



**INGRID MARCIANO ALVARENGA**

**LEISHMANIOSE VISCERAL: CARACTERIZAÇÃO DE  
UMA NOVA ÁREA DE TRANSMISSÃO, DE UM ANTIGO  
PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA**

**Lavras – MG**

**2019**

**INGRID MARCIANO ALVARENGA**

**LEISHMANIOSE VISCERAL: CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA ÁREA DE  
TRANSMISSÃO, DE UM ANTIGO PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA**

Dissertação apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal e Saúde Coletiva, para a obtenção do título de Mestre.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joziana Muniz de Paiva Barçante

Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha

Co-orientadora

**Lavras – MG**

**2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Alvarenga, Ingrid Marciano.

Leishmaniose Visceral: Caracterização de uma nova área de transmissão, de um antigo problema de saúde pública / Ingrid Marciano Alvarenga. - 2019.

60 p. : il.

Orientador(a): Joziana Muniz de Paiva Barçante.

Coorientador(a): Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Leishmaniose. 2. Flebotomíneos. 3. Vigilância Epidemiológica. I. Barçante, Joziana Muniz de Paiva. II. Rocha, Christiane Maria Barcellos Magalhães da. III. Título.

**INGRID MARCIANO ALVARENGA**

**LEISHMANIOSE VISCERAL: CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA ÁREA DE  
TRANSMISSÃO, DE UM ANTIGO PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA**

**VISCERAL LEISHMANIASIS: CHARACTERIZATION OF A NEW  
TRANSMISSION AREA OF AN OLD PUBLIC HEALTH PROBLEM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal e Saúde Coletiva, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 8 de Agosto de 2019

Profª Drª Joziana Muniz de Paiva Barçante

Profª Drª Eunice Aparecida Bianchi Galati

Drº Felipe Dutra Rêgo

Profª. Drª. Joziana Muniz de Paiva Barçante – UFLA

Orientadora

Profª. Drª Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha – UFLA

Co-orientadora

**Lavras – MG**

**2019**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pelo dom da vida, por me fazer capaz de realizar os meus sonhos e alcançar meus objetivos. Sem a fé eu não seria ninguém. Obrigada Deus por sempre andar ao meu lado!

Ao longo destes dois anos de mestrado diversas pessoas estiveram ao meu lado, me apoiando e me auxiliando em diversas áreas, eu agradeço do fundo do meu coração a todas as pessoas que me apoiaram e me ajudaram durante essa jornada profissional e pessoal.

À minha mãe, Mara, que sempre foi guerreira e batalhou para que eu pudesse estar onde estou, que me possibilitou alcançar e batalhar pelas minhas vitórias, me motivou e apoio em todos os momentos. Eu te amo mãe!

Ao meu irmão, João Vitor, que eu amo muito e que sempre esteve ao meu lado, mesmo que de forma diferente, me conforta e me apoia. Ao meu padrasto, Marcos, que sempre me deu todo suporte e nunca mediu esforços para me ajudar.

Ao meu namorado, Rafael, que além de meu companheiro de vida, me apoio em minha jornada, me ajudando a realizar minhas atividades, sem seu apoio não sei como conseguiria finalizar minhas coletas, obrigada, eu te amo.

À minhas avós, Elza e Kotinha, que são exemplo de mulheres que eu quero um dia ser. Mulheres que batalharam para criar suas famílias, e que mesmo com o fardo pesado dos anos, nunca negaram um colo, um abraço, um aconchego, eu amo muito as senhoras.

À minhas famílias Marciano e família Alvarenga, que como toda família tem seus defeitos, mas que o amor e a união fazem com que as qualidades prevaleçam. Obrigada por serem quem são.

À minha madrinha Cidinha, e minhas primas Rafaela e Dani, que sempre foram mais do que família, foram amigas, foram confidentes, eu amo muito vocês.

À Caroline, que desde a graduação sempre esteve ao meu lado, me apoiando e vibrando com minhas vitórias, obrigada por tudo amiga, espero pode estar com você sempre em suas vitórias também, amo você.

À Mari, que me acompanhou em toda jornada de mestrado, e que quero poder levar para vida toda. Ao Davi por ser um bebê iluminado e que me alegra só de ver suas fotos.

À Jozi, que não é apenas uma orientadora de mestrado, é uma orientadora da vida, é uma mãe da UFLA, sempre me apoiou em todas as loucuras que eu inventei, sempre acreditou que eu podia mais, e me fez acreditar que eu poderia. Sempre me inspirou a ser uma pessoa melhor, uma profissional melhor, apenas com suas atitudes. Eu te admiro muito, e espero um dia ser um pouco do que você é, e poder retribuir tudo que já fez e faz por mim.

Ao Thales, que sempre esteve por perto, me apoiando, me fazendo rir quando na verdade eu queria chorar, ou até mesmo me fazendo chorar por me mostrar a verdade, aquilo que eu precisava ouvir. Muito obrigada por ajudar em meu crescimento profissional e emocional.

A Mari e Carol por todo apoio e carinho que sempre tiveram por mim.

À Kiti, minha coorientadora, que me ajudou muito, me mostrou novas possibilidades, e ajudará a aperfeiçoar no seguimento do meu trabalho.

À família BIOPAR e NEP, que é minha segunda casa, é onde eu me sinto à vontade, onde eu cresci e vi crescer muitas pessoas, sou grata por participar desse grupo. Porque nenhum de nós é tão bom quanto todos juntos.

Ao Anderson, Marcelo, Nayara e todos da Prefeitura de Ribeirão Vermelho, que me ajudaram a entrar na cidade e ser bem recebida por todos, muito obrigada por abrirem as portas das residências as quais eu criei vínculo e desenvolvi minha pesquisa.

À Marina, Beatriz M., Dyovanna, Thiago que me auxiliaram em minhas coletas, viajando comigo, e pegando no batente. Obrigada pelo apoio moral e técnico.

Ao Tarcísio e Josinha por dedicarem seu tempo com minhas amostras como se fossem suas, muito obrigada pela dedicação e disponibilidade.

Ao Leandro e Carolina por me ajudarem diversas vezes com minhas amostras e apoio moral.

À Cris e à Mirian, por serem boas ouvintes e disponíveis, pelas dicas e apoio motivacional.

Ao Professor Ricardo Fujiwara e toda sua equipe de laboratório, por me receberem diversas vezes e me deixarem a vontade como se fosse de casa. Obrigada pelo apoio técnico e pela experiência adquirida.

Ao Professor Leco, a professora Celia por abrirem seu laboratório para me receberem as presas para identificar meus flebs, obrigada por me deixarem fazer parte desse cotidiano, pela experiência adquirida e pelo apoio técnico.

À Camila, que foi uma pessoa querida e atenciosa, me ajudou no que foi preciso e me ensinou desde o básico para a identificação, mesmo em um breve período, me transmitiu muito conhecimento.

Ao Andrey pelo apoio moral e técnico. Obrigada pelas dicas.

Ao professor Passarinho pelo apoio técnico e sua disponibilidade na elaboração dos mapas.

Ao professor Fladimir por me receber na patologia para coleta do material biológico dos cães.

À turma 2019 de Biotecnologia e Identificação de flebotomíneos da FSP, que foram excepcionais em compartilhar experiências, e principalmente me ajudarem a passar por esse momento tão feliz, mas tão estressante, vocês deixaram isso muito mais leve, obrigada. À professora Eunice, Marcia, Fredy, Vanessa, Laura e Priscila por fazerem essas duas semanas de disciplinas serem de enorme aprendizado, obrigada por compartilharem conosco essa experiência fantástica.

Aos moradores das residências as quais me aceitaram de tão bom agrado, agradeço a cada um de vocês por todo esse tempo que me receberam de portas abertas e boa vontade em ajudar, isso tudo é por vocês. Gratidão!

Aos cães que participaram do estudo.

À Universidade Federal de Lavras, a qual tenho orgulho de fazer parte, por dar a oportunidade de crescimento profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinário, pela oportunidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Gratidão a tod@s!

## RESUMO

As leishmanioses são doenças infecciosas de caráter zoonótico, que têm como agentes etiológicos parasitos do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) e como vetores, desses agentes insetos da família Psychodidae. A Leishmaniose Visceral (LV), conhecida também como Calazar, é a que apresenta maior letalidade, sobretudo entre crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos. Nas Américas, o agente etiológico da LV é *Leishmania infantum* (= *L. chagasi*) e o principal vetor deste parasito é a espécie *Lutzomyia longipalpis*. Considerando a importância da LV e seu processo de expansão geográfica, a compreensão das relações epidemiológicas que envolvem o estabelecimento do ciclo é de fundamental importância para a proposição de medidas de prevenção, vigilância e controle da doença. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo o levantamento da fauna de flebotomíneos município de Ribeirão Vermelho, Sul de Minas Gerais assim como a investigação da ocorrência de casos de infecção natural em cães e a detecção de DNA de *Leishmania* nos vetores. Foram conduzidas duas ações de educação em saúde nas quais foram realizados testes sorológicos em cães, DPP-Biomanguinhos como teste de triagem, e ELISA confirmatório, sendo estes preconizados pelo Ministério da Saúde. Foram testados 348 animais, sendo 186 (53,45%) fêmeas e 162 (46,55%) machos. Destes, 14 animais (4,02%) apresentaram sorologia positiva nos em ambos os testes, e dois destes cães foram submetidos à eutanásia, após autorização dos proprietários, com confirmação parasitológica e molecular da infecção. Entre os outros cães, 4 foram eutanasiados, e o restante não foram entregues ao serviço de saúde do município. Com relação à investigação entomológica, durante o período de fevereiro de 2018 a maio de 2019 foram instaladas armadilhas do tipo HP em residências, nas quais havia presença de cães positivos nas sorologias e ao redor dessas residências. Um total de 443 espécimes de flebotomíneos foram capturados, sendo estes pertencentes a pelo menos 13 espécies. As espécies mais abundantes foram, respectivamente, *Lutzomyia longipalpis* (73,8%), *Exopallata firmatoi* (6,7%), *Nyssomyia intermedia* (5,19%) e *Evandromyia cortelezze* (3,84%). A análise molecular permitiu identificar a presença de DNA *Leishmania* em 21 das 157 amostradas testadas, sendo estas pertencentes aos seguintes gêneros e/ou espécies *Lu. longipalpis*, *Brumptomyia* spp., *Miggonei. migonei*, *Ex. firmatoi*, *Ev. cortelezze* e *Pintomyia fischeri*. Este foi o primeiro estudo que objetivou investigar a situação da LV no município de Ribeirão Vermelho. Os dados obtidos permitiram fazer o primeiro registro de leishmaniose visceral canina no município, assim como o primeiro relato de 13 espécies de flebotomíneos na área de estudo. Ademais, os resultados demonstram a presença de DNA de *L. infantum* em espécies com reconhecida importância no ciclo de transmissão do parasito, e em espécies cuja importância vetorial ainda não foi reconhecida. A partir destes resultados o município de Ribeirão Vermelho passa a ser classificado como área de transmissão de leishmaniose visceral, com a necessidade de medidas de vigilância e controle, a fim de evitar novos casos caninos e a ocorrência de casos humanos.

**Palavras-chave:** Leishmanioses, flebotomíneos, vigilância epidemiológica.

## ABSTRACT

Leishmaniasis are infectious diseases of zoonotic character, whose etiological agents are parasites of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and as vectors of these insect agents of the family Psychodidae. Visceral Leishmaniasis (VL), also known as Calazar, is the one with the highest lethality, especially among children, the elderly and immunocompromised individuals. In the Americas, the etiologic agent of VL is *Leishmania infantum* (= *L. chagasi*) and the main vector of this parasite is *Lutzomyia longipalpis*. Considering the importance of VL and its process of geographic expansion, the understanding of the epidemiological relationships that involve the establishment of the cycle is of fundamental importance for the proposition of prevention, surveillance and disease control measures. Given the above, this study aimed to survey the fauna of sand flies of the municipality of Ribeirão Vermelho, southern Minas Gerais as well as to investigate the occurrence of cases of natural infection in dogs and the detection of *Leishmania* DNA in vectors. Two health education actions were conducted in which serological tests were performed on dogs, DPP-Biomanguinhos as a screening test, and confirmatory ELISA, which were recommended by the Ministry of Health. 348 animals were tested, 186 (53.45%) females and 162 (46.55%) males. Of these, 14 animals (4.02%) were serologically positive in both tests, and two of these dogs were euthanized, after authorization from the owners, with parasitological and molecular confirmation of the infection. Among the other dogs, 2 were euthanized, and the rest were not delivered to the health service of the municipality. Regarding the entomological investigation, from February 2018 to May 2019, HP-type traps were installed in residences in which positive dogs were present in and around the serology. A total of 443 sand flies specimens were captured, belonging to at least 13 species. The most abundant species were, respectively, *Lutzomyia longipalpis* (73.8%), *Expapillata firmatoi* (6.7%), *Nyssomyia intermedia* (5.19%) and *Evandromyia cortelezze* (3.84%). Molecular analysis allowed us to identify the presence of *Leishmania* DNA in 21 of the 157 sampled tested, which belong to the following genera and / or *Lu species*. *longipalpis*, *Brumptomyia spp.*, *Miggonei. migonei*, *Ex. firmatoi*, *Ev. cortelezze* and *Pintomyia fischeri*. This was the first study that aimed to investigate the situation of VL in the city of Ribeirão Vermelho. The data obtained allowed us to make the first record of canine visceral leishmaniasis in the municipality, as well as the first report of 13 sandfly species in the study area. Moreover, the results demonstrate the presence of *L. infantum* DNA in species of recognized importance in the parasite transmission cycle, and in species whose vectorial importance has not yet been recognized. From these results, the municipality of Ribeirão Vermelho is now classified as the area of transmission of visceral leishmaniasis, with the need for surveillance and control measures in order to prevent new canine cases and the occurrence of human cases.

Keywords: Leishmaniasis, sand flies, epidemiological surveillance.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico de parasitos do gênero <i>Leishmania</i> no inseto. ....	18
Figura 2 – Situação da Leishmaniose Visceral no mundo. ....	19
Figura 3 - Mapa de Ribeirão Vermelho.....	25
Figura 4 - Realização de DPP® Leishmaniose Visceral Canina: Bio-Manguinhos em cães de Ribeirão Vermelho/MG em ações de Educação em Saúde. ....	27
Figura 5 - Teste DPP® LVC - Bio-Manguinhos.....	27
Figura 6 - Armadilha luminosa tipo HP .....	30
Figura 7 - Mapa de distribuição de residentes participantes do levantamento de fauna de flebotomíneos no município de Ribeirão Vermelho/MG. ....	31
Figura 8 - Triagem e sexagem de flebotomíneos de coletas com armadilha luminosa HP em Ribeirão Vermelho/MG .....	32
Figura 9 - Distribuição espacial de cães com duas sorologias positivas para leishmaniose visceral, procedentes do município de Ribeirão de Vermelho, Minas Gerais.....	35
Figura 10 - Apresentação clínica de animais com leishmaniose visceral canina, procedentes do município de Ribeirão Vermelho, Minas Gerais. ....	37
Figura 11 - Amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. em esfregaço de medula óssea de cão.....	38
Figura 12 - Análise de RFLP de amplicons referentes à amostra de um cão procedente do município de Ribeirão Vermelho, Minas Gerais. ....	38
Figura 13 - Distribuição de flebotomíneos fêmeas e machos coletados em Ribeirão Vermelho/MG por mês. ....	44
Figura 14 - Caracterização fotográfica das residências com maior frequência de flebotomíneos, no município de Ribeirão Vermelho, Minas Gerais, no período de fevereiro de 2018 a 2019. ....	46
Figure 15 - Distribuição dos flebotomíneos recuperados no município de Ribeirão Vermelho, Minas Gerais, no período de fevereiro de 2018 a maio de 2019. ....	47
Figura 16 - Gel de agarose 2% demonstrando as bandas de amplificação da PCR utilizando o primer kDNA <i>Leishmania</i> . ....	48
Figura 17 - Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores usados nas reações de PCR com suas respectivas sequências e tamanhos de produtos amplificados.....	29
Tabela 2 - Números de espécies de flebotomíneos coletados no município de Ribeirão Vermelho/MG, durante o período de fevereiro de 2018 a maio de 2019. ....	41
Tabela 3 - Número de espécimes por espécies coletadas nas residências de março/2018 a maio/2019. ....	45

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CDC – Centers of Disease Control and Prevention

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DPP® - “Dual path platform”

ELISA - “Enzyme Linked Immuno no Sorbent Assay”

FUNED - Fundação Ezequiel Dias

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IgG – Imunoglobulina G

ITS1- “Internal Transcribed Spacer 1”

kDNA - DNA do cinetoplasto

LV - Leishmaniose Visceral

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

LVH - Leishmaniose Visceral Humana

LT - Leishmaniose Tegumentar

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MVCLV – Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral

MG - Minas Gerais MS - Ministério da Saúde

MP - Matriz Peritrófica

OMS - Organização Mundial da Saúde

pb – Pares de Base

PSF – Programa de Saúde da Família

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PVCLV – Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral

RIFI - Reação da imunofluorescência indireta

UFLA – Universidade Federal de Lavras

WHO – World Health Organization

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
2.1 Leishmaniose Visceral .....	16
2.2 Histórico.....	16
2.3 Agente etiológico .....	17
2.3 Epidemiologia.....	18
2.6 Prevenção e controle .....	20
2.7 Vetores .....	20
2.10 Detecção de DNA de <i>Leishmania</i> em flebotomíneos .....	22
2.11 Diagnóstico Canino .....	23
3. OBJETIVOS .....	24
3.1 Objetivo Geral.....	24
3.2 Objetivos específicos .....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Comitê de Ética .....	25
4.2 Área de estudo .....	25
4.3 Identificação de casos positivos de LVC .....	26
4.3.1 Testes sorológicos.....	26
4.3.2 Testes Direto.....	28
4.3.3. Extração de DNA.....	28
4.3.3 PCR convencional.....	29
4.3.4 Identificação de espécie pelo polimorfismo de fragmentos de DNA (RFLP) .....	30
4.4 Coleta e Identificação dos flebotomíneos.....	30
4.4.1 Identificação dos machos de flebotomíneos.....	32
4.4.2 Identificação das fêmeas de flebotomíneos.....	33
4.5 Avaliação da presença de DNA de <i>Leishmania</i> em flebotomíneos.....	33
4.5.1 PRC convencional dirigida ao ITS 1.....	34
4.6 Georreferenciamento.....	34
4.7 Análise dos dados.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Aspectos caninos.....	35

<b>5.2 Aspectos entomológicos e ambientais</b> .....	40
<b>5.3 Aspectos moleculares</b> .....	48
<b>6. Considerações Finais</b> .....	49
<b>CONCLUSÃO</b> .....	51
<b>REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO</b> .....	52

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um complexo de doenças infecciosas, de caráter zoonótico, causadas por mais de 20 espécies de parasitos do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), que possuem um ciclo biológico que envolve a participação de hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrado (inseto). (PEARSON; SOUSA, 1996; DESJEUX, 2004; OMS, 2019).

As leishmanioses podem se apresentar sob diferentes formas clínicas sendo elas a Leishmaniose Tegumentar (LT) e a Leishmaniose Visceral (LV), sendo a última de particular importância devido a sua alta letalidade, principalmente em crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos, se não tratados (PEARSON; SOUSA, 1996; DESJEUX, 2004; GONTIJO; MELO, 2004; MOURÃO et al., 2014; ZACARIAS et al., 2017).

Os agentes etiológicos das leishmanioses são parasitos do gênero *Leishmania*, que têm como vetor os insetos da subfamília Phlebotominae (Diptera: Nematocera: Psychodidae) (GIRAUD et al., 2019). Nas Américas existem mais de 528 espécies de flebotomíneos, mas somente cerca de 60 tem sido relacionadas com a transmissão de *Leishmania* (GALVIS-OVALLOS et al, 2017). O estudo dos potenciais vetores bem como sua relação com o protozoário e os hospedeiros vertebrados são fundamentais para criação de medidas para controle, visando reduzir a expansão das leishmanioses (WHO, 2019).

Ribeirão Vermelho é um município situado no Sul de Minas Gerais, com aproximadamente 4 mil habitantes, e até o ano de 2017 nenhum estudo epidemiológico para LV havia sido realizado, como inquérito sorológico e levantamento da fauna de flebotomíneos. O município possui uma extensão territorial de 49,18 km<sup>2</sup>, com 54,8% de arborização urbana (BRASIL, 2019) com características de mata de transição entre Mata Atlântica e Cerrado. De acordo com dados da campanha de vacinação antirrábica de 2017, a população canina estimada é de 1.200 cães, ou seja, uma razão cão/habitante de 1:3.

O município de Lavras/MG, limítrofe a Ribeirão Vermelho, começou a registrar casos de LVC no final do ano de 2013 e de LV Humana (LVH) em 2017 e está enquadrado como área de transmissão recente (BRASIL, 2016a; LAVRAS, 2019). Considerando a expansão das leishmanioses, tornou-se necessário conhecer a situação epidemiológica de Ribeirão Vermelho, sobretudo no que tange a presença dos vetores e ocorrência de casos de cães positivos. Ademais, o conhecimento da distribuição das espécies de flebotomíneos é

essencial para melhor compreender as relações epidemiológicas das leishmanioses. Por esta razão, o presente estudo teve por objetivo investigar a fauna de flebotomíneos e a presença de DNA de *Leishmania* nos vetores e fazer o levantamento de casos de LVC no município de Ribeirão Vermelho/ MG.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Leishmaniose Visceral**

A leishmaniose visceral é a forma mais grave entre o complexo de doenças que é as leishmanioses. A espécie responsável pela forma clínica visceral, no Brasil, é *Leishmania (Leishmania) infantum* Nicolle, 1908. Este protozoário tem como principal reservatório no meio urbano os cães, que podem ser assintomáticos por vários anos. A LVH é caracterizada por episódios irregulares de febre, emagrecimento exacerbado, hepatomegalia, esplenomegalia e anemia (WHO, 2019).

### **2.2 Histórico**

O primeiro relato de leishmaniose visceral, no Brasil, foi registrado em 1934, quando Penna encontrou amastigotas de *Leishmania* em cortes histológicos de fígado de pessoas que foram a óbito com suspeita de febre amarela (GONTIJO; MELO, 2004). O primeiro surto de LV ocorreu em Sobral, no Ceará, 20 anos após o primeiro relato (DEANE; DEANE, 1956). No Piauí ocorreu uma epidemia no período de 1980 a 1986, onde os principais atingidos foram menores de cinco anos e adultos com mais de 40 anos, totalizando 1509 enfermos (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990).

Noventa por cento dos casos de LV notificados na década de 90 foram em áreas rurais da Região Nordeste, porém a LV passou, nos últimos anos, por processo de transição epidemiológica, apresentando crescente incidência nas áreas urbanas (BRASIL, 2014).

A participação dos canídeos na epidemiologia da LV foi mencionada em 1908, por Nicolle & Comte, que demonstraram o parasito na pele de cães infectados (ALVES, 2006). Em 1914, Laveran e Franchini realizaram a infecção experimental de 25 cães com *L. infantum* e descreveu o encontro de parasitos na pele e outros órgãos destes animais.

No Brasil ao final da década de 30, em áreas de ocorrência da infecção humana, foi encontrado o parasito isolado em animais positivos e apontada a importância dos cães como fonte de infecção para os insetos vetores (DEANE; DEANE, 1955).

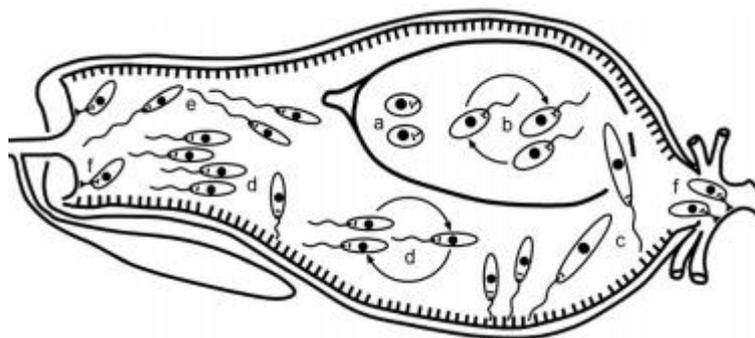
### 2.3 Agente etiológico

*Leishmania* podem ser classificadas, taxonomicamente, de acordo com a sua localização no aparelho digestivo de vetor, assim, aquelas que aderem à porção anterior e média do intestino são do subgênero *Leishmania* e aquelas que possuem uma fase de divisão que se aderem ao intestino posterior são do subgênero *Viannia* (AÑEZ; NIEVES; CAZORLA, 1889; BATES, 2007; AKHOUNDI et al., 2016; CDC, 2019). Outra classificação sugerida por Spinosa et al (2016), classifica-os por com um novo subgênero *Leishmania (Mundinia)* Shaw, Camargo & Teixeira, 2016 que é criado para o complexo *L. enriettii* que inclui *L. martiniquensis*. (SPINOSA et al., 2016)

No Brasil são encontradas as seguintes espécies que podem infectar o ser humano: *L. (Leishmania) amazonensis* Lainson e Shaw 1982; *L. (L.) infantum*; *L. (L.) guyanensis* Floch, 1954; *L. (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911, emend Matta 1913; *L. (V.) lainsoni* Silveira et al. 1987; *L. (V.) naiffi* Lainson e Shaw, 1989; *L. (V.) lindenbergi* Silveira et al. 2002; *L. (V.) panamensis* Lainson e Shaw, 1972; *L. (V.) shawi* Lainson et al. 1989 (AKHOUNDI et al., 2016; SPINOSA et al., 2016).

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório e se reproduz preferencialmente por divisão binária. As formas amastigotas, durante o repasto sanguíneo são ingeridas pelo flebotomíneo, essas formas são ovaladas com presença de um flagelo curto interiorizado, elas vão para intestino médio do abdome transformam-se em promastigotas procíclicas. Estas que são mais ativas, se replicam e se transformam em nectomonadas longas. Durante a digestão, os parasitas são cercados por matriz peritrófica (MP). Quando a MP é quebrada por enzimas dos flebotomíneos, as nectomonadas longas escapam pela abertura posterior e se ligam as microvilosidades do intestino médio. O próximo estágio são nectomonadas curtas, chamadas leptomonadas; estas se transformam em promastigotas metacíclicas, que são a forma infecciosas, ou se ligam ao revestimento de quitina da válvula estomodeal como haptomônadas. No estágio avançado de desenvolvimento, massas de nectomonadas secretam filamentos de proteofosfoglicano, obstruem o intestino médio torácico do inseto. Isso, juntamente com a destruição da válvula, facilita o refluxo de parasitas quando o flebotomíneo faz uma nova alimentação (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012) (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo biológico de parasitos do gênero *Leishmania* no inseto.



Fonte: DOSTÁLOVÁ & VOLF, 2012

Legenda: Desenvolvimento de *Leishmania* no trato digestivo do flebotomíneo. a)Amastigotas; b)Promastigotas procíclicas; c)Nectomonadas longas; d)Leptomonadas; e)Promastigotas metacíclicas; f) Haptomônadas.

As formas promastigotas metacíclicas, agora no hospedeiro vertebrado, evadem a lise mediada pelo sistema complemento e usam a interação com as moléculas deste sistema para se estabelecerem como parasitos intracelulares. Ali se transformam em amastigotas no fagolisossomos e se dividem rapidamente por fissão binária. Devido ao grande número de amastigotas ocorre o rompimento do macrófago e, assim, a disseminação do parasito. O inseto vetor, ao realizar o hematofagia no hospedeiro infectado, ingere junto com o sangue, macrófagos infectados ou amastigotas, completando o ciclo do parasito (ALEXANDER; ROSSEL, 1992; BATES, 2007; CDC, 2019).

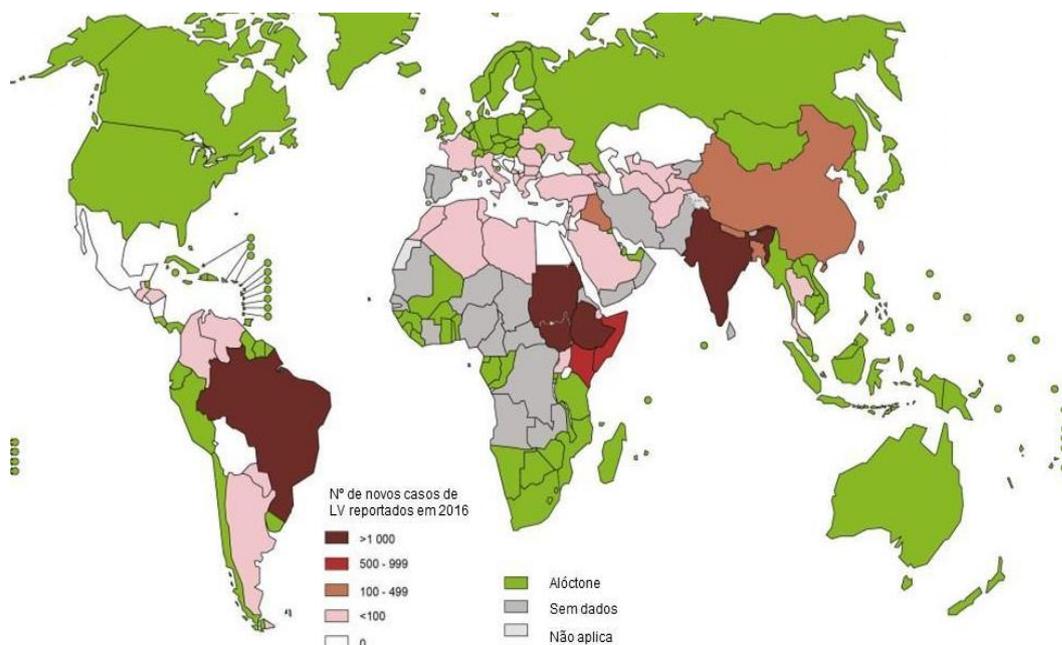
### 2.3 Epidemiologia

A epidemiologia das leishmanioses depende das características do parasito, da ecologia do local de transmissão e sua relação com os vetores e aspectos socioculturais, assim como tipo de colonização dos ambientes (WHO, 2019).

A LV é uma doença característica de regiões tropicais e subtropicais. Antes registrada majoritariamente em zonas rurais, com o passar dos anos, houve uma rápida expansão para zonas peri urbanas e urbanas, e hoje possui mais representatividade em zonas urbanas (BERN; MAGUIRE; ALVAR, 2008; BARÇANTE et al., 2015).

Em 2017 94% dos novos casos de LV do mundo ocorrem no Brasil, na África Oriental e no Sudeste Asiático. A estimativa de novos casos por ano é de 50.000 a 90.000 casos em todo o mundo. (WHO, 2019). (Figura 2).

Figura 2 – Situação da Leishmaniose Visceral no mundo.



Fonte: OMS (2016)

No ano de 2017 foram notificados 4.103 casos de LVH no Brasil, sendo 908 na Região Sudeste, ocupa a segunda colocação com maior número de casos, ficando abaixo apenas da Região Nordeste com 1.824 casos. Em Minas Gerais foram notificados 750 casos, representando 82,6% dos casos da Região Sudeste. A letalidade para LVH no Brasil no mesmo ano foi de 8,8%. Na Região Sudeste, a letalidade foi de 11,3%. Já em Minas Gerais a letalidade chegou a 12,5%, sendo registrado 99 óbitos (BRASIL, 2019).

Um dos principais fatores de risco da LV é a presença de cães positivos, devido a importância do cão como reservatório, como já demonstrado em estudos, como o realizado em uma área endêmica para LV no Ceará (ALVES, 2006). Embora, outros animais já tenham sido descritos como portadores do protozoário e potencialmente capazes de causar a infecção do vetor, em condições experimentais, os cães preenchem as condições necessárias para serem considerados reservatórios, por serem altamente suscetíveis, por possuírem alto parasitismo cutâneo e por sua relação de proximidade com os humanos. Porém não estão

descartados outros prováveis reservatórios como roedores e marsupiais, que já demonstraram suscetibilidade a desempenhar o papel de reservatório (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; NASCIMENTO et al., 2008).

A infecção canina geralmente precede o aparecimento de casos humanos sendo ainda, mais prevalente que a doença humana. No âmbito doméstico, a maioria dos cães com sorologia reagente, no entanto, podem atuar como fonte de infecção para o inseto vetor (GONTIJO; MELO, 2004).

## 2.6 Prevenção e controle

O Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) apresenta ações voltadas ao humano, ao cão e ao vetor. As voltadas ao ser humano são ações de educação em saúde, para informar a população, o diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos. Para os cães são realizados inquéritos sorológicos, bem como as devidas medidas frente a casos positivos, seja por meio de eutanásia ou de tratamento com drogas autorizadas. Com relação aos vetores são realizados o levantamento de fauna de flebotomíneos, tendo como objetivo levantar as informações de caráter quantitativo e qualitativo sobre a ocorrência e sazonalidade dos vetores, bem como a utilização de inseticidas nos ambientes. (BRASIL, 2014).

O estudo da fauna flebotomínica tem como importância o conhecimento da ecologia dos insetos vetores, sendo fundamental para compreensão da epidemiologia das leishmanioses. Tais estudos baseiam-se, principalmente, na identificação da fauna flebotomínica em focos da doença. O conhecimento da diversidade e da riqueza de parte da entomofauna de uma região, auxiliam na determinação das principais espécies vetoras, e mesmo a elucidar a participação de espécies secundárias, na transmissão de *Leishmania* (MARCONDES; SANTOS-NETO; LOZOVEI., 2001; SARAIVA, 2008).

## 2.7 Vetores

Os flebotomíneos, popularmente conhecidos por mosquito-palha, cangalhinha, asadura, possuem grande importância para a saúde pública por serem envolvidos na transmissão

de agente etiológicos de doenças infecciosas, principalmente os do gênero *Leishmania* (BRASIL, 2014).

Os flebotomíneos estão classificados como: família Psychodidae, Tribo Phlebotomini que está dividida em 5 Subtribos: Hertigiina, Brumptomiini, Sergentomyiina, Lutzomyiina e Psychidipygiina (GALATI, 2019)

Os adultos de ambos os sexos se alimentam de soluções açucaradas como sucos vegetais, néctar de flores e frutos, por meio de sucção. As fêmeas, porém, são também hematófagas, necessitando de sangue para a maturação de seus ovários. Algumas espécies realizam apenas um repasto sanguíneo entre as posturas, mas há aquelas que o fazem diversas vezes em um ciclo de ovoposição, o que resulta em maior poder de transmissão de patógenos pelo inseto. (KILLICK-KENDRICK, 1999, OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2008)

O tamanho dos adultos há 2,5 mm, corpo densamente coberto por cerdas, com cor amarelada ou castanha e como característica de vôo em saltos durante o pouso mantêm as asas eretas sem descansar sobre o abdômen. Seus hábitos são crepusculares e se abrigam em locais úmidos e escuros como toca de animais, troncos de árvores e folhas caídas no solo (ALEXANDER et al., 1992; YOUNG; DUNCAN, 1994; KILLICK-KENDRICK, 1999)

Estudos epidemiológicos longitudinais são realizados no Brasil a fim de compreender a dinâmica das leishmanioses, bem como a distribuição das espécies de flebotomíneos (FONSECA; BERMÚDEZ; DESMOULIÈRE, 2010). Já foram descritas mais de 1.017 espécies de flebotomíneos no mundo, sendo que 528 ocorrem na região Neotropical, e no Brasil 280 espécies (Galati et al, 2017). Em Minas gerais estipula-se mais de 97 espécies (ANDRADE; DANTAS-TORRES, 2010; ANDRADE; GALATI, 2012; BARATA et al. 2012).

As espécies envolvidas na transmissão de *L. infantum* no Brasil são *Lutzomyia longipalpis* Neiva & Lutz, 1908 com distribuição geográfica ampla, *Lu. cruzi* Mangabeira, 1938, *Pintomyia fischeri* Pinto, 1926, *Migonemyia migonei* França, 1920 e há indícios de *Nyssomyia intermedia* Antunes & Coutinho, 1939 também ser uma espécie vetora (SARAIVA et al., 2010; BRASIL, 2014; MOYA et al., 2015; GUIMARÃES, 2016; GALVIS-OVALLOS et al., 2017).

O principal vetor de *L. amazonensis* é *Bichromomyia flaviscullata* (Mangabeira, 1942). Para *L. braziliensis* são *Psychodopygus wellcomei* (França, Shae & Lainson, 1971),

*Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) e *Ny. whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939). O principal vetor de *L. guyanensis* é *Ny. umbratilis* (Ward & Fraiha, 1977)(GALATI, 2019).

Estudos realizados no município de Lavras, limítrofe a Ribeirão Vermelho, já demonstraram a presença de diversas espécies de flebotomíneos, entre elas *Lu. longipalpis*, *Mi. migonei*, *Ny. whitmani*, entre outras (CASTRO, 2017; MILAGRES, 2018; BLANCO, 2019).

## 2.10 Detecção de DNA de *Leishmania* em flebotomíneos

O estudo da diversidade genética de *Leishmania* é fundamental e auxiliam na compreensão da diversidade de padrões clínicos, que as leishmanioses podem assumir, e a utilização da biotecnologia, quadro de investigação epidemiológica, diagnóstico e controle de doenças (CAVALCANTI; LORENA; GOMES, 2008). O uso da biologia molecular relacionada leishmanioses vem sendo relatada há cerca de 48 anos, com o isolamento e caracterização do DNA cinetoplástico de uma espécie de *Leishmania* (LAINSON; RANGEL, 2005).

Diversos autores vêm utilizando ferramentas moleculares considerando que podem aumentar a sensibilidade de detecção de infecção natural por parasitos do gênero *Leishmania*, a correta detecção, identificação e caracterização dos parasitos, em infecções humanas, caninas, reservatórios e também a infecção natural dos flebotomíneos (BARKER, 1989; REGÔ et al., 2015).

Metodologias como a reação em cadeia da polimerase (RCP/PCR - Polymerase Chain Reaction) que consiste em realizar ciclos repetidos de desnaturação, anelamento e extensão de uma sequência alvo juntamente com os iniciadores, visando à síntese in vitro de milhões de cópias de um determinado segmento de DNA. Para a detecção e identificação de *Leishmania* através da PCR, diversas regiões do DNA desses parasitos têm sido utilizadas como alvo, tais como: a região interglênica (q-ITS1), gene do RNA ribossômico (rRNA), o gene do mini-exon derivado de RNA e o minicírculo do kDNA (BARKER, 1989; GALAI et al., 2011).

O cinetoplasto está presente em 10.000 cópias por célula e sua sequência é conhecida na maioria das espécies de *Leishmania*. Assim, tendo como alvo para a PCR a amplificação

de fragmento de  $300 \pm 350$  pb da região intergênica de DNA de *Leishmania* (q-ITS1), tem demonstrado bons resultados, e uma boa aplicabilidade (El Tai et al., 2000).

## 2.11 Diagnóstico Canino

O Diagnóstico canino de LV pode ser realizado por técnicas sorológicas as quais se baseiam no princípio da detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* produzidos pelo hospedeiro ao ter contato com o patógeno. O Teste Rápido (TR) imunocromatográfico DPP® Bio-Manguinhos é um teste sorológico qualitativo de fácil manipulação, com resultado a dentro de 15 minutos, e é recomendado pelo MS na utilização em inquéritos sorológicos (BRASIL, 2008; COURA-VITAL et al., 2014).

MS recomenda que se faça o teste confirmatório, que é outro teste sorológico, como o “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay” (ELISA) ou o Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), que se baseia na detecção de anticorpos através do reconhecimento de antígenos íntegros de promastigotas de *Leishmania* sp. fixados em lâminas de microscopia (BRASIL, 2008).

Podem também ser realizados testes diretos, como citologia, histologia, imunohistoquímica, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), cultura e xenodiagnóstico. Os testes indiretos são mais usuais e podem ou não indicar uma infecção latente. Por outro lado, testes diretos positivos demonstram a presença de *Leishmania* ou de seu DNA indicando que o parasito estava presente no indivíduo no momento do exame (PALTRINIERI et al., 2016).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Descrever a fauna de flebotomíneos no município de Ribeirão Vermelho, Minas Gerais, e investigar a presença de DNA de *Leishmania* em flebotomíneos e cães.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- ✓ Investigar e georeferenciar os casos de caninos de leishmaniose visceral no município de Ribeirão Vermelho, Minas Gerais.
- ✓ Investigar e georeferenciar a ocorrência de flebotomíneos no município de Ribeirão Vermelho, Minas Gerais e identificar os flebotomíneos coletados.
- ✓ Verificar a presença de flebotomíneos e cães com a presença de DNA de *Leishmania* sp.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

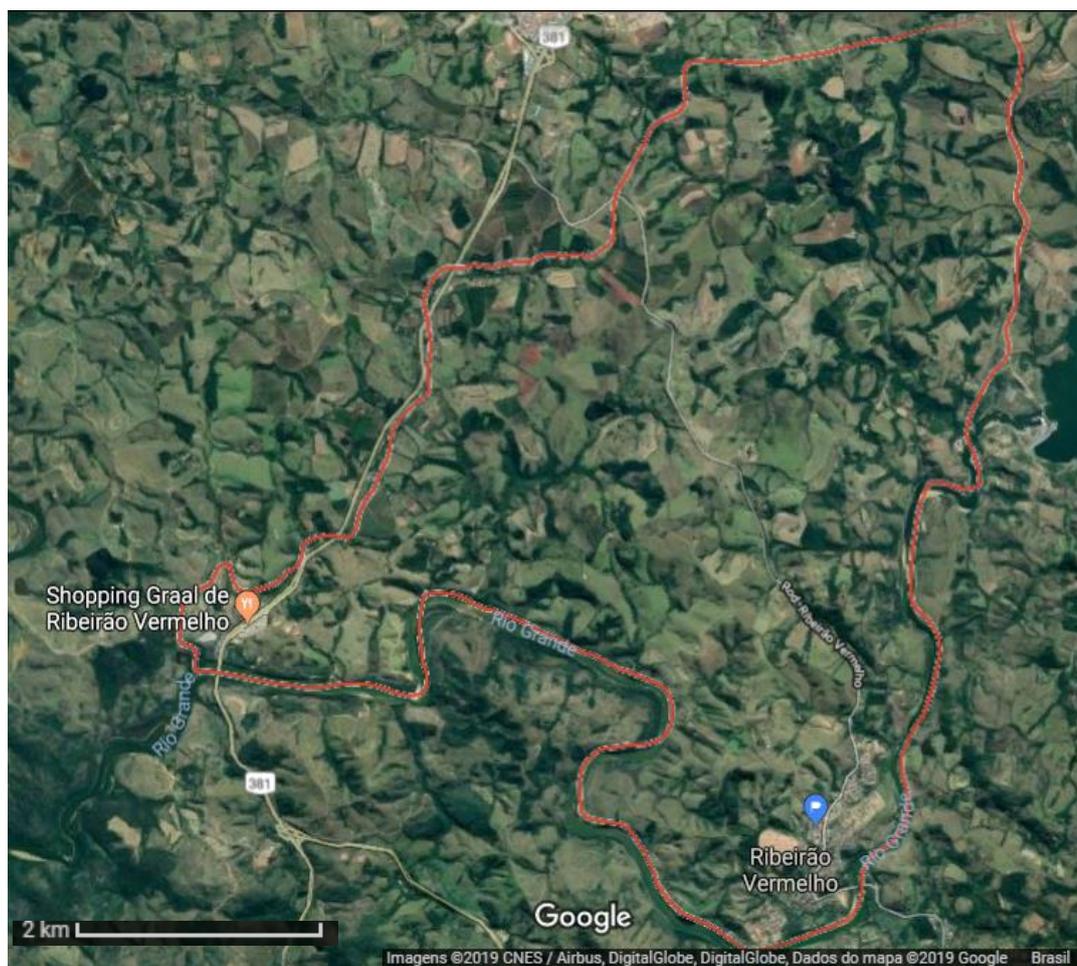
### 4.1 Comitê de Ética

O presente estudo foi realizado seguindo todos os preceitos éticos preconizados na legislação brasileira de animais em pesquisa científica. O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras (UFLA) em 22/12/17, conforme consta no atestado nº 77/17.

### 4.2 Área de estudo

Ribeirão Vermelho é um município pertencente à Mesorregião do Campo das Vertentes e a Microrregião de Lavras, Sul de Minas Gerais, que possui população estimada pelo IBGE 2010 de 3.826 habitantes e uma extensão territorial de 49.251km<sup>2</sup> (IBGE, 2017).

Figura 3 - Mapa de Ribeirão Vermelho.



Fonte: Google (2019).

O município apresenta esgoto sanitário adequado em 95,2% de área domiciliar, ocupando o primeiro lugar comparado a outros municípios de sua microrregião, arborização em 54,8% dos domicílios urbanos em vias públicas, e 34,8% destes com urbanização adequada com presença de bueiro, calçada, pavimentação e meio-fio (IBGE, 2010).

O município conta com duas unidades de saúde do Sistema Único de Saúde, sendo um Programa da Saúde da Família (PSF), e um hospital.

A região é montanhosa e a principal bacia hidrográfica é Rio Grande. O crescimento do município, tanto populacional quanto econômico, está ligado à implantação da ferrovia na região, que possibilitou a construção de pontes, facilitando e incrementando o comércio e propiciando oportunidades de emprego. A areia é seu principal produto mineral, e a agricultura tem por base o café e o milho.

### **4.3 Identificação de casos positivos de LVC**

O presente estudo foi realizado em parceria com a Secretaria de Saúde de Ribeirão Vermelho. Para início da investigação sorológica foram realizadas duas ações de educação em saúde, para orientação e convocação da população para realização dos exames sorológicos nos cães.

A população amostral foi constituída a partir de adesão espontânea dos proprietários que levaram os animais para realização dos exames e também por aqueles que buscaram a Vigilância em Saúde do município para realização dos exames fora das ações de educação em saúde.

#### **4.3.1 Testes sorológicos**

Para investigação sorológica canina, foi realizado os protocolos preconizados pelo Ministério da Saúde, que consiste no teste rápido DPP® Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos (Dual Path Platform), que é um ensaio imunocromatográfico de caráter qualitativo para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* e que utiliza a proteína recombinante K28 (fragmentos k26, k39 e k9) como antígeno. O teste a campo foi realizado por agentes de endemias do município de Ribeirão Vermelho. Os animais foram contidos utilizando focinheira. Em seguida, foi realizada uma punção com lanceta estéril para coleta de uma gota

de sangue capilar total. A realização do teste seguiu o preconizado pelo fabricante (Figura 4).

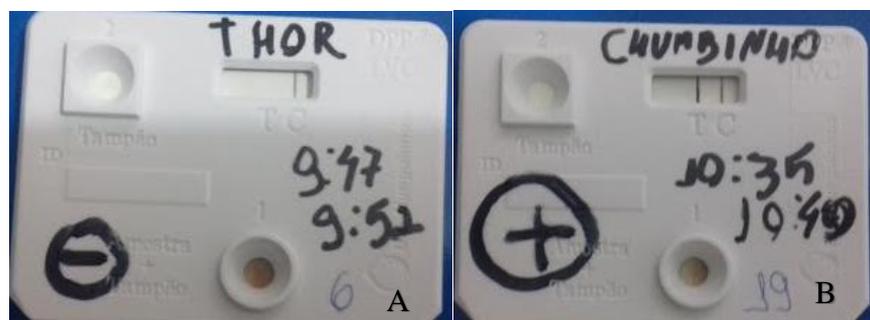
Figura 4 - Realização de DPP® Leishmaniose Visceral Canina: Bio-Manguinhos em cães de Ribeirão Vermelho/MG em ações de Educação em Saúde.



Legenda: A- contenção de animal para retirada de sangue para realização de teste de triagem. Fonte: Alvarenga, 2017

Os animais negativos no DPP® LVC - Bio-Manguinhos foram liberados logo após coleta de dados dos proprietários. Os animais cujos exames apresentaram padrão de positividade (Figura 5) foram puncionados para coleta de cinco (5) ml de sangue venoso. O material coletado foi encaminhado para realização do teste de ELISA.

Figura 5 - Teste DPP® LVC - Bio-Manguinhos.



Legenda. A- Teste com resultado negativo. B- Teste com resultado positivo. Fonte: Alvarenga, 2017

### 4.3.2 Testes Direto

Para os cães que foram positivos nos testes sorológicos, e que os proprietários entregaram para o serviço de saúde, foi realizada a eutanásia, e coletado material biológico sendo medula óssea, fígado, baço e linfonodo no setor de patologia, durante o procedimento de necropsia do animal. O material biológico foi acondicionado em tampão de extrassão e congelado. Também foram coletadas amostras da conjuntival com “*swab*”.

Foram feitos quatro esfregaços em lâmina de microscopia com o aspirado da medula óssea dos cães. Após secagem do esfregaço, as lâminas foram coradas pelo corante hematológico Panótico Rápido® (Laborclin, Brasil) seguindo o procedimento descrito pelo fabricante. Foram observados no mínimo 200 campos em microscópio óptico na objetiva de imersão para observação de formas amastigota de *Leishmania*.

### 4.3.3. Extração de DNA

As extrações de DNA das amostras biológicas foram realizadas segundo os procedimentos descritos no manual do Kit Genomic DNA from tissue, NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Alemanha) com modificações apenas na fase da eluição do DNA, onde foram adicionados 50µL de água ultrapura ao microtubo, ao invés de 100µL de solução de Tampão BE proveniente do Kit, e o tempo de incubação em temperatura ambiente foi alterado para 10 minutos. Para a extração de DNA do “*swab*” conjuntival foi utilizado o kit DNeasy Blood & Tissue® (QIAGEN, Alemanha) com modificações no procedimento descrito pelo manual, conforme a seguir:

- O algodão do “*swab*” foi removido com lâmina de bisturi estéril e transferido para o microtubo de 1,5 ml livre de DNase; foram adicionados 300 µL de tampão ATL, misturado com auxílio do aparelho de vortex em pulsos de 5 segundos;

- Foram adicionados 33 µL de proteinase K e misturados em pulsos de 10 s; os microtubos foram incubados a 56°C por 16 horas;

- O algodão foi removido e os tubos foram misturados em pulsos de 15 s; foram adicionados 334 µL do tampão AL e misturados em vortex com pulsos de 10 s;

Os demais passos foram seguidos conforme as instruções do fabricante, exceto pelo tempo de incubação dos microtubos à temperatura ambiente antes da última centrifugação que foi alterado para 10 minutos.

Após a extração do DNA das amostras de medula óssea e de “swab”, o DNA foi dosado em espectrofotômetro nas razões 260/280 nm e 260/230 nm.

### 4.3.3 PCR convencional

Cada amostra teve seu DNA ajustado para uma dosagem de 20 a 100 nanogramas/ $\mu$ L. As reações de PCR foram preparadas em uma estação de trabalho após uso de luz ultravioleta. As reações foram preparadas segundo o protocolo adaptado de Lachaud et al. (2002), sendo que em cada microtubo foram adicionados 4  $\mu$ L de 5X GoTaq, 0,4  $\mu$ L de dNTP 10mM, 0,25  $\mu$ L de Taq (5U/ $\mu$ l), 1  $\mu$ L de cada primer a 10 $\mu$ M e 11,75  $\mu$ L de uma mistura de água ultrapura e DNA da amostra, que continha de 20 a 100 ng de DNA (LACHAUD et. al, 2002). Para a PCR foram utilizados iniciadores específicos para subgênero *Leishmania* que têm como alvo o DNA do cinetoplasto de minicírculo (kDNA).

Tabela 1 - Iniciadores usados nas reações de PCR com suas respectivas sequências e tamanhos de produtos amplificados.

ALVO	PRIMER	SEQUENCIA	TAMANHO DO AMPLICON (PARES DE BASE)
Subgênero	kDNA, Leish, F	5'CGTGGGGGAGGGGCGTTCT 3'	135
<i>Leishmania</i>	kDNA, Leish, R	5' CCGAAGCAGCCGCCCTATT 3'	

Fonte: Adaptado de Cardoso et al., 2019

Os microtubos foram colocados em termociclador automático com as seguintes condições de ciclo térmico: desnaturação inicial a 94 ° C durante 5 minutos; seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 59°C por 30s e extensão a 72°C por 30s; em seguida extensão final a 72°C durante 7 minutos.

As amostras foram submetidas à eletroforese em um gel de agarose 2% corados com brometo de etídio (0,5 $\mu$ g/mL), utilizando um padrão de peso molecular de 100 pares de base, e o gel foi visualizado à luz ultravioleta, utilizando o Image Quant LAS4000 (GE Healthcare

Life Science). Foi utilizado como controle positivo o DNA extraído de formas promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e água ultrapura como controle negativo.

#### 4.3.4 Identificação de espécie pelo polimorfismo de fragmentos de DNA (RFLP)

Para a identificação da espécie de *Leishmania*, foram selecionadas 1 das amostras positivas na PCR convencional, que obteve resultado negativo na PCR convencional em uma das amostras. Foi realizada a PCR convencional utilizando os iniciadores (LITSR:5'CTGGATCATTTTCCGATG3'e L5.8S:5'TGATACCACTTATCGC ACTT3') endereçados para o alvo ITS I (Internal Transcribed Spacer I) a 10µM. As amostras foram digeridas com a enzima "HaeIII"(10U/µL) (Promega, EUA). A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 µL contendo 1µL de "HaeIII" (10U/mL), 1,5 µL de tampão da enzima, 2,5 µL de água ultrapura e 10 µL de produto de PCR. A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas e os perfis de restrição analisados em gel de agarose 4% e comparados com os seguintes perfis de *Leishmania*: *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) (CASTRO, 2017).

#### 4.4 Coleta e Identificação dos flebotomíneos

Para as coletas de flebotomíneos foram utilizadas armadilhas luminosas tipo HP, uma tecnologia nacional adaptada da armadilha CDC (desenvolvida pelo Centers for Disease Control – EUA – CDC, 2008) e validada para captura de flebotomíneos (PUGEDO et al., 2005) (Figura 6).

Figura 6 - Armadilha luminosa tipo HP

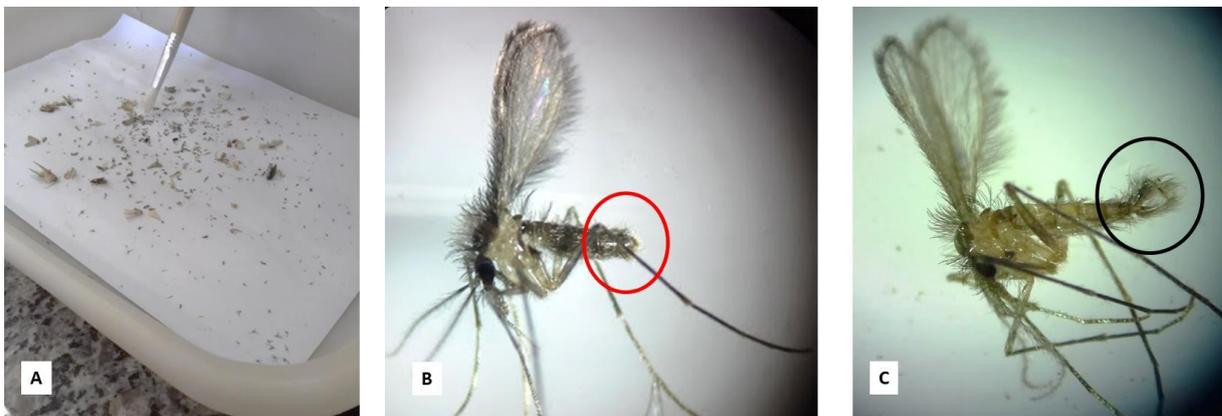


Fonte: Alvarenga, 2018



Os flebotomíneos foram colocados em placas de Petri e com auxílio de microscópio estereoscópio foram separados em machos e fêmeas com base na morfologia externa na porção final do corpo do inseto. (Figura 8).

Figura 8 - Triagem e sexagem de flebotomíneos de coletas com armadilha luminosa HP em Ribeirão Vermelho/MG.



Legenda: A- Triagem de bichos capturados em armadilhas luminosa HP. B- Fêmea de flebotomíneo. Circulo vermelho- região genitália de da Fêmea. C- Macho de flebotomíneo. Circulo preto- região da genitália do macho. Fonte: Alvarenga, 2018

Os machos foram acondicionados em microtubos de poliestireno contendo álcool 70% e armazenados para posterior preparação, montagem e identificação. As fêmeas foram submetidas à dissecação e separação da cabeça e do abdome. As partes para identificação morfológica foram armazenadas em álcool 70% e para pesquisa de DNA de *Leishmania*, foram congeladas.

#### 4.4.1 Identificação dos machos de flebotomíneos

Os espécimes machos foram imersos em solução de hidróxido de potássio a 10% (KOH) por 24h para clarificar e amolecer a quitina. Na sequência foram imersos por 20 minutos em solução de ácido acético a 10% e três passagens de 15 minutos em soluções alcoólicas em concentrações crescentes de 70%, 90% e 100% (absoluto), para desidratação. Em seguida os espécimes foram colocados entre e eugenol por 24 horas para diafanizar e montados em bálsamo do Canadá lâmina e lamínula com Eugenol, montados com a cabeça com a face dorsal voltada para cima, o tórax e o abdômen montados lateralmente, as pernas

e asas distendidas. A identificação específica dos espécimes foi realizada de acordo com o proposto por Galati (2018).

#### **4.4.2 Identificação das fêmeas de flebotomíneos**

A identificação específica das fêmeas foi realizada a partir de caracteres morfológicos das espermatecas, que estão situadas no último segmento abdominal e a cabeça. Essas partes foram destinadas para a bateria de clarificação, desidratação e diafanização, citadas no item anterior.

No momento da montagem de lâmina, a parte dorsal da cabeça foi colocada voltada para cima a fim de permitir a visualização de características taxonômicas presentes no cibário, a parte final do abdômen, a partir do 8º tergito, foi colocada com a parte ventral voltada para cima. Foram colocadas em lâmina com Eugenol e cobertas por lamínulas, deixando agir por 24h.

O abdômen da fêmea sem os últimos segmentos foi utilizado para identificação morfológica foram congeladas em freezer, para posterior realização dos métodos de extração de DNA e reações de PCR genérica para *Leishmania* (SARAIVA, 2008).

#### **4.5 Avaliação da presença de DNA de *Leishmania* em flebotomíneos**

Um espécime por vez foi macerada em um microtubo de 1,5mL, acrescentando 50µL de NaCl (0,08 M), sacarose (0,18 M), EDTA (0,06), SDS a 0,5%, Tris-CL (0,1), pH 8,6.

Essa mistura homogênea foi colocada em banho maria a 65° durante 30 minutos e depois foi adicionado 7,1µL de acetato de potássio (8 M), passando pelo agitador e incubando por mais 30 minutos em geladeira ou gelo a 4°C.

Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 13000 e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado 100µL de álcool a 95% e em seguida realizada outra centrifugação por 10 minutos a 13000g. Após este passo, o sobrenadante foi descartado e o tubo secado invertido contra um papel absorvente. Em seguida adicionou-se 100µL de etanol 70% ao tubo já seco passando pela centrifuga a 13000 por 10 minutos, descartando o sobrenadante, deixando o tubo secar.

#### 4.5.1 PRC convencional dirigida ao ITS 1

Para PCR dirigida ao Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1), a reação foi preparada para um volume final de 20µL contendo 1µL de DNA (20nanogramas) da amostra que a ser testada, 4 µL da solução tampão GoTaq Green 5x, 2,0 µL de dNTP 2,0 mM, 1,00 µL de cada um dos primers (LITSR: 5'CTGGATCATTTTCCGATG3' e L5.8S: 5'TGATACCACTTATCGCACTT3') a 10µM, 0,25 µL de Taq DNA polimerase a 5U/ µL, 10,75 µL de H2O ultrapura (EL TAI et al., 2000).

A amplificação foi processada em aparelho termociclador automático Eppendorf® Mastercycler Gradient, utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos; seguido de 30 repetições de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. A extensão final foi a 72°C por sete minutos.

As amostras foram então submetidas à eletroforese em um gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL) um padrão de peso molecular de 100 pares de base, 20 µg de DNA extraído de formas promastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/74/PP75) como controle positivo e os reagentes da PCR como controle branco.

#### 4.6 Georreferenciamento

Foram realizadas o georreferenciamento dos domicílios com casos de leishmanioses visceral canina e das coletas de flebotomíneos dos domicílios participantes da pesquisa, utilizando aplicativo baixado gratuitamente pelo Google Play chamado GPS Essentials, em equipamento Samsung Galaxy J8, e os dados plotados para desenho dos Mapas.

A partir das coordenadas e utilizando o programa ArcGIS 10.3 foram elaborados mapas com a distribuição dos casos caninos.

#### 4.7 Análise dos dados

Os dados foram tabulados em planilhas no programa Microsoft Excel Profissional Plus (Office 2016). Foram feitas análises descritivas dos dados coletados.

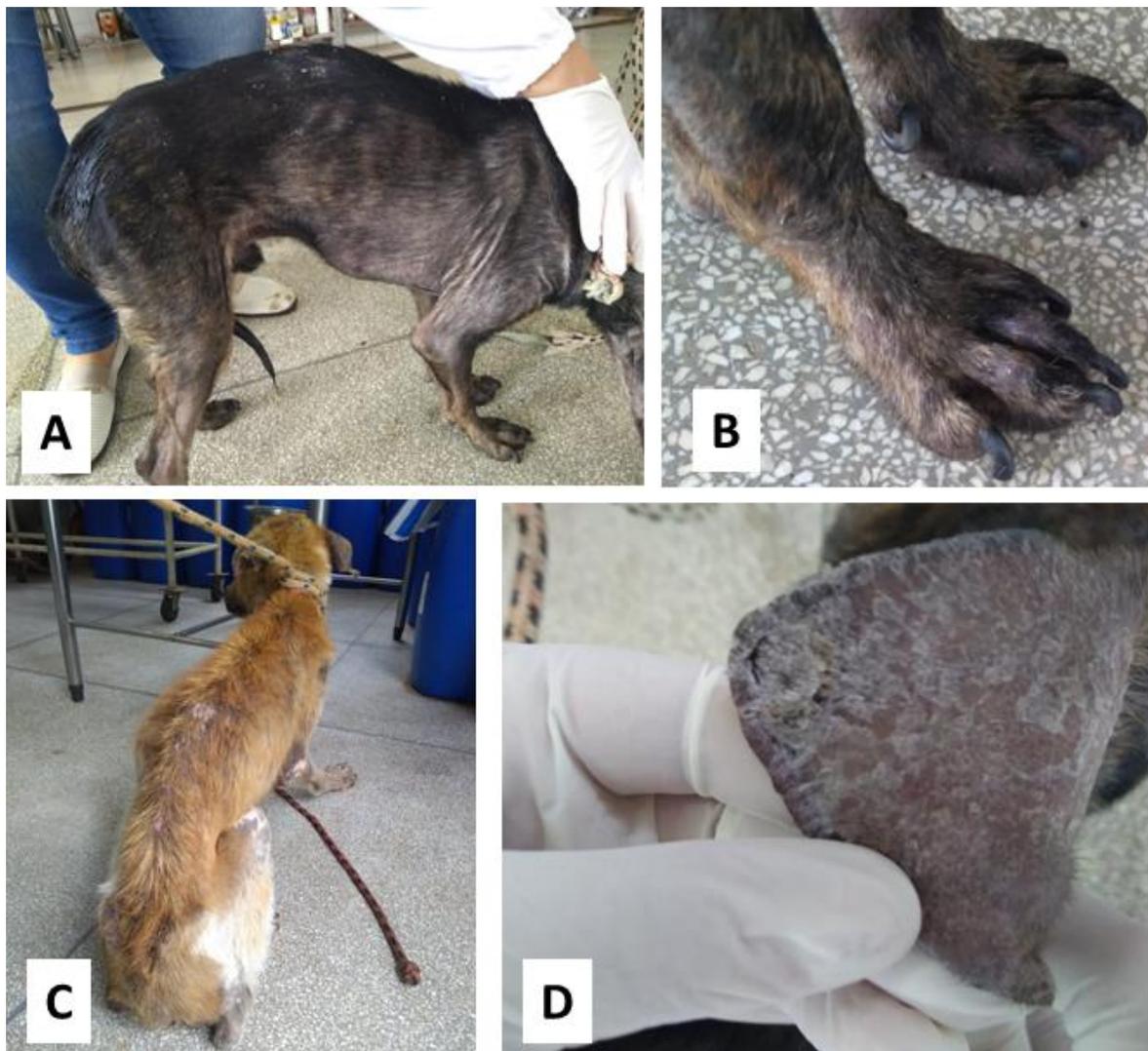


mudança do perfil epidemiológico da leishmaniose para áreas urbanas torna-se visível principalmente nas periferias onde o adensamento populacional humano e canino é alto. De acordo com os dados da Vigilância em Saúde de Ribeirão Vermelho, a partir das campanhas de vacinação antirrábica, a população de cães é estimada em aproximadamente 1200 animais, enquanto a população humana é de 3.826 habitantes. A proximidade com áreas rurais e a elevada relação cão/humano (1:3) são fatores que merecem atenção, no que tange à LV.

Dos 14 cães com duas sorologias positivas, dois foram eutanasiados. Estes apresentavam sinais clínicos de LV, como adenopatia linfoide, emagrecimento, alopecia, pelo opaco, úlceras, hiperqueratose, ceratoconjuntivite e onicogribose, nunca foram vacinados contra LVC, nem faziam uso de coleiras repelentes para flebotomíneo (Figura 10). O restante dos animais soropositivos, os proprietários não entregaram para o serviço de saúde, ou vieram a óbito. Estes não foram avaliados clinicamente.

Esses sinais clínicos corroboram observados nos cães eutanasiados, tem como lesões dermatológicas relatadas para cerca de 90% dos cães sintomáticos (FERRER et al., 1988). A hiperqueratose é ocasionada pelo aumento da produção de queratina e a alopecia tem relação com a ação que o parasito provoca no folículo piloso. Este sinal pode ainda estar associado a imunocomplexos, frequente em cães sintomáticos, que quando a queratina se deposita na membrana basal da pele induz uma reação autoimune ou ainda por distúrbios do metabolismo do ácido pantotênico (vitamina B5) devido às lesões hepáticas causadas pela infecção (HOMMEL, 1978). A alopecia expõe grandes áreas da pele do animal facilitando a transmissão (BRASIL, 2014). A linfadenopatia observada é decorrente da proliferação do parasito e destruição de células do sistema mononuclear fagocitário e corresponde a um dos sinais clínicos mais frequentes e precoces na LVC (RIBEIRO et al., 2018). Lombardo e colaboradores (2012) demonstraram a forte presença da linfadenopatia em cães com LV em um estudo com 173 cães de uma área endêmica nas províncias da Sicília.

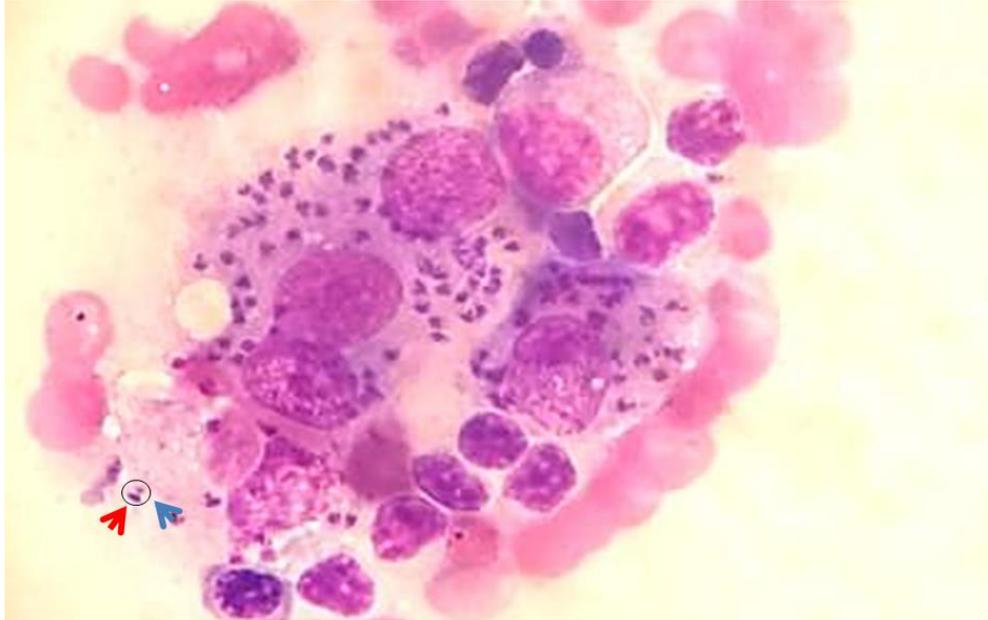
Figura 10 - Apresentação clínica de animais com leishmaniose visceral canina, procedentes do município de Ribeirão Vermelho, Minas Gerais.



Legenda: A – Emagrecimento e alopecia generalizada; B – Onicogribose; C – Emagrecimento, alopecia e áreas ulceradas; D – Hiperqueratose. Foto: Alvarenga, 2019.

Os laudos das necropsias revelaram características consistentes do quadro de LV: mucosas conjuntivais e oral moderadamente pálidas; hipotricose, opacidade e descamações cutâneas generalizadas com alopecia na face, crostas em pinas e presença de úlceras; linfonodos superficiais muito aumentados de volume, baço aumentado de volume, vermelho escuro, com cicatriz associada a esplenose em omento maior; fígado vermelho escuro, com espessamento capsular e com pequena quantidade de fibrina entre os lobos; rins discretamente pálidos; citologia de medula óssea (extremidade proximal do fêmur) revelou macrófagos com citoplasma repleto de formas amastigotas de *Leishmania* sp. (Figura 11).

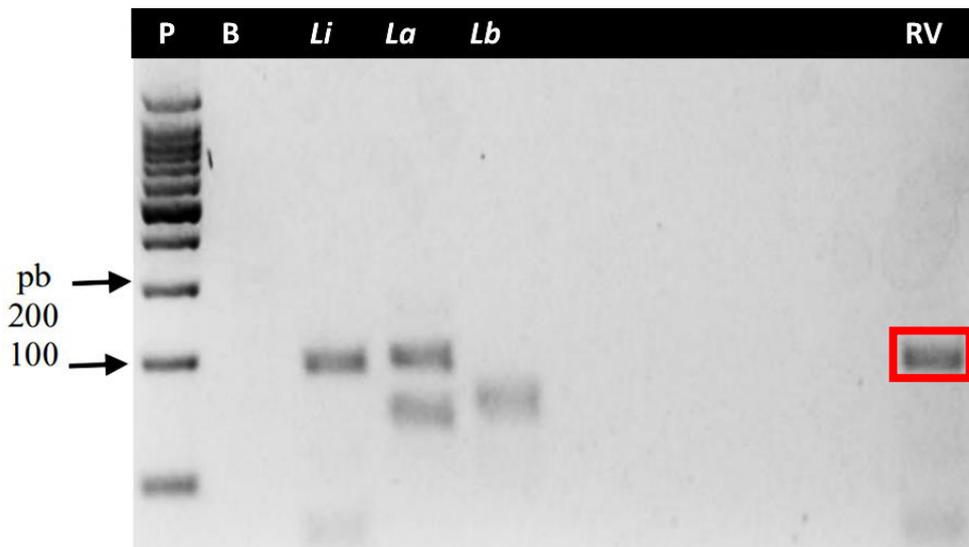
Figura 11 - Amastigotas de *Leishmania* sp. em esfregaço de medula óssea de cão.



Legenda: Esfregaço corado por Giemsa evidenciando estruturas arredondas, nucleadas compatíveis com amastigotas de *Leishmania* obtidas a partir de medula óssea de um cão com sorologia positiva para leishmaniose, procedente do município de Ribeirão Vermelho/MG. Obj 100x. Circulo preto – amastigota de *Leishmania* sp.; seta vermelha – núcleo; seta azul – cinetoplasto. Fonte: Alvarenga, 2019

De acordo com a compatibilidade do padrão de banda apresentado na análise do gel, foi possível verificar somente a espécie *L. infantum* na amostra testada (Figuras 12).

Figura 12 - Análise de RFLP de amplicons referentes à amostra de um cão procedente do município de Ribeirão Vermelho, Minas Gerais.



Legenda: B- branco; Li- *Leishmania infantum*; La- *L. amazonensis*; Lb- *L. braziliensis*; RV- Amostra de cão procedente do município de Ribeirão Vermelho. Retângulo vermelho – *L. infantum*. Fonte: Alvarenga, 2019

A identificação da espécie pelo polimorfismo de fragmentos de DNA evidenciou *L. infantum* na amostra selecionada. Embora a confirmação parasitológica seja incontestável, ela não permite a identificação específica. Neste sentido, por se tratar do primeiro registro de LVC no município de RV, a PCR-RFLP foi essencial para excluir a possibilidade de parasitismo por outras espécies do subgênero *Leishmania*, uma vez que alguns estudos relatam a possível visceralização *L. (Leishmania) amazonensis* (TOLEZANO et al., 2007).

No que tange ao percentual de 4,02% cães com sorologia duplamente positiva, identificados no presente trabalho, cabe ressaltar que este foi superior aos 2% que o Ministério da Saúde considera para investigação de uma área livre de LV (BRASIL, 2014). O Manual de Vigilância e Controle da LV direciona uma série de ações aos municípios que possuem prevalência superior a 2% dentre elas a busca ativa de cães com suspeita clínica, o desenvolvimento de atividades de educação em saúde, o treinamento de profissionais para diagnóstico precoce e tratamento, eutanásia de cães sororreagentes e vigilância e monitoramento (BRASIL, 2014). Neste sentido, os resultados do presente estudo serão fundamentais para nortear as ações de saúde do município de Ribeirão Vermelho, uma vez que, além de relatar o primeiro caso de LVC, este trabalho aponta para uma prevalência inicial de 4,02% na amostra estudada.

Ainda é importante ressaltar que os testes de triagem preconizados pelo MS fornecem dados heterogêneos, podendo apresentar falsos negativos, mesmo sendo testes considerados com alta sensibilidade. Gondim (2019) verificou baixa sensibilidade nos testes imunocromatográficos utilizados para triagem. Quando um teste de triagem apresenta valor relativamente baixo de sensibilidade, o número de resultados falso negativo se torna elevado (BASTOS; BASTOS, 2004; FRANCO; PASSOS, 2005). Neste mesmo estudo, realizado em Lavras, município contíguo a RV, Gondim verificou que mais da metade dos cães infectados sem sinais clínicos característicos da LV deixaram de ser detectados pelos testes triagem. Este fato é particularmente importante, uma vez que cães sem sinais clínicos podem apresentar elevada transmissibilidade e potencial de manutenção e disseminação do parasito (LAURENTI et al., 2013).

Em estudos realizados em Belo Horizonte, houve a confirmação de *L. infantum* em 24,7% dos cães amostrados por meio de PRC, sendo que 15,9% foram positivos na sorologia, demonstrando o quanto é importante a realização de testes mais específicos, principalmente

se tratando de uma zoonose cujos dois desfechos possíveis são a eutanásia canina (COURA-VITAL et al., 2011; BRASIL, 2014) ou o tratamento, que é uma medida de controle.

Em estudo realizado em Ipatinga/MG foi encontrada uma prevalência de 14,8% de cães positivos em pelo menos dois testes sorológicos, os mesmos usados no presente trabalho. Foram amostrados 9.139 cães, sendo 4.183 por busca ativa, e os outros 4.953 foram oriundos de pesquisa passiva. Enquanto em nosso estudo houve uma prevalência de 4,02%, com pesquisa passiva, na qual o tutor levava o cão para realizar o teste. No referido estudo, por se tratar de uma área endêmica para LV, houve um maior esforço amostral em bairros com casos positivos para LVH e LT (LANA et al., 2018).

A realização de exames mais específicos do que os testes sorológicos são importantes para confirmação dos primeiros casos em regiões indenes para LV (PALTRINIERI, 2016). No município de Iguatama/MG, a confirmação do primeiro caso canino foi feita após exames sorológicos, utilizando exames parasitológico e molecular com positividade para *L. infantum* (FARIA et al., 2017). No município de Lavras/MG, foi realizado exames sorológicos, parasitológico e molecular para confirmação do primeiro caso canino de LV no ano de 2013 (NARCISO et al., 2016), e desde então, o município deixou de ser considerado livre e passou ser considerado área de transmissão, já registrando oito casos de LVH, e dois óbitos, o que corresponde a uma taxa de letalidade 25% e uma prevalência de 6,53% de casos caninos (BLANCO, 2019).

Embora ainda não tenham sido relatados casos de LVH na área do presente estudo, os resultados aqui apresentados apontam para a necessidade de envidar esforços para realização das ações de vigilância e controle, pois é sabido que a enzootia canina precede a ocorrência de casos humanos e, de acordo com o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (MVCLV) estima-se o aparecimento dos primeiros casos humanos em que as prevalências caninas sejam iguais ou acima de 2% (BRASIL, 2014).

## **5.2 Aspectos entomológicos e ambientais**

Dos 15 pontos de coleta definidos inicialmente (Figura 7) quatro residências (4, 5, 9 e 12) por incompatibilidade dos horários dos proprietários, foram descontinuadas logo no início do estudo. Assim, foram incluídas nas presentes análises as 11 residências que tiveram pelo menos 11 meses de seguimento desde o início do estudo: 7 e 10 com 15 meses de coleta, residências 1, 6 e 14 com 14 meses de coleta; residências 2, 3, 8 e 11 com 13 meses de coleta; residências 13 e 15 com 11 meses de coleta.

Foram coletados ao todo 443 espécimes de flebotomíneos, durante o período de fevereiro de 2018 a maio de 2019, sendo 165 (37,25%) fêmeas e 278 (62,75%) machos (Tabela 1). Os espécimes foram identificados como pertencentes a 4 Subtribos: Brumptomyiina, Sergentomyiina, Lutzomyiina e Psychodopygina e 8 gêneros: *Brumptomyia*, *Micropygomyia*, *Lutzomyia*, *Migonemyia*, *Pintomyia*, *Expapillata*, *Evandromyia*, *Psathyromyia* e *Nyssomyia*; e 14 espécies (Tabela 1).

Tabela 2 - Espécies de flebotomíneos coletados no município de Ribeirão Vermelho/MG, durante o período de fevereiro de 2018 a maio de 2019.

Gênero/Espécie	Números absolutos (%)		
	Fêmeas	Machos	Total
<i>Brumptomyia brumpti</i>	0(0,00)	15 (5,39)	15(3,39)
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	0(0,00)	1(0,36)	1(0,22)
<i>Brumptomyia</i> spp.	8(4,85)	1(0,36)	9(2,03)
<i>Evandromyia cortelezzi</i>	15(9,09)	2(0,72)	17(4,84)
<i>Expapillata firmatoi</i>	30(18,18)	0(0,00)	30(6,77)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	75(45,45)	252(94,65)	327(73,81)
<i>Micropygomyia</i> sp.	1(0,61)	0(0,00)	1(0,22)
<i>Migonemyia migonei</i>	6(3,63)	0(0,00)	6(1,35)
<i>Nyssomyia intermedia</i>	23(13,94)	0(0,00)	23(5,19)
<i>Nyssomyia neivai</i>	1(0,61)	3(1,08)	4(0,90)
<i>Nyssomyia whitmani</i>	2(1,21)	2(0,72)	4(0,90)
<i>Pintomyia fischeri</i>	2(1,21)	2(0,72)	4(0,90)
<i>Psathyromyia lanei</i>	1(0,61)	0(0,00)	1(0,22)
<i>Psathyromyia pascalei</i>	1(0,61)	0(0,00)	1(0,22)
<b>Total</b>	<b>165</b>	<b>278</b>	<b>443</b>

Fonte: Alvarenga, 2019

As espécies mais abundantes foram *Lu. longipalpis* (73,81%) seguida de *Expanpillata firmatoi* Barretto, Martins & Pellegrino, 1956 (6,77%) e *Nyssomyia neivai* (5,19%) (Tabela 2).

Estudos realizados em outras regiões de Minas Gerais também verificaram resultados semelhantes. Em Divinópolis/MG, que tem como vegetação predominante o Cerrado, foi realizado um levantamento de fauna flebotomínica durante 12 meses, houve a identificação de 16 espécies com coletas em zonas urbanas e zonas de mata, onde 7 espécies são as mesmas encontrado no presente estudo, sendo estas: *Br. brumpti*, *Ev. cortelezzi*, *Ny. neivai*, *Ny intermedia*, *Ny. whitmani*, *Mg migonei* e *Lu. longipalpis*, sendo esta última a de maior abundância, corroborando com o presente trabalho (NASCIMENTO et al., 2013).

No estudo realizado em Barra do Guaicuí, distrito de Várzea da Palma/MG, contendo área urbana, de transição e de mata, houve um achado de 15 espécies, e apenas 4 ocorreram também no presente estudo, sendo elas *Ny. intermedia*, *Ny. neivai*, *Ny. whitmani* e *Lu. longipalpis*, sendo a primeira com maior abundância (SANGUINETTE et al., 2015).

No trabalho realizado no município de Ipatinga/MG, com 12 meses de coleta foram coletadas 17 espécies, sendo as predominantes *Lu. longipalpis* (61,9%) e *Ev. cortelezzii* (21,8%). Seis das espécies encontradas no presente trabalho também foram encontradas em Ipatinga/MG, sendo elas *Br. nitzulescui* Marcosdes, 2007, *Ev. cortelezzii*, *Lu. longipalpis*, *Ny. whitmani*, *Ny. intermedia* e *Pi. fischeri* (LANA et al., 2018)

No presente estudo, foram identificadas espécies que desempenham papel importante como vetores de *L. infantum*, sendo a principal delas *Lu. longipalpis*, encontrada em maior abundância. Essa espécie tem uma relação bem definida como principal espécie transmissora nas Américas, principalmente por sua adaptabilidade (MARGONARI et al, 2006). Neste sentido, o fato de *Lu. longipalpis* corresponder a 73,81% dos espécimes de flebotomíneos encontrados na região de estudo, em residências com cães comprovadamente positivos para infecção por *L. infantum* é um dado que merece particular atenção das autoridades sanitárias do município. É importante ressaltar, que em Lavras, a ocorrência de *Lu. longipalpis* já foi relatada (BARCANTE et al., 2015). Em outro estudo realizado em Lavras, utilizando a mesma metodologia aqui descrita, foram capturados, ao longo de cinco anos, 136 flebotomíneos, sendo que destes, 43% eram pertencentes à espécie *Lu. longipalpis* (BLANCO, 2019). Das 14 espécies reportadas para o município de Lavras (CASTRO, 2017; NARCISIO, 2016; BARCANTE et al., 2018; BLANCO, 2019), cinco desta também foram recuperadas no presente estudo: *Evandromyia cortelezzi* Brèthes, 1923, *Lu. longipalpis*, *M. migonei*, *Ny. whitmani* e *Pi. fischeri*.

*Lutzomyia longipalpis* é um inseto que possui a habilidade de ocupar diversos nichos ecológicos, incluindo aqueles resultantes de ação antrópica (YOUNG; DUNCAN, 1994; MARGONARI et al, 2006). Apresenta ampla distribuição geográfica, estando presente desde o Sul do México até o Norte da Argentina e Paraguai, com ocorrência coincidente a presença de LV nessas regiões. Embora seja considerada a principal espécie transmissora de *L. infantum* nas Américas, em algumas regiões têm se verificado a ocorrência de casos humanos e cães positivos em áreas sem a presença de *Lu. longipalpis*, como é o caso de Jaciara, Estado de Mato Grosso, onde a espécie *Lu. cruzi* parece ser a responsável pelo ciclo

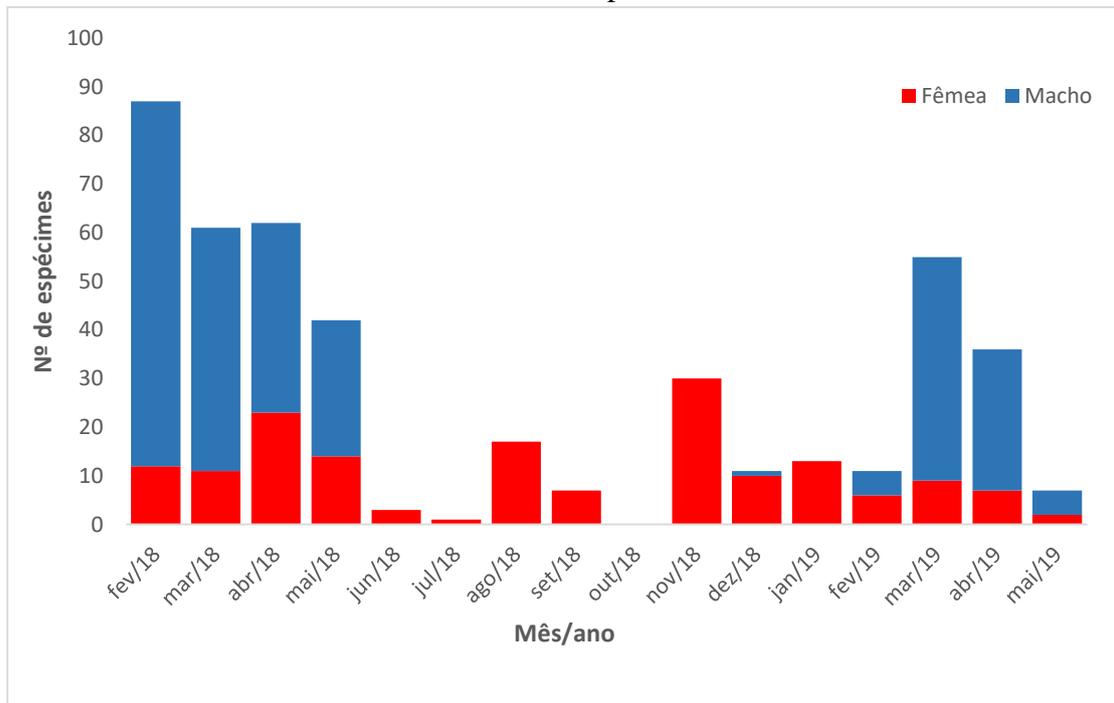
de transmissão (MISSAWA et al., 2011) e em Corumbá, Mato grosso do Sul, onde *Lu. cruzi* foi apontada como vetor de *L. infantum* (OLIVEIRA et al. 2017).

Além de *Lu. longipalis*, outras espécies que atuam como prováveis vetores de *L. infantum* foram encontradas no município de Ribeirão Vermelho, sendo essas: *Mg. migonei* (1,3%) e *Pi. fischeri* (0,9%). Vários autores têm discutido o papel no ciclo de transmissão de *L. infantum* de outras espécies de flebotomíneos (MOYA et al., 2015; GUIMARÃES, 2016; GALVIS-OVALLOS et al., 2017).

Com relação à sazonalidade, embora o período de 15 meses de coleta não seja suficiente para se fazer uma inferência concreta, verificou-se que, à exceção do mês de outubro de 2018, foram coletados flebotomíneos em todos meses incluídos na presente pesquisa. O maior número de espécimes coletados foi nos meses de fevereiro, março e abril de 2018 (Figura 13). Em estudo realizado em Belo Horizonte/MG, pode-se perceber uma maior abundância de *Lu. longipalpis* no intradomicílio e nos períodos mais quentes e chuvosos do ano, ou seja outubro, novembro e dezembro para aquela região (RESENDE et al., 2006).

Quanto à relação fêmea/macho, verificou-se que esta foi maior no período de junho de 2018 a fevereiro de 2019, sendo que no mês de novembro de 2018 verificou-se o maior número de fêmeas de todo o estudo (30 espécimes). Em estudos realizados em Barra do Guaiçuí, distrito de Várzea da Palma não houve diferença numérica na relação fêmea/macho (SANGUINETTE et al., 2015), enquanto no estudo realizado em Divinópolis a relação macho/fêmea foi evidente 4:1 (NASCIMENTO, 2013).

Figura 13 - Distribuição de flebotomíneos fêmeas e machos coletados em Ribeirão Vermelho/MG por mês.



Fonte: Alvarenga, 2019

Em estudo realizado por Blanco (2019), no município de Lavras, não foi verificada uma distribuição relacionada à sazonalidade, contudo, no presente trabalho verificou-se uma maior abundância de flebotomíneos nos períodos mais frios do ano.

As residências 7 e 3 foram as que apresentaram maior abundância correspondendo, respectivamente a 41,19% e 37,78% dos flebotomíneos coletados entre março/2018 a maio/2019 (Tabela 3).

Tabela 3 - Número de espécimes por espécies coletadas nas residências de março/2018 a maio/2019.

Espécies/Gênero	Residências											Total
	1	2	3	6	7	8	10	11	13	14	15	
<i>Brumptomyia brumpti</i>	0	0	2	0	11	0	0	0	0	0	0	<b>13</b>
<i>Brumptomyia nitzulescui</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>
<i>Brumptomyia</i> spp.	0	0	1	0	6	0	1	0	0	0	0	<b>8</b>
<i>Evandromyia cortelezzi</i>	1	0	7	0	8	0	1	0	1	0	0	<b>18</b>
<i>Expapillata firmatoi</i>	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	<b>30</b>
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	0	0	117	3	65	2	26	12	2	12	1	<b>240</b>
<i>Micropygomyia</i> spp.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>
<i>Migonemyia migonei</i>	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	<b>6</b>
<i>Nyssomyia intermedia</i>	0	0	3	0	14	1	3	0	0	0	0	<b>21</b>
<i>Nyssomyia neivai</i>	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	<b>4</b>
<i>Nyssomyia whitmani</i>	0	0	0	0	1	0	1	2	0	0	0	<b>4</b>
<i>Pintomyia fischeri</i>	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	<b>4</b>
<i>Psathyromyia lanei</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>1</b>
<i>Psathyromyia pascalei</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	<b>1</b>
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>133</b>	<b>3</b>	<b>145</b>	<b>6</b>	<b>32</b>	<b>15</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>1</b>	<b>352</b>

Fonte: Alvarenga, 2019

Nas duas residências foi observada a presença de árvores, plantas em vasos ou no chão, madeira acumulada, telhas, entulhos, e/ou trocos de árvores (Figuras 14), tornando-se ambientes favoráveis a presença de flebotomíneos, visto que são insetos que dependem de matéria orgânica, sombra e umidade para completarem seu ciclo. Com relação à presença de fontes de alimentação, verificou-se a presença de galinheiro e canil. Alguns estudos já demonstraram que a presença de animais domésticos e de criação são fatores de risco para o aumento da população de vetores de LV, principalmente *Lu. longipalpis* (CURI et al., 2014). Além da presença de animais domésticos, as duas casas contavam com vegetação natural nas proximidades. A casa 7 ainda apresentava um córrego no lote da residência, de maneira que o ambiente era favorável para a presença de flebotom

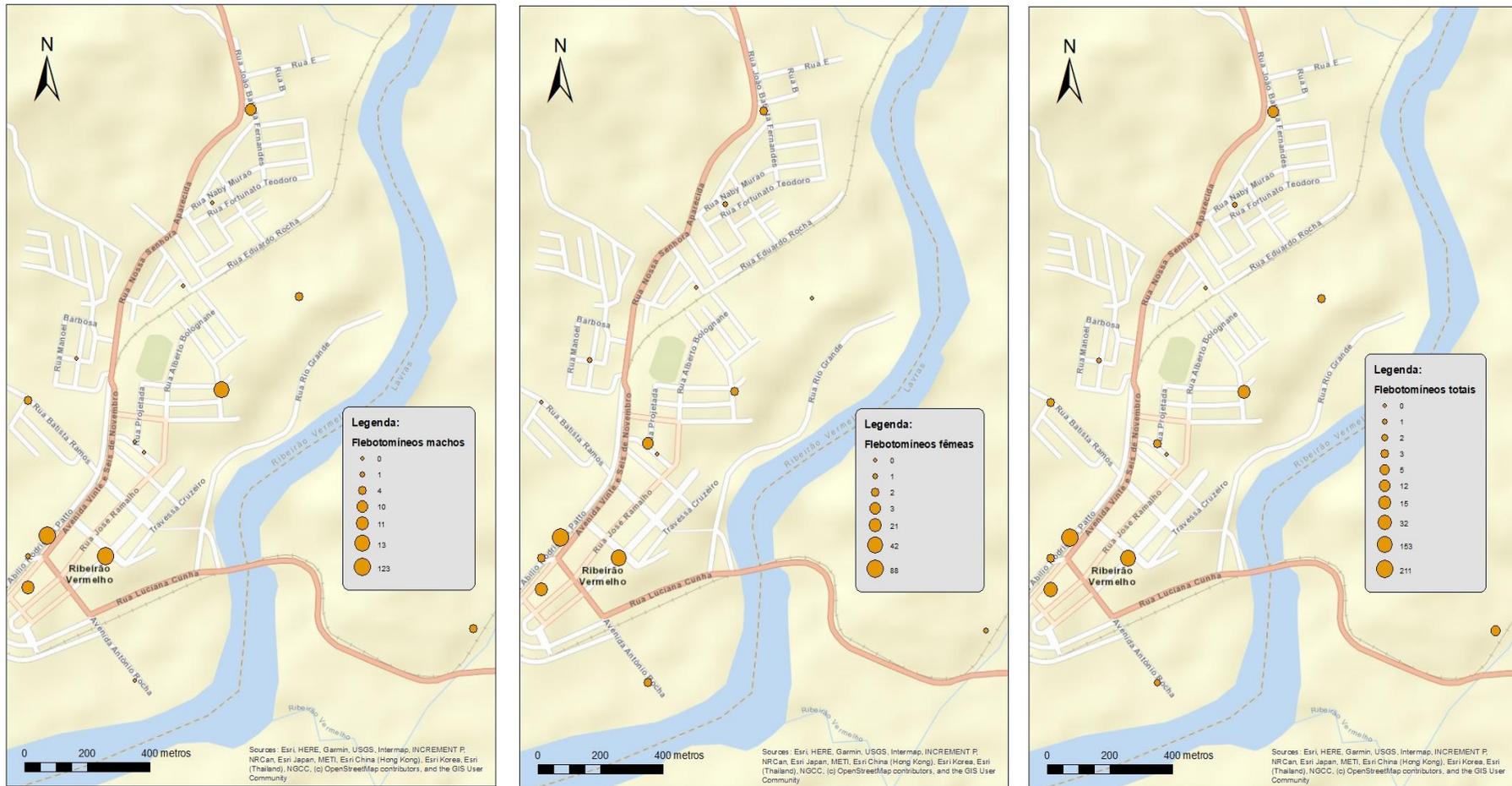
A residência com maior número de espécimes (Tabela 3) coletadas tem características de peri urbanas e zona de mata, por se tratar de uma casa com um grande terreno todo arborizado e o quintal tem a presença de uma mata, porem fica no centro da cidade. Tem a presença de galinheiro e canil. Nessa residência foram diagnosticados 2 cães com LVC, os quais permanecem no local utilizando coleiras repelentes e fazendo tratamento para os sintomas de LVC.

Figura 14 - Caracterização fotográfica das residências com maior frequência de flebotomíneos, no município de Ribeirão Vermelho, Minas Gerais, no período de fevereiro de 2018 a 2019.



Legenda: Imagens A a F – residência 3; G a I – residência 7. Fonte: Alvarenga, 2019.

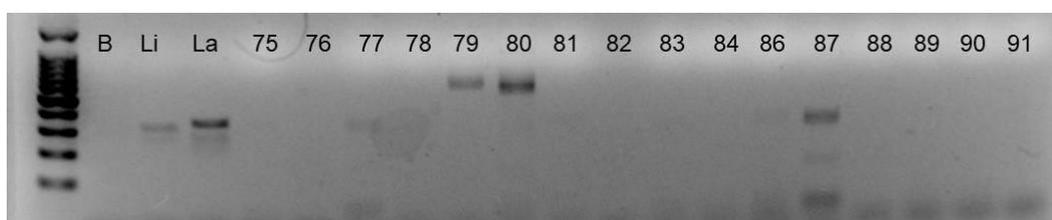
Figure 13 - Distribuição dos flebotomíneos coletados no município de Ribeirão Vermelho, Minas Gerais, no período de fevereiro de 2018 a maio de 2019.



### 5.3 Aspectos moleculares

Após análise molecular, verificou-se a presença de DNA de *Leishmania* spp. em 21 das 157 amostradas testadas, sendo estas pertencentes aos seguintes gêneros e/ou espécies *Lu. longipalpis*, *Brumptomyia* spp., *Mg. migonei*, *Ex. firmatoi*, *Ev. cortelezii* e *P. fischeri* (Figura 16). Três das espécies prováveis vetores da LV foram encontradas com o DNA de *Leishmania* sp., o que pode sugerir infecção natural.

Figura 16 - Gel de agarose 2% demonstrando as bandas de amplificação da PCR utilizando o primer kDNA *Leishmania*.



Legenda: B: branco; Li: *L. infantum*, La: *L. amazonensis*; 75-85, 86-91: Amostras de espécimes de fêmeas de flebotomíneos. 77,79,80 e 87: bandas de pares de bases reagentes na PRC

Fonte: Alvarenga, 2019

Outras espécies foram encontradas contendo DNA *Leishmania* sp., sendo essas: *Evandromyia cortelezii*, *Brumptomyia* spp. e *Ex. firmatoi*, e alguma dessas podendo estar vinculadas com a transmissão de *Leishmania* spp responsáveis pela LT, bem como *L. infantum*. Killick-Kendrick (1999) postulou algumas condições para seja considerado como vetor de *Leishmania*: (1) se alimentar em humanos e, se a doença for zoonótica, no reservatório animal; (2) suportar o desenvolvimento do parasito depois que o bolo sanguíneo infectado tiver sido digerido e expulso; (3) possuir parasitos indistinguíveis daqueles isolados de pacientes e; (4) ser capaz de transmitir o parasito pela picada. Estas condições são universalmente aceitas, logo, estudos ainda são necessários para comprovação dessas espécies como vetores de parasitos do gênero *Leishmania*.

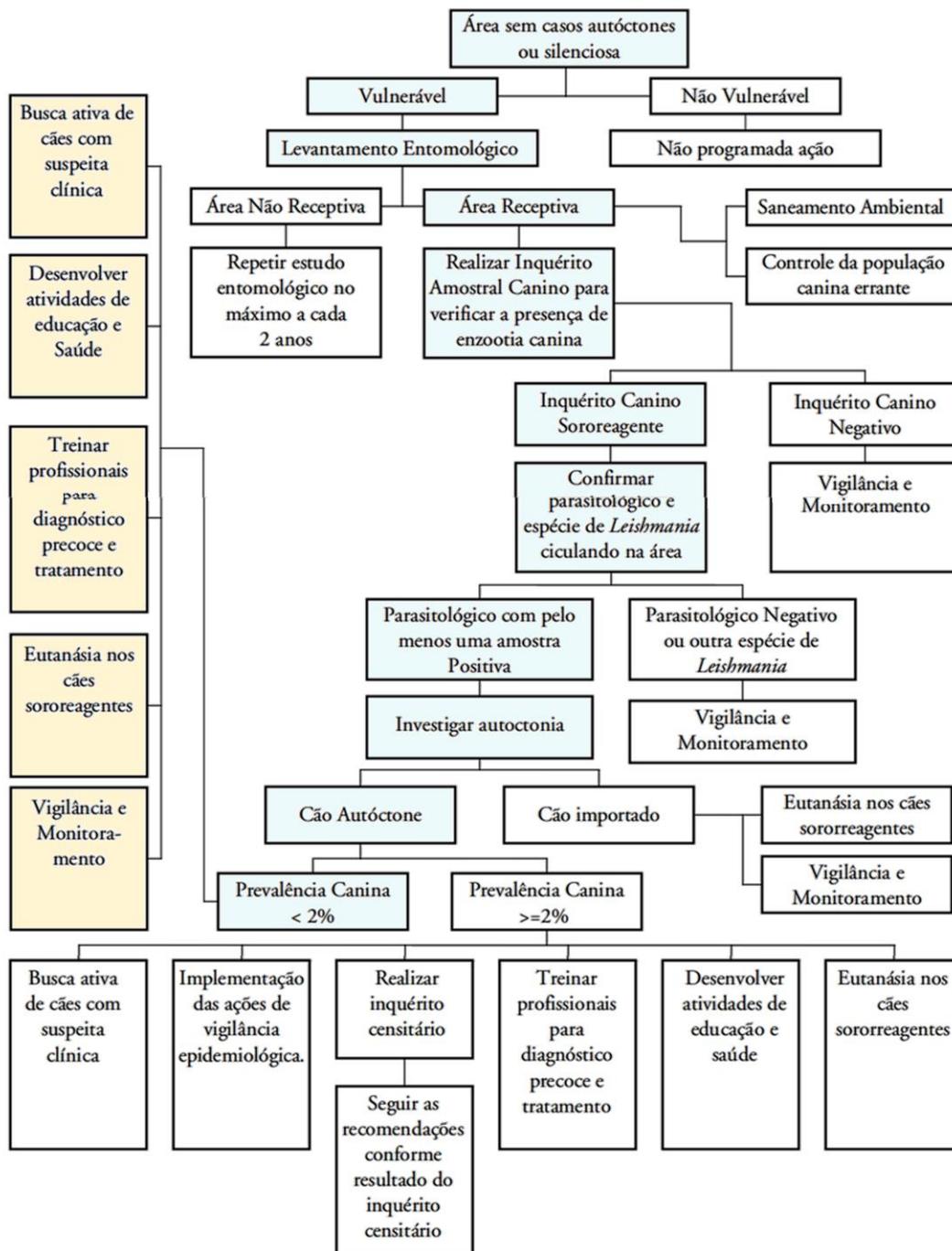
## 6. Considerações Finais

A realização deste trabalho permitiu ainda mudar a classificação epidemiológica do município de Ribeirão Vermelho, no que tange a LV, tendo este passado de área vulnerável para uma área de transmissão recente, com mais de 2% de cães positivos sorologicamente, para a qual há necessidade de implementação de uma série de ações de vigilância e controle da LV (Figura 17).

Este foi o primeiro estudo que objetivou investigar a situação da LV no município de Ribeirão Vermelho. Os dados obtidos permitiram fazer o primeiro registro de LVC no município, assim como o primeiro relato de 12 espécies de flebotomíneos na área de estudo. Ademais, os resultados demonstram a presença de DNA de *L. infantum* em espécies com reconhecida importância no ciclo de transmissão do parasito, mas também em diferentes espécies cuja importância vetorial ainda não foi reconhecida.

O monitoramento, assim como medidas de controle de flebotomíneos deve ser constante, para que possa prevenir o aparecimento de novos casos caninos, bem como casos de LV humana, que ainda não foram diagnosticados no município.

Figura 17 - Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral



Fonte: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Ministério da Saúde (BRASIL, 2014) modificado.

## CONCLUSÃO

A partir deste primeiro estudo, pode-se concluir que:

- 1) o município de Ribeirão Vermelho/MG possui casos autóctones de leishmaniose visceral canina;
- 2) pelo menos 13 espécies de flebotomíneos colonizam a área de estudo, sendo estas mais frequentes em ambientes residenciais com presença de árvores, folhas, plantas, matéria orgânica e animais domésticos;
- 3) a espécie *Lutzomyia longipalpis* é mais abundante na região de estudo;
- 4) as fêmeas de flebotomíneos capturadas na região têm se alimentando de animais infectados por parasitos do gênero *Leishmania*, uma vez que foi possível recuperar DNA do parasito nos intestinos destas;
- 5) o município de Ribeirão Vermelho é uma área de transmissão recente, no que tange à leishmaniose visceral;
- 6) é necessária a continuidade dos trabalhos a fim de identificar os determinantes epidemiológicos da leishmaniose visceral no município, assim como é necessário implementar, prementemente às medidas de vigilância e controle, preconizadas pelo Ministério da Saúde, no intuito de evitar novos casos de leishmaniose visceral canina e casos humanos da doença.

## REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALVES, W. Controle da leishmaniose visceral baseado no reservatório canino. In: CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS, 1., 2005, Brasília. Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas. **Organización Panamericana de salud**, Rio de Janeiro, p. 94-98, 2006.

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, mar. 2016.

ALEXANDER, B. et al. Ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a focus of *Leishmania* (*Viannia*) braziliensis in Northern Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 387-395, 1992.

ALEXANDER, J.; RUSSEL, D. G. The Interaction of *Leishmania* Species with Macrophages. **Advances In Parasitology**, v. 31, p. 175-254, 1992.

ANDRADE, A. J.; DANTAS-TORRES, F. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) of the State of Minas Gerais, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 39, ed. 1, p. 115-123, 2010.

ANDRADE, A. J.; GALATI, E. A. B. A New Species of *Evandromyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) From Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Medical Entomology**. v. 49, ed. 3, p. 445-450, 2012.

AÑEZ, N; NIEVES, E; CAZORLA, D. The validity of the developmental pattern in the sandfly gut for classification of *Leishmania*. **Transactions of the Royal Society or Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 634-635, 1989

BARATA, R. A.; APOLINÁRIO, E. C. Sandflies (Diptera: Psychodidae) from caves of the quartzite Espinhaço Range, Minas Gerais, Brazil. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, ed. 8, p. 1016-1020, 2012.

BARÇANTE, J. M. P. Urbanização e Leishmaniose. **Pré-Univesp.**, v. 52, p. 1-3, 2015.

BARÇANTE, T.A. et al. First report of *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) and *Pintomyia fisheri* (Pinto, 1926) in a transmission area of American cutaneous Leishmaniasis, in south of Minas Gerais State, Brazil. **J Dairy Vet Anim Res.**, v. 7, n. 3, p. 99–101, 2018.

BARÇANTE, T.A. et al. First report of the main vector of visceral *Leishmaniasis* in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz, Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in southern Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 40, n. 2, dez. 2015.

BARKER, D. C. Molecular approaches to DNA diagnosis. **Parasitology**, v. 99, p. 125-146, 1989.

BASTOS, R. R.; BASTOS, R. R. Sensibilidade e especificidade. Curso Continuo de Bioestatística e Epidemiologia. **Revista Médica Oficial do Hospital Universitário da UFJF**, v. 30, n. 1, p. 48-51, Jan-Abr, 2004.

BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p.1097-1106, 2007.

BERN, C.; MAGUIRE, J.H.; ALVAR, J. Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to *Leishmaniasis*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.2, n. 10, p. 313, 2008.

BLANCO, Y. A. C. Identification and observational epidemiological study of flebotomine fauna (diptera: psychodidae: phlebotominae) in the transmission area of canine visceral *Leishmaniasis* in the municipality of Lavras, Minas Gerais, Brazil. 2019. 49 p. **Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras**, Lavras, 2019.

BRASIL, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/ribeirao-vermelho/panorama>>. Acesso em: 20 jul. 2019.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico. CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS-MS, Brasília, set. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. **Ensaio imunoenzimático (EIE) para diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, 2008.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. **Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**, Brasília/DF, 120 p., 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**, 1. ed. atual. – Brasília : Ministério da Saúde, 2016a. 773 p. Disponível em: <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/18/Guia-LV-2016.pdf> . Acesso em: 24/02/2019.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Tegumentar (LT)**: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar>>. Acesso em: 02 fev. 2019.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Visceral**: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 02 fev. 2019.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota técnica conjunta nº 01/2011. **CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS-MS**, Brasília, 3 p., 2011.

CASTRO, J.C. et al. Investigação da fauna flebotomínica e sua infecção por *Leishmania* spp., no município de Lavras, MG, Brasil. **Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras**, p. 58., 2017.

CAVALCANTI, M. P.; LORENA, V. M. B.; GOMES, Y. M. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Revista de Patologia tropical**, v.31, n. 1, p. 1-14, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, CDC. *Leishmania* Biology. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/Leishmaniasis/biology.html#>>. Acesso em: 05 fev. 2019.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M.V. Epidemia De Leishmaniose Visceral No Estado Do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 24, p. 361-72, 1990.

COURA-VITAL, W. et al. Evaluation of changes in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new protocol for diagnosis. **Plos One**, v. 9, n. 3, mar. 2014.

CURI, N.H.A. et al. Factors Associated with the Seroprevalence of *Leishmaniasis* in Dogs Living around Atlantic Forest Fragments. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104003-1-e104003-11, 2014.

DANTAS-TORRES, F.; BRADÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 4, n. 3, p. 151-156, mai-jun. 2006.

DEANE, L. M., DEANE, M. P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **Hospital**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 1. P. 75-87, 1955.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology Microbiology & Infections Disease**, v. 27, p. 305-318, 2004.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 276, dez. 2012.

EL TAI N.O., et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) and sequencing. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 94, p. 575-579, 2000.

FARIA, M.T. et al. Autochthonous case of Canine Visceral *Leishmaniasis* in a non-endemic area in Minas Gerais, Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 37, n. 12, p. 1505-1508, dez. 2017.

FERRER, L. et al. Skinlesions in canine *Leishmaniasis*. **Journal of Small Animal Practice**, v. 29, n. 6, p. 381-388, jun. 1988.

FONSECA, F. O. R.; BERMÚDEZ, E.G.C.; DESMOULIÉRE, S. J. M. Distribuição de flebotomíneos (Diptera: Psychodidea) na amazônia legal através de técnicas de informática e geoprocessamento. **Caminhos de Geografia**, v.11, n. 36, p. 142-149, 2010.

FRANCO, L. J.; PASSOS, A. D. C. Fundamentos de Epidemiologia. 1 ed. São Paulo: **Manole, Barueri**, p.151-64, 2005.

GALAI, Y. et al. Diagnosis of Mediterranean Visceral *Leishmaniasis* by Detection of *Leishmania* Antibodies and *Leishmania* DNA in Oral Fluid Samples Collected Using an Oracol Device. **Journal Of Clinical Microbiology**, v.49, n.9, p. 3150–3153, 2011.

GALATI E. A. B. Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas. **Apostila da Disciplina Bioecologia e Identificação de Phlebotominae**. Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo. v I, 132p, 2019.

GALVIS-OVALLOS, F. et al, Canine visceral *Leishmaniasis* in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite**, v. 24, n.2, p. 10, 2017.

GIRAUD, E. et al. Quantifying *Leishmania* Metacyclic Promastigotes from Individual Sandfly Bites Reveals the Efficiency of Vector Transmission. **Communications Biology**, v.2, p. 84, 2019.

GONDIM, C. N. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral canina em uma área de transmissão recente: mais de 25% dos cães soronegativos estavam infectados. 2019. 103 p. **Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)** – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no brasil: quadro atual desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, n. 3, p. 338-349, set. 2004.

GUIMARÃES, V. C. F. V. Avaliação da susceptibilidade de *Lutzomyia migonei* (Diptera:Psychodidae) ao desenvolvimento de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*. 2016. 84 p. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife, 2016.

HOMMEL, M. The genus *Leishmania*: Biology of the parasites and clinical aspects. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, Paris, v. 76, n.1, p. 5-102, 1978.

**INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. Cidades. Ribeirão Vermelho – MG. 2017. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/ribeirao-vermelho/panorama> acessado: 10/02/2019

KILLICK-KENDRICK, R. The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. **Clinics in Dermatology**, v.17, p. 279–289, 1999.

LACHAUD, L. et al. 2002. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n.1, p. 210-215, Jan, 2002.

LAINSON, R. ; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LANA, R. S. et al. Ecoepidemiological aspects of visceral *Leishmaniasis* in an endemic area in the Steel Valley in Brazil: An ecological approach with spatial analysis. **PLOS ONE**, v. 13, n. 10, out. 2018.

LAURENTI, M. D. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 296-300, set. 2013.

LAVERAN, A.; FRANCHINI, G. Infections de Mammifères par des flagelles d'invertébrés. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 2, p. 605-612, 1914.

LAVRAS. Prefeitura Municipal. Vigilância Ambiental e Epidemiológica. **Inquéritos de Leishmaniose Visceral Canina**, 2019.

LOMBARDO, G. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 1, p. 10-17, Feb, 2012.

MARCONDES, C.B., SANTOS-NETO, L.G., LOZOVEI, A.L. Ecology of Phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in Brazilian Atlantic Forest. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 255-260, 2001.

MARGONARI, C. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 31-38, 2006.

MILAGRES, T.F. et al. *Evandromyia cortelezii* (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) in an Endemic Area of *Leishmaniasis*, Lavras, Brazil. **Ann Clin Cytol Pathol**, v. 4, n.1, p. 1098, 2018.

MISSAWA, N.A. et al. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med.**, v.44 jan-fev. 2011.

MOURÃO, M.V.A. et al. Parasite load and risk factors for poor outcome among children with visceral *Leishmaniasis*. A cohort study in Belo Horizonte, Brazil, 2010-2011. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 2, p. 147-153, mar. 2014.

MOYA, S.L. et al. First description of *Migonemyia migonei* (Franc, a) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Psychodidae: Phlebotominae) natural infected by *Leishmania infantum* in Argentina. **Acta Tropica**, v. 152, p. 181–184, 2015.

NARCISO, T.P. Investigação do estado da leishmaniose visceral canina no município de Lavras - MG. Lavras: UFLA, 2016. 43 p. **Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Lavras**, 2016.

NASCIMENTO E. L. T., et al. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Postscript: new challenges in the epidemiology of *Leishmania chagasi* infection. **Caderno de Saúde Pública**. v.24(12), p. 2964-7, 2008.

NASCIMENTO, B.W.L. Estudo de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil. 2013. 105 p. **Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou)**. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias. Universidade Federal, Belo Horizonte, 2013.

OLIVEIRA, E; F et al. Monthly Distribution of Phlebotomine Sand Flies, and Biotic and Abiotic Factors Related to Their Abundance, in an Urban Area to Which Visceral *Leishmaniasis* Is Endemic in Corumbá, Brazil. **PLoS ONE**. V. 11, n. 10, p. 155-165, 2016.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y.N. et al. Preferência alimentar sanguínea de flebotomíneos da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, n. 9, p. 2183-2186, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, Termos de Cooperação Técnica, 2019. Acesso em <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=756&Itemid=610](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=756&Itemid=610)>. Acesso em: 14 maio 2019.

PALTRINIERI, S. et al. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine *Leishmaniasis*. **Veterinary Clinical Pathology**, v.45, n.4, p. 552-78, 2016.

PEARSON, R.D.; SOUZA, A.Q. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 22, p. 1-13, jan. 1996.

PUGEDO, H., et al. HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 70–72, 2005.

REGÔ, F.D. et al. Molecular Detection of *Leishmania* in Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from a Cutaneous *Leishmaniasis* Focus at Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. **Plos One**. V.10, n.4, 2015.

RESENDE, M.C. et al. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 51-55, jan-fev. 2006

RIBEIRO, R. R. et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, v. 2018, p.1-12, mar. 2018.

SANGUINETTE, C.C. et al. Comparison of the phlebotomine (Diptera: Psychodidae) fauna of urban, transitional, and wild areas in northern Minas Gerais, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 8, n.1, p. 428, 2015.

SARAIVA, L. Estudos da fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), sua infecção natural por *Leishmania* spp. e aspectos biogeográficos da leishmaniose visceral, na regional nordeste do município de Belo Horizonte, Minas Gerais - Brasil. 2008. 172 p. **Dissertação (Mestrado em em Parasitologia, pelo Instituto de Ciências Biológicas)**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

SARAIVA, L. et al. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral *Leishmaniasis* sympatric area in Southeastern Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 1033-1039, 2010.

SHAW, J. et al. Os Flebotomíneos como Hospedeiros e Vetores de Determinadas Espécies. In: RANGEL, E.F. & LAISON, F. **Flebotomíneos do Brasil**, cap. 7, p. 337-351, 2003.

SPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 430-442, abr. 2018.

TOLEZANO, J. E. et al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral *Leishmaniasis* from Aracatuba County, São Paulo State Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.149, p. 280-284, 2007.

WORD HEALTH ORGANIZATION, WHO. Leishmaniasis. Disponível em: <<https://www.who.int/Leishmaniasis/vector/en/>>. Acesso em: 30 jan. 2019.

YOUNG, D. 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**, v. 54, p. 104-140, 1994.

ZACARIAS, D. A. et al. Causes and consequences of higher *Leishmania infantum* burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients. **Tropical Medicine and International Health**, v. 22, n. 6, p. 679-687, jun. 2017.