-metil glucamina (Glucantime) pode ser administrado no nível ambulatorial, diminuindo os riscos relacionados à hospitalização (COSTA et al., 2007); já a anfotericina B, é a única opção no tratamento de gestantes e pacientes que tenham contraindicações ou que manifestem toxicidade ou refratariedade em relação ao uso dos antimoniais pentavalentes (MISHRA et al., 1994).

Apesar dos cães portadores de *Leishmania* serem considerados, de uma forma geral, fonte de infecção para os flebotomíneos e grandes responsáveis pela persistência da LV em diversas regiões (ABRANCHES et al., 1991), esta questão ainda é polêmica e tem sido questionada por vários autores, tanto no Brasil quanto em outros países (ASHFORD, 1996; DIETZE et al., 1997; MAGALHÃES et al., 1980). Diante disso, recentemente, foi publicada a Nota Técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA autorizando o registro do produto milteforan (nome comercial da miltefosina), propriedade da empresa VIRBAC SAÚDE ANIMAL, para o tratamento da LVC, que pode ser realizado em clínicas veterinárias particulares. Trata-se de uma das drogas mais utilizadas na Europa para o tratamento da doença canina.

Além disso, como profilaxia da LVC, existe uma vacina disponível no mercado, e outras em fase de testes dentro dos laboratórios. Atualmente a Leish-Tec[®], que utiliza o antígeno proteico A2, é a única vacina anti-LVC licenciada pelas autoridades brasileiras de saúde pública, para a venda e administração por médicos veterinários, restrito ao uso individual (REGINA-SILVA et al., 2016).

Devido às dificuldades do controle da doença, é indicado o manejo ambiental adicionalmente à 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). Teodoro et al. (2003) mostraram que tanto a borrifação quanto a reorganização do ambiente contribuem significativamente para reduzir a densidade de flebotomíneos no domicílio e peridomicílio. Já Lara-Silva et al. (2017) mostrou que o manejo pode ser até mais efetivo que a borrifação. Assim, a limpeza de matéria orgânica acumulada no solo, representada por frutos e folhas em decomposição, corte de algumas árvores ao lado das residências e drenagem do solo com elevada umidade constituem medidas complementares que podem auxiliar no controle destes insetos.

É importante salientar que as medidas, aplicadas isoladamente, não se mostram efetivas para a redução da incidência da doença (BRASIL, 2006), então devem estar sempre integradas, para que se obtenha a eficiência desejada (GONTIJO & MELO, 2004). A efetividade destas ações depende de mudança de comportamento, que levam a resultados alcançados de médio à longo prazo (OLIVEIRA et al., 2008).

A complexidade do controle fica clara quando consideramos que existem "gaps" no conhecimento sobre 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 (FRANÇA-SILVA, 1997). Desta forma, as características particulares de cada elemento da cadeia de transmissão aliadas às várias situações epidemiológicas, têm mostrado que estratégias de controle devem ser flexíveis e designadas, especialmente, para cada área endêmica (MARZOCHI, 1992).

1.6 Geoprocessamento como ferramenta de monitoramento e controle de doenças parasitárias

A utilização de mapas relacionando-os com a distribuição geográfica de doenças teve início em um passado remoto. Hipócrates há 480 a.C no seu livro

“Dos ares, dos mares e dos lugares” destacou a importância do modo de vida dos indivíduos, analisou a influência dos ventos, água, solo e localização das cidades em relação ao sol, na ocorrência de doenças (MEDRONHO, 1995; COSTA & TEIXEIRA, 1999).

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

O geoprocessamento é um termo amplo, que envolve um conjunto de técnicas de coleta, tratamento de imagens e exibição de informações georreferenciadas que permitem identificar variáveis relacionadas às estruturas sociais, econômicas e ambientais que podem oferecer risco à saúde (MEDRONHO & PEREZ, 2002; BARCELLOS & BASTOS, 1996).

Dentre as tecnologias de georrefrenciamento se destacam: o sensoriamento remoto, a digitalização de dados, a automação de tarefas cartográficas, a utilização de Sistemas de Posicionamento Global – GPS, os Sistemas de Informações Geográficas – SIG e a utilização de modelos matemáticos inseridos na estatística espacial (KITRON, 1998; UMUNBO et al., 2002; MARGONARI et al., 2006). Com essas tecnologias disponíveis e integração de dados, pode-se realizar análise dos padrões de distribuição espacial e temporal das doenças; mapeamento das doenças; ecologia das doenças; e aplicação de conceitos geográficos ao planejamento para a localização e administração de serviços de saúde.

Muitas doenças podem ser entendidas desvinculadas da questão espacial, mas quando o processo de transmissão está ligado ao meio, como é o caso de algumas doenças parasitárias, neste caso a leishmaniose, não se pode deixar de entender o espaço. Este se coloca como ponto estratégico na construção dos eventos do ambiente que envolve as doenças.

Estudos utilizando técnicas de análise espacial permitem aos epidemiologistas o mapeamento de vetores e análises de fatores ambientais

que afetam a distribuição espacial e temporal dos insetos. Assim, diversos estudos foram realizados: com mosca Tsé-tsé, *Glossina* spp. (ROGERS, 1991), *Aedes* (MEDRONHO, 1995; GLEISER et al., 1997), *Anopheles gambiae* (THOMSON et al. 1997), *Phlebotomus papatasi* (CROSS et al., 1996), todos eles artrópodes de importância médica. Essas técnicas também têm sido utilizadas para monitorar doenças como malária, tripanossomíases e leishmanioses (ELNAIEM et al., 2003; THOMSON & CONNOR, 2000; UMUNBO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2001; MARGONARI et al., 2006; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006; ARAÚJO et al., 2013).

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

Diversos estudos em várias regiões do Brasil utilizaram análises espaciais para relacionar a LV com seus fatores determinantes (ambientais, socioeconômicos ou ocupacionais) (ANTONIALLI et al., 2007; WERNECK & MAGUIRE; 2002). Essas análises também têm sido realizadas para associar prevalência da doença canina com casos humanos (ARAÚJO et al., 2013; FRANÇA-SILVA et al., 2003; PRADO et al., 2011).

Assim, os métodos geocomputacionais demonstram extrema relevância para análise de um grande volume de dados de saúde, permitindo analisar os padrões de distribuição das doenças e as possibilidades de uso dos dados coletados.

2. JUSTIFICATIVA

Recentemente o município de Ipatinga foi caracterizado pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, como área de intensa

transmissão de LV, de acordo com o manual de Vigilância e Controle de LV. No período anterior ao ano de 2011 não havia sido notificado nenhum caso autóctone de LV no município, entretanto, de 2011 em diante, iniciou-se uma expansão progressiva de casos caninos e humanos, totalizando mais de 140 casos humanos entre 2011 e 2017, com óbitos ocorrendo em todas as faixas etárias.

O ano de 2014 obteve destaque devido ao grande número de casos notificados, mais de 40 casos (SINAN, 2018). Neste mesmo ano, o município entrou em contato com nosso laboratório para que fossem identificados exemplares de flebotomíneos capturados por eles. A partir de então, houve um interesse mútuo do município e do laboratório para estabelecer uma parceria para o estudo da LV em Ipatinga.

Diante do número crescente de notificações de casos humanos de LV e da carência de dados ecoepidemiológicos a respeito da doença no município, a proposta geral do projeto foi estudar, de forma conjunta, os vários aspectos relacionados à epidemiologia da LV (fauna flebotomínica, infecção natural, reservatório doméstico, além de casos humanos) em Ipatinga. Dessa forma, contribuir para a identificação das principais áreas de risco, podendo-se assim direcionar as ações de controle da LV no município de Ipatinga, área recente de transmissão intensa.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar os aspectos ecoepidemiológicos envolvidos na transmissão da leishmaniose visceral em área de alta transmissão do município de Ipatinga.

3.2 Específicos

a) Estudo de flebotomíneos

- Determinar a fauna de flebotomíneos das áreas selecionadas.

- Estabelecer a flutuação mensal das espécies de flebotomíneos e correlacioná-la com variáveis climáticas.

- Investigar a infecção natural dos espécimes capturados.

b) Estudo da leishmaniose visceral em cães

- Determinar a soropositividade da leishmaniose visceral canina nas áreas selecionadas.

- Investigar a infecção e identificar a espécie de *Leishmania* nas diferentes amostras dos cães soropositivos.

c) Epidemiologia descritiva

- Georreferenciar os casos humanos, caninos e os pontos entomológicos

- Demonstrar a distribuição espacial dos casos humanos e caninos de leishmaniose visceral na cidade de Ipatinga.

- Apontar as áreas de risco para transmissão da LV visando direcionar as ações de controle.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

Ipatinga é um município pertencente à região do Vale do Rio Doce, localizada a cerca de 210 km da capital mineira. Segundo a classificação de Köppen (1948), a região tem clima tipo Aw, com invernos secos e amenos (raramente frios) e verões chuvosos com temperaturas moderadamente altas. O município é banhado pelo ribeirão Ipanema, que deságua no Rio Doce e está situado na margem esquerda do Rio Piracicaba (IBGE, 2010). Quanto à cobertura vegetal, o Vale do Aço faz parte do Bioma Mata Atlântica classificado como formação de Floresta Estacional Semidecidual Montana (acima de 500m de altitude) e Submontana (abaixo de 500m de altitude) (UNILESTE, 2014). Desta vegetação, restam alguns fragmentos com plantações de eucalipto,

pastagens e núcleos urbanos. O maior remanescente de Mata Atlântica de MG, o Parque Estadual do Rio Doce, uma Unidade de Conservação com área de 36.970 hectares, está localizado no Vale do Aço nos municípios de Marliéria, Dionísio e Timóteo (UNILESTE, 2014).

O desenvolvimento da região deve-se às grandes empresas locais, como a Cenibra, a Aperam South America e principalmente a Usiminas, localizada no próprio município. A cidade faz parte da Região Metropolitana do Vale do Aço, que ultrapassa os 449.340 habitantes. Além das quatro principais cidades (Coronel Fabriciano, Ipatinga, Santana do Paraíso e Timóteo), há outras 22 no colar metropolitano. Apesar de ser a cidade mais populosa da Região Metropolitana do Vale do Aço, é a que possui a menor quantidade de bairros (32) dentre os três principais municípios; Coronel Fabriciano possui 63 e Timóteo 39. Segundo Dias (2013), a origem da cidade de Ipatinga é intrínseca ao momento político que o país vivia em meados de 1950 a 1960, marcado pela abertura a empresas estrangeiras e a industrialização. A implantação da Usiminas foi o marco que deu origem à cidade.

Segundo o Plano Diretor de Ipatinga, a cidade é composta por nove regionais, sendo oito localizadas no perímetro urbano e 32 unidades administrativas, sendo 28 bairros residenciais e comerciais somados a unidades não residenciais perfeitamente delimitadas como o parque industrial da Usiminas, Usipa, Parque Ipanema e Industrial, além de povoados rurais, de loteamentos e bairros não-oficiais (PREFEITURA MUNICIPAL DE IPATINGA, 2014). Segundo o IBGE (2010), o bairro mais populoso é o Canaã, localizado na Regional V, reunindo 28.284 habitantes, sendo seguido pelo Bethânia (Regional VI), com 27.857 pessoas, e pelo Veneza (Regional IV), com 20.793. Com 50,4 km², o Ipaneminha possuía a maior área, sendo que a Regional IX, a qual está situado, compõe a zona rural ipatinguense. A maior renda domiciliar média mensal era de R\$ 7.277,73, do bairro Castelo.

Em 2010, a população do município foi contada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 239.177 habitantes, sendo o décimo mais populoso do estado e apresentando uma densidade populacional de 1.445,1

habitantes por km². Segundo o censo de 2000, 48,98% da população eram homens (104.089 habitantes), 51,02% (108.407 habitantes) mulheres, 99,25% (210.895 habitantes) vivia na zona urbana e 0,75% (1.601 habitantes) estavam na zona rural. O Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDH-M) de Ipatinga é considerado elevado pelo Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD). Seu valor é de 0,806, sendo o trigésimo maior de todo estado de MG (em 853), o 169º de toda a Região Sudeste do Brasil (em 1666 municípios) e o 445º de todo o Brasil (entre 5.507 municípios). Considerando apenas a educação o valor do índice é de 0,901, enquanto o do Brasil é 0,849. O índice da longevidade é de 0,787 (o brasileiro é 0,638) e o de renda é de 0,729 (o do Brasil é 0,723). A cidade possui a maioria dos indicadores elevados e todos acima da média nacional segundo o PNUD.

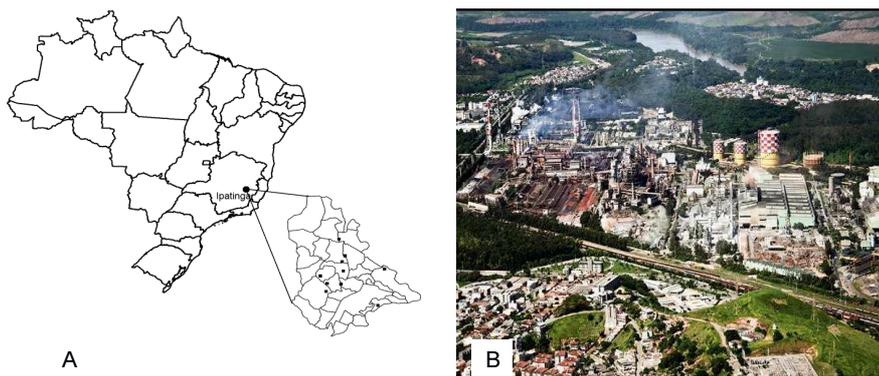


Figura 1: Município de Ipatinga, Minas Gerais (MG), Brasil. A) Localização geográfica, com destaque para os pontos de coleta entomológica por bairro. B) Vista aérea. Fonte: Letícia C. Pinheiro/Google.

4.2 Critérios de inclusão para exposição das armadilhas

Os critérios de inclusão para exposição das armadilhas luminosas foram residências com ocorrência de casos humanos de LV e/ou que possuíam condições ecológicas favoráveis para a presença do vetor. Assim, foram selecionados 10 bairros do município, onde havia o maior número de casos humanos de LV, para exposição das mesmas: Bethânia, Bom Jardim, Canaã, Cariru, Cidade Nobre, Ideal, Iguaçu, Esperança, Veneza, Vila Celeste. Esses bairros estão inseridos em seis das nove regionais (Regionais 1, 4 e 6 apresentam um bairro cada uma com armadilha, Regional 3 apresenta três bairros com armadilhas, Regionais 5 e 7 com dois bairros em cada com armadilhas). Assim, tiveram regionais com um, dois ou três bairros representados. A distribuição das regionais por bairro pode ser visualizada através do mapa abaixo (Figura 2).

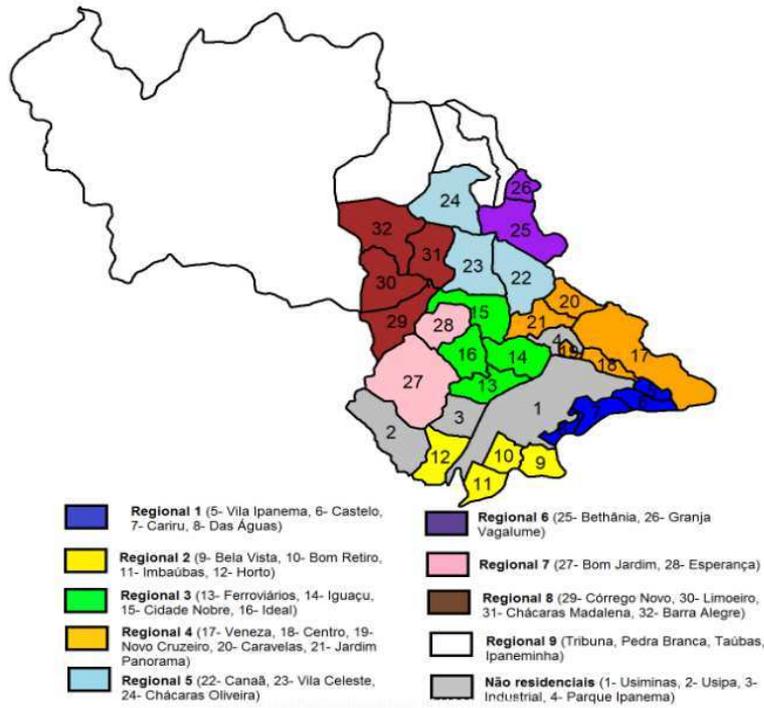


Figura 2: Delimitação de bairros e Regionais de Planejamento de Ipatinga, de acordo com o Plano Diretor da Prefeitura Municipal de Ipatinga, MG (2014). Fonte: Leticia C. Pinheiro e Rosana S. Lana

4.3 Descrição epidemiológica dos bairros estudados

De acordo com um estudo envolvendo cobertura arbórea do município por bairro e outras variáveis, realizado por Aza (2016), tomamos como base o valor de porcentagem de cobertura arbórea (PCA) calculado pela autora para fins deste estudo. Os resultados do PCA podem ser avaliados de acordo com o parâmetro proposto por Oke (1985) no qual a porcentagem da área urbana destinada à vegetação deve ser em torno de 30% a fim de proporcionar um

adequado balanço térmico. Também foram utilizados dados do IBGE (2010) de população, densidade demográfica e de renda domiciliar mensal média por bairro. A estimativa de cães por bairro foi calculada de acordo com Brito & Chamone (2001) em 13,5% da população humana.

Abaixo, seguem as características dos bairros estudados de acordo com a regional a qual estão inseridos, arborização e renda domiciliar média mensal.

Cariru (Regional 1)

O bairro Cariru pertence à Regional 1, juntamente com os bairros Vila Ipanema, Castelo, Cariru e Das Águas. Em 2010, o IBGE calculou uma população residente 4.756 habitantes e uma densidade demográfica de 39,55 habitante ha⁻¹. Em relação à população canina, é composta por aproximadamente 642 cães. O Cariru é diferente dos demais da regional, pois possui uma densidade de ocupação maior, construções mais verticalizadas dentro do máximo permitido pela legislação, possuindo cobertura arbórea nas praças, cinturão verde e acompanhamento viário. Em relação à configuração, densidade e disposição geométrica há uma predominância do tipo Conectado (caracterizado pela ampla cobertura vegetal e o mais alto grau de conectividade e contiguidade, com a presença de florestas remanescentes que normalmente se estabeleceram antes da urbanização) no entorno das instalações industriais da Usiminas.

O bairro Cariru, assim como os demais bairros da Regional 1, caracterizam-se pela uniformidade de urbanização basicamente residencial de classe média/alta, sendo a renda domiciliar média mensal entre 5 a 10 salários mínimos. A quase inexistência de lotes vagos, a baixa densidade demográfica em sua predominância de construções isoladas, em conjunto com a vegetação, configura uma paisagem bastante apreciada. Este bairro construído ao longo dos anos pela Usiminas, fazendo parte da Vila Operária, reflete a hierarquia da empresa, já que existem bairros construídos para dirigentes, engenheiros e

operários. Embora as casas sejam diferenciadas, todos possuem infraestrutura, com diversas praças e extensa cobertura arbórea ao redor (DIAS, 2013).

Com uma PCA de 25,27%, o bairro conta com a presença do cinturão verde (como os demais bairros da Vila Operária), que minimiza os efeitos das plumas de dispersão de poluentes, provenientes da atividade industrial da siderúrgica, bem como protege encostas e nascentes. Além disso, o cinturão verde é responsável pela redução da poluição sonora e do impacto visual da usina, e afasta a população da área industrial através da sua cobertura arbórea densa (AZA, 2016).

Ideal, Cidade Nobre e Iguaçu (Regional 3)

O bairro Ideal possuía 9.703 habitantes, com densidade demográfica média de 53,95 habitante ha-1 (IBGE, 2010). A população canina estimada é de 1310. O bairro Ideal, construído na década de 80 para atender uma nova demanda habitacional para funcionários da usina, tem PCA de 29,39%, enquanto o do bairro Castelo, destinado a funcionários com altos cargos de chefia é de 54,77% (AZA, 2016).

Já os bairros Cidade Nobre e Iguaçu, são bairros com características de urbanização já consolidada, crescimento desordenado e padrão de ocupação denso. A população do bairro Cidade Nobre foi de 15.198 habitantes, densidade demográfica de 64,93 habitante ha-1, a população canina estimada é de 2052; e no Iguaçu a população foi de 16.908 habitantes, com densidade demográfica de 78,37 habitante ha-1, a população canina estimada é de 2283, refletindo PCA menores: 12,23% e 9,22% respectivamente (AZA, 2016).

Nesses três bairros, a renda domiciliar média mensal é entre 2 a 5 salários mínimos. Porém, é importante ressaltar que o bairro Iguaçu é dividido em duas regiões que se diferem muito quanto ao poder aquisitivo. A região conhecida como "Morro do Game", no Iguaçu, onde foi realizada a coleta entomológica, é uma região periférica, altamente marginalizada, com muitas casas humildes e pessoas com menor poder aquisitivo em relação à outra

parte do bairro Iguaçu - uma região mais nobre, próxima à área comercial e melhor infraestrutura. Portanto, é possível que a renda domiciliar média mensal nessa área seja menor que a estipulada pelo censo.

Veneza (Regional 4)

Apesar do bairro Veneza, junto com Canaã, Bethânia, Bom Jardim e Vila Celeste concentrar quase metade da população ipatinguense, o bairro possui a PCA satisfatória, com 31, 44% (AZA, 2016). Extraoficialmente, os moradores dividem o bairro em "Veneza I" e "Veneza II", somando quase 21 mil habitantes, com densidade demográfica de 34,64 habitante ha-1. A população canina estimada é de 2807 e a renda domiciliar média mensal é de até dois salários mínimos (IBGE, 2010).

Canaã e Vila Celeste (Regional 5) e Bethânia (Regional 6)

A regional 5, conta com uma população residente de 47.542 habitantes e uma densidade demográfica média de 4.792,54 habitantes/km², chegando a 9.159 habitantes/km² em alguns setores censitários dos bairros Canaã e Vila Celeste. O bairro Vila Celeste possui população canina de aproximadamente 2416 e tem PCA de 15,74%, enquanto o Canaã é o bairro mais populoso de Ipatinga, com população canina de aproximadamente 3818, e possui o menor PCA registrado no município, ou seja, somente 8,84% de sua área coberta por vegetação arbórea (AZA, 2016). A alta densidade demográfica nesses bairros culminou no adensamento construtivo, na vegetação dispersa, fragmentada e de baixa densidade de cobertura. As árvores são encontradas isoladas e restritas, isto é, em um terreno baldio, quintais ou nas vias públicas. No Canaã, em algumas avenidas principais a arborização é do tipo linear, com formato estreito, alongado e composto por uma linha de árvores mais ou menos paralelas. As calçadas estreitas de várias vias não se adequam à arborização, o que gera problemas com a fiação, residência e calçamento. A densidade

demográfica dos bairros Vila Celeste e Canaã mostra uma região urbana altamente construída e típica de zonas de baixa renda (AZA 2016).

O bairro Bethânia possui 27.857 habitantes, densidade demográfica de 85,48 habitante ha-1, a população canina estimada é de 3761, e possui PCA de 14,18%. A vegetação também é dispersa, fragmentada e de baixa densidade de cobertura (AZA, 2016).

Os bairros Canaã, Vila Celeste e Bethânia formam o conjunto urbano de maior extensão territorial do município, e que passou por um acelerado processo de adensamento populacional e crescimento desordenado na década de 80, refletindo o mau uso do solo, que influencia na qualidade de vida urbana. Dessa forma, a vegetação como elemento paisagístico é relativamente pouco presente nesses bairros, não constituindo a cobertura arbórea uma característica do local, como é o caso dos bairros da Regional 1. A renda domiciliar média mensal nesses bairros é de até dois salários mínimos (AZA, 2016).

Bom Jardim e Esperança (Regional 7)

Segundo o IBGE (2010), o bairro Bom Jardim possuía população de 19.413 habitantes, com densidade demográfica de 33,77 habitante ha-1, sendo a população canina estimada de 2621. O conjunto de bairros próximos ao limite com Coronel Fabriciano e a zona rural, onde Bom Jardim está situado, possui extensas Zonas de Proteção Ambiental (ZPAM) que necessitam de preservação e monitoramento. No Bom Jardim há uma predominância do tipo Isolado-Agregado (árvores agregadas em unidades maiores, geralmente em quintais maiores, praças ou taludes), inserido em uma matriz pouco urbanizada, dominada pelas serras de Escuro e dos Cocais, composta por agrupamentos de árvores remanescentes de extensão considerável. Sua PCA é de 21,15% e a renda domiciliar média mensal é até dois salários mínimos (AZA, 2016).

O bairro Esperança possuía população com 16.608 habitantes e densidade demográfica de 87,03 habitante ha-1 (IBGE, 2010), sendo a população canina estimada de 2242. Assim como o Bom Jardim, foi criado após o surgimento da Usiminas. É um bairro caracterizado pela urbanização já consolidada, crescimento desordenado e padrão de ocupação denso.

A densidade demográfica média de Ipatinga é de 31,69 habitante ha-1, sendo que em alguns bairros da cidade como o Canaã, Esperança e Bethânia esse valor pode ser triplicado, conforme análise feita pelo Plano Diretor de Desenvolvimento Integrado (PDDI) do Vale do Aço (UNILESTE, 2014). Este bairro ilustra o processo de crescimento de Ipatinga, com padrões de ocupação do solo que possibilitaram o surgimento, principalmente nos bairros populares, de problemas socioambientais que refletem na qualidade do ambiente e no valor de PCA de 12,30%. A renda domiciliar média mensal tanto no Esperança quanto no Bom Jardim é de até dois salários mínimos.

4.4 Estudo da fauna de flebotomíneos

Para a captura dos flebotomíneos, foram utilizadas 20 armadilhas luminosas do tipo HP (PUGEDO et al., 2005), sendo uma exposta no peridomicílio e outra no intradomicílio de cada residência, para estudos de endofilia e exofilia, durante três noites consecutivas por mês no período de um ano (março de 2015 a fevereiro de 2016). As armadilhas foram colocadas nas mesmas casas durante o período estudado, sendo em locais sombreados, próximos a galinheiros e a outros animais domésticos (Figura 3). Os moradores dessas residências estavam de acordo com a pesquisa e assinaram o TCLE (Termo de Consentimento Livre Esclarecido), conforme Anexo 1.

Os insetos machos foram acondicionados em tubos de hemólise contendo álcool 70% e encaminhados ao Laboratório do Grupo de Pesquisas Taxonomia de flebotomíneos, epidemiologia, diagnóstico e controle das leishmanioses (TFL) do Instituto René Rachou, para posterior preparo,

montagem e identificação. Já as fêmeas capturadas foram colocadas em tubos de 1,5 mL contendo dimetilsulfóxido (DMSO) 6%, armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, e foram incluídas tanto na fauna quanto no estudo de infecção natural.

A cabeça e os três últimos segmentos das fêmeas foram dissecados, montados entre lâminas e lamínulas para identificação taxonômica e o restante do corpo do inseto foi utilizado para extração de DNA (item 4.6.1). Utilizou-se líquido de Berlese para montagem de machos e fêmeas de acordo com a técnica de Langeron (1949) modificada (Tabela 1). Neste estudo, as fêmeas não passaram pelo processo de clarificação como os machos, uma vez que foram armazenadas em DMSO a 6% para detecção de infecção natural.

Os flebotomíneos capturados de ambos os sexos foram identificados por meio de descrições específicas, chaves taxonômicas e comparação com espécimes da Coleção de Referência de flebotomíneos do Instituto René Rachou / FIOCRUZ. Adotamos a classificação das espécies de flebotomíneos proposta por Galati (2003).



Figura 3: Exemplos dos ecótopos peridomiciliares onde foram expostas armadilhas entomológicas, no município de Ipatinga, MG. Fonte: Rosana S. Lana.

Tabela 1: Protocolo de preparação de flebotomíneos para montagem e identificação (Langeron, 1949, adaptada).

Procedimento	Tempo
Hidróxido de potássio 10%	2 h
Ácido acético 10%	20 min
Água destilada	15 min
Água destilada	15 min
Água destilada	15 min
Lactofenol	24 h

4.5 Análise estatística da influência das variáveis climáticas na densidade vetorial

Para verificar a influência do clima sobre a densidade de flebotomíneos no município, foram utilizados dados de temperatura compensada média ($^{\circ}\text{C}$), umidade relativa média (%) e precipitação total (mm), referentes ao período de março de 2015 a fevereiro de 2016. Os dados relativos às variáveis climáticas foram obtidos junto ao Instituto Nacional de Meteorologia, estação de Caratinga-A554 (INMET), a mais próxima de Ipatinga.

Para visualizar a relação conjunta da temperatura e da precipitação com a densidade populacional de flebotomíneos por mês, foi construído um gráfico de bolhas no qual o raio das bolhas é proporcional à quantidade de flebotomíneos capturados por mês e os eixos correspondem às variáveis climáticas em questão.

Para testar individualmente a correlação de cada uma das variáveis

climáticas com o número de flebotomíneos capturados por mês, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman e testada sua significância.

4.6 Estudo da infecção natural dos flebotomíneos

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

4.6.1 Extração de DNA total das fêmeas de flebotomíneos

As fêmeas, depois de dissecadas e identificadas, foram armazenadas individualmente ou agrupadas em "pools" de no máximo 10 indivíduos para extração de DNA total. Esta foi realizada através de kit de extração de tecido e células (GE HealthCare) e o material genético extraído foi armazenado a - 20° C até a realização de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

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

Para determinar a taxa de infecção natural, as amostras de DNA extraídas dos "pools" ou dos tubos individuais 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 μ l utilizando um kit para PCR (PureTaq Ready-To-Go PCR Beads/GE Healthcare) que contém aproximadamente 2,5 unidades de PureTaq™ DNA Polymerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP e estabilizadores, incluindo BSA. A cada "bead" foram adicionados 1 μ l de cada iniciador (20 pmol) e 13 μ l de água ultra pura. Preparados os tubos, foram adicionados 10 μ l de DNA (cerca de 10 ng/ml). Em tubos contendo 1 ml de H₂O foram diluídos 25 μ l de produto da primeira reação, para serem utilizados como "template" na segunda PCR. Esta foi preparada utilizando o mesmo kit de PCR Bead, para um volume final de 25 μ l contendo 10 μ l do produto amplificado diluído.

A amplificação foi realizada em um 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 utilizou-se 20 ng de DNA extraído de cultura de *Le. infantum* (cepa MHOM/BR/PP75), como controle positivo. Como controle negativo (sem DNA) a amostra de DNA foi substituída por volume equivalente de H₂O destilada estéril.

4.6.3 Análise dos produtos amplificados pela PCR

O produto amplificado pela PCR foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 2% corados com brometo de etídio e examinados no captador de imagens L-PIX EX (Loccus biotecnologia), sob exposição de luz ultravioleta (UV).

4.6.4 Sequenciamento para identificação da espécie de *Leishmania* spp.

Para a identificação da(s) espécie(s) 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 H₂O ultra pura 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 H₂O 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 Instituto René Rachou (IRR), Fiocruz.

O alinhamento das sequências editadas foi comparado 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). Estas análises incluem a edição e o alinhamento das sequências estudadas. Isto nos permitiu identificar a espécie de *Leishmania* presente nos flebotomíneos e cães.

4.6.5 Cálculo da taxa mínima de infecção natural

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

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

A mesma fórmula foi utilizada para tubos individuais, substituindo-se "pools" por tubo individual.

4.7 Inquérito sorológico canino

O inquérito sorológico canino foi realizado pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) através dos agentes de saúde, nos anos de 2015 e 2016. Nesse inquérito estão incluídos cães do inquérito parcial realizado pelos agentes de saúde e demanda espontânea (cães que são levados até a zoonose pelos proprietários para realização do teste). A partir dos dados coletados foi calculada a taxa de soropositividade da LVC nas áreas selecionadas.

No momento da coleta de sangue dos cães, foram utilizados os formulários de rotina do Programa de Controle da LV do município: Boletim

Diário de Inquérito Canino com identificação das amostras, responsável pela coleta, nome e endereço dos proprietários e nome do cão; Protocolo de Coleta de Sangue para LV contendo código da amostra, dados do proprietário e dados do cão.

4.8 Diagnóstico sorológico canino, eutanásia e necrópsia de cães soropositivos

Foi utilizado o seguinte protocolo para o diagnóstico sorológico da LVC:

1) Teste de Triagem: TR DPP (Bio-Manguinhos) - Teste imunocromatográfico de uso único para detecção, em cães, de anticorpos específicos para Leishmania, em soro, plasma ou sangue total. 2) Teste Confirmatório: EIE® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (Bio-Manguinhos) - Ensaio imunoenzimático ELISA - utilizado na detecção de anticorpos contra Leishmania major like, em soros ou plasma de cães (BRASIL, 2011). O resultado foi obtido através da visualização da alteração de cor com o auxílio de equipamentos mensuradores de absorbância. Este teste só foi realizado quando o primeiro fosse positivo. A execução de ambos os testes foi realizada por profissionais devidamente qualificados.

Em seguida, foi realizada a eutanásia desses cães sorologicamente reativos nos dois testes, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde. Para posteriores testes parasitológicos e moleculares, foi realizada a punção de medula óssea e retirada de fragmentos de pele. Para a punção de medula óssea, utilizou-se seringa de 20 mL, agulha 40/12, scalp 23G, e aproximadamente 200 µL de extrato medular coletado de cada cão foi transferido para tubos devidamente etiquetados, e guardados em caixas de isopor com gelox para posterior acondicionamento em freezer a -20 °C, e extração. Para a retirada de fragmentos de pele do cão, com auxílio de tesoura e pinças estéreis, retirou-se entre 2-3 mm de ponta de orelha, que também foram armazenados em tubos de 1,5 µL, à seco, devidamente etiquetados, armazenados em caixa de isopor com gelox, seguido de freezer a -20 °C, para posterior extração.

Os proprietários dos cães assinaram um termo de autorização para eutanásia dos animais. A retirada dos cães soropositivos foi realizada pelo CCZ de Ipatinga, sendo a eutanásia dos animais realizada no mesmo, segundo as normas técnicas definidas na Resolução 714 de 20/06/2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Os procedimentos realizados foram autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa, conforme Anexo 2, sendo os dados de todos os cães necropsiasos transferidos para uma ficha epidemiológica de necropsia (Anexo 3) e transferidos para um banco de dados (Anexo 4). Já os demais cães sorologicamente positivos foram retirados pelos agentes de saúde e também eutanasiados, de acordo com o cronograma do município.

4.8.1 Cálculo da taxa de soropositividade da LVC

Para ser considerado sorologicamente positivo o cão deveria apresentar sorologia positiva no DPP e no ELISA. Para o cálculo da taxa de soropositividade da LVC no município de Ipatinga foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de soropositividade canina} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de cães reagentes nos dois testes} \times 100}{\text{Total de cães examinados no bairro}}$$

4.9 Diagnóstico parasitológico direto das amostras de cães soropositivos

4.9.1 Cultura em ágar sangue de Novy & McNeal, modificado por Nicolle (NNN/LIT) (Nicolle, 1908)

Para o isolamento e manutenção das cepas de Leishmania foram semeadas aproximadamente 200 µl de aspirado de medula óssea em

aproximadamente 3 mL de meio de cultura NNN/LIT (Nicolle, 2008), em tubo Falcon, para o crescimento dos parasitos. As culturas foram armazenadas em estufas entre 24 a 26°C e examinadas a cada sete dias e feitos repiques para a manutenção das cepas.

4.9.2 Aposições em lâminas de biópsias obtidas de cães soropositivos

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

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

A PCR foi realizada com o objetivo de confirmar os resultados da sorologia. As amostras de DNA extraídas a partir de pele e aspirado de medula óssea dos cães soropositivos foram analisadas através da técnica “Nested PCR” (LnPCR) dirigida ao gene SSUrRNA de *Leishmania*, que amplifica um fragmento conservado em todas as espécies de *Leishmania* (VAN EYS et al., 1992; CRUZ et al., 2002, 2006). A mesma técnica utilizada para amplificação de DNA de flebotomíneos. Foi modificado apenas o kit de extração, nesse caso utilizado o kit de extração de sangue (GE HealthCare) e o material genético

extraído foi armazenado a -20°C até a realização de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Em cada conjunto de reação de PCR foi incluído um controle negativo e um controle positivo. Como controle negativo da reação, foi utilizado um tubo que continha o mix (solução tampão, iniciadores, dNTPs, DNA polimerase, H_2O ultra pura estéril) exceto o DNA; e no controle positivo, foi adicionado DNA purificado da cepa referência de *Le. infantum* (cepa MHOM/BR/PP75).

Os produtos amplificados pela LnPCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e examinado em exposição à luz UV, da mesma forma realizada com DNA de flebotomíneos (item 4.6.3).

4.9.4 Sequenciamento SSUrRNA para determinação da espécie de *Leishmania* nas amostras de cães soropositivos

O sequenciamento foi realizado conforme item 4.6.4.

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

4.10.1 Levantamento, caracterização e georreferenciamento dos casos caninos

Para o estudo de casos caninos foram utilizados os dados do inquérito sorológico canino (48,8%) e da demanda espontânea (51,2%), abrangendo todos os bairros do município. Ambos os levantamentos de dados foram realizados pelos agentes de saúde do município no período de março de 2015 a fevereiro de 2016.

Para todos os cães sorologicamente reagentes nos dois testes (DPP e ELISA), foram considerados os bairros para fins de georreferenciamento,

confecção de mapas e demais análises espaciais realizadas através do programa R (R CORE TEAM, 2017). Os dados de população canina de cada bairro foram estimados em 13.5% da população humana (BRITO & CHAMONE, 2001).

4.10.2 Levantamento, caracterização e georrefenciamento dos casos humanos

Para o levantamento de casos humanos de LV os dados foram obtidos junto à Secretaria Municipal de Saúde de Ipatinga (Seção de Vigilância Epidemiológica), sendo contabilizados os casos notificados no município entre 2015 e 2016. Para a análise descritiva dos casos humanos foram considerados os endereços das residências. Os dados de população humana foram obtidos a partir do Censo 2010 do IBGE. A análise descritiva dos dados foi feita através de tabelas, gráficos e medidas resumo, como médias, medianas, proporções e taxas. Para analisar a distribuição espacial dos casos humanos, foi feito um mapa de densidade de Kernel e um mapa temático das taxas de incidência nos bairros estudados. Esses mapas foram feitos utilizando o programa R (R CORE TEAM, 2017).

4.10.3 Georreferenciamento dos pontos de capturas entomológicas

Todos os endereços onde as armadilhas entomológicas foram expostas para captura de flebotomíneos foram georreferenciados.

4.11 Análise estatística dos testes diagnósticos caninos

Para comparar o percentual de positividade dos testes (PCR, imprint/esfregaço e cultura) entre os diferentes tecidos (pele e medula), assim como para comparar o percentual de positividade de cada técnica utilizando o

mesmo tecido foram utilizados diferentes testes estatísticos.

Para as comparações entre dois grupos (PCR Pele X PCR Medula, Parasitológico Pele X Parasitológico Medula e PCR Pele X Parasitológico Pele) o teste utilizado foi o teste de McNemar. Para a comparação entre 3 grupos (PCR Medula X Parasitológico Medula X Cultura Medula), o teste utilizado foi o teste Q de Cochran com o teste de McNemar utilizando correção de Bonferroni no pós teste para comparação 2 a 2, caso o primeiro tenha resultado em rejeitar a hipótese de que o percentual de positividade nos 3 grupos não é estatisticamente diferente. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R (R CORE TEAM, 2017), com nível de significância de 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Flebotomíneos

5.1.1 Fauna

A fauna flebotomínica de Ipatinga foi constituída de 1501 exemplares, distribuídos em 16 espécies: *Brumptomyia avellari* (Costa Lima, 1932), *B. nitzulescui* (Costa Lima, 1932), *Evandromyia baculus* (Martins, Falcão & Silva 1965), *Pressatia choti* (Floch & Abonnenc, 1941), *Evandromyia cortelezzii* (Brèthes, 1923), *Pintomyia fischeri* (Pinto, 1926), *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), *Evandromyia lenti* (Mangabeira, 1938), *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *Trichopygomyia longispina* (Mangabeira, 1942), *Martinsmyia minasensis* (Mangabeira, 1942), *Pintomyia pessoai* (Coutinho & Barreto, 1940), *Micropygomyia quinquefer* (Dyar, 1929), *Sciopemyia sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927), *Evandromyia termitophila* (Martins, Falcão & Silva 1965), *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939). As fêmeas do gênero *Brumptomyia* só foram identificadas no âmbito genérico devido a grande semelhança morfológica entre as fêmeas.

O número de fêmeas capturadas (645 exemplares) foi bastante elevado, comparado ao número de machos (856 exemplares), conforme mostra a Tabela 2. Também foi capturado 15 exemplares pertencentes à subtribo Lutzomyiina (Abonnenc & Leger, 1976) que não foi possível identificar a nível específico, por isso, não foram incluídos na Tabela 2.

Tabela 2: Espécies de flebotomíneos capturados em Ipatinga, MG, utilizando armadilhas luminosas HP, no período de março de 2015 a fevereiro de 2016.

Espécies	Machos	Fêmeas	Total	%
<i>Brumptomyia avellari</i>	8	0	8	0,5
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	1	0	1	0,1
<i>Brumptomyia</i> spp.	0	7	7	0,5
<i>Evandromyia baculus</i>	0	1	1	0,1
<i>Pressatia choti</i>	2	1	3	0,2
<i>Evandromyia cortelezii</i>	119	208	327	21,8
<i>Pintomyia fischeri</i>	0	1	1	0,1
<i>Nyssomyia intermedia</i>	7	11	18	1,2
<i>Evandromyia lenti</i>	96	78	174	11,6
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	610	319	929	61,9
<i>Trichopygomyia longispina</i>	0	1	1	0,1
<i>Martinsmyia minasensis</i>	1	0	1	0,1
<i>Pintomyia pessoai</i>	0	1	1	0,1
<i>Micropygomyia quinquefer</i>	4	3	7	0,5
<i>Sciopemyia sordellii</i>	2	5	7	0,5
<i>Evandromyia termitophila</i>	0	1	1	0,1
<i>Nyssomyia whitmani</i>	6	8	14	0,9
Total	856	645	1501	100

Com relação às espécies de importância médica, ressaltamos o encontro de *Lu. longipalpis* (61,9%), *Ny. whitmani* e *Ny. intermedia*, com aproximadamente 1% dos exemplares capturados de cada uma dessas

espécies. Quanto às espécies mais numerosas e também que não possuem papel comprovado como vetoras das leishmanioses foram: *Ev. cortelezzii* (21,8%) e *Ev.lenti* (11,6%).

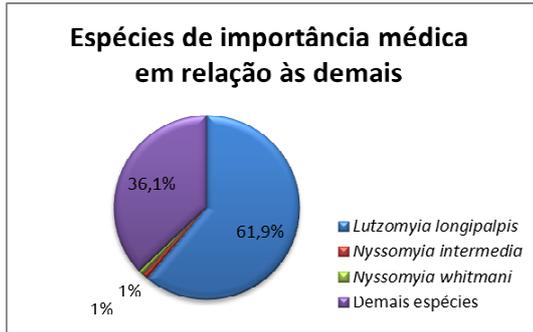


Figura 4: Número de *L. longipalpis* capturados em relação às demais espécies, no município de Ipatinga, MG, utilizando armadilhas luminosas HP, no período de março de 2015 a fevereiro de 2016.

Quanto ao local de captura, 52,9% dos exemplares foram capturados no peridomicílio, enquanto 47,1% no intradomicílio (Figura 5).

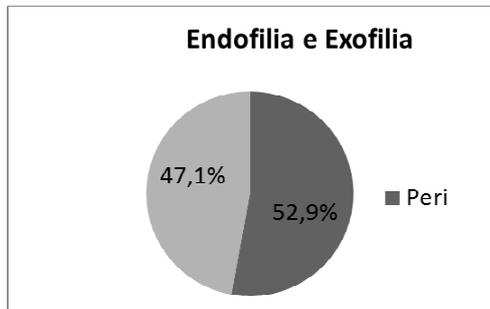


Figura 5: Número de flebotomíneos em relação ao local de captura, no município de Ipatinga, MG, utilizando armadilhas luminosas HP, no período de março de 2015 a fevereiro de 2016.

A espécie *Lu. longipalpis* foi capturada em maior número no peridomicílio, porém quando se compara somente o número de fêmeas

percebe-se que elas foram encontradas em maior número no intradomicílio (Tabela 3), reforçando que a transmissão também pode estar ocorrendo no interior das residências. Esta espécie foi encontrada em todos os meses estudados.

Também foram capturadas espécies vetoras de LT (*Ny. intermedia* e *Ny. whitmani*) no interior das residências, conforme a Tabela 3.

Tabela 3: Espécies de flebotomíneos capturados no peridomicílio e intradomicílio, de acordo com o sexo, utilizando armadilhas luminosas HP, no período de março de 2015 a fevereiro de 2016.

ESPÉCIES/SEXO	MACHOS		FÊMEAS		TOTAL	%
	PERI	INTRA	PERI	INTRA		
<i>Br. avellari</i>	2	6	0	0	8	0,5
<i>Br. nitzulescui</i>	1	0	0	0	1	0,1
<i>Brumptomyia</i> spp.	0	0	3	4	7	0,5
<i>Ev. baculus</i>	0	0	0	1	1	0,1
<i>Pr. choti</i>	1	1	0	1	3	0,2
<i>Ev. cortelezzii</i>	45	74	77	131	327	21,8
<i>Pi. fischeri</i>	0	0	0	1	1	0,1
<i>Ny. intermedia</i>	5	2	4	7	18	1,2
<i>Ev. lenti</i>	59	37	38	40	174	11,6
<i>Lu. longipalpis</i>	398	212	149	170	929	61,9
<i>Tr. longispina</i>	0	0	0	1	1	0,1
<i>Ma. minasensis</i>	0	1	0	0	1	0,1
<i>Pi. pessoai</i>	0	0	0	1	1	0,1
<i>Mi. quinquefer</i>	1	3	1	2	7	0,5
<i>Sc. sordellii</i>	1	1	5	0	7	0,5
<i>Ev. termitophila</i>	0	0	0	1	1	0,1
<i>Ny. whitmani</i>	2	4	4	4	14	0,9
TOTAL	515	341	281	364	1501	100%

Embora o maior número de espécimes (53,4%) tenha sido capturado no peridomicílio em geral, em alguns bairros as fêmeas predominaram no intradomicílio, que foram Bethânia, Canaã, Cariru, Ideal e Vila Celeste.

Os bairros com maior número de flebotomíneos capturados foram Iguazu (24,4%), Bethânia (21,5%) e Bom Jardim (17,2%) (Tabela 4 e 5). Tais bairros totalizaram 63,1% de flebotomíneos capturados, ou seja, mais da metade dos exemplares foram capturados nesses bairros de estudo.

Tabela 4: Flebotomíneos capturados no peridomicílio e intradomicílio, de acordo com o sexo, em cada bairro de estudo, utilizando armadilhas luminosas HP, no período de março de 2015 a fevereiro de 2016.

BAIRROS	PERI		INTRA		TOTAL
	MACHOS	FÊMEAS	MACHOS	FÊMEAS	
Bethânia	44	34	132	112	322
Bom Jardim	78	74	34	72	258
Canaã	11	11	28	27	77
Cariru	8	4	2	8	22
Cidade Nobre	25	8	2	2	37
Ideal	22	16	44	52	134
Iguazu	154	65	86	61	366
Esperança	142	52	5	3	202
Veneza	17	15	3	12	47
Vila Celeste	5	1	10	20	36
Total	515	281	341	364	1501

A espécie *Lu. longipalpis* foi capturada em todos os bairros estudados, com destaque nos bairros Iguazu, Esperança, Bom Jardim e Bethânia, onde foram capturados 76,75% dos exemplares dessa espécie (Tabela 5).

No bairro Cariru, onde ocorre grande parte dos casos de LT do município e nenhum caso de LV até hoje registrado, foi capturado 61,1% dos exemplares

de *Ny. intermedia*, nenhum de *Ny. whitmani* e somente um de *Lu. longipalpis* (Tabela 5).

Tabela 5: Espécies de flebotomíneos capturados por bairro em Ipatinga, MG, utilizando armadilhas luminosas HP, no período de março de 2015 a fevereiro de 2016.

Espécies/Bairros	Vila Celeste	Canaã	Bethânia	Veneza	Cariru	Iguaçu	Cidade Nobre	Bom Jardim	Esperança	Ideal	TOTAL	%
Br. avellari	0	0	7	0	1	0	0	0	0	0	8	0.5
Br. nitzulescui	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1
Brumptomyia spp.	0	0	4	0	2	0	0	1	0	0	7	0.5
Ev. baculus	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1
Pr. choti	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3	0.2
Ev. cortelezzii	22	32	89	18	0	74	3	54	14	21	327	21.8
Pi. fischeri	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.1
Ny. intermedia	3	0	2	2	11	0	0	0	0	0	18	1.2
Ev. lenti	0	5	62	5	2	65	0	30	1	4	174	11.6
Lu. longipalpis	11	40	150	22	1	224	34	154	185	108	929	61.9
Tr. longispina	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1
Ma. minasensis	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.1
Pi. pessoai	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.1
Mi. quinquefer	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	7	0.5
Sc. sordellii	0	0	0	0	0	3	0	3	1	0	7	0.5
Ev. termitophila	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1
Ny. whitmani	0	0	4	0	0	0	0	8	1	1	14	0.9
TOTAL	36	77	322	47	22	366	37	258	202	134	1501	100

Quanto ao período de captura, o maior número de flebotomíneos capturados foi observado no mês de outubro e dezembro, com 181 (12%) e 191 (12,7%) exemplares respectivamente, totalizando 24,7% dos flebotomíneos capturados. O mês de novembro obteve o menor número de flebotomíneos capturados, somente 45 exemplares (3%) (Tabela 6).

Tabela 6: Distribuição de flebotomíneos capturados por mês e bairro em Ipatinga, utilizando armadilhas luminosas HP, no período de março de 2015 a fevereiro de 2016.

Mês/Ano/ Bairro	Vila Celeste	Canaã	Bethânia	Veneza	Cariru	Iguaçu	Cidade Nobre	Bom Jardim	Esperança	Ideal	TOTAL
MAR/15	4	13	36	7	7	22	2	30	8	17	146
ABR/15	1	8	36	12	1	38	2	13	2	4	117
MAI/15	4	14	43	7	1	17	12	19	0	25	142
JUN/15	1	21	29	3	0	21	2	15	0	19	111
JUL/15	0	7	22	7	0	25	1	5	2	12	81
AGO/15	4	4	25	3	1	66	2	13	43	4	165
SET/15	2	1	18	0	0	9	4	27	33	2	96
OUT/15	4	0	29	5	4	20	3	16	96	4	181
NOV/15	2	0	7	0	4	11	4	13	2	2	45
DEZ/15	8	4	45	2	1	61	4	33	8	25	191
JAN/16	2	1	7	0	3	41	1	29	0	9	93
FEV/16	4	4	25	1	0	35	0	45	8	11	133
TOTAL	36	77	322	47	22	366	37	258	202	134	1501

5.1.2 Influência das variáveis climáticas na densidade vetorial

O registro mensal das variáveis climáticas: precipitação, temperatura e umidade do ar e número de flebotomíneos capturados estão representadas na Tabela 7.

Tabela 7: Variáveis climáticas mensais no município de Ipatinga, MG, entre os meses de março de 2015 a fevereiro de 2016.

Mês	Precipitação	Temperatura compensada	Umidade Relativa	Flebotomíneos
	total (mm)	média (°C)	média (%)	
MAR/15	61,1	24,3	76,1	146
ABR/15	56,8	22,3	79,5	117
MAI/15	88	19,6	84,3	142
JUN/15	2,5	18,9	81	111
JUL/15	0,2	18,9	79,1	81
AGO/15	0,9	19,8	70,5	165
SET/15	24,9	23,5	65,2	96
OUT/15	68	24,8	60,9	181
NOV/15	126,5	25,4	70	45
DEZ/15	141,3	24,8	75,2	191
JAN/16	260,4	23,8	82,1	93
FEV/16	10,1	25,1	74,3	133
Média	70,0	22,6	74,8	

Para aprimorar a análise, foi feito um delineamento de estações em relação à temperatura e precipitação (quente e seca, quente e úmida, fria e seca e fria e úmida), tomando como referência as medianas de cada variável (Figura 6).

Para avaliar se havia alguma relação de variáveis climáticas (temperatura, umidade relativa do ar e precipitação) com a densidade

populacional de flebotomíneos, investigamos uma possível associação entre cada uma das variáveis climáticas e o número mensal de flebotomíneos capturados.

A Figura 6 mostra a relação entre a precipitação média e a temperatura média avaliada, onde o raio das bolhas corresponde à quantidade de flebotomíneos capturados em cada mês de estudo e as linhas representam as medianas para as respectivas variáveis.

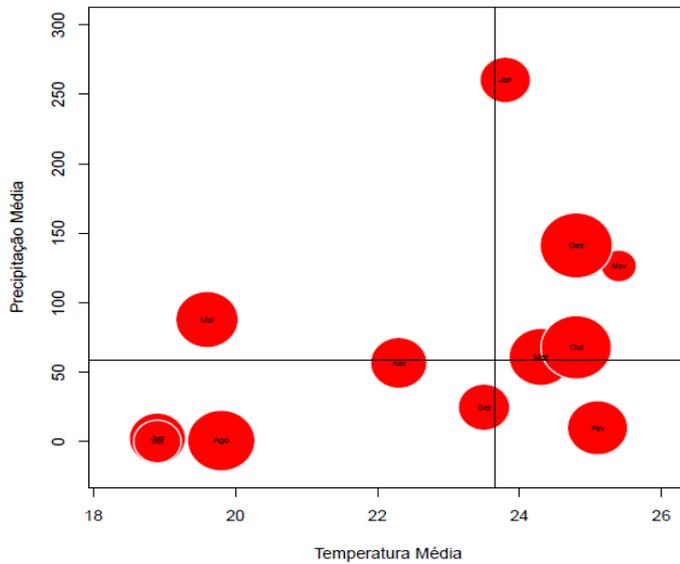


Figura 6: Interferência climática mensal na densidade de flebotomíneos em Ipatinga, MG, entre março de 2015 a fevereiro de 2016. A mediana das variáveis climáticas consideradas é representada por uma linha.

Há grandes flutuações no número de flebotomíneos coletados tanto nos meses do período mais quente e chuvoso (primavera e verão) quanto nos meses do período mais frio e seco (outono e inverno), não tendo sido

visualmente clara nenhuma relação entre essas variáveis. Ao calcular os coeficientes de correlação de Spearman entre cada uma das variáveis climáticas e o número de flebotomíneos por mês, não houve associação estatisticamente significativa para nenhuma das variáveis climáticas em questão (p valor $> 0,05$ para todas as variáveis consideradas).

Apesar de não ser estatisticamente significativo, não sendo possível visualizar uma concentração de flebotomíneos em um único quadrante, houve uma tendência de maior número de flebotomíneos capturados no período chuvoso, conforme mostra a Figura 7. Assim, podemos perceber que houve um pico na densidade de flebotomíneos, das espécies mais numerosas, nos meses mais chuvosos e quentes.

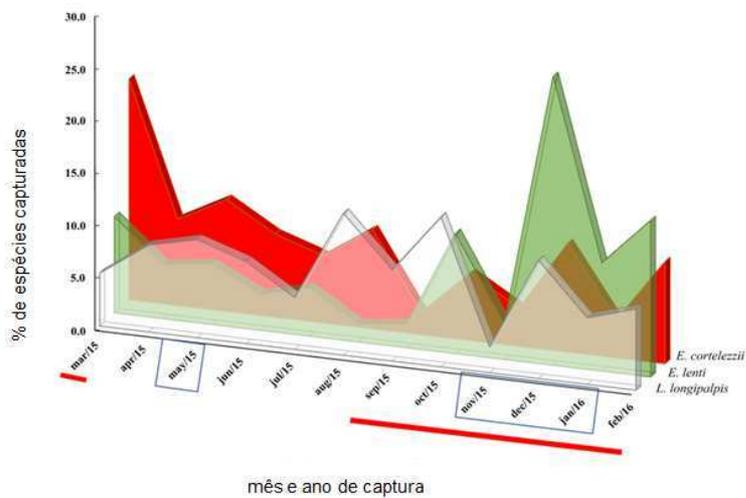


Figura 7: Porcentagem de espécies mais numerosas capturadas, por mês e ano, em Ipatinga, MG.

5.1.3 Estudo da infecção natural de flebotomíneos

Dos 285 “pools”/tubos individuais confeccionados a partir de diferentes espécies de fêmeas de flebotomíneos, dois deles foram positivos, correspondendo a um tubo contendo uma espécie do complexo *cortelezzii* (um tubo com um exemplar) e *Lu. longipalpis* (um “pool” com sete exemplares). A taxa mínima de infecção natural (TMI) por *Leishmania* no “pool” com *Ev. cortelezzii* foi de 0,5% enquanto para *Lu. longipalpis* foi de 0,3%. A taxa de infecção natural geral foi 0,3% (Tabela 8).

Tabela 8: Amostras de “pools” analisados para detecção de infecção natural por *Leishmania* de acordo com a espécie de flebotomíneo capturado no período de março de 2015 a fevereiro de 2016, no município de Ipatinga, MG.

Espécies	Número de fêmeas	“Pools” formados	Presença de DNA de <i>Leishmania</i>	TMI (%)
<i>Brumptomyia</i> spp.	7	7	0	0
<i>Ev. baculus</i>	1	1	0	0
<i>Pr. choti</i>	1	1	0	0
<i>Ev. cortelezzii</i>	208	93	1	0,5
<i>Pi. fischeri</i>	1	1	0	0
<i>Ny. intermedia</i>	11	11	0	0
<i>Ev. lenti</i>	78	38	0	0
<i>Lu. longipalpis</i>	319	115	1	0,3
<i>Tr. longispina</i>	1	1	0	0
<i>Ma. minasensis</i>	0	0	0	0
<i>Pi. pessoai</i>	1	1	0	0
<i>Mi. quinquefer</i>	3	3	0	0
<i>Sc. sordellii</i>	5	4	0	0
<i>Ev. termitophila</i>	1	1	0	0
<i>Ny. whitmani</i>	8	8	0	0
Total	645	285	2	0,3

A Figura 8 mostra os produtos de amplificação de DNA de *Leishmania* spp. em um tubo individual e em um “pool” de flebotomíneos, que foram visualizados após gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio.

Através do alinhamento das sequências de DNA, encontradas nas amostras positivas para *Leishmania* spp. de flebotomíneos, foi realizada a identificação

da espécie de *Leishmania* spp., mostrando que a espécie *Le. infantum* esteve presente no tubo individual e no “pool”.

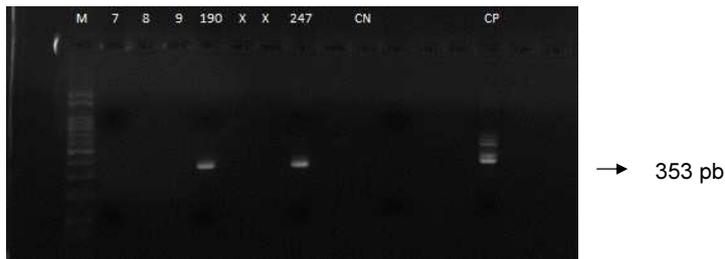


Figura 8: Exemplos de produtos de amplificação de DNA de *Leishmania* spp. em “pools” de flebotomíneos, utilizando iniciadores para o gene SSUrRNA da PCR R3R4 (353 pb), visualizados após gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio. Canaletas: M- marcador (100pb); amostras positivas de DNA de *Leishmania* spp.- 190: “pool” com sete exemplares de *Lu. longipalpis*; e 247: amostra com um exemplar de *Ev. corlezzii*; CN- Controle negativo (sem DNA); CP- Controle positivo: *Le. infantum*.

5.2 Inquérito sorológico canino

Foram examinadas 9.136 amostras de sangue de cães domiciliados da área urbana do município de Ipatinga, no ano de 2015. Desses, 2.726 foram positivos no DPP® e 1.355 confirmados pelo ELISA.

5.2.1 Taxa de soropositividade da LVC

A taxa de soropositividade da LVC foi baseada no resultado positivo nos dois testes sorológicos, que mostrou que dos 9.136 cães examinados, 1.355 foram positivos para LVC, obtendo-se uma taxa de soropositividade canina no município de 14,8%.

A taxa de soropositividade para LVC se distribuiu de forma variada nos bairros estudados, sendo que os bairros Bethânia e Vila Celeste registraram os

maiores índices, 18,6% e 17,1% respectivamente, enquanto o bairro Cariru registrou 2,4%, o menor índice registrado nos bairros estudados (Tabela 9).

Tabela 9: Inquérito canino/demanda espontânea realizado em cães domiciliados na área urbana do município de Ipatinga, MG, de março de 2015 a fevereiro de 2016.

Bairros	Total de cães examinados	Reagentes (DPP e ELISA)	Taxa de soropositividade da LVC (%)
Bethânia	2202	410	18,6
Canaã	2364	309	13,0
Bom Jardim	857	128	14,9
Vila Celeste	658	113	17,1
Esperança	615	94	15,2
Cidade Nobre	455	55	12,0
Veneza	306	43	14,0
Ideal	313	49	15,7
Iguaçu	285	42	14,7
Cariru	41	1	2,4
Demais bairros	1040	111	10,7
Total	9136	1355	14,8

Quando comparamos as taxas de soropositividade da LVC separadamente por inquérito canino e por demanda espontânea, no geral, observamos uma variação de somente 1,8% entre as duas (Tabela 10).

Tabela 10: Discriminação de resultados do inquérito canino e demanda espontânea realizado em cães domiciliados na área urbana do município de Ipatinga, MG, de março de 2015 a fevereiro de 2016.

Cães	Total de cães examinados	Reagentes (DPP e ELISA)	Taxa de soropositividade da LVC (%)
Inquérito	4183	661	15,8

Demanda espontânea	4953	694	14
TOTAL	9136	1355	14,8

5.2.2 Retirada de cães com LVC em Ipatinga

Nos meses de junho e julho de 2016 uma amostra aleatória de cães com LVC dos bairros estudados foi selecionada (44) para eutanásia e necropsia.

Assim, do total de cães analisados nesta etapa do estudo, 31 eram sintomáticos (70,45%) e 13 assintomáticos (29,55%), mas a escolha dos cães para o estudo foi totalmente aleatória, ou seja, a presença ou não de sintomas não foi uma condição avaliada previamente para retirada do animal, assim, a eutanásia ocorreu conforme o consentimento dos moradores na entrega do cão. Dentre os sintomáticos, seis apresentavam somente um sinal clínico (onicogribose ou hiperqueratinização de focinho), quatro cães somente dois sinais clínicos da doença, e os outros 21 cães apresentavam três ou mais sinais. Entre os sintomáticos, somente três não apresentaram onicogribose, que é um sinal clínico característico da LVC.

Quanto à raça, 35 eram sem raça definida (SRD), oito pinschers e um rottweiler (Anexo 4).

5.3 Análise do diagnóstico parasitológico

5.3.1 Cultura em ágar sangue de Novy & McNeal, modificado por Nicolle (NNN/LIT) (Nicolle, 1908)

Formas promastigotas de *Leishmania* foram observadas através de aspirados de medula óssea obtidas dos cães soropositivos em cultura de parasitos. Dos 44 cães sorologicamente positivos, em dois não foi possível

realizar a punção de medula porque os cães estavam muito desidratados. Assim, dos 42 cães, 28 apresentaram crescimento de *Leishmania* em cultura, representando 66,67% de positividade (Figura 9).

5.3.2 Detecção de *Leishmania* em “imprint” de pele e esfregaço de medula óssea de cães soropositivos

Para detecção de *Leishmania* em lâminas com imprint de pele e esfregaço de medula óssea de cães soropositivos em lâminas, foram confeccionados 88 esfregaços/“imprints” em lâminas, sendo 44 de cada órgão (medula óssea e pele), que foram analisados através de leitura em microscópio óptico. As amostras de pele de 24 cães apresentaram formas de *Leishmania* (54,55%), enquanto em 22 amostras de medula em lâmina foram encontradas tal parasita (50%).

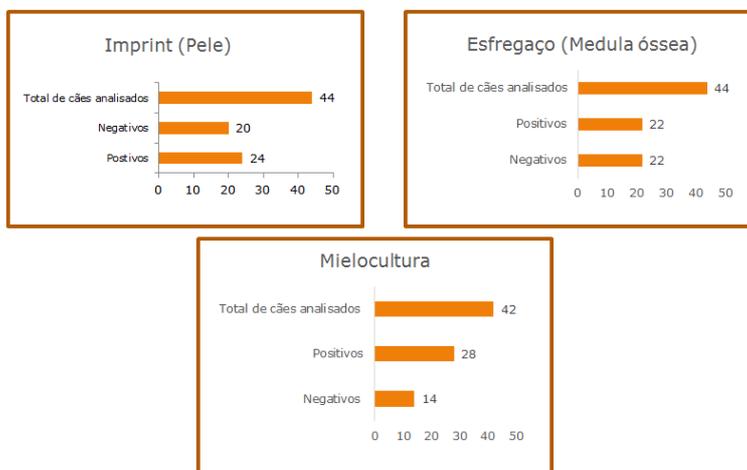


Figura 9: Diagnóstico parasitológico de amostras de pele e medula óssea dos cães analisados no estudo, mostrando o número de cães positivos e negativos em cada um dos tecidos, no “imprint”/esfregaço e mielocultura.

5. 4 Análise do diagnóstico molecular

5.4.1 Detecção de Leishmania através da PCR

Para detecção de DNA de *Leishmania* por métodos moleculares, foi realizada a PCR das amostras de pele e medula dos 44 cães. A Figura 10 mostra exemplos de amplificação de DNA de *Leishmania* spp. em biópsias de cães soropositivos. Amostras de pele de 42 cães (95,5%) apresentaram-se positivas para *Leishmania* spp, enquanto as amostras de medula de 30 cães (68,2%) apresentaram positividade para *Leishmania* spp. (Figura 11).

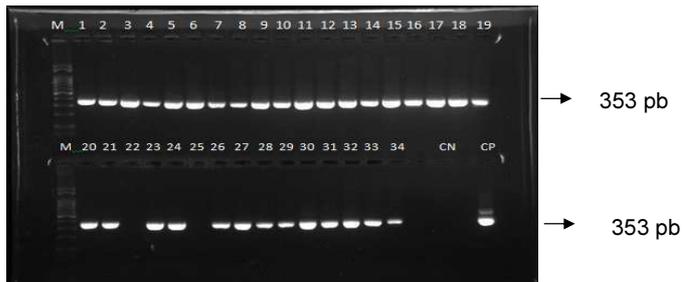


Figura 10: Exemplos de produtos de amplificação de DNA de *Leishmania* spp. em amostras de cães soropositivos para LVC, utilizando iniciadores para o gene SSUrRNA da PCR R3R4 (353 pb), visualizados após gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídio. Canaletas: M- marcador (100pb); amostras positivas de DNA de *Leishmania* spp. - 1 a 34 (exceto 22 e 25); CN- Controle negativo (sem DNA). CP- Controle positivo: *Le. infantum*.

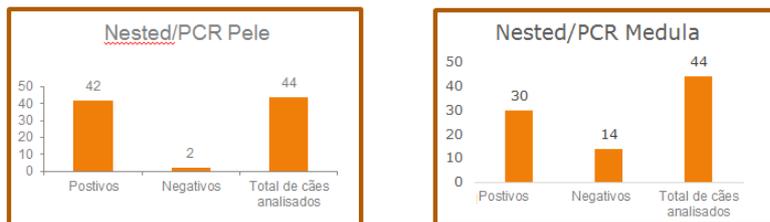


Figura 11: Diagnóstico molecular (Nested PCR) de amostras de pele e medula óssea dos cães analisados no estudo, mostrando o número de cães positivos e negativos em cada tecido.

5.5 Análise simultânea dos métodos de diagnóstico utilizados

Quanto se compara a taxa de positividade de todos os cães nos três testes realizados, independente de tecido, o resultado é que 20 em 44 cães foram positivos em todos os testes, ficando a taxa de positividade em 45,45%. A Tabela 11 sintetiza todos os dados referentes às taxas de positividade em todos os métodos realizados.

Todos os 44 cães foram positivos em pelo menos um teste, e houve quatro cães negativos em todos os testes parasitológicos, sendo positivos na PCR.

Tabela 11: Detecção de positividade através de diagnóstico molecular (PCR) e parasitológico (imprint/esfregaço e mielocultura) de amostras de biópsias de cães soropositivos, provenientes de Ipatinga, MG.

Cães	PCR		Imprint/Esfregaço		Mielocultura	Positivos PCR e Parasitológico
	Pele	Medula	Pele	Medula		
Soropositivos	42/44	30/44	24/44	22/44	28/42	20/44
Total (%)	95,5%	68,2%	54,55%	50%	66,67%	45,45%

5.6 Sequenciamento SSUrRNA para determinação da espécie de Leishmania nas amostras de de flebotomíneos e cães soropositivos

Através do alinhamento das sequências de DNA encontradas nas amostras positivas para *Leishmania* spp. de flebotomíneos e de cães foi realizada a identificação da espécie. Em todas as amostras de flebotomíneos, medula óssea e pele analisadas foi verificada a presença da espécie *Le. infantum* (Anexo 5).

5.7 Análise estatística dos testes diagnósticos caninos

Em relação a PCR, de acordo com o Teste de McNemar, na comparação do percentual de resultados positivos entre Pele X Medula houve diferença

significativa entre os resultados obtidos nos dois tecidos (p-valor=0,0033).

Em relação ao diagnóstico parasitológico, na comparação do percentual de resultados positivos entre Pele X Medula não houve diferença significativa entre os resultados obtidos nos dois tecidos (p-valor=0,7893).

No cruzamento de métodos PCR x Parasitológico, ambos de pele, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos nos dois métodos (p-valor=0,1356).

No cruzamento dos métodos PCR Medula X Parasitológico Medula X Cultura Medula, há diferença significativa entre os resultados obtidos em pelo menos em um par de métodos (p-valor=0,0002). Nesse caso, é necessário fazer a comparação dos testes 2 a 2 para verificar entre quais grupos se dá essa diferença.

Na comparação entre PCR Medula X Parasitológico Medula houve diferença significativa entre os resultados obtidos nos dois métodos (p-valor ajustado=0,0055), assim como na PCR Medula X Cultura Medula houve diferença significativa entre os resultados obtidos nos dois métodos (p-valor ajustado= 0,0007). Porém, no cruzamento de métodos Parasitológico Medula X Cultura Medula não houve diferença significativa entre os resultados obtidos nos dois testes (p-valor ajustado= 1).

5.8 Georreferenciamento e Análise espacial

5.8.1 Distribuição espacial dos domicílios com casos caninos e humanos de LV e os pontos de capturas entomológicas em Ipatinga

Somente entraram nesta análise, cães soropositivos para LVC diagnosticados em 2015 e 2016 e casos humanos de LV ocorridos no mesmo período na zona urbana da cidade.

Na Figura 12 podemos observar as taxas de infecção canina e humana de LV por bairro. A taxa de prevalência de casos caninos de LV por bairro foi

calculada por 1.000 cães, em Ipatinga, MG, no período de março de 2015 a fevereiro de 2016. Já a taxa de incidência de casos humanos de LV por bairro foi calculada por 10.000 habitantes, em Ipatinga, MG, no período de março de 2015 a fevereiro de 2016. Os pontos em preto representam as localizações geográficas dos casos humanos, enquanto os losângos em verde representam os 10 pontos de captura entomológica distribuídos por todo o município de Ipatinga.

Ao comparar casos de doenças em áreas com diferentes tamanhos de população, é importante considerar essa proporção. Assim, a taxa de prevalência da LV canina foi calculada para cada bairro (Figura 12A), assim como a taxa de incidência da LV humana (Figura 12B).

De todos os cães analisados no inquérito, 97,73% eram dos bairros estudados, enquanto na demanda espontânea 86,17% eram dos bairros estudados. A taxa de prevalência da LV canina variou consideravelmente nos diferentes bairros do município, sendo os bairros Bethânia, Canaã, Vila Celeste, Esperança, Bom Jardim e Cariru os bairros com maiores taxas (em marrom) (Figura 12A).

No bairro Cariru não ocorreram muitos casos caninos, mas devido ao tamanho da população do bairro o número foi proporcionalmente alto. Na maioria dos bairros, destacados em vermelho e marrom nas Figuras 9A e 9B, altas taxas de prevalência da LV canina coincidem com altas taxas de LV em humanos. O bairro Bethânia é o que aparece na categoria de taxas mais altas (em marrom) em ambos os mapas, ou seja, tem taxas mais altas de prevalência canina e humana de LV. Os bairros Canaã, Vila Celeste, Esperança e Bom Jardim também apresentam taxas elevadas tanto para doença canina como humana (Figura 12).

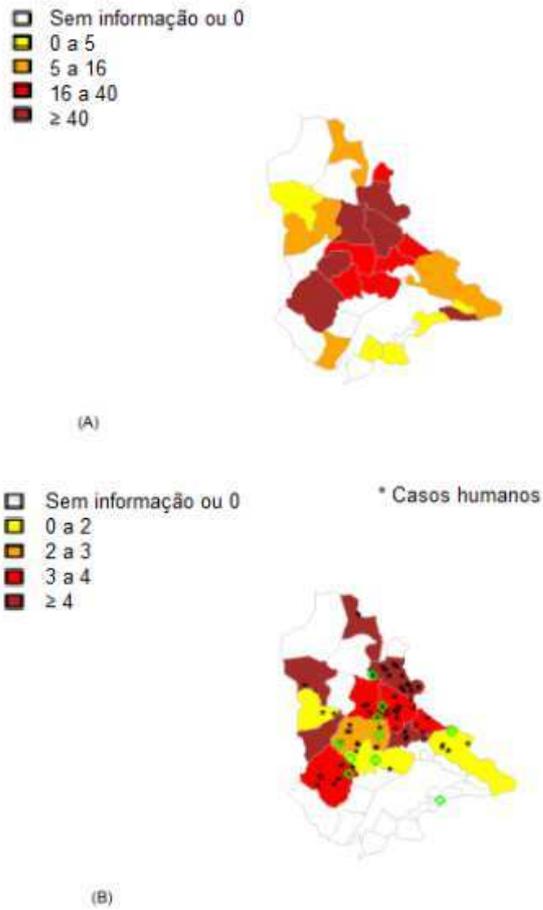


Figura 12: Mapas do município de Ipatinga, MG, mostrando as taxas de infecção canina e humana de LV por bairro, no período de março de 2015 a fevereiro de 2016. (A) Taxa de prevalência (por 1.000) de casos caninos de LV por bairro. (B) Taxa de incidência (por 10.000) de casos humanos de LV por bairro. Os pontos pretos representam as localizações geográficas dos casos humanos; e os losângos verdes os pontos de capturas entomológicas. Fonte: Letícia C. Pinheiro.

O gráfico a seguir (Figura 13) mostra o número de casos de LV humana e sua incidência ao longo dos anos (2011 a 2017) no município de Ipatinga. As taxas de incidências variaram entre 0,08 a 1,85, com dois picos em 2014 e 2015.

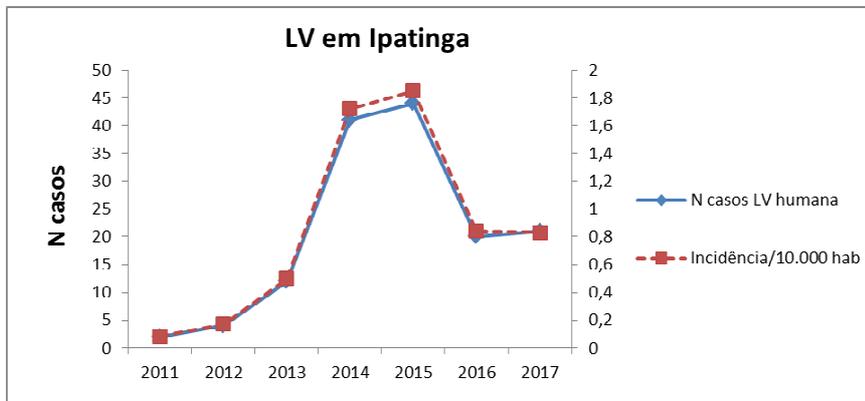


Figura 13: A leishmaniose visceral em Ipatinga: casos em números absolutos e taxa de incidência (por 10.000 habitantes), no período de 2011 a 2017. Fonte: Rosana S. Lana.

5.8.2 Distribuição espacial dos casos humanos de LV em Ipatinga

A partir dos endereços de residência dos casos humanos, foi feito o mapa de densidade de Kernel (Figura 14), mostrando que a LV humana está amplamente distribuída em nove dos 10 bairros do estudo entomológico, com exceção do bairro Cariru. Por outro lado, segundo dados da prefeitura local, este bairro tem alta prevalência de LT (ocorreram 13 casos somente no ano de 2015, mas não houve óbitos).

Os bairros Ideal e Iguazu apresentaram casos humanos de LV somente em um dos anos estudados. Os demais bairros estudados tiveram casos humanos em ambos os anos, sendo que os bairros Bethânia e Canaã acumularam 19 e 10 casos, respectivamente, que são os “hot spots”

apresentados no mapa de Kernel. Houve três óbitos por LV no Bethânia e dois no Canaã no período estudado. Em 2015 não tiveram casos de LV nos bairros Cariru e Ideal; e em 2016 não tiveram casos de LV nos bairros Cariru e Iguaçu (Tabela 12). De modo geral, 70% (7/10) dos óbitos no período ocorreram nos bairros estudados.

Nota-se que alguns bairros que não aparecem como zonas quentes (“hot spots”) no mapa de Kernel são bairros com taxas de incidência mais altas. Essas diferenças ocorrem devido às populações pequenas nesses bairros, que fazem com que um baixo número absoluto de casos resulte em uma taxa de incidência relativamente alta.

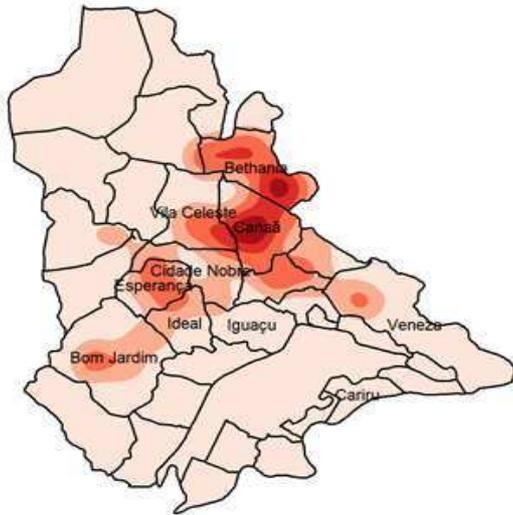


Figura 14: Mapa de Kernel mostrando a distribuição de casos humanos de LV em Ipatinga, MG. As manchas vermelhas (“hot spots”) representam as áreas com mais número de casos de LV. Fonte: Leticia C. Pinheiro.

Tabela 12: Distribuição dos casos de LVH, georreferenciados na cidade de Ipatinga, MG, em 2015 e 2016. *Bairros onde foram colocadas as armadilhas entomológicas.

Bairros com casos de Leishmaniose Visceral Humana	2015		
	2015	2016	Óbitos
Barra Alegre	0	1	0
Bethânia*	16	3	3
Bom Jardim*	5	2	1
Canaã*	7	3	2
Caravelas	2	1	2
Cariru*	0	0	0
Cidade Nobre*	2	2	1
Córrego Novo	0	1	1
Esperança*	3	2	0
Ideal*	0	1	0
Iguaçu*	1	0	0
Jardim Panorama	3	1	0
Limoeiro	0	1	0
Vila Celeste*	5	1	0
Veneza*	3	1	0
TOTAL	47	20	10

5.9 Síntese dos dados entomológicos, caninos e humanos

Em resumo, a Tabela 13 sintetiza todos os casos de LV humana e os óbitos, LV canina e número de flebotomíneos capturados no período de estudo de modo a dar uma visão geral dos aspectos relacionados à LV no município.

Tabela 13: Distribuição do número de flebotomíneos capturados por bairro estudado, do número de cães reagentes nos dois testes sorológicos, e dos casos de LVH e óbitos por ela causados, ocorridos em Ipatinga, MG, em 2015 e 2016.

Bairros	Nº de flebotomíneos capturados	Nº de cães positivos	Nº de casos humanos de LV	Óbitos por LVH
Bethânia	322	410	19	3
Bom Jardim	258	128	7	1
Canaã	77	309	10	2
Cariru	22	1	0	0
Cidade Nobre	37	55	4	1
Ideal	134	49	1	0
Iguaçu	366	42	1	0
Esperança	202	94	5	0
Veneza	47	43	4	0
Vila Celeste	36	113	5	0
TOTAL	1501	1244	56	7

6 DISCUSSÃO

Ipatinga é hoje o município com maior densidade populacional e o que mais sofre com a ocorrência da LV no Vale do Aço. Por outro lado, é o único da região que possui um CCZ com ações de controle voltadas para o cão. 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. Assim, o presente estudo foi realizado nos bairros onde ocorreu o maior número de casos humanos até o ano de 2014, sendo o município classificado recentemente como área de intensa transmissão.

Os inquéritos sorológicos na população de cães e os levantamentos entomológicos flebotomínicos nas áreas endêmicas revelaram altas taxas de

prevalência canina e a presença predominante do vetor, demonstrando um elevado risco de transmissão para o homem (VIEIRA & COELHO, 1998). As epidemias registradas em importantes centros urbanos do país evidenciam como o processo migratório do campo para as grandes cidades influenciou na mudança do perfil epidemiológico da LV (VIEIRA & COELHO, 1998). E esse estabelecimento de novas fronteiras da doença e sua urbanização, comprovada pela ocorrência de casos em cidades de médio e grande porte (MAIA-ELKOURY et al., 2008, PRADO et al., 2011; SARAIVA et al., 2011; LARA-SILVA et al., 2014), está evidente na cidade de Ipatinga.

Pela primeira vez no município, foi estudado o perfil epidemiológico da LV levando-se em conta não só o aspecto vetorial, mas a doença humana e canina e sua distribuição espacial. Entre 2015 e 2016, que foi o período de estudo, o número de casos humanos de LV caiu mais da metade (de 47 para 20 casos, Tabela 12), apesar de não ter sido realizada nenhuma intervenção direta, como borrifação ou manejo ambiental nos bairros de estudo, decorrente desta pesquisa. As borrifações seguiram o cronograma normal de acordo com a ocorrência de novos casos humanos. Porém, houve uma divulgação maior sobre as leishmanioses através das rádios locais e os médicos foram orientados a fazer o diagnóstico diferencial para LV nos hospitais diante do elevado número de casos humanos em 2014.

Em relação ao levantamento entomológico realizado no município, nosso estudo apresentou uma fauna flebotomínica diversificada, com presença de 16 espécies, sendo três delas responsáveis pela transmissão das leishmanioses no Novo Mundo: *Lu. longipalpis*, *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani*. A espécie de flebotomíneo predominantemente capturada foi *Lu. longipalpis* (61,9%), 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; MICHALSKY et al., 2009b, 2011).

O município estudado foi considerado receptivo para *Lu. longipalpis*, uma vez que já foi constatado, através de inquérito entomológico prévio realizado pelo município, a presença do vetor (informação pessoal, Secretaria

Municipal de Saúde de Ipatinga, 2014).

A maioria dos flebotomíneos capturados neste estudo foi macho (57%), corroborando com outros trabalhos realizados em MG (SOUZA et al., 2004; MONTEIRO et al., 2005; DIAS et al., 2007; LARA-SILVA et al., 2015). O grande número de machos encontrados no peridomicílio pode ser justificado pela alta concentração de flebotomíneos em abrigos de animais, formando abundantes "leks" ou agregados (XIMENES et al., 1999; LAINSON & RANGEL, 2003).

Embora se tenha encontrado um maior número de flebotomíneos capturados no peridomicílio (52,9%), a alta densidade de flebotomíneos encontrada no intradomicílio (47,1%) sugere que a transmissão também possa estar ocorrendo no interior das residências. Os dados mostram um número bastante aproximado de flebotomíneos capturados nos dois ambientes, confirmando assim, a adaptação dos vetores ao ambiente modificado pelo homem. Nossos resultados corroboram com os de Sherlock (1996) que encontrou um elevado número de exemplares capturados tanto no intra como no peridomicílio associado a um grande número de animais domésticos, condições sanitárias inadequadas e baixo nível socioeconômico. Sobretudo, devido à alta capacidade vetorial associada à antropofilia e ao encontro no intra e peridomicílio, *Lu. longipalpis* é considerada a espécie de maior importância médica (MONTROYA LERNA et al., 2003; SOARES & TURCO, 2003) e foi a espécie predominante encontrada neste estudo.

Um grande número de flebotomíneos encontrados em ambientes com presença de galinheiro é algo muito discutido na literatura devido a sua grande importância na epidemiologia das leishmanioses (ALEXANDER et al., 2002; MOREIRA Jr. et al., 2003; MORENO et al., 2005). A localização da armadilha no interior do galinheiro, a deixa protegida do vento e das fontes luminosas externas, podendo favorecer o encontro de mais flebotomíneos nesses ambientes (SILVA et al., 2012). Muitas espécies de flebotomíneos se beneficiam dessas mesmas condições e utilizam tais abrigos como locais de descanso após a cópula e a hematofagia (XIMENES et al., 1999). Outra característica importante é que estes ambientes não são borrifados

comumente, contribuindo para que os flebotomíneos se abriguem nesses locais em detrimento daqueles borrifados. Porém, MORENO et al. (2005) em estudo em Sabará (MG), relatam que não houve relação entre infecção por *Le. infantum* e galinheiros.

Uma questão discutida na literatura é o uso de galinheiros como barreiras zoo-profiláticas, que podem contribuir para a captura de um maior número de flebotomíneos do que em outros ambientes, especialmente no intradomicílio (TEODORO et al., 2007; REINHOLD-CASTRO et al., 2008). Outro ponto em relação aos galinheiros, é que flebotomíneos infectados com *Leishmania* podem ter a infecção eliminada quando este realiza um segundo repasto em galinhas (ALEXANDER et al., 2002). Em nosso estudo, duas residências possuíam galinheiros nos peridomicílios (Iguaçu e Esperança) e apresentaram um número elevado de flebotomíneos capturados (24,4% e 13,5% respectivamente).

A densidade populacional dos flebotomíneos no ambiente peridomiciliar está diretamente relacionada ao grau de atratividade desses insetos aos animais domésticos, como também a adaptabilidade dos mesmos às condições ambientais encontradas como: ambiente rico em matéria orgânica favorável à maturação das formas imaturas, presença de animais para a alimentação sanguínea dos adultos e uma gama de micro habitats que os protegem das situações adversas (LIMA, 1986; XIMENES et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2012).

Estudo realizado em Belo Horizonte avaliou potenciais fatores de risco de contrair LV e mostraram que a presença de animais domésticos, matéria orgânica abundante, armazenamento de lixo de forma inadequada, tijolos e pedras empilhadas, árvores e quintais estão relacionados com sua ocorrência (MORENO et al., 2005).

Camargo-Neves et al. (2001) ressaltam a importância de analisar a densidade vetorial e correlacioná-la com os aspectos ligados ao peridomicílio, tais como presença de vegetação, raízes, troncos de árvores e matéria orgânica no solo, que representam possíveis abrigos e criadouro para o vetor.

Assim, no estudo realizado em Ipatinga, as armadilhas foram colocadas em locais estratégicos para a captura de flebotômíneos, locais estes sombreados e, quando possível, próximas às vegetações. Em algumas residências havia árvores frutíferas e/ou animais domésticos (galinhas e/ou cães). Isso pode ter favorecido o encontro da fauna flebotomínica diversificada e, especialmente, o grande número de flebotômíneos capturados, sobretudo de *Lu. longipalpis* (bairros Iguazu e Esperança). As condições observadas nos peridomicílios dessas residências como disponibilidade de matéria orgânica no solo e presença de galinhas, podem ser consideradas como potenciais fatores de risco na transmissão da LV (CAMARGO-NEVES et al., 2001; MORENO et al., 2005).

Os fatores climáticos como temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade, influenciam de modo variável na população de flebotômíneos, dependendo da região estudada (FORATTINI, 1960). Este mesmo autor, analisando a influência da sazonalidade na densidade de flebotômíneos observou que nos meses mais quentes e úmidos há um aumento do número de flebotômíneos capturados, enquanto nos meses secos e frios há uma redução considerável na densidade populacional destes insetos, verificado também por outros autores (BARATA et al., 2011a,b; BARATA et al., 2004; MONTEIRO et al., 2005; DIAS et al., 2007). No estado do Mato Grosso do Sul, a densidade maior de flebotômíneos foi observada durante a estação chuvosa (GALATI et al., 1997).

É importante salientar que não há uma regra; deve-se considerar que os fatores climáticos influenciam de modo variável na população de flebotômíneos, de acordo com a região estudada e com o padrão de distribuição de chuvas. Barata et al. (2004), mostrou que precipitação pluviométrica e umidade influenciaram significativamente na densidade de flebotômíneos, enquanto a temperatura não teve efeito sobre a população dos mesmos. Em nosso estudo, a temperatura não foi um fator determinante na densidade de flebotômíneos, como demonstrado também por outros autores (MISSAWA & DIAS, 2007; DIAS et al., 2007; MICHALSKY et al., 2009; LANA et

al., 2014). Em síntese, neste estudo não foi possível realizar associação estatisticamente significativa entre as variáveis climáticas e a densidade vetorial, provavelmente pelo tempo de captura que não permitiu analisar variáveis de anos atípicos, mas houve a tendência de maior densidade vetorial no período da chuva.

Sabe-se que Ipatinga é área endêmica para LT e que nesse estudo houve o encontro das espécies *Ny. intermedia* e *Ny. whitmani*, confirmados vetores de LT (BRASIL, 2010a), porém em pequena quantidade (aproximadamente 2% dos exemplares capturados).

Tanure et al. (2015) realizaram capturas em Governador Valadares, cidade próxima à Ipatinga, e encontraram *Lu. longipalpis* como espécie predominante; já Barata et al. (2011b) realizaram capturas no mesmo município, e encontraram *Ny. intermedia* em maior número. Souza et al. (2009) encontraram como espécies predominantes em Timóteo, município vizinho a Ipatinga, *Ny. whitmani* e *Ny. intermedia*.

Embora tenha sido realizado estudos relacionados à fauna flebotômica em municípios vizinhos a Ipatinga e endêmicos para LT, não houve nessas localidades estudo de infecção natural para verificar qual espécie de *Leishmania* está envolvida na transmissão (TANURE et al., 2015; BARATA et al., 2011b; SOUZA et al., 2008a, ANDRADE-FILHO et. al, 1997). Por outro lado, um estudo realizado por Lara-Silva et al. (2014) em um município próximo a Ipatinga, mostrou um roedor (*Rattus norvegicus*) e o vetor da LV (*Lu. longipalpis*) infectados com DNA de *Le. infantum*.

Sabe-se que roedores participam do ciclo de transmissão silvestre da LT (BRANDÃO-FILHO et al., 1994; VASCONCELOS et al., 1994) e que *Le. infantum* já foi encontrado causando lesões cutâneas em pacientes pertencentes a outras regiões, mas é raro no Brasil (LYRA et al., 2015; OLIVEIRA-NETO et al., 1986). Talvez *Le. infantum* possa estar envolvida em lesões cutâneas, frente ao baixo número de vetores comprovados de LT capturados no município (aproximadamente 2%). Mas só podemos sugerir, uma vez que não foi feito um estudo completo da epidemiologia da LT incluindo

reservatórios, parasito, vetores e hospedeiros no município.

A taxa geral de infecção natural dos flebotomíneos por *Leishmania* em nosso estudo foi de 0,3%. Taxas aproximadas já foram encontradas em trabalhos realizados em outras áreas endêmicas de LV no Brasil (RYAN et al., 1990; GALATI et al., 1996; MIRANDA et al., 2002).

Em área endêmica do Estado da Bahia detectou-se taxa mínima de infecção de até 1,5% por *Le. braziliensis* (MIRANDA et al., 2002); em ambiente florestal de Mato Grosso do Sul, a taxa de infecção por flagelados em *Ny. whitmani* foi de 0,16% (GALATI et al., 1996), enquanto uma pesquisa realizada em localidades com casos recentes de leishmaniose cutânea, demonstrou taxa de infectividade por flagelados de 0,52% (RYAN et al., 1990). Foram encontradas taxas de infecção natural por *Le. infantum* de 1,25% e 0,25% em São Luís, no Maranhão (Soares et al., 2010); de 3,49% em Janaúba (MICHALSKY et al., 2011), e de 2,5% em Governador Valadares (LARA-SILVA et al., 2011). O índice de positividade das fêmeas de flebotomíneos para formas promastigotas de *Leishmania* spp. foi igual a 1,18% em estudo realizado em Três Lagoas, Mato Grosso do Sul. Na natureza, mesmo em áreas endêmicas e de alta transmissão, a prevalência da infecção por *Leishmania* na população total de flebotomíneos pode ser inferior a 0,1% (OLIVEIRA et al., 2010).

Neste estudo, *Ev. cortelezzii* foi encontrada naturalmente infectada por *Le. infantum*. Esta espécie apresentou grande número de exemplares capturados (21%) e já foi encontrada naturalmente infectada em outros trabalhos realizados em MG (CARVALHO et al., 2008; SARAIVA et al., 2009; LANA et al., 2014). Porém, mais estudos são necessários a fim de investigar o real papel epidemiológico desta espécie na transmissão das leishmanioses.

A retirada do galinheiro da casa do bairro Esperança foi uma opção do morador e parece ter contribuído na diminuição considerável do número de flebotomíneos capturados nos meses seguintes, conforme se pode verificar, na Tabela 6, a partir do mês de novembro. Apesar de terem sido capturados poucos flebotomíneos no mesmo bairro entre abril e julho de 2015, esses meses também foram mais frios e secos corroborando com dados da literatura,

em que se captura menor número de flebotomíneos nessas condições climáticas. Portanto, a diminuição do número de flebotomíneos após a retirada do galinheiro no bairro Esperança parece indicar a relação entre galinhas e flebotomíneos, conforme a literatura (DIAS et al., 2003; BORGES et al., 2009).

Em relação às borrifacões, o CCZ de Ipatinga adota medidas de controle químico contra os vetores da LV somente em áreas com casos autóctones humanos notificados, e após investigação entomológica, conforme os procedimentos determinados pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2006). Essas borrifacões ocorreram nos bairros Bethânia, Canaã, Vila Celeste e Esperança no período de estudo, devido à ocorrência de novos casos humanos. Porém o único que parece ter havido influência no número de flebotomíneos capturados foi o Canaã, pois não foi capturado nenhum exemplar no mês em que houve a borrifacão (outubro) nem no mês seguinte. E nos três meses consecutivos e considerados muito quentes também o número capturado foi baixo. O mês que houve borrifacão foi marcado por pouca precipitação, menor umidade relativa do ar e temperatura mais alta. O ponto de captura deste bairro é um canil da Polícia Militar de Ipatinga, que é monitorado constantemente em função dos cães adestrados ou em fase de adestramento que ali se encontram.

O bairro Cariru apresentou um número baixo de exemplares capturados, sobretudo de *Lu. longipalpis*, um único exemplar. Por outro lado, apresentou o maior número de *Ny. intermedia* capturado (61,1%) no período de estudo. Neste bairro, ocorreu o maior número de casos de LT do município entre 2012 e 2016, totalizando 34,7% dos 75 casos (Secretaria Municipal de Saúde Ipatinga, 2017). Neste contexto, a coincidência de ocorrência desta espécie de flebotomíneo e casos humanos de LT neste bairro corroboram com a determinação de sua capacidade vetorial, ou seja, a possibilidade de *Ny. intermedia* ser responsabilizada pela veiculação do parasito *Le. braziliensis*, (apesar de não ter sido encontrado naturalmente infectado nenhum dos 11 "pools" formados com esta espécie de flebotomíneo).

Para reforçar essa possibilidade é importante salientar que não houve encontro de *Ny. whitmani* neste bairro, que apresenta características peculiares

de topografia e vegetação em relação aos demais bairros estudados. Ele é cercado por extensa vegetação que inclui mata ciliar e cinturão verde, sendo localizado em uma área de topografia plana em um nível superior à margem do rio Piracicaba. Limita-se a sul pelo curso d'água e a norte pela reserva florestal. Essas características podem ter favorecido o encontro de espécies associadas à vegetação natural modificada.

A espécie *Ny. whitmani*, encontrada principalmente no Bethânia e Bom Jardim, é caracterizada por fazer a transição entre o ambiente silvestre e domiciliar (FALQUETO, 1995).

A densidade populacional de flebotomíneos parece estar associada ao manejo ambiental. A casa do bairro Vila Celeste é localizada em um sítio com diversas árvores frutíferas e presença de cães domésticos, mas estava constantemente limpa e foi onde capturamos um número baixo de flebotomíneos. Apesar disso, foi uma das residências que encontramos *Ev. cortelezii* com DNA de *Leishmania*. Já a residência do bairro Esperança, onde encontramos um "pool" positivo, foi um dos locais com mais número de flebotomíneos capturados, havia galinheiro e muita matéria orgânica acumulada no quintal.

Os bairros Cariru e Cidade Nobre são bairros mais nobres em relação aos demais e também apresentaram baixo número de flebotomíneos. No Cariru, a proprietária da residência não possuía cão doméstico. Já no Cidade Nobre, a proprietária da residência possuía cães e já foi diagnosticada com LV e apresentou cura após tratamento, mas um de seus cães foi sacrificado pós diagnóstico positivo para LV. Nesse caso, houve mudança de hábito em relação à limpeza do quintal após o diagnóstico de LV. Antes, a proprietária guardava esterco em seu quintal e após ter adquirido a doença e conhecimentos sobre sua transmissão deixou este comportamento. Atualmente nesta residência há cães domésticos, mas o quintal é bastante organizado e limpo.

Dessa forma, podemos dizer que a limpeza e organização dos quintais das residências destes bairros (Cariru, Cidade Nobre, Veneza e Vila Celeste) contribuíram para o baixo número de flebotomíneos capturados, corroborando

com estudos que demonstram a importância do manejo ambiental para o controle de vetores (LARA-SILVA et al., 2017; CAMARGO-NEVES et al., 2001). Em Belo Horizonte, um estudo em relação às medidas de controle, mostrou uma redução estatisticamente significativa no número de flebotômíneos no trecho onde houve somente o manejo ambiental e a retirada de cães soropositivos, enquanto houve apenas uma tendência de queda no número de flebotômíneos no trecho onde houve somente a borrifação e retirada de cães soropositivos, demonstrando a importância do manejo ambiental, que pode ser mais efetiva que a borrifação (LARA-SILVA et al., 2015).

A maior parte dos estudos que analisam a possível relação entre existência de cobertura vegetal em cidades e as características socioeconômicas da população utilizam variáveis provenientes dos Censos, sendo as mais comuns a densidade demográfica, o nível escolar, a taxa de desemprego, o valor médio das habitações e a renda familiar. De acordo com Aza (2016), o Percentual de Cobertura Arbórea de Ipatinga é de 32,54%, valor próximo ao recomendável por Oke (1985) para áreas urbanas, que é de 30%; e o ICA corresponde a 102 m² habitante⁻¹. Embora o índice seja bastante elevado, se comparado ao valor recomendável pela Sociedade Brasileira de Arborização Urbana (SBAU) -15 m² habitante - é necessário ressaltar que a vegetação não está distribuída de forma homogênea entre os bairros, como se pode verificar no trabalho realizado por este mesmo autor.

Quase todos os bairros estudados são contemplados com uma cobertura arbórea adequada em relação ao seu número de habitantes, exceto Canaã, Iguazu e Esperança. Esses bairros estão entre os mais populosos e com as maiores densidades demográficas e construtivas, com poucos espaços vazios. Desse modo é possível observar que a população economicamente menos favorecida é aquela que vive a maior parte dos problemas ambientais, destacando-se a relação entre a distribuição das áreas verdes públicas e as distintas condições de vulnerabilidade social urbana (AZA, 2016).

O conhecimento dos reservatórios é importante para o efetivo controle da LV. Entretanto, outros fatores de risco relacionados à epidemiologia da

doença são mais complexos, como a urbanização do ciclo de transmissão e a manutenção de um ciclo enzoótico nas cidades (CABRERA et al., 2003). Com relação ao cão, vários inquéritos sorológicos revelaram a sua importância como reservatório doméstico para *Le. infantum* em municípios de MG, revelando altas taxas médias de prevalência canina (FRANÇA-SILVA et al., 2003; MONTEIRO et al., 2005; LARA-SILVA et al., 2014). Corroborando com esses resultados, neste estudo também foi encontrada uma taxa de soropositividade canina para LV alta (14,8%).

Diferentes materiais biológicos podem ser utilizados nas reações para diagnóstico da LV: aspirado de linfonodos, medula óssea, baço, sangue total, camada leucocitária, cultura e sangue coletado em papel filtro, biópsia ou escarificação da pele. No presente estudo foi utilizado aspirado de medula óssea para cultura e esfregaço, "imprints" de pele em lâminas, analisados por microscopia, além da realização de PCR de amostras de medula e pele.

O melhor teste de laboratório para diagnosticar LV é a demonstração do parasita em material de biópsia ou punção aspirativa de tecidos (MELO, 2004). É um método seguro de diagnóstico, uma vez que o resultado positivo é dado pela observação direta de formas amastigotas ou promastigotas, no caso de cultura de parasitos. No caso do aspirado de medula e baço geralmente pode-se verificar a presença de formas amastigotas do parasito.

A punção aspirativa esplênica é o método que oferece maior sensibilidade (90-95%) para a demonstração do parasita, seguida pelo aspirado de medula óssea, biópsia hepática e a aspiração de linfonodos. Por ser um procedimento mais seguro, recomenda-se a punção aspirativa da medula óssea (BRASIL, 2006). A especificidade destes métodos é de 100%, mas a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição dos parasitas não é homogênea no mesmo tecido (GONTIJO & MELO, 2004).

O exame direto ou a cultura de aspirados de baço ou medula óssea são as principais técnicas usadas para o diagnóstico da LV tanto em humanos como em cães. Já o exame microscópico de fragmentos de pele ou biópsia de lesão como "imprints", embora rápido e de baixo custo, tem sensibilidade

limitada, particularmente em lesões crônicas. A técnica de cultura “in vitro” é ligeiramente mais sensível que o exame microscópio de biópsias de lesão e amostras histológicas, apesar de mais laboriosa, onerosa e sujeita a contaminações microbiológicas (MANNA et al., 2004). Neste estudo a sensibilidade foi maior na cultura (66,76%) que no imprint de pele e esfregaço de aspirado de medula (50% a 54,55%, respectivamente).

Quanto ao diagnóstico molecular o método da PCR, constitui-se em uma nova perspectiva para o diagnóstico da LV, pois apresenta 94% de especificidade (BRASIL, 2006). Rodrigues et al. (2002) obtiveram uma sensibilidade de 95,4% e especificidade de 100% da PCR em amostras de pacientes. Uma explicação possível para os resultados falso-negativos é atribuída à baixa carga parasitária, instabilidade do DNA extraído ou a qualidade da amostra de DNA, que podem apresentar diferentes concentrações de inibidores da DNA polimerase. Neste estudo, obtivemos resultado semelhante ao estudo supracitado, na PCR de pele (95,5%), enquanto para aspirado de medula foi 68,2%.

Segundo Solano-Gallego et al. (2001) a frequência de detecção de DNA do parasito é variável em diferentes tecidos. A baixa porcentagem de amostras positivas na medula óssea pode indicar que a disseminação do parasito pela medula não ocorra com frequência nos animais. No mesmo estudo, os autores sugerem que a pele é o maior tecido reservatório de parasitos em cães, já que a PCR utilizando biópsia de pele detectou DNA de *Leishmania* em metade dos cães estudados e da medula somente 17%. Isso corrobora com nosso estudo, pois a PCR de pele apresentou a maior taxa de positividade em relação a todos os métodos (95,5%). Comparando o parasitológico de pele e medula, a pele também apresentou a maior positividade (54,55%). Estes resultados estão de acordo com os estudos de Reithinger et al. (2002), que demonstraram que a carga parasitária tende a ser menor em aspirados de medula óssea, baço e linfonodos, pois estes órgãos contêm inibidores da PCR que podem afetar a sensibilidade da técnica.

Em relação ao reservatório doméstico, a presença de cães assintomáticos para LV é uma dificuldade enfrentada pelos órgãos de saúde pública. Embora sem sinal clínico de LV, alguns destes cães são infectantes para *Leishmania* e podem atuar como uma fonte de infecção (MICHALSKY et al., 2007). Além disso, Molina et al. (1994), demonstraram que a infectividade dos cães com LVC não está exclusivamente ligada ao estágio sintomático da doença. Isso reforça que a remoção de cães soropositivos, apesar de polêmica, é uma medida importante para o controle da LV humana (ALENCAR et al., 1991; DEANE, 1956; DEANE & DEANE, 1955; DEANE & DEANE, 1962; DEANE et al., (1955).

No Brasil, no município de Caratinga, Vale do Rio Doce (MG), uma ação controlada envolvendo a eutanásia de todos os cães soropositivos, culminou com o controle da LV, após 10 anos de intensivos trabalhos, além da rigorosa manutenção da vigilância epidemiológica (MAGALHÃES et al., 1980). Um resultado semelhante foi observado na Ásia e Europa, com o decréscimo da incidência de LV, após a eliminação de cães infectados domiciliados em áreas endêmicas (ASHFORD, 1996).

A transmissão continuada pode estar relacionada com a baixa aceitação da eutanásia dos cães pelos proprietários e o tempo que leva para remoção de cães sorologicamente positivos e pela viragem sorológica dos mesmos (ASHFORD et al., 1998; ROMERO & BOELAERT, 2010). Ou ainda, a permanência do cão infectado nos domicílios pode ser explicada por vários motivos: não colaboração dos moradores, ausência de uma estratégia eficaz por parte dos órgãos competentes para exame dos cães de modo sistemático, a baixa sensibilidade do teste utilizado em estudos de forma geral – resultando em falsos negativos, além disso, o fato de existir cães assintomáticos garante a manutenção do parasito no município. Deste modo, a soroprevalência canina se mantém alta e surgem novos casos humanos (SILVA et al., 2001; CABRERA et al., 2003).

Costa et al. (2007) apontam um efeito protetor da eliminação de cães infectados somada à borrifação intradomiciliar na incidência da infecção por *Le.*

infantum, mostrando que em comparação com áreas 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 sororeativos não esteve significativamente associada à redução da soroconversão.

Como eutanásia dos cães soropositivos tem sido bastante discutido, trabalhoso e de eficácia duvidosa (DIETZE et al., 1997), uma alternativa é a profilaxia através do uso de coleiras e vacinas nos cães, já que não há vacina humana disponível no mercado. Outra alternativa é o uso de coleiras impregnadas com deltametrina tem mostrado resultados promissores na proteção dos animais, com consequências na transmissão (KILLICK-KENDRICK et al., 1997). Mas a questão dos cães errantes continua sendo uma problemática no contexto da saúde pública.

Outra questão importante é a ausência de sintomas clínicos da LVH em área com prevalência da doença humana e canina, ou mesmo casos assintomáticos e subclínicos sem evolução para fase aguda da doença. Isso leva a um quadro subestimado sobre a problemática da LV no Brasil (MORENO et al., 2006; CALDAS et al., 2002; GAMA et al., 2004).

Além disso, Oliveira et al. (2001) sugeriu que todo caso humano de LV deve ser monitorado por no mínimo seis meses, já que a ocorrência de um caso humano em um domicílio aumenta a chance de se observar outro caso humano na mesma casa nos próximos três meses, mas não altera a chance de outro evento no mesmo bairro.

O geoprocessamento tem sido amplamente utilizado no estudo das leishmanioses, permitindo a análise da dependência espacial entre LV canina e humana, distribuição vetorial e/ou caracterização de áreas com alta incidência e risco de morte (CAMARGO-NEVES et al., 2001; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006; FRANÇA-SILVA et al., 2003; MARGONARI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2001; PRADO et al., 2011). Sendo assim, trata-se de uma importante ferramenta epidemiológica, visando o planejamento de ações de controle de doenças.

França-Silva et al. (2003), utilizando ferramentas de análise espacial e temporal em Porteirinha (MG) encontrou um “cluster” bem definido de casos caninos coincidentes com casos humanos. Prado et al. (2011), através de mapa de Kernel, descreveu a distribuição espacial da LV humana e canina na área urbana do município de Montes Claros, no período de 2007 a 2009, verificando-se a relação de casos humanos e caninos. Diversos estudos em Belo Horizonte também apontaram para uma relação positiva entre LV humana e canina (ARAÚJO et al., 2013; MARGONARI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2001), seja pela sobreposição da infecção canina com as maiores taxas de incidência de LVH ou risco de contrair a doença.

Em nosso estudo, Ipatinga demonstrou a existência de alguns focos da LV (Figura 12), de modo que os mapas temáticos mostraram, visualmente, uma associação entre a prevalência da doença canina e a incidência humana. Os bairros com altas taxas de prevalência de LV canina coincidem com os bairros com altas taxas de incidência de LV humana.

Ressalta-se que a descontinuidade das ações de controle vetorial compromete de forma significativa as ações de prevenção e controle da LV em determinado município, uma vez que a manutenção da transmissão e a reincidência de casos humanos são um reflexo da descontinuidade das ações, relacionadas tanto ao cão como ao vetor, e ao manejo ambiental (CAMARGO-NEVES et al., 2003; CAMARGO-NEVES et al., 2001; FIUZA et al., 2010). Pois do contrário, acabam não cumprindo seu objetivo (CAMARGO-NEVES et al., 2003).

A análise espacial permitiu visualizar as regiões com maiores taxas de LV, a densidade vetorial, possibilitando a identificação de áreas-alvo e fatores de risco, a fim de orientar estratégias mais efetivas de controle/prevenção. Entre elas estão: a remoção de cães sorologicamente positivos e a pulverização de inseticidas nos domicílios em meses com maior densidade populacional de vetores.

Esse tipo de trabalho em Ipatinga é importante não só para a pesquisa do Ministério da Saúde, mas também para a secretaria de saúde local. Pois os

resultados poderão auxiliá-la na aplicação das medidas de controle/prevenção da LV de forma mais direcionada, priorizando as áreas onde há necessidade de uma vigilância constante e integrada.

7 CONCLUSÕES

A fauna flebotomínica apresentou-se diversificada, com a presença de espécies vetoras das leishmanioses (*Lu. longipalpis*, *Ny. whitmani* e *Ny. intermedia*). O encontro das espécies *Ny. whitmani* e *Ny. intermedia*, reforça a participação destas na transmissão da doença no município, que é endêmico para LT.

O grande número de *Lu. longipalpis* capturados no intradomicílio e o encontro destes infectados naturalmente por *Le. infantum*, demonstram a grande adaptação deste vetor ao ambiente doméstico, contribuindo para que a transmissão possa estar ocorrendo, também, no interior das residências.

Não houve correlação estatisticamente significativa dos flebotomíneos capturados com fatores climáticos, porém houve uma tendência de maior densidade nos meses mais quentes e úmidos.

O encontro de *Ev. cortelezzii* infectado com *Le. infantum* demonstra que esta espécie merece mais investigação do ponto de vista da transmissão deste parasito em áreas urbanas.

A alta taxa de soropositividade canina (14,83%) e a detecção do DNA de *Le. infantum* em todos os cães necropsiados, confirmam a importância destes reservatórios na transmissão da LV em área urbana.

Entre os tecidos estudados a pele apresentou as maiores taxas de positividade tanto no diagnóstico molecular (PCR) quanto no parasitológico (imprint), quando comparado à medula. Assim, a pele demonstra ser um excelente tecido para diagnóstico.

Os bairros Bethânia, Canaã, Vila Celeste, Esperança e Bom Jardim obtiveram altas taxas de LV humana e canina. Nestes bairros, também, foram capturados um grande número de flebotomíneos e/ou detectado a presença de

Leishmania, por isso, merecem mais atenção do ponto de vista da vigilância epidemiológica.

Os resultados demonstram que a LV está amplamente distribuída em Ipatinga, caracterizando o município como importante área endêmica, devido à presença elevada do vetor, alta taxa de positividade canina e ao grande número de casos humanos notificados, traduzindo-se em um grave problema de saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, P. et al. Canine leishmaniosis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *Journal of Parasitology*, 77: 557-561, 1991.
- ABRANCHES, et al. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 13, 537-550. 1991.
- AFONSO, P.S. et al. Doenças emergentes, reemergentes e negligenciadas: revisão de literatura. *Revista Ciências da Saúde*. v. 12, n. 1, p. 29-38, 2010.
- AGUIAR, G.M.; MEDEIROS, W.M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. p.207- 255, 2003. In Rangel EF & Lainson R (org.), *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 368 pp. 2003.
- AGUIAR G.M.; SCHUBACK, P.A.; VILELA, M.L.; AZEVEDO, A.C.R. Aspectos da Ecologia dos Flebotomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. II- Distribuição vertical (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 80:187-194, 1985.
- AGUILLAR, C.M. et al. Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 15- 16, 1998.
- ALENCAR, J.E.; NEVES, J.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral. In *Doenças Infecciosas e Parasitárias* (R. Veronesi, org.), Guanabara Koogan. 706–717, 1991.
- ALENCAR, J.E.; PESSOA E.P.; FONTENELE F., “Infecção natural de *Rattus rattus alexandrinus* por *Leishmania* (provavelmente *L. braziliensis*) em zona endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado do Ceará, Brasil,” *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 2, pp. 347–348, 1960.
- ALEXANDER, B.; CARVALHO, R.L.; MCCALLUM, H.; PEREIRA, M.H. Role of domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 8:1480-5, 2002.
- ALEXANDER, B. et al. Ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in northeastern Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87(3):387-395, 1992.
- ALVAR, J, et al. Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 57(04):1–88, 2004.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7(5), 2012.

ALMEIDA, O.S. et al. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, estado de Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43:723-727, 2010.

ANDRADE FILHO, J.D. et al. Carneiro APS, Lima MLN, Santiago RM, Gama MA, Santos CA, Falcão AL, Brazil RP. Flebotomíneos de Timóteo, Estado de Minas Gerais, Brasil (Diptera: Psychodidae). *Caderno de Saúde Pública*, 13: 767-770, 1997.

ANTONIALLI, S.A.C. et al. Spatial analysis of American visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul state, Central Brazil. *Journal of Infection*, 54:509-514, 2007.

ARAÚJO, V.E.M. et al. Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area. *PLoS Neglect Tropical Diseases*, 7(11):e2540, 2013.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30:1269-81, 2000.

ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology*, 14: 523-532, 1996.

AZA, N.M.F. Análise da distribuição espacial da cobertura arbórea urbana através da relação das variáveis socioeconômicas, Ipatinga - MG. Dissertação de Mestrado. Viçosa. 2016.

AZEVEDO, A.C.R.; LUZ, S.L.B.; VILELA, M.L.; RANGEL, E.F. Studies on the sandfly fauna of Samuel ecological station, Porto Velho Municipality, Rondônia state, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 88(4): 509-512, 1993.

BARATA, R.A. et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(5):421-5, 2005.

BARATA, R.A. et al. Phlebotomine Sand Flies in Porteirinha, na Area of American Visceral Leishmaniasis Transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 481-487, 2004.

BARATA, R.A. et al. Assessment of sand fly (Diptera, Psychodidae) control using cypermethrin in an endemic area for visceral leishmaniasis, Montes Claros, Minas Gerais State, Brazil. *Caderno de Saúde Publica*, 27(11):2117-23, 2011a.

BARATA, R.A. et al. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in Governador Valadares, a transmission area for American tegumentary

leishmaniasis in State of Minas Gerais, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(2), 136-139, 2011b.

BARCELLOS, C.; BASTOS, F.I. Geoprocessamento, ambiente e saúde: uma união possível? *Caderno de Saúde Pública*, 12: 389-97, 1996.

BASIMIKE, M.; MUTINGA, M.J.; KUMAR, R. Distribution of sandflies (Diptera: Psychodidae) in three vegetation habitats in the Marigat area, Baringo district, Kenya. *Journal of Medical Entomology*, 28: 330-333, 1991.

BEATI, L.; CÁCERES, A.G.; LEE, J.A.; MUNSTERMANN, L.E. Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. *International Journal for Parasitology*, 34(2):225-34, 2004.

BELO, V.S. et al. Factors associated with visceral leishmaniasis in the Americas: a systematic review and meta-analysis. *Plos Neglect Tropical Disease*, 7:e2182, 2013.

BORGES, B.K.A. et al. Animal presence and the risk for transmission of visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 61, n. 5, p. 1035-1043, 2009.

BORGES, B.K.A. Fatores de risco para Leishmaniose Visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais. Dissertação de Mestrado. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

BRANDÃO FILHO, S.P. et al. American Cutaneous Leishmaniasis in Pernambuco, Brasil: eco- epidemiological aspects in 'Zona da Mata' region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89(3): 445-449, 1994.

BRASIL. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. Ministério da Saúde. Ministério da Saúde (MS)/ Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2010a.

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. Ministério da Saúde. II Fórum de discussão sobre o tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC) 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/PDF/ii_forum_tratamento_relatorio_final30_7_10.pdf. Acesso em: 04/12/2016.

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. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Técnica Conjunta 01/2011 CGDDT/CGLAB/DEVIT/SVS/MS de 29 de dezembro de 2011.

BRASIL. Nota Técnica Conjunta de Leishmaniose Visceral Humana N°03/SMS/DVS/GVE/2017. Secretaria Municipal de Saúde de Santa Catarina-Diretoria de Vigilância em Saúde – Gerência de Vigilância Epidemiológica de 12 de setembro de 2017.

BRASIL. Nota técnica NT/SESA/CEVADVDTV/2018. Vigilância Epidemiológica da leishmaniose visceral humana no Paraná. 2018.

BRAZIL, R.P; BRAZIL, B.G Bionomia. In: Rangel EF, Lainson R (orgs) Flebotômíneos do Brasil. Editora da Fundação Oswaldo Cruz, 257-274, 2003.

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

BRITO, M.G; CHAMONE, T.L. Manual de condutas básicas na campanha de vacinação anti-rábica animal. Belo Horizonte: Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais, 16 p. 2001.

CABRERA, M.A.A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assesment of risk factors. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 45: 79-83, 2003.

CALDAS, A.D.J.M. et al. Risk factors asso-ciated with asymptomatic infection by Leishmania chagasi in northeast Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,96(1):21–28, 2002.

CAMARGO NEVES V.L.F et. al. Controle da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 35:90-96, 2003.

CAMARGO NEVES, V.L.F. et al. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana - Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. Caderno de Saúde Pública, 17(5):1263–7, 2001.

CARVALHO, G.M. et al. Naturally infected Lutzomyia sand flies in a Leishmania-endemic area of Brazil. Vector Borne Zoonotic Diseases. 8:407-14, 2008.

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

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

CHAGAS, A.P. et al. Ecological aspects of phlebotomine sand flies in foci of leishmaniasis in the eastern Amazon, Pará State, Brazil *Revista Pan-Amaz Saude*, 7 núm esp:123-132, 2016.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, 5(11):873–82, 2007.

COSTA, C.H.N.; TAPETY, C.M.M.; WERNECK, G.L. Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 40(4):415–9, 2007.

COSTA, M.C.N.; TEIXEIRA, M.G.L.C. A concepção de “espaço” na investigação epidemiológica. *Caderno de Saúde Pública*, 15: 217-279, 1999.

CORREDOR, A. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40: 480-486, 1989.

COSTA, C.H.N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, 24(12):2959–63, 2008.

COUTINHO, M.T.Z.; LINARDI, P.M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Veterinary Parasitology*, 147: 320-325, 2007.

CROSS, E.R.; NEWCOMB, W.W.; TURCKER, C.J. Use of weather data and remote sensing to predict the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in southwest Asia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54: 530-536, 1996.

CRUZ, I. et al.. A nested polymerase chain reaction (Ln- PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in coinfecting patients with human immunodeficiency virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96: 185-189, 2002.

CRUZ, I. et al. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *Journal Clinical Microbiology*, 44: 2343-2347, 2006.

CUNHA, A.M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* n.sp. Nota prévia. *Hospital*, 11:3-9, 1937.

DANTAS TORRES, F.; BRANDÃO FILHO, S.P. Expansão Geográfica da Leishmaniose Visceral no Estado de Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39:352–356, 2006.

DAVIES, C.R.; REITHINGER, R.; CAMPBELL, L.; LENDRUM, D. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Caderno de Saúde Pública*, 16: 925-950, 2000.

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

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographic distribution and transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 4(1):198–212, 1962.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *O Hospital*, 47: 75-87, 1955.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P.; ALENCAR, J.E. Control of *Phlebotomus longipalpis* by DDT house spraying endemic foci of kala-azar in Ceara. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, n.7, p.131-41, 1955.

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

DE QUEIROZ, N.M. et al. Detection of *Leishmania* (L.) *chagasi* in canine skin. *Veterinary Parasitology*, v.178, n.1-2, p.1-8, 2011.

DIAS, E.S. et al. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 176(2-3):101–11, 2011.

DIAS, E.S. et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40: 49-52, 2007.

DIAS, F.D.O.P.; LOROSA, E.S.; REBÊLO, J.M.M. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Caderno de Saúde Pública*, 19: 1373-1380, 2003.

DIAS, F.C. O tratamento dos espaços livres em uma cidade média planejada: o caso de Ipatinga-MG. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

DIAS LIMA, A.G.; CASTÉLLON, E.G.; SHERLOCK, I. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma floresta primária de terra firme da estação experimental de silvicultura tropical, estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica*, 33: 303-316, 2003.

DI BELLA, C. et al. Are rodents a potential reservoir for *Leishmania infantum* in Italy? *Journal of Mountain Ecology*, vol. 7, pp. 125–129, 2003.

DIETZE, R. et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*, 25: 1240-1242, 1997.

DONOVAN, C. The etiology of the heterogeneous fevers in India. *British Medical Journal*, ii: 1401, 1903.

DUQUE, C.O.M. et al. Intralesional meglumine antimoniate – relato de caso. *Revista de Medicina e Saúde de Brasília*, 6(2):240-8, 2017.

DYE, C. et al. Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basis reproduction number calculated from a cross - sectional serological survey on the Island of Gozo. *Parasitology*, 105: 35-41, 1992.

ELNAIEM, D.E.A. et al. Risk mapping of visceral leishmaniasis: the role of local variation in rainfall and altitude on the presence and incidence of Kala-Azar in eastern Sudan. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68: 10-17, 2003.

ELKHOURY, A.N.S.M. Vigilância e controle da leishmaniose visceral no Brasil. Consulta de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas, 24, 2005.

FALQUETO, A. Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar no Estado de Espírito Santo. Tese de Doutorado, Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 1995.

FIGUEIREDO, F.B. et al. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP[®] CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 113(11): e180260, 2018.

FIUZA, V.O.P. 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.

FELICIANGELI, M.D. Natural breeding places of Phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 18(1): 71-80; 2004.

FIGUEIREDO, F.B. et al. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-Leishmania em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42: 141-145, 2009.

FORATTINI, O.P. Entomologia médica: Psychodidae, Phlebotominae. Leishmanioses, bartoneloze. São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., v. 4, 1973.

FORATTINI, O.P.; PATTOLI, D.B.; RABELLO, E.X.; FERREIRA, O.A. Nota sobre infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 7: 181-184, 1973.

FORATTINI OP. Sobre os reservatórios naturais da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 2(4): 195-203, 1960.

FORATTINI, O.P.; PATTOLI, D.; RAUN, J.R. Algumas observações sobre o comportamento da *Leishmania braziliensis* em cães. *Arquivos da Faculdade de Higiene*, 7:139, 55, 1953.

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

FRANÇA SILVA, J.C. Leishmaniose visceral canina no município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. Dissertação de Mestrado. 120 pp. 1997.

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

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

GALATI, E.A.B. et al. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 30(2):115-128, 1996.

GALATI, E.A.B. et al. Estudo de Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 31: 378-390, 1997.

GALIMBERTTI, M.Z. et al. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32 (Suppl 1): 217, 1999.

GAMA, M.E.A.; COSTA, J.M.L.; GOMES, C.M.C.; CORBETT, C.E.P. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(8):889-893, 2004.

GARCEZ, L.M. et al. Vigilância da leishmaniose visceral em localidades epidemiologicamente distintas em Juruti, um município minerário do Estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1(1):107-16, 2010.

GENARO, O. Leishmaniose visceral canina experimental. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Tese de doutorado. 1993.

GIUNCHETTI, R.C. et al. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *Journal of Comparative Pathology*, 135, 100-107, 2006.

GLEISER, R.M.; GORLA, D.E.; LUDUEÑA ALMEIDA, F.F. Monitoring the abundance of *Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus* (Macquart 1838) (Diptera: Culicidae) to the south of Mar Chiquita Lake, central Argentina, with the aid remote sensing. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 91: 917-926, 1997.

GOMES, A.C, SANTOS, J.L.F; GALATI, E.A.B. Ecological aspects of american cutaneous leishmaniasis. 4. Observations on the endophilic behavior of the sandfly and vectorial role of *Psychodopygus intermedius* in the Ribeira Valley of the São Paulo State, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 20:280-287, 1986.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7: 338-349, 2004.

GRIMALDI, G. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP(R) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106: 54-9, 2012.

IBRAHIM E.A. et al. Leishmania infecting man and wild animals in Saudi Arabia. 9. The black rat (*Rattus rattus*) a probable reservoir of visceral Leishmaniasis in Gizan province, south-west Saudi Arabia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 86, no. 5, pp. 513–514, 1992.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Censo Demográfico 2010, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=313460>. Acesso em: 01/08/2017.

KILLICK KENDRICK, R. et al. Protection of dogs from bites of phlebotomines sandflies by deltamethrin collars for control of canine. Medical and Veterinary Entomology, 11:105-11, 1997.

KILLICK KENDRICK, R.; MOROLI, M.; KILLICK KENDRICK, M. Bibliography on the colonization of Phlebotomine sandflies. Parasitologia, 33: 321-333, 1991.

KITRON, U. Landscape Ecology and epidemiology of vector borne diseases: tools for spatial analysis. Journal of Medical Entomology, 35: 435-445, 1998.

KÖPPEN, W. Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra. México: Fondo de Cultura Económica, 478p. 1948.

LAINSON, R. et al. Amazonian visceral leishmaniasis - distribuição of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 85: 135-137, 1990.

LAINSON, R; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – Review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 100: 811-827, 2005.

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

LAINSON, R; SHAW J.J. Observations on the development of *Leishmania* (L.) *chagasi* (Cunha and Chagas) in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, 63(2):134-45, 1998.

LANA, R.S. et al. Phlebotomine Sand Fly Fauna and *Leishmania* Infection in the Vicinity of the Serra do Cipó - National Park, a Natural Brazilian Heritage Site. Biomed Research International, 1-9, 2015.

- LANGERON, M. 1949. Précis de microscopie. Masson et Cie, Libraires de L'Académie de Médecine, Saint-Germain, Paris, 1. 1949.
- LANGOHR, R.E.I.M; SCHOSSLER, J.E.W; DE BARROS, S.S; DE BARROS C.S.L. Leishmaniose cutânea em cobaias (*Cavia porcellus*). *Ciência Rural*, 30: 525-528, 2000.
- LARA SILVA, F.O. et al. Evaluation of chemical spraying and environmental management efficacy in areas with minor previous application of integrated control actions for visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Tropica*, 109-113, 2017.
- LARA SILVA, F.O. et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Tropica*, 148:128-36, 2015.
- LARA SILVA, F.O. et al. *Rattus norvegicus* (Rodentia: Muridae) infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (syn. *Le. chagasi*) in Brazil. *BioMed Research International*, 592986, 2014.
- LEWIS, D.J. The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis. *Annual Review of Entomology*, 19: 363-384, 1974.
- LIMA, L.C. Ruralização da *Lutzomyia intermedia*, um provável caso de pré-adaptação. *Revista Salud Publica*, 20: 102-104, 1986.
- LYRA, M.R. et al. First report of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in an urban area of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57:451-4, 2015.
- MACEDO, I.T.F. et al. Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de Leishmaniose Visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. *Ciência Animal*, 18: 67-74, 2008.
- MADEIRA, M.D.F. et al. Identification of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian. The Journal of Infectious Diseases*, 8: 440-444, 2004.
- MAGALHÃES, P.A. et al. Calazar na zona do Rio Doce - Minas Gerais. Resultado das medidas profiláticas. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 22:197-202, 1980.
- MAIA, C; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158(4):274-87, 2008.

MAIA-ELKHOURY, A.N.S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Caderno de Saúde Pública*, 24: 2941-2947, 2008.

MANNA, L. et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 125: 251-262, 2004.

MANCIANTI, F; Gramiccia, M; Gradoni, L; Pieri, S. Studies on canine leishmaniasis control. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82, 566-567, 1988.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Suspensão da licença de fabricação e comercialização do produto Leishmune - vacina contra leishmaniose visceral canina. Nota Técnica 038/2014 DFIP/DAS)

MARCONDES, C.B. et al. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania* (*Viannia*) spp. in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103 (11): 1093-7, 2009.

MARGONARI, C. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101: 31-38, 2006.

MARZOCHI, M.C.A. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina*, 63: 82-104, 1992.

MARZOCHI, M.C.A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brasil. Clinical, parasitological, therapeutic and epidemiological finds (1977-1983). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 80: 349-357, 1985.

MARZOCHI, M.C.A, COUTINHO S.G, SOUZA W.J, AMENDOEIRA M.R. Leishmaniose visceral (Calazar). *Jornal Brasileiro de Medicina*, 41: 61-84, 1981.

MARZOCHI, M.C.A; MARSDEN P.P. Ecologia e controle de vetores-Leishmanioses. *Encontro Nacional sobre Saúde e Meio Ambiente*, 31-36, 1991.

MARZOCHI, M.C.A; MARZOCHI K.B. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging Anthroozoonosis and Possibilities for Their Control. *Caderno de Saúde Pública*, 10: 359-75, 1994.

MAURÍCIO, I.L; STOTHARD J.R; MILES M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, 16 (5): 188-189, 2000.

MEDRONHO, R.A. Geoprocessamento e saúde: uma nova abordagem do espaço no processo saúde-doença. Rio de Janeiro. Fiocruz/CICT/NECT, 135 p, 1995.

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

MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 23: 41-45, 2004.

MICHALSKY, E.M. et al. Infecção natural de *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 44(1): 58-62, 2011.

MICHALSKY, E.M. et al. Phlebotomine distribution in Janaúba, in area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104:56-61, 2009a.

MICHALSKY, E.M et al. 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. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104(8):1191-3, 2009b.

MICHALSKY, E.M. et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. Veterinary Parasitology, 147: 67-76, 2007.

MIGONE, LE. Um caso de kalazar à Assuncion (Paraguay). Bulletin de la Société Pathologie Exotique, 6:118-120, 1913.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. Nota Técnica Conjunta 01/2011. Brasília: CGDT/CGLAB/DVIT/ SVS/MS; 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Brasília. 62 p. 2010.

MIRANDA, J.C. 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. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 97:185-188, 2002.

MISHRA, M; BISWAS U.K; JHA A.M; KHAN A.B. Amphotericin versus sodium stibogluconate in first-line treatment of Indian kala-azar. *The Lancet*, 344(8937):1599-1600, 1994.

MISSAWA, N.A; DIAS E.S. 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 913-918, 2007.

MISSAWA N.A; LOROSA E.S.; DIAS E.S. Feeding preference of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in transmission area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(4):365-368, 2008.

MOLINA, R. et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 88(4):491-3, 1994.

MONTEIRO, E.M. et al. Leishmaniose visceral: Estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(2):147-52, 2005.

MONTOYA-LERNA, J. et al. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Tropica*, 85: 19-29, 2003.

MOREIRA JÚNIOR, E.D. et al. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69: 393-397, 2003.

MORENO, E.C. et al. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(5):421-7, 2006.

MORENO, E.C. et al. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(6):456-63, 2005.

NICOLLE, A. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences (Paris)* 146:842, 1908.

NUNES, C.M. et al. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Veterinary Parasitology*, 170:131-133, 2010.

OKE, T. R. *Boundary layer Climates*. Methuen, London, UK, 435, 1985.

OLIVEIRA, A.G. et al. Ecological Aspects of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in Endemic Area of Visceral Leishmaniasis, Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 49: 43-50, 2012.

OLIVEIRA, C.D.L, ASSUNÇÃO R.M, REIS I.A, PROIETTI F.A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais, State, Brazil, 1994-1997. *Caderno de Saúde Pública*, 17: 1231-1239, 2001.

OLIVEIRA, C.D.L; MORAIS M.H.F; MACHADO-COELHO G.L.L. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. *Caderno de Saúde Pública*, 24(12):2953–8, 2008.

OLIVEIRA, G.M.G. et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no município de Três Lagoas, área de transmissão intensa de Leishmaniose Visceral, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 54:304-331, 2010.

OLIVEIRA F.S. et al. "PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral Leishmaniasis in Brazil." *Veterinary Parasitology*, vol. 129, no. 3-4, pp. 219–227, 2005.

OLIVEIRA NETO, M.P. et al. Active cutaneous leishmaniasis in Brazil induced by *Leishmania donovani* chagasi. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81:303-309, 1986.

PASSOS-DIAS, F.O; LOROSA E.S; REBÊLO J.M.M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodiade, Phlebotominae). *Caderno de Saúde Pública*, 19:1373-1380, 2003.

PATTABHI, S. et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS Neglect Tropical Disease*, 4(9): e822, 2010.

PAZ, G.F. et al. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*, 106: 523-528, 2010.

PENNA, H.A. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil Médico*, 48: 949-950, 1934.

PESSOA, S. B. Parasitologia Médica. 5ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1958.

PISCOPO, T.V; MALLIA A.C. Leishmaniasis. Postgraduate Medical Journal, 82:649-57, 2006.

PRADO, P.F.D. et al. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 44: 561-566, 2011.

PREFEITURA MUNICIPAL DE IPATINGA. Lei Nº 3.350/14 - Plano Diretor do Município de Ipatinga (MG) - Zoneamento da macrozona urbana e perímetro urbano 2005 <http://www.ipatinga.mg.gov.br/abrir_arquivo.aspx/Plano_Diretor_LEI_N_3.350,DE_12_DE_JUNHO_DE_2014?cdLocal=2&arquivo=%7B73E2AB2D-54CC-E7CD-E0B3-308E1061A67D%7D.pdf> Acesso em :05/03/2016.

PUGEDO, H. et al. HP: an improved model of suction light trap for the capture of small insects. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 38: 70-72, 2005.

QUEIROZ JÚNIOR, E.M. Validação do teste imunocromatográfico rápido dual path platform para o diagnóstico da leishmaníase visceral canina. Universidade Estadual do Ceará. Dissertação de Mestrado 2011, 77 pp.

R CORE TEAM. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>> Acesso em: 26/09/2017.

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

RAMIRO, M.J. et al. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. Vaccine, 21: 2474–2484, 2003.

REBÊLO, J.M.M. Flebotomos vetores das leishmanioses (Manual para técnicos e profissionais de Saúde) São Luis: Universidade Federal do Maranhão/Ministério da Saúde; 1999.

REGINA SILVA, S. et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec ® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. Vaccine, 34(19): 2233-2239, 2016.

REINHOLD CASTRO, K.R. et al. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(3):269–76, 2008.

REIS, A.B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128, 87-95. Review. 2009.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R.J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C.R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 2352-2356, 2002.

RODRIGUES, E.H. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in area of endemicity in northeastern Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 3572-3576, 2002.

ROGERS, D.J. Satellite imagery, tsetse and trypanosomiasis in Africa. *Preventive Veterinary Medicine*; 11: 201-220, 1991.

ROMERO, G.A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - a systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4: 584, 2010.

RYAN, L. et al. The importance of rapid diagnosis of new cases of cutaneous Leishmaniasis in pin-pointing the sandfly vector. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 84:786, 1990.

SANGIORGI, B. et al. Natural breeding places for Phlebotomine Sand flies (Diptera: Psychodidae) in a semiarid region of Bahia State, Brazil. *Journal of Tropical Medicine*, 1 – 5, 2012.

SANTOS, S.O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, 12:315–317, 1998.

SARAIVA, L. et al. Natural infection of *Nyssomyia neivai* and *Evandromyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 46: 1159–1163, 2009.

SAVANI, E.S.M.M. et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 120(3): 229-233; 2004.

SCHUBACH, E.Y.P. Validação da técnica de imunocromatografia rápida de duplo percurso para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em amostras de sangue total e soro. Universidade Federal de Brasília. Faculdade de Medicina. Dissertação de Mestrado 2012; 74 pp.

SHAW, J.J. The relationship of sand fly ecology to the transmission of leishmaniasis in South America with particular reference to Brasil. In: *Memoirs on Entomology, International*. JFB.(eds). Associated Publishers, 1999.

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

SHERLOCK, I.A. Há especificidade dos flebotomíneos para as leishmânias? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30:151-155, 1997.

SHERLOCK, I.A. Ecological interactions of visceral Leishmaniasis in the state of Bahia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91: 671-683, 1996.

SHERLOCK, I.A.; GUITTON N. Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia. III- Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, 21: 541-548, 1969.

SHIMABUKURO, P.H.F.; GALATI, E.A.B. Checklist dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotropica*, v. 11, 2011.

SINAN (Sistema de Informação de Agravos e Notificação). Ministério da Saúde. Proporção e Listagem de casos de doença de notificação compulsória (DNC) encerrados oportunamente. Brasília: MS, [s.d]. 2015. Disponível em: <http://www.portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan>. Acesso em: 31/01/ 2018.

SILVA, ES. et al. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 285- 291, 2001.

SILVA, F.S.; CARVALHO, L.P.C.; SOUZA, J.M. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) associados a abrigos de animais domésticos em área rural do Nordeste do Estado do Maranhão, Brasil. *Revista da Pesquisa Agropecuária Tropical*, 337-47, 2012.

SILVA, F.L. et al.. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 160: 55-59, 2009.

- SILVA, K.L.O. et al. Vacinas Contra Leishmaniose: Uma Revisão. *Archieves of health Investigation*, 2(4), 2013.
- SOARES, M.R.A. et al. Molecular analysis of natural infection of *Lutzomyia longipalpis* in an endemic area for visceral leishmaniasis in Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, 26:2409-2413, 2010.
- SOARES, R.P.P.; TURCO, S.J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 75: 301-330, 2003.
- SOLANO GALLEGO, L...; BANETH, G. Canine leishmaniosis - a challenging zoonosis. *The European Journal of Companion Animal Practice*, 18: 232-241, 2008.
- SOLANO GALLEGO, L. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal Clinical Microbiology*, 39 (2): 560-563, 2001.
- SOUZA, C.F. Estudo da urbanização de flebotomíneos e aspectos epidemiológicos de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Timóteo, Minas Gerais, Brasil. Dissertação de mestrado. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. P
- SOUZA, C.F.; BORGES, M.A.Z; ANDRADE, A.J. Contribution to the knowledge of the phlebotomine sand flies fauna (Diptera: Psychodidae) of Timóteo municipality, Minas Gerais, Brasil. *Neotropical Entomology*, 38:267-271, 2009.
- SOUZA, C.F.; BORGES, M.A.S. Ocorrência de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) em Timóteo, Minas Gerais, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, 24: 1454-1455, 2008a.
- SOUZA, V.M.M. 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*. 2008b;17(2):97-106.
- SOUZA, CM. et al. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(8):795-803, 2004.
- SOUZA-GOMES M.L; Romero G.A; Werneck G.L. Visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Brazil: are we aware enough? *Plos Neglect Tropical Disease*, 11:e0005772, 2017.

TANURE, A. et al. Identification of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) blood meals in an endemic leishmaniasis area in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(4): 321-4, 2015.

TEODORO, U. 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. *Caderno de Saúde Publica*, 23(11):2597-2604, 2007.

TEODORO, U. et al. Flebotomíneos em área de transmissão de leishmaniose tegumentar na região norte do Estado do Paraná-Brasil: variação sazonal e atividade noturna. *Revista de Saúde Publica*, 27(3):190-4, 1993.

TEODORO, U. et al. Influência da organização, da limpeza do peridomicílio e da desinsetização de edificações na densidade populacional de flebotomíneos no município de Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, 19: 1801-1813, 2003.

TESH, R.B. The genus Phlebovirus and its vectors. *Annual Review of Entomology*, 33: 169-181, 1998.

THOMSON, M.C.; CONNOR, S.J. Environment information systems for the control of arthropod vectors of disease. *Medical and Veterinary Entomology*, 14: 227-244, 2000.

THOMSON, M.C.; CONNOR, S.J.; MILIGAN, P.J.W.; FLASSE, S. Mappig malaria risk in Africa – what can satellite data contribute? *Parasitology Today*, 8: 313-318, 1997.

THOMSON, M.C.; ELNAIEM, D.A.; ASHFORD, R.W.; CONNOR, S.J. Toward a dala azar risk map for Sudan: mapping the potential distribution of *Phlebotomus orientalis* using digital data of environmental variables. *Tropical Medicine & International Health*, 4: 105-113, 1999.

TRAVI, B.L. et al. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 84: 676-677, 1990.

UMUMBO, J.A.; HAY, S.I.; GOETZ, R.W.S.; ROGERS, D.J. Updating historical maps of malaria transmission intensity in East Africa using remote sensing. *Photogrammetric Engineering and Remote Sensing*, 68: 161-166, 2002.

UNILESTE. Plano Diretor de Desenvolvimento. Integrado – PDDI. Região Metropolitana do Vale do Aço. Coronel Fabriciano, 2014.

VASCONCELOS, I.A.B. et al. The identity of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous Leishmaniasis in Baturite, Northeastern Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 50, no. 2, pp. 158–164, 1994.

VIANNA, E.N et al. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* in urban households as risk factor of transmission of visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(5): 302–310, 2016.

VIEIRA, J.B.F; COELHO, G.E. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 31(supl II): 85-92, 1998.

WERNECK, G.L; MAGUIRE, J.H. Spatial modeling using mixed models: an ecologic study of visceral leishmaniasis in Terezina, Piauí State, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, 18: 633-637, 2002.

WIJAYARATNE, P.M; ARSENAULT, J; MURPHY, C.J. Endemic disease and development: the leishmaniasis. *Acta Tropica*, 56:349-364, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the Leishmaniasis. Geneva, WHO, (Technical Report Series 703), 158p, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)/TDR. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Natures Reviews Microbiology*, 5:S7-S16, 2007.

XIMENES, M.F.F; SOUZA M.F; GUILHERMO 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(4):427-432, 1999.

YOUNG, G.G., DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*, 54 Associates Publishers, Gainesville, FL., 1994.

ZULUETA, A.M et al. Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniasis in an endemic focus in Eastern Venezuela. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61: 945-950, 1999.

ANEXOS

Anexo 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)


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

**ESTUDO: EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO
 MUNICÍPIO DE IPATINGA, REGIÃO METROPOLITANA DO VALE DO AÇO,
 ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL.**

Nome do voluntário: Ida 38267275
 Casa: 1
 Endereço: R. Tucano Sul, 75
 Bairro: Vila Celeste

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO VOLUNTÁRIO

Esta pesquisa tem como objetivo estudar aspectos da Leishmaniose Visceral relacionados ao vetor no município de Ipatinga, sob a responsabilidade do pesquisador Dr. Edelberto Santos Dias.

Tenho consciência que a minha participação como voluntário não me trará nenhum benefício ou privilégio e em hipótese alguma prejudicará a minha saúde e bem-estar. Poderei a qualquer momento me retirar do projeto de pesquisa por qualquer motivo, sem que isso acarrete prejuízo para mim ou minha família.

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

Coordenador da Pesquisa: Dr. Edelberto Santos Dias
 Endereço: Centro de Pesquisas René Rachou, Avenida Augusto de Lima, 1715, Bairro Barro Preto, Belo Horizonte, Minas Gerais.
 Telefone de contato: (31-3349-7758)

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

Ipatinga, 19 de março de 2015.

Assinatura do voluntário: Ida Finer

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-002 Belo Horizonte - MG - Brasil
 Tel: (0055) (31) 3349-7700(ramal 7758) - Fax: (0055) (31) 3349-7795
 e-mail: edel@cpqrr.fiocruz.br

Anexo 2 Licença Comitê de Ética no uso de animais

 <p>Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência</p>	 <p>CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais</p>
LICENÇA	
LW-16/15	
<p>Certificamos que o protocolo (P-91/14-2), intitulado "EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE IPATINGA, REGIÃO METROPOLITANA DO VALE DO AÇO, ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL", sob a responsabilidade de EDELBERTO SANTOS DIAS, atende ao disposto na Lei 11754/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.</p> <p>Esta licença tem validade até 30/03/2015 e inclui o uso total de :</p>	
<p>Canis familiaris - 80 Machos. - 80 Fêmeas.</p>	
Rio de Janeiro, 30 de março de	
 Octavio Augusto França Presgrave Coordenador da CEUA	
<p>Octavio A. F. Presgrave Coordenador CEUA/FIOCRUZ BIAPE 04029550 30/03/15</p>	
<p><small>Comitê de Ética no Uso de Animais Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz Av. Brasil 4330 - Prado de Expansão - sala 200 - Marquês - Rio de Janeiro / RJ Telefone: (21) 3842-3121 - e-mail: ceua@fiocruz.br</small></p>	

Anexo 3 Ficha epidemiológica de 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:
Endereço:

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 ()

Ectoparasitos () pulgas () carrapatos

Classificação geral

Assintomático() Oligossintomático() Sintomático()

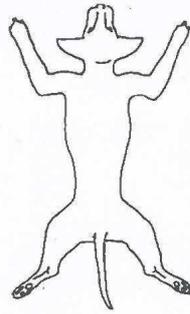
Achados de necropsia

Fígado: normal() alterado()

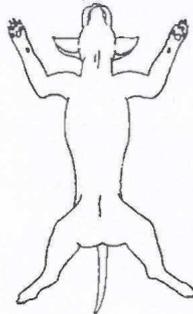
Baço: normal() alterado()

Linfonodo mesentérico: normal() alterado()

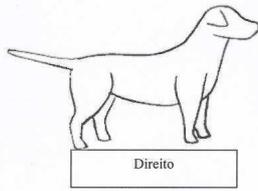
Exame dermatológico – localização e número de lesões



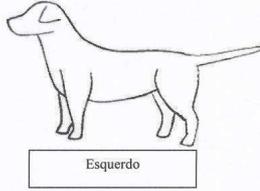
Dorsal



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:** _____

Anexo 4 Informações do banco de dados dos cães

NOME	RAÇA	SEXO	SINAIS CLÍNICOS
Tufão	SRD	M	Assintomático
Nininha	SRD	F	Assintomático
Nino	Pincher	M	Dermatite de ponta de orelha; Dermatite localizada; Emagrecimento moderado; Onicogribose
Priscila	SRD	F	Onicogribose
Toby	SRD	M	Assintomático
Negão	SRD	M	Assintomático
Mel	SRD	F	Assintomático
Jurema	SRD	F	Hiperqueratinização do focinho
Apolo	SRD	M	Onicogribose
Bob	SRD	M	Assintomático
Duque	SRD	M	Ceratoconjuntivite; Hiperqueratinização do focinho; Emagrecimento moderado; Úlceras de decúbito; Onicogribose
Bela	SRD	F	Opacificação córnea; Dermatite de ponta de orelha; Dermatite localizada; Emagrecimento moderado; Onicogribose
Mike	Pincher	M	Hiperqueratinização do focinho; Dermatite de ponta de orelha; Dermatite generalizada; Onicogribose
Aika	SRD	F	Assintomático

Sadan	SRD	M	Hiperqueratinização do focinho; Emagrecimento leve; Onicogribose
Samanta	SRD	F	Assintomático
Suzy	Pincher	F	Dermatite generalizada (Furfurácea); Emagrecimento leve; Onicogribose
Mel	SRD	F	Onicogribose
Bil	SRD	M	Hiperqueratinização do focinho; Emagrecimento leve; Onicogribose
General	SRD	M	Onicogribose
Frederico	Pincher	M	Dermatite de ponta de orelha; Emagrecimento moderado; Onicogribose
Mileide	SRD	F	Dermatite de ponta de orelha; Alopecia localizada (região dorsal); Onicogribose
Florzinha	SRD	F	Assintomático
Spyke	SRD	M	Assintomático
Leona	Rottweiler	F	Hiperqueratinização do focinho; Úlceras de decúbito
Zeus	SRD	M	Hiperqueratinização do focinho; Dermatite de ponta de orelha; Dermatite generalizada; Alopecia localizada; Emagrecimento moderado; Onicogribose
kilo	SRD	M	Emagrecimento leve; Onicogribose
Nina	SRD	-	Assintomático
Pico	SRD	M	Hiperqueratinização do focinho; Dermatite de ponta de orelha; Alopecia localizada

			(olhos); Úlceras de decúbito; Onicogribose
Leona	SRD	F	Hiperqueratinização do focinho; Dermatite de ponta de orelha; Dermatite generalizada; Onicogribose
Suzi	SRD	F	Ceratoconjuntivite; Dermatite generalizada; Emagrecimento leve; Onicogribose
Bilú	SRD	F	Dermatite localizada; Onicogribose
Mel	Pincher	F	Dermatite localizada; Alopecia localizada; Emagrecimento leve; Onicogribose
Zé Neguinho	Pincher	M	Assintomático
Cacau	Pincher	F	Onicogribose
Spike	SRD	M	Ceratoconjuntivite; Alopecia localizada (Espelho nasal); Emagrecimento moderado; Onicogribose
Teddy	Pincher	M	Assintomático
Teca	SRD	F	Ceratoconjuntivite; Hiperqueratinização do focinho; Onicogribose
Nick	SRD	M	Assintomático
Meg	Basset / Dachshund	F	Dermatite de ponta de orelha; Dermatite localizada (Periocular); Alopecia localizada (Região dorsal orelha); Emagrecimento moderado; Úlceras de decúbito; Onicogribose
Josefina	SRD	F	Hiperqueratinização do focinho; Dermatite

			de ponta de orelha; Dermatite localizada; Emagrecimento leve; Onicogrifose
Gordinho	SRD	M	Dermatite de ponta de orelha; Dermatite localizada; Úlceras de decúbito; Onicogrifose
Fuleco	SRD	M	Dermatite localizada; Alopecia generalizada
Fred	SRD	M	Dermatite localizada e generalizada (Orelha e espelho nasal); Onicogrifose

Anexo 5 Exemplos de alinhamento das amostras positivas de flebotômicos e cães com as sequências de Leishmania depositadas no GenBank

	10	20	30	40	50
<i>L. amazonensis</i> M80293.1	AGTGC	GTC	CCGGT	TCG	TCCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCAG
<i>L. braziliensis</i> M80292.1	AGTGC	GTC	CCGGT	TCG	TCCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCAG
<i>L. chagasi</i> M81430.1	AGTGC	GTC	CCGGT	TCG	TCCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCAG
24P	AGTGC	GTC	CCGGT	TCG	TCCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCAG
31P	AGTGC	GTC	CCGGT	TCG	TCCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCAG
21M	AGTGC	GTC	CCGGT	TCG	TCCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCAG
38M	AGTGC	GTC	CCGGT	TCG	TCCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCAG
190F	AGTGC	GTC	CCGGT	TCG	TCCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCAG
247F	AGTGC	GTC	CCGGT	TCG	TCCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCAG

	60	70	80	90	100	110
<i>L. amazonensis</i> M80293.1	GCCTC	TAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTA	CTGGGGCGTCAGAGG			
<i>L. braziliensis</i> M80292.1	GCCTC	TAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTA	CTGGGGCGTCAGAGG			
<i>L. chagasi</i> M81430.1	GCCTC	TAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTA	CTGGGGCGTCAGAGG			
24P	GCCTC	TAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTA	CTGGGGCGTCAGAGG			
31P	GCCTC	TAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTA	CTGGGGCGTCAGAGG			
21M	GCCTC	TAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTA	CTGGGGCGTCAGAGG			
38M	GCCTC	TAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTA	CTGGGGCGTCAGAGG			
190F	GCCTC	TAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTA	CTGGGGCGTCAGAGG			
247F	GCCTC	TAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTA	CTGGGGCGTCAGAGG			

	120	130	140	150	160
<i>L. amazonensis</i> M80293.1	TGAAATTCT	FAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGA			
<i>L. braziliensis</i> M80292.1	TGAAATTCT	FAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGA			
<i>L. chagasi</i> M81430.1	TGAAATTCT	FAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGA			
24P	TGAAATTCT	FAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGA			
31P	TGAAATTCT	FAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGA			
21M	TGAAATTCT	FAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGA			
38M	TGAAATTCT	FAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGA			
190F	TGAAATTCT	FAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGA			
247F	TGAAATTCT	FAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGA			

RESEARCH ARTICLE

Ecoepidemiological aspects of visceral leishmaniasis in an endemic area in the Steel Valley in Brazil: An ecological approach with spatial analysis

Rosana S. Lana¹, Erlin M. Michalaky¹, Lívia G. Lopes¹, Fabiana O. Leme-Silva¹, Jézia L. Nardimanto¹, Letícia C. Pinheiro², João C. França-Silva², Talma S. C. Mendes⁴, Consuelo L. Fortes-Dias^{3*}, Edelberto S. Dias^{5*}

1 Laboratório de Leishmanioses, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Núcleo de Estudos em Saúde Pública e Desenvolvimento, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Laboratório de Leishmanioses, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **4** Departamento de Vigilância em Saúde, Secretaria Municipal de Saúde, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, **5** Laboratório de Entomologia, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Esportiva Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

* cldias@renepi.fiocruz.br (CSO), edeldias@ufjf.edu.br (EDS)



OPEN ACCESS

Citation: Lana RS, Michalaky EM, Lopes LG, Leme-Silva FO, Nardimanto JL, Pinheiro LC, et al. (2018) Ecoepidemiological aspects of visceral leishmaniasis in an endemic area in the Steel Valley in Brazil: An ecological approach with spatial analysis. PLoS ONE 13(10): e0206492. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206492>

Editor: Yoko Fukui, Public Library of Science, UNITED KINGDOM

Received: January 30, 2018

Accepted: October 12, 2018

Published: October 30, 2018

Copyright: © 2018 Lana et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPESQ) grant number 025/ARQ-0181-14 (ESD) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) through the Graduate Program in Health Sciences of Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz.

Abstract

Leishmaniasis are a group of infectious diseases transmitted by phlebotomine sand flies, and their distribution depends on the presence of vectors, parasites, reservoirs and susceptible hosts in the same environment. In the last decades, visceral leishmaniasis (VL) has become urbanized and reached economically important cities in countries within the transmission zone. Our study was conducted in one of those cities—Joazeiro—in the state of Minas Gerais, Brazil, where the first autochthonous case of VL dates back to 2011. Since no data regarding the epidemiological triad of VL (etiological agent/vector/domestic reservoir) were available for this city, we characterized the local entomological fauna, identified the presence of specific *Leishmania* DNA in the captured phlebotomine sand flies, and assessed the incidence of canine and human VL. For the entomological survey, we set twenty light traps in ten districts of the city with reports of human and canine VL. The insect captures were performed monthly, during one year, starting in March 2015. A total of 1501 specimens of phlebotomine sand flies belonging to 16 distinct species were captured, with predominance (61.9%) of *Lutzomyia longipalpis*. *Leishmania infantum* DNA was detected in *L. longipalpis* and in *Evanthomyia orthozaxi* tested samples. A total of 9,136 dogs were examined, 1,355 of which (14.8%) were serologically positive for VL. The cases were georeferenced and the data were plotted in thematic maps, along with human cases of VL, registered by the local Department of Health, during the study period. Our results confirm that the VL transmission cycle is active in Joazeiro, with the presence of vectors carrying *Leishmania* DNA, canine and human cases of the disease. Spatial analysis allowed for the observation of a positive relationship between canine and human cases of VL, and the identification of areas with high priority for control actions in the city. The mapping of high-risk areas, together with

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

epidemiological study in urban areas, is fundamental to improve the efficacy of the Program for Surveillance and Control of VL (PSCVL) in Brazil.

Introduction

Leishmaniasis are a group of infectious diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* Ross, 1903, and transmitted by the haematophagous Diptera from the family Phlebotomidae and subfamily Phlebotominae, the phlebotomine sand flies [1]. In the New World, two basic clinical forms of leishmaniasis are described: tegumentary leishmaniasis (TL) and visceral leishmaniasis (VL). VL is the most severe form of the disease in humans and is fatal if left untreated.

In the American continent, eight countries are within the transmission zone of VL, but most human cases (>95%) are reported in Brazil [2–4]. VL cases, as well as TL cases, are mandatorily reported to the Brazilian Ministry of Health through the National System of Notifiable Diseases (named SINAN). At first, VL characteristically occurred in rural environments, with a peridomestic profile. However, over the decades, it became urbanized due to several factors, such as deforestation, which reduced the availability of an animal that served as a source of food for the vector, and the migratory process, which brought human and canine populations from rural areas, where the disease was endemic, to the periphery of cities [2–6].

The transmission chain of leishmaniasis requires, in endemic areas, the concomitant presence of the vector, the parasite, the reservoir and the susceptible host. In the particular case of Brazil, the epidemiological triad of VL involves the parasite *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 (syn. *Leishmania chagasi*) as the etiological agent, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) phlebotomine sand flies as the main vector and dogs (*Canis familiaris*) as the principal domestic reservoirs [10–12]. Actually, it has been observed that canine VL usually precedes human cases of VL [13].

Historically, in 1955, the Brazilian government launched a campaign against VL due to the increasing number of cases in the country [14]. An official program, named Program for Surveillance and Control of Visceral Leishmaniasis (PSCVL), is still active and constitutes an integrated public health initiative specifically acting on all links in the epidemiological chain: diagnosis and treatment of human cases of VL as early as possible, control of the population of vectors by chemical spraying and removal of domestic canine reservoirs [15].

The actions of the PSCVL vary according to the local epidemiological transmission risk (ETR), which 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 ($2.4 < n < 4.4$) to intense ($n > 4.4$). The integrated control actions are generally intensified in areas with high or medium ETR (Brazilian Ministry of Health, 2009). In spite of these actions, VL has been expanding in Brazil, reaching highly urbanized cities including state capitals [16].

Currently, human VL is present in every State but Acre, in the five Brazilian geographic regions—named Center-west, North, Northeast, South and Southeast [17]. Between 2007 and 2016, 36,726 new cases of VL were notified to the Brazilian Ministry of Health, with an average incidence of 3,673 cases per year and 2,393 deaths in total. However, it is possible that the official data are underreported by 1.2 to 1.8 fold [3]. Thirteen per cent of the VL cases (including 4,771 cases) occurred in the state of Minas Gerais, which is located in the Southeast region of Brazil. And, in the course of time, VL spread from rural areas to urbanized and economically important cities in the state. This is the case of Ipatinga, a city located in the so-called Steel

Valley, where large steel-producing companies—such as Usiminas and Açoarcel Metal—operate. The city also belongs to the Tourist Circuit of the Atlantic forest in Minas Gerais and offers trails, forests, ponds and waterfalls in its surroundings, therefore attracting a great number of tourists [18]. The last City Human Development Index (IDHM), published in 2010, was 0.771, which is considered high by the United Nations Development Program (UNDP), being the 20th highest in Brazil and the 16th highest in the State of Minas Gerais [12].

Ipatinga is considered an endemic area for VL, with 286 cases reported to the SUSAN of the Brazilian Ministry of Health, between 2007 and 2016. The first autochthonous case of VL was recorded in 2011. In the four following years, the number of cases of VL increased to eight, thirteen, 49, until it reached 51 in 2015 [17]. According to the criteria adopted by the Brazilian Ministry of Health, those numbers characterize a high local ETR [22]. Nonetheless, no data are available on the epidemiological trend for VL in the city, i.e. the parasite, the vector and the canine reservoir. Hence, in this study we characterized the local entomological fauna, we identified the presence of *Leishmania* in the captured phlebotomine sand flies, and we evaluated the presence of canine visceral leishmaniasis providing the first data on the VL epidemiological trend for Ipatinga.

Material and methods

Study area

The city of Ipatinga (19° 28' 06" S and 47° 32' 12" W) is located in the Southeast region of Brazil, in the East of the State of Minas Gerais (Fig 1). The city is approximately 209 km far from the state capital, Belo Horizonte (19° 55' 15" S and 43° 56' 16" W). The county of Ipatinga has an area of 164,884 km², with 22,245 km² in the urban perimeter. The estimated population is 289,468 inhabitants [21]; the climate of the region is warm and semi-humid tropical, according to the classification of Köppen.

The city is composed of 34 districts (Fig 1), ten of which were selected for our study: Bela-Vista, Bom Jardim, Canaã, Carim, Glória Nova, Iloá, Ipatinga, Esperança, Venâncio and Vila Celso. All of them had VL cases notified to the local Health Department with the exception of the district of Carim. Although no VL cases were reported before our study, this district accumulated 26 (33.8%) of the 77 cases of VL registered in the city, between 2012 and 2016 (data obtained from the Epidemiological Section of the local Department of Health, provided by T.S. Mendes). No specific permissions were required for the activities performed in the study area (Ipatinga, Minas Gerais state, Brazil).

Phlebotomine sand fly fauna

Phlebotomine sand flies were captured using light traps operating from 6 pm to 8 am, during four consecutive days per month, from March 2015 to February 2016, in ten residences (one per district) placed inside an outside human dwelling, totaling twenty traps. The traps used are a modified version of the classical CDC light traps totally constructed using low cost materials [22]. All residences had favorable ecological conditions for the presence of phlebotomine sand flies, such as shaded areas, the presence of domestic animals and/or fruit trees [22–23], as well as a previous record of human and/or canine VL cases. Concerning favorable ecological conditions for the presence of phlebotomine sand flies, a study carried out in Belo Horizonte evaluated the potential risk factors for VL and showed that the presence of domestic animals, abundant organic matter, inadequate storage of garbage, stacked bricks and stones, trees and vegetable gardens in the households are related to its occurrence [26].

The phlebotomine sand flies were sorted from other insects and stored in hemolysis tubes containing 70% ethanol (males) or 6% dimethyl sulfoxide (DMSO) (females). Subsequently,



Fig 1. Geographic location of the city of Itatinga in the Brazilian state of Minas Gerais. Itatinga (black dot) is the main urban center in the region known as São Valley, due to the local appearance of large limestone deep-pooling conglomerates in area. Map of the city of Itatinga with district subdivisions.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0296422.g001>

males and females were taken to the Laboratory of Leishmaniasis of Instituto René Rachou for identification. The males were submitted to clarification by treatment with 10% KOH for 2 h, followed by 10% acetic acid for 20 min. After three washings with type I water for 15 min in each, the samples were treated with a hexaphenol solution composed of 100 ml of acetic acid, 200 ml of glycerin, 100 g of phenol and 100 ml of type I water. After the clarification process, the specimens were mounted. The females had the head and the last three abdominal segments dissected for specific identification. Berlese was used as the mounting medium in both cases. The remaining females were transferred to new tubes and individually frozen at -20°C for the study of natural *Leishmania* infection.

The captured phlebotomine sand flies of both sexes were identified using specific keys: *pep-* *sonis*, *la*, *minorum*, *keys* and compared with specimens from the Reference Collection of Phlebotomine Sand Flies of Instituto René Rachou. We adopted the species classification of phlebotomine sand flies proposed by Galei [24, 25, 28, 29].

The sum of the number of sand fly specimens captured during the three nights of capture in a given month was taken as representative of that month.

Climate data

In order to establish a correlation between seasonality, climate conditions and the sand fly population, average monthly maximum temperature (°C), total rainfall (mm), and relative humidity (%) data were sourced from the nearest meteorological station to Ipatings (station A554, OMM code 86802), with geographic coordinates of 19° 23' 57" S and 42° 13' 17" W. This station is located about 100 km away from the study area, in the city of Caratinga (Mina Gerais state, Brazil). Correlation analysis of Spexam an (with a significance level of 0.05) was calculated using R software [22] to evaluate the influence of climate variables on the whole population density of phlebotomine sand flies captured per month. Average values for maximum temperature (°C) and total rainfall (mm) were calculated for the study year and used to calculate the monthly local weather, in comparative terms. The months with temperatures above the yearly mean value were considered to be warm. Similarly, a total monthly rainfall all above the yearly mean was taken as rainy period.

Detection of *Leishmania* DNA in the phlebotomine sand flies

Test samples containing one or more specimens of the same of phlebotomine sand fly species were prepared exclusively with the female body portions stored at -20°C. When more than one specimen (up to ten) of the same species were captured in the same household and in the same month, they were pooled by composite one test sample. Otherwise, individual specimens constitute one test sample. All the test samples contained a) only females (i.e. no non-vectorial males), and b) only females that could be unambiguously identified morphologically (i.e. no cryptic sibling species).

Total DNA from each test sample was extracted using a commercial kit (GIE HealthCare). The presence of *Leishmania* DNA was analyzed by Nested PCR (LnPCR) directed to the SSU-rDNA gene that amplifies a conserved fragment for *Leishmania* [21,23]. All amplifications were performed with Taqtra Pure Taq Ready-to-go PCR Beads kit (GIE HealthCare), and the products were analyzed by electrophoresis in agarose gel. DNA from *Leishmania infantum* (strain MHOM/BR/1975) and sterile distilled water were used as positive and negative controls, respectively.

The PCR amplicons were extracted from the agarose gel using QIAquick extraction kit (QIAGEN) and sequenced in both directions using the automated sequencer ABI3730 (Life Technologies). The consensus nucleotide sequences for each test sample were aligned and compared to databases of *Leishmania chagasi* (syn. *Leishmania infantum*, accession M83430), *Leishmania braziliensis* (accession M8232) and *Leishmania mexicana amazonensis* (accession M8293), using the Basic Local Aligned Search Tool (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

The minimum rates of *Leishmania* infection (MRI) in the captured phlebotomine sand flies were calculated as the number of positive pools of a given phlebotomine sand fly species divided by the number of specimens of that species in the test sample and then multiplied by 100 [22].

Canine visceral leishmaniasis

Canine VL diagnosis was performed using both active and passive methods. The canine survey aimed at diagnosing the disease in an active way, with trained public health agents visiting all the residences of the chosen district. In positive detection, the dog owner spontaneously took his animal to the Center of Zoonosis Control of the City Hall of Ipatings for VL testing, between March 2015 and February 2016.

Canine VL diagnosis was performed according to the current protocol adopted by the Brazilian Ministry of Health: 1) Screening test: DPP rapid test—single use

immunochromatographic test for detection of *Leishmania* specific antibodies 2) Confirmation test: EB—an immunoenzymatic assay for antibody detection using purified and soluble antigen of *Leishmania major*-like (strain MHOM/BR/71/RH21). The positive samples in the screening test were admitted to the confirmation test [24]. Both kits are produced by Biomanguinhos (Fiocruz) and are primarily destined to attend the demands of the Public Health Program of VL control and also to research projects developed by public institutions in Brazil. The protocol was performed by skilled professionals.

When the dog was serologically reactive in both tests, the owner's residence was georeferenced. Subsequently the prevalence rates were plotted on a thematic map using the R software [25]. The canine population for each district corresponds to approximately 13.5% of the human population [32].

Human visceral leishmaniasis

The data on human cases of VL per district of Ipatinga, during the study period, were obtained from the Epidemiological Surveillance Section of the Municipal Health Department of Ipatinga (provided by T.S. Mendes). The residential addresses were considered for the descriptive analysis of human cases, using tables, graphs and summary measures, such as averages, medians, proportions and rates. In order to analyze the spatial distribution of the human cases of VL, the Kernel density map was constructed and the incidence rates were plotted on a thematic map. These maps were performed using the "R" software [33].

Ethics statement

This research was approved by the Animal Research Ethics Committee of Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/Fiocruz) under number LW-16/15 (S1 Fig). All the procedures followed the technical norms established by the Federal Board of Veterinary Medicine (CFMV resolution no. 714/2002). Dog owners were informed of the project objectives and voluntarily signed a Free and Informed Consent Statement. The entomological captures were performed after voluntary signature of a Free and Informed Consent Statement by the residents. Data on human VL cases were kindly provided by the Epidemiological Surveillance Section of the City Health Department of Ipatinga. The field studies did not involve endangered or protected species.

Results

Phlebotomine sand fly fauna survey

The total numbers of phlebotomine sand flies captured in our study are compiled in Table 1, sorted by species and gender. About 53% of the phlebotomine sand flies were captured in the peridomestic area and 47% inside the residences (S1 Table).

From a total of 1,501 captured specimens of phlebotomine sand flies, males were slightly predominant (57%) over females (43%). The predominant species, for both genders, were *Lutzomyia longipalpis* (61.5%), *Evanromyia cortezzi* (21.8%), and *Evanromyia lentii* (11.6%) with female:male ratios of 0.5, 1.7, and 0.8, respectively. Phlebotomine sand flies belonging to other species accounted for 4.7% of the total captured specimens (Fig 2). Relative percentages of females belonging to the three predominant species followed the same decreasing order observed for both genders: 46.3% for *L. longipalpis*, 32.2% for *E. cortezzi*, and 22.1% for *E. lentii*. The species *Nysomyia whitmani* and *Nysomyia intermedia*, both species of biological importance, reached about 1% each of the total number of phlebotomine sand flies.

The spatial distribution of the entomological capture points in the districts of Ipatinga is shown in Fig 3. In eight out of the ten districts selected for the study, *L. longipalpis* was the

Table 1. Phlebotomine sand fly species captured in the city of Itapetinga (Município Geográfico, Brazil) using light traps, from March 2015 to February 2016.

Species	Females		Males		Males + Females	
	No.	%	No.	%	No.	%
<i>Brumptomyia areolaris</i>	0	0.0	8	8.0	8	0.5
<i>Brumptomyia vittuloides</i>	0	0.0	1	0.1	1	0.1
<i>Brumptomyia sp.</i>	7	1.1	0	0.0	7	0.5
<i>Zschokkomyia basalis</i>	1	0.2	0	0.0	1	0.1
<i>Phlebotomus cortelezzi</i>	20	22.2	19	13.9	37	23.0
<i>Phlebotomus leish</i>	70	12.1	96	11.2	174	11.6
<i>Phlebotomus intertropicus</i>	1	0.2	0	0.0	1	0.1
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	39	49.5	40	71.3	929	61.9
<i>Martinyomyia robustus</i>	0	0.0	1	0.1	1	0.1
<i>Stomoxys calcitrans</i>	3	0.5	4	0.5	7	0.5
<i>Synsenta mucronella</i>	11	1.7	7	0.8	18	1.2
<i>Synsenta schimantzi</i>	8	1.2	6	0.7	14	0.9
<i>Protonycta fuscifemur</i>	1	0.2	0	0.0	1	0.1
<i>Protonycta pectus</i>	1	0.2	0	0.0	1	0.1
<i>Prozania cheni</i>	1	0.2	2	0.2	3	0.2
<i>Paratopomyia similis</i>	5	0.8	2	0.2	7	0.5
<i>Trichopygomyia longipennis</i>	1	0.2	0	0.0	1	0.1
Total	66	100.0	86	100.0	1901	100.0

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208522.t001>

predominant species throughout the year: *Bethulia*, Bom Jardim, Canaã, Cidade Nôbre, Itapetinga, Esperança, Ideal and Venosa. The species *E. cortelezzi* was present in the district of Vila Colônia, and *N. intermedia* in the district of Carina (S2 Table). The districts with the higher population density (>300) of phlebotomine sand flies, considering all species, were *Bethulia* and Itapetinga (Fig 2).

In order to evaluate whether climate variables (temperature, relative air humidity and rainfall) had any effect on the population density of phlebotomine sand flies, we first investigated any possible associations between each pair of climate variables themselves. No significant association was found, except for a tendency of concomitant increase of relative air humidity with rainfall through the months. Similarly, there was no statistically significant association between the monthly number of phlebotomine sand flies and any of the climate variables. The climate variables did not interfere with the monthly number of *L. longipalpis* either. The monthly number of specimens captured for the three predominant species throughout the year is expressed in Fig 4. The species *E. cortelezzi* showed an increased percentage (22.1%) in March (warm and dry weather conditions). On the other hand, *E. leish* displayed a peak (27.6%) in December, which was also warm and rainy. *L. longipalpis* population was more homogeneously distributed over the year of capture, with less pronounced population peaks in August, October and December, in comparison with *E. cortelezzi* and *E. leish*.

Leishmania DNA in phlebotomine sand flies

The presence of *Leishmania* DNA was investigated in 285 test samples of total DNA from the female phlebotomine sand flies captured in our study (Table 2). Among them, the 353 bp fragment characteristic of the *Leishmania* genus was observed in one test sample of *L. longipalpis* (numbered 190) and in one test sample of *E. cortelezzi* (numbered 247), after LAMP (Fig 5).

Further nucleotide sequencing of the amplified fragments in the two positive test samples for *Leishmania* indicated the presence of *Leishmania infantum* DNA in both cases (Fig 6). The

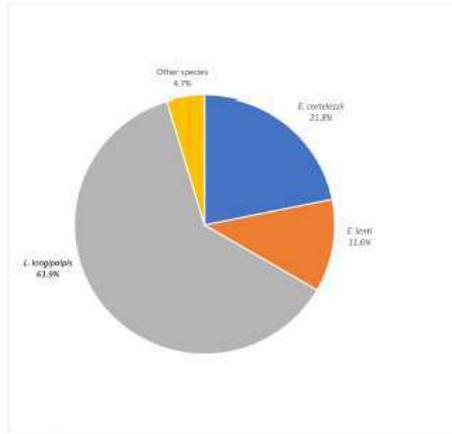


Fig 2. Species distribution of phlebotomine sand flies in the city of Iperitanga, (Minas Gerais, Brazil). Species with relative percentage lower or equal to 1.2% were grouped under the "Other species". Study period: March 2015 to February 2016.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206498.g002>

minimum rates of natural infection (MRI) by *Leishmania infantum* were estimated as 0.3% for *L. longipalpis* and 0.5% for *E. corleae*. In the first case, the test sample was a pool of seven specimens, whereas the latter can be a single specimen of *E. corleae*.

Canine visceral leishmaniasis

A total of 9136 blood samples were obtained in the canine serological survey, of which 4183 (45.8%) were actively collected and 4953 (54.2%) originated from passive survey. Canine VL was serologically confirmed in 1355 (14.8%) dogs (Table 3).

Fig 7 shows the distribution of canine and human VL infection in the districts of Iperitanga and the entomological capture sites in the study period. The prevalence rates of canine VL, based on the estimate of evenly distributed dog population considerably varied among the studied districts. Barbáza, Canal, Vila Colônia, Esperança and Bom Jardim had higher prevalence

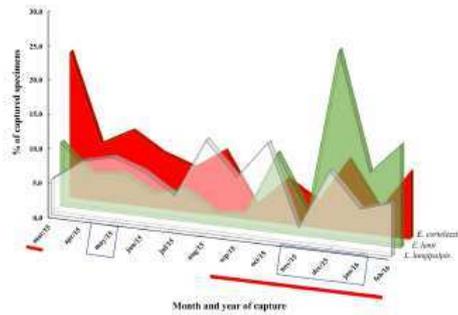


Fig 4. Monthly percentage of the three predominant species of phlebotomine sand flies captured in Ipatinga, Minas Gerais (Brazil). The total sum of each species is always 100%. Color legend: 1. *E. sandstonei* (red), 2. *E. juzei* (green), and 3. *E. longipalpis* (brown). Rainy months (with precipitation index higher than the mean calculated for the one-year period) are inside rectangles. The red line below the X-axis indicates warmer months (with temperature above the mean temperature calculated for the one-year period) and study March 2017 to February 2018.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206452.g004>

The Kernel density map (Fig 5) shows main hotspots in the districts of Beldônia and Canal. However, VL was widely distributed in nine of the ten studied districts.

Discussion

In the present study we describe, for the first time, important aspects of the transmission chain of VL in area of recent transmission but with high epidemiological transmission risk of the disease in humans. We investigated the entomological fauna, the prevalence of canine VL and the reported cases of human VL in Ipatinga, an economically important city for the state of Minas Gerais and Brazil. Our results were compiled in thematic maps indicating the actual situation of VL in the city.

The importance of analyzing the population density of vectors and correlating it with aspects related to the peridomestic is extensively discussed in the literature [23, 25, 26, 27]. This relationship is directly associated with the degree of adaptability of domestic animals and the vector's sensitivity to the environmental conditions, such as: 1. abundance of organic matter favoring the maturation of immature forms; 2. large number of domestic animals as a blood source for hematophagous female adults; 3. a variety of microhabitats that protect them from adverse conditions [25, 26, 27]. Taking these factors into account, the entomological traps were strategically mounted in shade of a rose and near vegetation, whenever possible. Many residences had fruit trees and/or domestic animals (dogs or chickens) in its peridomestic that may have favored the diverse fauna of captured phlebotomine sand flies captured in our

Table 5. Natural presence of *Leishmania* DNA in total DNA extracted exclusively from females of captured phlebotomine sand flies. When more than one specimen (up to six) of the same species was captured in the same household and in the same month, they were pooled as one specimen. Otherwise, individual specimens constituted one test sample.

Species	No. females captured	No. of test samples	
		Analyzed	Positive for <i>Leishmania</i> DNA
<i>Brumptomyia</i> sp.	7	7	0
<i>E. barclayi</i>	1	1	0
<i>E. cheni</i>	1	1	0
<i>E. costaricensis</i>	208	93	1
<i>E. bucherti</i>	1	1	0
<i>N. intermedia</i>	11	11	0
<i>E. longipalpis</i>	78	58	0
<i>L. longipalpis</i>	219	125	1
<i>T. longipalpis</i>	1	1	0
<i>M. minimum</i>	0	0	0
<i>F. personi</i>	1	1	0
<i>M. gwynneae</i>	2	2	0
<i>S. sandali</i>	5	4	0
<i>S. irritabilis</i>	1	1	0
<i>N. whitnani</i>	8	8	0
Total	645	245	2

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294492.t005>

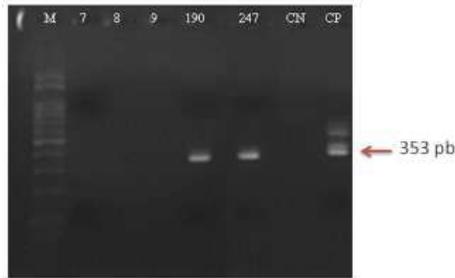


Fig 5. Electrophoresis of TaqPCR amplification products of total DNA from sand fly DNA on 2% agarose stained by ethidium bromide. A 25bp PCR product is evidence of the presence of *Leishmania* DNA. Sample number M—100bp ladder; 7, 8 and 9—Representative negative test samples for *Leishmania* DNA; 190—Positive test sample for *Leishmania* DNA in *L. longipalpis*; 247—Positive test sample for *Leishmania* DNA in *E. costaricensis*; CN—Negative control (without DNA); CP—Positive control *Leishmania* *gwynneae* (M:100bp ladder).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294492.g005>

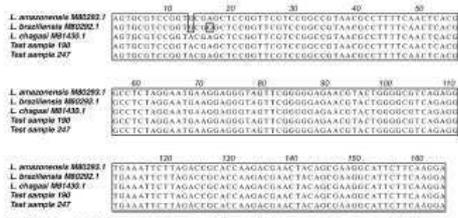


Fig 6. Multiple nucleotide alignment of the characteristic Leishmania DNA fragments at a 10 PCR using total phlebotomine sandfly DNA, as template. The red double mutation, that characterise each Leishmania species are also in the bottom. (Leishmania sequence used as reference are those deposited in the GenBank [26]).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206492.g006>

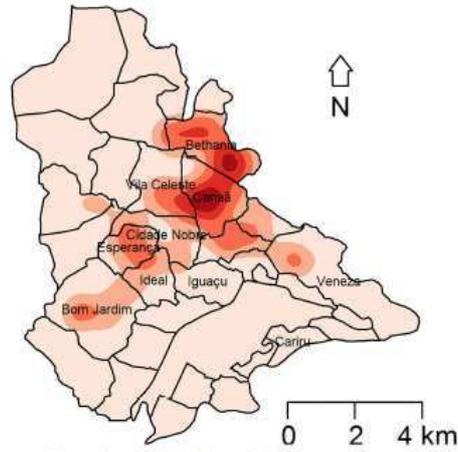
study. The availability of organic matter in the soil and the presence of chickens may increase potential risk factors for the occurrence of VL [23, 25].

In Brazil, *L. longyptisi* is the main phlebotomine sandfly species responsible for VL transmission, followed by *Leishomyia crum*, which is more important in the states of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul [32–34]. Due to its high vector capacity, anthropophila and prevalence in the urban and peri-urban areas, *L. longyptisi* is considered the species of major medical importance in VL transmission [42, 43]. *L. longyptisi* was the predominant species (61.9%) captured in Itapetinga, corroborating other studies carried out in known endemic areas

Table 3. Canine visceral leishmaniasis in the city of Itapetinga, Minas Gerais State, Brazil. Data were obtained from active and passive survey from March 2015 to February 2016. Dogs with positive CRP (or waiting list) at ELISA (antibody test) result were considered serologically positive for VL, in accordance with the current protocol adopted by the Brazilian Ministry of Health for canine VL diagnosis [24].

District	Number of dogs tested	Number of positive dogs	
		CRP	CRP and ELISA
Bethânia	2205	77	410
Carol	2566	60	309
Calisto Nobre	452	12	25
Barro Jardim	857	24	128
Itapetinga	615	33	84
Idraí	315	14	49
Ignácio	267	10	45
Vences	200	12	42
Vila Colêta	658	20	113
Carra	41	0	1
Sobriná	8096	273	1244
Okem	1040	52	111
Total	9156	5479	1335

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206492.t003>



of VL in Minas Gerais State [5, 44–48]. *L. longipalpis* specimens were present every month and in every district under study. *E. corrientii* and *E. leiri* were also captured in major amounts.

Since climate factors, such as temperature, air humidity and rainfall, variably interfere with the population density of phlebotomine sand flies [49], we analyzed the local seasonal profile of the three predominant species in our study: *L. longipalpis*, *E. corrientii* and *E. leiri*. Although it has been generally observed that the population density of phlebotomine sand flies generally increases in warm and humid months and decreases in dry and cold months, each of the three major species displayed a different seasonal profile [5, 44, 45, 50]. No statistical association could be found between any climate factor and the population density of any of these species.

L. infantum DNA was detected in *L. longipalpis* and *E. corrientii* with estimated MTBs of 0.3% and 0.9%, respectively. In nature, even in endemic and high-VL transmission areas, the presence of *L. infantum* DNA in the total population of phlebotomine sand flies is low [21]. These low, or nil, values are compatible with other studies described in the literature that found a value between 0.16% and 1.25% [51–54]. The presence of *L. infantum* DNA in *E. corrientii* was described before [55–57]. Ross et al. [58] raised the possibility that this phlebotomine sand fly could be participating in VL transmission, since they found specimens naturally infected by *Leishmania* in endemic areas of VL. However, a number of criteria must be attended in order to consider a given species of phlebotomine sand fly a competent vector of leishmaniasis: a geographical distribution coincident with that of the disease, high density of the species, detection of natural infection by the parasite, transmission capacity and food preference [59]. The whole set of data available so far is insufficient to conclude anything about the actual epidemiological role of *E. corrientii*, if any, in VL transmission. Further studies are needed in order to specifically investigate this point.

The species *N. intermedia* and *N. whitmani* were captured in our entomological fauna survey, similarly to surveys conducted in other endemic areas of TL in Minas Gerais, but which did not provide data about their natural infection by *Leishmania* [22, 30, 31]. Spating is an endemic area of TL, with 197 cases reported between 2009 and 2015 [12]. In Curitiba alone, one of the districts included in the present study, fourteen cases of TL (36%) were reported of the total of 39 for the whole city between March 2015 and February 2016 (data provided by TS Mendes). Remarkably, in this district, the predominant species of phlebotomine sand fly captured was *N. intermedia*, vector of TL. Unfortunately, up to the present time, there are no studies on the etiological agent of TL. *L. braziliensis* is the most frequent infecting parasite in endemic TL regions. But, despite the abundance of *N. intermedia* and *N. whitmani*, we did not detect *L. braziliensis* DNA in any of the test samples analyzed. Some works in the literature suggest that *L. infantum* could be an etiological agent of TL. Lara-Silva et al. [62] detected *L. infantum* DNA in *Rattus norvegicus*, which is known to participate in the wild transmission cycle of the disease [63, 64]. Although rare, *L. infantum* has been found in patients with cutaneous lesions. Oliveira-Neto et al. [65] described a first case of cutaneous lesions induced by a "microscopic" *Leishmania*. At that time, however, the authors called the attention to the fact that assumptions about the etiological agent based solely on clinical examination and epidemiological data might lead to erroneous conclusions. Later, Liya et al. [66] reported the first case of TL with exclusive cutaneous lesions in Rio de Janeiro (Brazil) and concluded that *L. infantum* was the etiological agent there. Unfortunately, our data do not allow any conclusion about that and further studies are needed on endemic regions of TL.

The use of geoprocessing in epidemiological studies has contributed to improve the description of diseases in relation to spatially distributed variables. Spatial analysis techniques have been largely used in the study of leishmaniasis, allowing the analysis of spatial dependence between canine and human VL vector distribution, and characterization of areas with

high incidence and risk of death [27–29]. The density of infected dog population was positively correlated with the relative risk of contracting human VL [30]. A correlation between asymptomatic dogs and human cases of VL was described in Belo Horizonte, the capital of Minas Gerais State [27]. In our study, the thematic maps suggested an association between the canine prevalence and human incidence on a visual basis. Spatial analysis allowed the visualization of regions with the highest VL prevalence, therefore enabling the identification of target areas and risk factors in order to guide the use of effective strategies of control/prevention. Among these are the removal of seropositive dogs and insecticidal spraying of the households in months with a higher population density of vectors.

In practical terms, the Zoonosis Control Center of Ipatinga, in accordance with the procedures determined by the Brazilian Ministry of Health, only adopts chemical control measures against the vectors in areas with not well annotated human VL, and after entomological investigation [12]. As for the domestic reservoir, the presence of asymptomatic dogs for VL is a difficulty faced by the public health organs. Although these dogs present no clinical signs of the disease, some of them are infective for *Leishmania* and may act as a source of the parasite [21]. This reinforces that the removal of seropositive dogs, although controversial, is one important measure to control human VL [10, 22–25]. In addition, Oliveira [6] suggested that every VL case should be monitored for at least six months, since the occurrence of a human case in one household increases the chance of observing another human case in the same house within the next three months but does not change the chances of another event in the district.

Ipatinga is, today, the municipality with the highest human population density in the Steel Valley and the one that most suffers from the occurrence of VL. It has a Zoonosis Control Center and invests in VL control actions in accordance with the PSCVL of the Brazilian Ministry of Health. The actions are performed according to the existing epidemiological reality and are prioritized to a zone of greater occurrence of human and canine cases of VL. Based on the presence of *L. longipalpis* carrying *L. infantum* DNA, the prevalence of canine and human VL cases, we can conclude that the transmission cycle of VL is active in Ipatinga. Although only asymptomatic human cases were included in our analysis, the spatial techniques used here allowed us to visualize a positive relationship between canine and human cases of VL and also to perceive the area with the highest priority for application of control measures against the disease in Ipatinga.

According to the manual of the PSCVL of the Ministry of Health, the main objective of the Program is the reduction in the number of cases and number of deaths, since the percentage of death due to VL can reach over 90% if the patients are left untreated. Besides efforts aiming at early diagnosis and treatment of the disease, the reduction of risk transmission through the control of reservoir and vectors is another important point of the PSCVL. The objective of our study was to contribute to the comprehension of the local epidemiological profile in Ipatinga concerning vectors and reservoirs of VL.

Supporting information

S1 Fig. License for scientific use of animals from the Ethics Committee on the use of animals (CEUA/Fisomaz LW/36/15).
(PDF)

S1 Table. Phlebotomine sand flies captured per species, gender, and per or inside domestic light traps in the city of Ipatinga, State of Minas Gerais (Brazil).
(DOCX)

S2 Table. Phlebotomine sand fly species captured per district of Ipatinga, State of Minas Gerais (Brazil). (DOCX)

Acknowledgments

We would like to thank the employees of the Health Department of Ipatinga, especially Marcelides Alves, Reníca Lopes and female Pires Teixeira.

Author Contributions

Conceptualization: Rosana S. Lana, Telma S. C. Mendes, Edelberto S. Dias.

Formal analysis: Rosana S. Lana, Letícia C. Pinheiro, Cosuado L. Fortes-Dias, Edelberto S. Dias.

Funding acquisition: Edelberto S. Dias.

Investigation: Rosana S. Lana, Érika M. Michalicky, Lívia O. Lopes, Fabiana O. Lara-Silva, Letícia L. Nascimento, Letícia C. Pinheiro, João C. França-Silva, Telma S. C. Mendes, Cosuado L. Fortes-Dias, Edelberto S. Dias.

Methodology: Rosana S. Lana, Érika M. Michalicky, Lívia O. Lopes, Fabiana O. Lara-Silva, Letícia L. Nascimento, Letícia C. Pinheiro, João C. França-Silva, Telma S. C. Mendes, Cosuado L. Fortes-Dias, Edelberto S. Dias.

Project administration: Edelberto S. Dias.

Supervision: Edelberto S. Dias.

Writing – original draft: Rosana S. Lana, Edelberto S. Dias.

Writing – review & editing: Rosana S. Lana, Érika M. Michalicky, Letícia C. Pinheiro, Cosuado L. Fortes-Dias, Edelberto S. Dias.

References

1. WHO—World Health Organization. *Leishmaniasis*. In: *Global Health Information*. 2010. Geneva: WHO; 2010. www.who.int/leishmaniasis/. Accessed: 10/05/2017.
2. Akse J, Velez RD, Barni C, Hansen M, Desjeux P, Cline J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012; 7(9).
3. WHO—World Health Organization. *Leishmaniasis*. 2015. [Internet]. Geneva: WHO; 2015. www.who.int/leishmaniasis/. Accessed: 10/05/2017.
4. Pan American Health Organization (PAHO). *Epidemiological Report of the Americas, Leishmaniasis Report #5*. 2018.
5. Batista RA, França-Silva JC, Michalicky EM, Silva JC, Pires A, Lamas ES, et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de fêmeas de *V. limbo* em áreas endêmicas de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016; 39: 421–426.
6. Monteiro EM, França-Silva JC, Costa RTD, Costa DC, Batista RA, de Paula EV, et al. Leishmaniose visceral: situação de transmissão e distribuição em Minas Gerais, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 31: 147–52.
7. Michalicky EM, França-Silva JC, Batista RA, Lara-Silva FO, Loureiro AMF, Fortes-Dias CL, Dias ES. Phlebotomine distribution in Ipatinga, an area of transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104: 46–51. PMID: 19222322
8. De Souza CM, Paveschi JE, Batista RA, Monteiro EM, Costa DC, Dias ES. Study on phlebotomine sandfly (*Chibina Psychodidae*) fauna in São Horizonte, state of Minas Gerais, South West of Cerrado. *Ciênc. 2004*; 30(6): 975–983. PMID: 15712533

31. Van Eysa GL, Scheone GL, Knox MC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and locus for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Met. Biochem Parasitol.* 1995; 25: 135–142. PMID: 2863232
32. Cruz J, Cavalcanti C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, et al. Amplified polymerase chain reaction (L-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in cattle dogs infected with human *Leishmania* parasite. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 94: 185–189.
33. Palacios SR, Secor de NRC, Neidrems JC, Pinheiro RPP, Galati EAB, Jansen HF, Malachuk RS. Detection and identification of *Leishmania* species in field-collected phlebotomine sand flies based on mitochondrial COI. *Acta Tropica.* 2006; 99: 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.08.022> PMID: 17253444
34. Brasil. Ministério de Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Técnica Conjunta D12D11/CGDT/CGAB/DEVI/STSV/MS/da29 de dezembro de 2011.
35. Brito MG & Chagnon T. Manual de métodos básicos na competência de vacinação antileishmaniasse animal. São Francisco: Secretaria de Estado de Saúde do Estado de Minas Gerais; 2005. 15p.
36. Lima LC. Ruidelapão de *Leishmania* infamada, um provável caso de pre-diapetição. *Rev Saude Publica.* 1984; 23: 102–104.
37. Jarames MP, Souza MP, Cavalcanti ES. Density of sand flies (*Leishna* Psychodidae) in domesticated wild animals habitats in an area of visceral leishmaniasis in the city of Rio Grande do Norte, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94(4):27–432. PMID: 10445977
38. Santos SO, Azeiteiro JL, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacorn MAP. Identification of *Leishmania* species vectors of American Visceral Leishmaniasis. *Med Vet Entomol.* 1998; 12: 375–377. PMID: 9737024
39. Ekhouy ANEM. Vigilância e controle de leishmaniasse visceral no Brasil. *Consultas e Expertas OMS* sobre leishmaniasse visceral nas Américas; 2006. 24.
40. Ribeiro MA, Lima GDM. Distribuição espacial de *Leishmania longipalpis* (Lutz & Neiva, 1913) e *Leishmania cruzi* (Mangabeira, 1908) no Estado de Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39:37–343.
41. Santos SO, Azeiteiro JL, Hoffmann MP, Rufan MG, Ferreira WF, Pereira C, Ferreira L. The presence of *Leishmania longipalpis* a form of American visceral leishmaniasis whose formerly proven vector is *Leishmania cruzi* Contamb. Mato Grosso do Sul State. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36: 493–494. PMID: 14707490
42. Monteiro-Lima J, Caccato H, Ovelato M, Healy PD, Bianchini JL, Travil SL, Lane RP. Comparative vectorial efficiency of *Leishmania* species and *Leishmania longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Tropica.* 2003; 68: 19–26. PMID: 12962381
43. Santos RPP, Nunes SA. *Leishmania longipalpis* (Diptera: Psychodidae) (Phlebotominae): a review. *Actas de Academia Brasileira de Ciências.* 2008; 70: 310–330. PMID: 18481582
44. Bahia RA, França-Silva JC, Costa RT, Furtado-Oliveira CL, Silva JC, Paula EV, et al. Phlebotomine Sand Flies (Phlebotomidae, an Order of American Visceral Leishmaniasis Transmission) in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99: 467–487. PMID: 15540410
45. Dias ES, França-Silva JC, Silva JC, Monteiro EM, Paula NM, Gonçalves CM, et al. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de um focos de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007; 40: 49–52.
46. Michalsky EM, Gasque KS, Silva FOL, França-Silva JC, Dias CLF, Bahia RA, et al. Infecção natural de *Leishmania (Leishmania) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em *Leishmanioses cutâneas* no município de Jaracuba, Estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44(1): 34–42.
47. Lark-Silva FO, Michalsky EM, Farias-Dias CL, Faza VOOP, Passerina JEM, Regina-Silva S, et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic dog host in focus of recent transmission and no reported transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop.* 2015; 146: 129–36. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.018> PMID: 25937789
48. Viana EN, Helena M, Mendes F, Salazar PC, Reis W, Dias ES, et al. Abundância de *Leishmania longipalpis* (subsp. nov.) e *Leishmania* sp. (subsp. inc.) em focos de transmissão de visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016; 111(5): 380–381. <https://doi.org/10.1590/S1678-0202160130386> PMID: 27424386
49. Favalari OP. Sobre as neoseleções naturais de *Leishmaniasis* Tegumentar Americana. *Revista Med Trop.* 1980; 23(4): 326–333.
50. Bahia RA, Paz GP, Bahia MCO, Andrade RCO, Barros OCMO, et al. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in Governor Valadares, a transmission area for American Tegumentary Leishmaniasis in State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44(2): 135–139. PMID: 21928492

51. Miranda JC, Reis E, Schiele A, Gonçalves M, Reis MG, Carvalho L, et al. Frequency of infection of *Lactomyces* spp. with *Lactinase* in Brazil: a cross-sectional study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97: 245–48. PMID: [12032376](#)
52. Góes EAB, Nunes VLB, Dornel MEC, Coelho ET, Celidoro G, Espirito MA, et al. Estudo de lactonídeos (*Opuntia Psychodae*), em áreas de habitação popular, no Estado de Mato Grosso do Sul. *Bol. Soc. Bras. Parasitol.* 1998; 33: 175–85.
53. Santos MFA, Carvalho CC, Silva LA, Lima MGS, Sampaio AMF, Ribeiro JMM, et al. Molecular analysis of natural infections of *Lactomyces* spp. in an endemic area for visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad. Saude Publica* 2019; 35: e2018-0133. PMID: [31293223](#)
54. Tassi G, Tassi A, Rizzo D, Cavallo GM, Spicola TG, et al. 2017. Aspects of the ecology of *phlebotomine sandflies* (*Opuntia Psychodae*) in the Phlebotomine heritage near secondary Camp. *PLoS One*. 2017; 11(9): e0177928.
55. Cavallo GM, Andrade F, Rizzo D, Falcão AL, Reis Lima AC, Gondro GM. Naturally infected *Lactomyces* spp. in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 94(2): 1–4. [https://doi.org/10.1590/S1678-45012008000200001](#) PMID: [18428426](#)
56. Santos L, Cavallo GM, Gondro GM, Quaresima PP, Lima ACVM, Falcão AL, et al. Natural infection of *Opuntia Psychodae* (*Opuntia Psychodae*) by *Lactomyces* (*Opuntia Psychodae*) in Brazil. *J. Med. Entomol.* 2006; 43: 1153–1155. PMID: [16789493](#)
57. Lima PS, Michalsky EM, Faria-Oliveira G, França-Silva JC, Lima-Silva FO, Lima ACVM, et al. Phlebotomine sand fly natural leishmaniasis in Brazil: the role of the *Opuntia Psychodae* (Phlebotominae) in the transmission of *Leishmania* spp. *Rev. Soc. Bras. Parasitol.* 2015; 10(4): 339–344.
58. Falcão AL, Pereira CP, Souza RP, Figueiredo JG, Sakamoto O, Santiago E. Natural infection of *Opuntia Psychodae* (Phlebotominae) with *Lactomyces* (*Opuntia Psychodae*) in Brazil. *Acta Trop.* 2015; 150: 28–31. [https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.10.008](#) PMID: [25435059](#)
59. Kikuk-Kerndick R, Morán M, Kikuk-Kerndick M. Bibliography on the colonization of Phlebotomine sand flies. *Parasitologia*. 1991; 33: 321–330.
60. Tassoni A, Pivato JC, Alencar MMS, Duarte R, Pereira AC, Coelho DVS, et al. Identification of a new Brazilian *Opuntia Psychodae* (Phlebotominae) *leishmaniasis* in an endemic leishmaniasis area in Brazil. *Revista Med Trop São Paulo*. 2018; 57(4): 327–4. [https://doi.org/10.1590/S1678-45012018050000000000000000000000](#) PMID: [29529736](#)
61. Souza CR, Borges MAS. Occurrence of *Lactomyces* spp. in *Opuntia Psychodae* (an *Opuntia*, *Opuntia*, *Opuntia*). *Bol. Soc. Bras. Parasitol.* 2006; 31: 143–145.
62. Lima-Silva FO, Santos RA, Michalsky EM, Pereira EC, Lopes MOG, Falcão AL, et al. *Leishmania* spp. (Kinetoplastida: Kinetoplastida) infected by *Lactomyces* (*Opuntia Psychodae*) in Brazil. *Bol. Soc. Bras. Parasitol.* 2014; 9(2): 24–24.
63. Brandão-Filho SP, Carvalho FO, Brito ME, Almeida PA, Nacimento LA. Ametazoan *Opuntia Psychodae* in Pernambuco, Brazil: new epidemiological aspects in Zona da Mata region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994; 89: 445–448. PMID: [10292026](#)
64. Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Filho NMF, Oliveira JG, Santana EW, Souza M, et al. The identity of *Leishmania* species from sand flies and their hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011; 116: 159–164.
65. Oliveira Neto MP, Gomes GJ, Menezes H, Pacheco RS, Machado MCA, Machado P, et al. Active cutaneous leishmaniasis in Brazil induced by *Leishmania* (*Opuntia Psychodae*). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; 93: 303–309. PMID: [9723320](#)
66. Lima MS, Pinheiro M, Medeiros MF, Araújo LF, Lima JP, Figueiredo A, et al. First report of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Opuntia Psychodae*) in a non-endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Med Trop*. 2015; 57: 431–4.
67. Oliveira CL, Assumpção RM, Reis R. Spatial distribution of human and animal leishmaniasis in São Francisco, Minas Gerais State, Brazil, 1994–1997. *Cad Saude Publica*. 2001; 17: 1231–1239.
68. Meijerom C, Falcão AL, Ribeiro FC, Moura AM, Terribi M, Gripp AP, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a highland area in São Francisco municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103: 31–36. PMID: [18630022](#)
69. Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Espécies Geográficas de *Leishmania* Visceral no Estado de Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 39: 362–366.
70. Araújo VM, Pereira JC, Almeida MCM, Menezes FC, Morais MF, Reis A, et al. Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a epidemiological study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(4): e2100. [https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0021000](#) PMID: [23474726](#)
71. Michalsky EM, Rocha MF, Lima ACVM, França-Silva JC, Faria-Oliveira G, Oliveira PS, et al. Infectivity of *Opuntia Psychodae* showing different clinical forms of leishmaniasis to *Lactomyces* spp.

- praticidade e eficiência. *Rev Pan-Amaz*. 2007; 147: 67–76. <https://doi.org/10.1515/revpan.2007.01.004> PMID: 17748793
72. Alencar JE, Neves J, Dutra R. Leishmaniose visceral. In: *Doenças Infecciosas e Parasitárias* [J. Veronesi, org.]. Guanabara Koogan; 1995. 705–717.
 73. Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil: aspectos sobre a etiologia e as transformações realizadas no Estado do Ceará. *Tese de Graduação, Faculdade de Medicina* 1961; 152p.
 74. Deane LM, Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil: Geographic distribution and the zoonosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1962; 4(1):195–202.
 75. Deane LM, Deane MP, Alencar JE. Control of *Phlebotomus longipalpis* by CO₂ trapping and identification of behavior in Ceará. *Revista Brasileira de Otopneumologia*. 1995; 7: 131–41.