UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Ana Maria Sampaio Rocha

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE OURO PRETO, MINAS GERAIS, BRASIL.

Ouro Preto
2019

Ana Maria Sampaio Rocha

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE OURO PRETO, MINAS GERAIS, BRASIL.

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas, área de concentração Imunologia de Protozoários.

Orientador: Prof. Dr. George Luiz Lins Machado Coelho

Coorientador: Prof. Dr. Edelberto Santos Dias

Ouro Preto
2019

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

R672a Rocha, Ana Maria Sampaio .
Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no Município de Ouro Preto Minas Gerais Brasil. [manuscrito] / Ana Maria Sampaio Rocha. - 2019.
116 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. George Luiz Lins Machado Coelho.
Coorientador: Dr. Edelberto Santos Dias.
Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Leishmaniose visceral . 2. Leishmania . 3. Flebotomíneo. 4. Plasma sanguíneo. 5. Diagnóstico molecular. I. Coelho, George Luiz Lins Machado. II. Dias, Edelberto Santos. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.993.161

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6-1589

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE FAMILIA, SAUDE MENTAL E COLETIVA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Maria Sampaio Rocha
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE OURO PRETO, MINAS GERAIS, BRASIL.

Membros da banca

Alexandre Barbosa Reis - Doutor - Universidade Federal de Ouro Preto
Carina Margonari de Souza - Doutora - Fundação Oswaldo Cruz/ Instituto de Pesquisa René Rachou
Helida Monteiro de Andrade - Doutora - Universidade Federal de Minas Gerais
Wendel Coura Vital - Doutor - Universidade Federal de Ouro Preto

Versão final
Aprovado em 30 de outubro de 2019.

De acordo

George Luiz Lins Machado Coelho

Documento assinado eletronicamente por **George Luiz Lins Machado Coelho**, **PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 25/07/2020, às 00:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0 , informando o código verificador **0070197** e o código CRC **47AA1B08**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.005340/2020-76 SEI nº 0070197

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000
Telefone: - www.ufop.br

COLABORADORES:

Dr. João Carlos França e Silva (UFMG/MG)

Dra. Hélida Monteiro de Andrade (UFMG/MG)

Dra. Erika Michalsky Monteiro (Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ)

Danielly Marques (Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ)

INSTITUIÇÕES PARCEIRAS:

Instituto René Rachou/FIOCRUZ MINAS

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

SUPORTE FINANCEIRO:

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPEMIG - Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais

A Deus, por ser a minha fonte de coragem, mesmo quando tudo perdia o sentido, quando a caminhada se fazia pesada e quando a conquista parecia inatingível. Gratidão pelo aprendizado e pela minha evolução como ser humano.

À minha família, fonte de amor. E não tem como falar de amor, sem sentir a presença dos meus pais. Meus amados pais, Joaquim e Gracinha, vocês sempre foram o meu maior motivo, o meu alento e o meu coração. Muito obrigada pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim! Meu amor de sempre e para sempre! Este doutorado é por vocês e para vocês!

Aos meus queridos irmãos, Marcelo e Léo. Obrigada por serem fantásticos! Não sei o que seria da minha vida sem vocês. Obrigada pelo carinho, companheirismo, incentivo, torcida e amor. Sem vocês, nada disso seria possível. Vocês são o que eu tenho de mais precioso! Amo muito vocês!

Às minhas cunhadas que são como irmãs para mim. Obrigada pelo carinho, companheirismo e amizade. Vocês são muito especiais!

Aos meus sobrinhos, alegrias da minha vida! Miguel, Gabriel e Betina, obrigada por transformarem a tia Ana, na sua melhor versão. Amo muito vocês!

À família Rocha Barbosa Incalado Perri, especialmente Tia Celminha, Marcília, Cláudio, Lucas, Cacau, Juju e Taninha. Vocês são meus anjos aqui nessa terra. Nem tenho palavras para descrever o quanto vocês são importantes para mim. Obrigada por se fazerem presentes mesmo à distância e nunca me deixarem só! Muito obrigada por tudo! Este doutorado é nosso! Amo vocês!

À Regina, Ludi e Miguel por se fazerem presentes em todos os momentos da minha vida. Obrigada por todo amor, apoio e torcida! Vocês fizeram com que os momentos difíceis fossem menos doloridos e foram a minha fonte de incentivo! Amo vocês!

Ao professor Dr. George Luiz Lins Machado Coelho pela orientação, ensinamentos e amizade. Muito obrigada pela dedicação, paciência e por cada oportunidade de aprendizado! Seu profissionalismo, entusiasmo pela pesquisa e humanidade tornam-se referências e inspiram seus alunos. Gratidão por ser meu pai acadêmico! Dizem que os alunos se assemelham a seus orientadores. Ficarei muito lisonjeada, se um dia eu receber esse tipo de comparação com o meu orientador! Obrigada por tudo George!

Ao Dr. Edelberto Santos Dias pela co-orientação, disponibilidade, profissionalismo e amizade. Muito obrigada por me auxiliar em todo o estudo entomológico, por “abrir” as portas do seu laboratório e por estar sempre disponível. Sem a sua participação e orientação esse trabalho não ficaria completo. Sou muito grata por ter aprendido tanto com você e sua equipe! Obrigada por tudo Edel!

Ao Dr. João Carlos França e Silva pela disponibilidade, conhecimento, aprendizado e amizade. Obrigada por me auxiliar nas atividades de necropsia e cultivo de medula. Sou muito feliz e agradecida por ter encontrado pessoas como você na vida acadêmica. Sua leveza e alegria fizeram com que os dias de trabalho fossem mais prazerosos. Obrigada por tudo Joãozinho!

À Dra. Erika Michalsky Monteiro pelo conhecimento, experiência, profissionalismo e amizade. Obrigada por todo auxílio no estudo entomológico. Muito obrigada pela sua contribuição, aprendizado, disponibilidade e exemplo como pesquisadora. Sou muito grata por sua amizade e por ter aprendido tanto com você, Érika!

À Profa. Dra. Maria Terezinha Bahia por sua colaboração, conhecimento e amizade. Obrigada por colaborar nessa pesquisa dispondo seu laboratório, alunos, reagentes e, principalmente, toda a sua experiência como pesquisadora. Muito obrigada por todo auxílio, ensinamentos e por representar tão bem as mulheres na pesquisa! Muito obrigada por tudo, Terezinha!

À Danielly Marques por sua colaboração, paciência e amizade. Sua dedicação e conhecimento, na preparação/montagem dos flebotomíneos, foram de fundamental importância para o estudo entomológico. Muito obrigada pela sua disponibilidade, por todo auxílio, atenção e profissionalismo, Dani!

Ao Laboratório de Leishmanioses do Instituto de Pesquisa René Rachou por me oferecer todo o aparato necessário para que o estudo entomológico fosse realizado. Muito obrigada por me receberem tão bem e por me auxiliarem em tudo o que foi necessário para que esta pesquisa acontecesse. O meu obrigada a toda equipe!

À minha família/amigos do Laboratório de Epidemiologia (LEPI/UFOP), a melhor equipe de trabalho! Ter vocês comigo foi uma das partes fundamentais para a realização do meu doutorado. Aline, Keila e Maria a amizade e parceria de vocês me fizeram mais confiante. Obrigada por cada trabalho de campo, atividades de rotina do laboratório, disciplinas, amizade e conversas durante nossos cafés! Vocês são muito especiais para mim! Rafa, Maju e Luana obrigada per serem os meus melhores alunos de iniciação

científica! Sem vocês este trabalho não seria possível. Obrigada por tudo! Vivian e Cássio, obrigada pela amizade por me auxiliarem em cada pedido!

À Secretaria Municipal de Saúde de Ouro Preto, pelo apoio logístico na realização deste estudo e aos agentes de saúde por proporcionar todo auxílio na condução do inquérito canino.

Àos meus amigos e pesquisadores Karol e Álvaro por sempre estarem dispostos a ajudar. A experiência de vocês facilitou e muito o nosso trabalho de campo. Obrigada por toparem cada campo! A amizade e parceria de vocês foram fundamentais para a conclusão desse trabalho! Muito obrigada por tudo!

Às minhas queridas amigas Letícia, Paty, Bruna e Shisa. Obrigada por comemorarem comigo cada vitória e por me fazerem sorrir quando tudo perdia a graça. Foram quatro anos me apoiando, incentivando e aguentando a minha fala sobre o doutorado. Sei o quanto posso contar com vocês em tudo e por tudo. Obrigada por serem tão amigas e fantásticas!

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, pela oportunidade oferecida para a realização desse doutorado. Obrigada pela excelência no ensino, pelo conhecimento adquirido e vivenciado!

À Universidade Federal de Ouro Preto por ser a instituição que me ofereceu todo o suporte para a minha formação. Obrigada pelo ensino de qualidade, pelas vivências adquiridas, pela possibilidade de participar e apresentar meus trabalhos em congressos e por me oferecer transporte em todas as minhas atividades de campo.

À CAPES e a FAPEMIG pelo recurso concedido para execução do presente projeto.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de pós-graduação. Bolsa essa que foi muito necessária para que eu pudesse dedicar exclusivamente ao desenvolvimento das atividades relativas ao projeto de doutorado.

"Na convivência, o tempo não importa. Se for um minuto, uma hora, uma vida. O que importa é o que ficou deste minuto, desta hora, desta vida." (Mário Quintana)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ..... **x**

LISTA DE TABELAS ..... **xii**

ANEXOS ..... **xiii**

LISTA DE ABREVIATURAS ..... **xiv**

RESUMO ..... **xvi**

ABSTRACT ..... **xvii**

1. INTRODUÇÃO **2**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **5**

1.1 – As leishmanioses 5

1.2 – A leishmaniose visceral 6

1.3 – O reservatório canino 7

1.4 – O diagnóstico da LVC 8

1.5 – Estudo entomológico 11

1.6 – O município de Ouro Preto e a leishmaniose visceral 13

2. JUSTIFICATIVA **16**

3. OBJETIVOS **18**

3.1 - Objetivo geral 18

3.2 – Objetivos específicos 18

4. METODOLOGIA **20**

4.1 - Desenho do estudo 20

4.2 – Área do estudo 21

4.3 - Questões éticas e fonte de dados epidemiológicos 22

4.4- Inquérito canino 22

4.4.1- Cálculo da amostra 22

4.4.2 – Processo de amostragem 23

4.4.3 – Manuseio e contenção do cão 23

4.4.4 – Avaliação dos sinais clínicos dos animais 24

4.4.5 – Obtenção e acondicionamento das amostras biológicas 24

4.4.6 - Diagnóstico sorológico e critério de positividade 25

4.4.7 – Eutanásia/Necropsia dos cães sororeagentes 26

4.4.8 – Exame direto por aposição dos tecidos 27

4.4.9 - Diagnóstico molecular para LVC (método de comparação-Padrão Ouro) 27

4.5 – Levantamento entomológico 29

4.5.1 – Pontos de captura 29

4.5.2 – Captura dos flebotomíneos 29

4.5.3 – Detecção da infecção natural de flebotomíneos por Leishmania spp. 30

4.5.4 – Registro de dados climáticos e pluviométricos 32

4.5.5 – Processamento e análise dos dados 33

5. RESULTADOS 35

6. DISCUSSÃO 53

7. CONCLUSÕES 64

8. LIMITAÇÃO DO ESTUDO 66

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

10. ANEXOS 95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama do fluxo do diagnóstico da LVC em Ouro Preto, Minas Gerais. 18

Figura 2. Área investigada para LVC no município de Ouro Preto, Minas Gerais, ano de 2016. 19

Figura 3. Imobilização do focinho do cão para a coleta da amostra de sangue total. 22

Figura 4. Desenho esquemático da Ln-PCR destinada a amplificar um fragmento do gene SSUrRNA de *Leishmania*. 30

Figura 5. Prevalência da LVC no município de Ouro Preto conforme o método diagnóstico empregado. 39

Figura 6. Distribuição geográfica dos pontos de coleta de cães soropositivos e indeterminados, segundo a técnica do ELISA kit Bio-mangunhos e kit UFMG no município de Ouro Preto 40

Figura 7. Distribuição geográfica dos pontos de coleta de cães positivos pelo método molecular (qPCR-kDNA), no município de Ouro Preto, em 2016. 41

Figura 8. Distribuição geográfica dos pontos de coleta de cães positivos e negativos pelo método sorológico (DPP® +/ELISA +) no município de Ouro Preto, em 2016. 44

Figura 9. Fragmentos gerados pelo PCR-RFLP em gel de agarose 4,0%, tendo como objetivo a caracterização das espécies de *Leishmania* pela enzima Hae III. Pb (pares de base) PM (peso molecular -

120 pares de bases), CN (controle negativo), A^1 a A^{14} (amostras dos cães do estudo), La (*L. amazonensis*), Lb (*L. braziliensis*) e Li (*L. infantum*). As Amostras A^2, A^5 e A^6 foram identificadas como *L. infantum*. 45

Figura 10. Pontos de coleta entomológica no município de Ouro Preto, em 2017..... 46

Figura 11. Distribuição dos flebotomíneos capturados com relação à temperatura (°C) no município de Ouro Preto, Minas Gerais, no período de junho de 2017 a março de 2018 49

Figura 12. Distribuição dos flebotomíneos capturados com relação à umidade relativa do ar (%) no município de Ouro Preto, Minas Gerais, no período de junho de 2017 a março de 2018. .....,... 49

Figura 13. Distribuição dos flebotomíneos capturados com relação à precipitação (mm) no município de Ouro Preto, Minas Gerais, no período de junho de 2017 a março de 2018. 50

Figura 14: Distribuição dos flebotomíneos capturados com relação à velocidade do vento (km/h) no município de Ouro Preto, Minas Gerais, no período de junho de 2017 a março de 2018. 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos cães segundo distrito de procedência no município de Ouro Preto, Minas Gerais, ano de 2016. 33

Tabela 2. Soropositividade da LVC pelo método ELISA, conforme o fabricante, no município de Ouro Preto, Brasil, Minas Gerais, ano de 2016. 34

Tabela 3. Soropositividade conforme o método diagnóstico empregado para a descrição da frequência da LVC no município de Ouro Preto, Brasil, Minas Gerais, ano de 2016. 35

Tabela 4. Desempenho dos métodos sorológicos em comparação ao método molecular (qPCR-kDNA), na investigação da prevalência da LVC no município de Ouro Preto, Minas Gerais, ano de 2016. 36

Tabela 5. Comparação de positividade entre os grupos sorológicos e o método molecular (qPCR-kDNA) na investigação da prevalência da LVC no município de Ouro Preto, Brasil, Minas Gerais, ano de 2016. 37

Tabela 6. Percentual de positividade do diagnóstico molecular (qPCR-kDNA) em relação aos grupos sorológicos que determinam ou não a eutanásia dos cães segundo a norma técnica (Brasil 2011), no município de Ouro Preto, no ano de 2016. 42

Tabela 7. Número de flebotomíneos capturados no período de junho de 2017 a maio de 2018, de acordo com o sexo, distrito de coleta e altitude dos pontos de coleta no município de Ouro Preto, Minas Gerais. 45

Tabela 8. Espécies identificadas, sexo e número de flebotomíneos capturados no estudo entomológico realizado no município de Ouro Preto, Minas Gerais, no período de junho de 2017 a maio de 2018. 46

Tabela 9. Diversidade de flebotomíneos capturados e sua origem de captura no município de Ouro Preto, no período de junho de 2017 a maio de 2018. 47

ANEXOS

Anexo I – Aprovação do Comitê de Ética Animal (CEUA/UFOP) 113

Anexo II – Ficha de identificação do cão/amostra 114

Anexo III – Termo de consentimento livre esclarecido 115

LISTA DE ABREVIATURAS

CA – Cães assintomáticos

CEUA - Comitê de Ética Animal

CRMV – Conselho Regional de Medicina Veterinária

CS – Cães sintomáticos

CZ - Centro de zoonoses

ZC – Zona Cinza (Indeterminado)

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DPP - *Dual-Path Platform*

DPP + - *Dual-Path Platform* positivo

DPP - - *Dual-Path Platform* negativo

EDTA - Anticoagulante quelante de cálcio (ácido etilenodiamino tetra-acético)

ELISA - - Teste imunoenzimático negativo

ELISA - Teste imunoenzimático

ELISA ZC - Teste imunoenzimático positivo

ELISA+ - Teste imunoenzimático positivo

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FN – Falso Negativo

FP - Falso Positivo

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IRBP - Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein

kDNA - Ácido desoxirribonucléico do cinetoplasto

LIT - *Liver Infusion Tryptose*

LV - Leishmaniose visceral

LVC - Leishmaniose visceral canina

LVH - Leishmaniose visceral humana

PCR - Reação em cadeia da polimerase

qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

PVC-LV - Programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral

SIH - Sistema de Informações Hospitalares

SIM - Sistema de Informações sobre Mortalidade

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto

VN -Verdadeiro Negativo

VP - Verdadeiro Positivo

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias de caráter crônico, que apresentam ampla distribuição geográfica, diversidade de agentes etiológicos, podendo acometer seres humanos e animais. A Leishmaniose Visceral (LV) é a forma mais grave dessa infecção e sua transmissão vem se expandindo para as áreas urbanas. Nessa nova dinâmica de transmissão, o cão tem sido considerado o principal reservatório doméstico. Programas de controle propõem a incorporação de áreas de transmissão esporádica nas ações de vigilância, visando evitar e minimizar a propagação da doença. A proximidade com área endêmica e o não registro de investigação sistemática sobre a LV,fez com que o município de Ouro Preto fosse tratado como se essa infecção não fosse prevalente. O objetivo desse trabalho foi determinar os aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Ouro Preto, Minas Gerais. O estudo foi do tipo transversal amostral (n=726), realizado nos 13 distritos de Ouro Preto e em três localidades. A coleta das amostras caninas foi realizada no ano 2016, tendo como população-alvo os cães domiciliados participantes da campanha de vacinação antirrábica. O material avaliado destes animais foi o soro e o sangue total, coletados por punção venosa. O diagnóstico da infecção por LV foi realizado pelo método ELISA (Kit UFMG), ELISA (Kit Bio-Manguinhos), DPP® e qPCR-kDNA. O estudo entomológico ocorreu durante um ano hidrológico, correlacionando densidade vetorial aos fatores climáticos e à altitude. De modo geral, o inquérito amostral superou a frequência esperada de cães avaliados. A definição da infecção canina por LV por diferentes métodos diagnósticos permitiu observar a baixa concordância dos métodos sorológicos com o método molecular. Assumindo este como referência, o método ELISA (kit Bio-maguinhos) apresentou 37,5% e 62,2% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. O mesmo método, porém de fabricante diferente (kit-UFMG), obteve o menor resultado de sensibilidade (19,4%) e a maior especificidade (95,8%). O método imunocromatográfico DPP® também revelou comportamento similar, baixa sensibilidade (50%) e moderada especificidade (87,9%). Os valores do Kappa não ultrapassaram 36,8%. A prevalência da LVC no município de Ouro Preto, considerando a concordância dos métodos sorológicos DPP® e ELISA (Bio-manguinhos), foi de 1,93%. No entanto, considerando o diagnóstico molecular (qPCR-kDNA) a prevalência da infecção foi de 20,0%. A espécie responsável pela infecção dos cães foi a *Leishmania infantum*. A prevalência da LVC variou significativamente entre as áreas avaliadas e o principal vetor da doença, *Lutzomyia longipalpis*, foi encontrado em dois distritos do município. Dessa forma, a existência de animais infectados e de vetores é um alerta para o risco de transmissão da doença nessa região.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, *Leishmania infantum*, flebotomíneos, soroepidemiologia, diagnóstico molecular.

ABSTRACT

Leishmaniasis are a group of chronic parasitic diseases, which have wide geographical distribution, diversity of etiological agents and that can affect humans and animals. Visceral Leishmaniasis (VL) is the most severe form of this infection and its transmission has been expanding to urban areas. In this new transmission dynamics, the dog has been considered the main domestic reservoir. Control programs propose the incorporation of areas of sporadic transmission to surveillance actions, aiming at preventing and minimizing the spread of the disease. The proximity to an endemic area and the lack of systematic investigation of VL led the city of Ouro Preto to be deatt with as if this infection were not prevalent. The purpose of this study was to determine the epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Ouro Preto. The study was a cross-sectional study (n = 726), conducted in 13 districts of Ouro Preto and in three locations. The collection of canine samples was carried out in 2016, targeting the population of domiciled dogs participating in the rabies vaccination campaign. The evaluated samples from these animals was serum and whole blood, collected by venipuncture. The diagnosis of VL infection was performed by ELISA (UFMG Kit), ELISA (Bio-Manguinhos Kit), DPP® and qPCR-kDNA method. The entomological study took place during a hydrological year, correlating vector density with climatic factors and altitude. Overall, the sample survey exceeded the expected number of dogs evaluated. The definition of canine LV infection by different diagnostic methods allowed to observe the low agreement of serological methods with the molecular method. Assuming this as a reference, the ELISA method (Bio-maguinhos kit) presented 37.5% and 62.2% of sensitivity and specificity, respectively. The same method, but from a different manufacturer (kit-UFMG) obtained the lowest sensitivity result (19.4%) and the highest specificity (95.8%). The DPP® chromatographic method also revealed similar behavior, low sensitivity (50%) and moderate specificity (87.9%). Kappa values did not exceed 36.8%. The prevalence of CVL in the municipality of Ouro Preto, considering the agreement of the DPP® and ELISA (Bio-manguinhos) serological methods was 1.93%. However, considering the molecular diagnosis (qPCR-kDNA) the prevalence of infection was 20,0%. The species implicaled in dog infection was *Leishmania infantum*. The prevalence of CVL varied significantly between the evaluated areas and the main vector of the disease, *Lutzomyia longipalpis*, was found in two districts of the municipality. Thus, the existence of infected animals and vectors is a warning for the risk of disease transmission in this region.

Keywords: Visceral Leishmaniasis, serological tests, molecular diagnostics, infected dogs and *L. infantum.*

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um complexo de doenças infecto-parasitárias negligenciadas, de distribuição tropical e que apresentam poucas opções terapêuticas (WHO, 2018). São provocadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (Rossi, 1903), sendo transmitidas ao homem e a outros hospedeiros mamíferos através da picada de fêmeas de flebotomíneos. Essa é uma infecção que apresenta condições clínicas variáveis, graças a diversidade de patogenicidade e virulência das espécies de parasitos, a diversidade na densidade de vetores e graças a diversidade de resposta dos reservatórios à infecção (Young & Lawyer 1987, Ashford 1992).

A leishmaniose visceral (LV) é a forma clínica mais grave dentre as leishmanioses, sendo essa de evolução crônica, com acometimento sistêmico e com alta letalidade quando não tratada (WHO, 2018). O Brasil é o país da América Latina que mais notifica casos humanos, sendo estes já registrados em 26 dos 27 estados brasileiros (Reis et al. 2017; OPAS/OMS, 2018; Prestes-Carneiro el al., 2019). O crescente registro de casos e a expansão da doença demostram a baixa efetividade das medidas de controle realizadas no país (Palatnik-de-Sousa et al. 2001; Werneck, 2016; Zuben et al. 2016).

O evento da doença em uma área depende basicamente da presença do vetor susceptível e de um reservatório, mamífero, igualmente susceptível (Gontijo, 2014). Assim, medidas de vigilância e controle da LV segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2006) são embasadas no diagnóstico e tratamento dos casos humanos, identificação e eliminação dos reservatórios domésticos (cão doméstico), controle vetorial, educação em saúde e manejo ambiental. De acordo com as recomendações do Ministério da Saúde, as ações de vigilância não devem se restringir somente às áreas endêmicas. O monitoramento de áreas de transmissão esporádicas também deveria ser contemplado, sendo essas áreas também submetidas às medidas de prevenção, planejamento e controle. A presença de reservatório canino é um indicador do possível risco para infecção humana, sendo capaz de também trazer informações sobre as espécies de *Leishmania* spp. circulantes na região. A identificação da fauna flebotomínica permite determinar a presença de vetores potenciais e a força de infecção na região em estudo. Essas ações são indicadas para municípios em risco ou mesmo para aqueles que não apresentam registros de casos humanos de LV (Brasil, 2006).

O cão ocupa posição de destaque no ciclo da doença, tendo importância epidemiológica na transmissão urbana, sendo caracterizado como reservatório doméstico. A prevalência da LV canina geralmente precede ou até mesmo se apresenta concomitante aos casos humanos, onde um percentual maior ou igual a 2% de animais infectados direciona para a necessidade de investigação censitária como uma das medidas de controle da doença (Palatnik-de-Sousa et al. 2001; Brasil, 2006; Alves et al. 2006;

Belo et al. 2013; Socool et al. 2017). No Brasil, a LV é causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e é transmitida por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Peterson & Shaw, 2003; Romero & Boelart, 2010).

Tendo o objetivo de conter a transmissão e diminuir a morbidade e letalidade da LV, o programa de vigilância e controle (PVC-LV) determina a eliminação do reservatório canino, a detecção e tratamento de casos humanos e a identificação/combate aos vetores (Brasil, 2006). A identificação do cão infectado depende de métodos acurados, sendo sua identificação primordial para determinação das áreas com risco de transmissão (Coura-Vital et al. 2014). Entretanto, falhas dos métodos sorológicos subestimam a prevalência da infecção canina, fazendo com que animais indeterminados ou falsos negativos permaneçam na área e mantenham o ciclo de transmissão da LV (Coura-Vital et al., 2011; Grimaldi et al., 2012; Lopes et al., 2017). Atualmente, o algoritmo para diagnóstico canino para LV é o teste rápido imunocromatográfico "Dual-Path Platalform" (DPP®) utilizado como método de triagem, e o teste imunoenzimático (ELISA EIE®) como confirmatório (Brasil, 2011).

Considerando tudo o que foi mencionado anteriormente somado as características apresentadas pelo município de Ouro Preto (proximidade com área endêmica, registros esporádicos de casos humanos e a ausência de registro de investigação sistemática sobre a LV), fizeram com que a busca sobre aspectos epidemiológicos sobre a LV nessa região fosse imprescindível. Dessa forma, esse trabalho estudou os aspectos epidemiológicos da LVC no município de Ouro Preto, Minas Gerais, promovendo o conhecimento dos elos de transmissão e resultando em dados capazes de nortear as ações de saúde e a vigilância dessa zoonose.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 – As leishmanioses

Doença de elevada prevalência em regiões tropicais e subtropicais do mundo, as leishmanioses são um grupo de infecções de transmissão vetorial, de patogenicidade variada e com alterações clínicas bem distintas entre si. Segundo a OMS, são doenças negligenciadas, reemergentes e sem controle. Podem acometer pele, mucosas e vísceras, parasitando tanto o homem quanto animais. Enfermidade presente em 98 países com uma estimativa de 350 milhões de pessoas em risco. Estima-se uma incidência de 1,3 milhões anualmente, sendo que 20.000 a 30.000 pessoas venham a óbito por essa infecção (WHO, 2017).

As leishmanioses são ocasionadas pelo protozoário do gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida, família Trypanossomatíde (Ross, 1903). Este é um parasita digenético, que em mamíferos assume a forma amastigota, sendo essa capaz de multiplicar-se em células do sistema monocítico fagocitário, e em invertebrados, apresenta a forma promastigota que está presente no meio extracelular, na luz do trato digestivo (Palatnik-de-Sousa Day, 2011).

A transmissão das leishmanioses é realizada por fêmeas de dípteros hematófagos pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. A especificidade entre as espécies de *Leishmania* e o hospedeiro invertebrado é variável (Gontijo & Melo 2004).

As formas clínicas da leishmaniose nos seres humanos podem ser divididas em grupos: a leishmaniose cutânea, onde ocorre o aparecimento de ulcerações na pele; a leishmaniose cutâneo-mucosa, que promove também lesões nas mucosas do paciente; a leishmaniose cutânea difusa, que gera lesões nodulares não ulcerativas disseminadas em todo o corpo e a leishmaniose visceral (LV), sendo essa a forma mais grave, por apresentar acometimento das vísceras (baço, fígado e linfonodos), que pode evoluir para o óbito quando não tratada (Bern et al., 2008; WHO, 2017).

O Brasil é o país das Américas que mais notifica a ocorrência das leishmanioses, sendo a região Sudeste a segunda maior em registros e o estado de Minas Gerais o que mais contribui com o registro de casos na região (Brasil, 2006; Alvar et al., 2012).

Observando o padrão de transmissão das leishmanioses no Brasil, pode-se afirmar que este vem adquirido caráter urbano, periurbano, emergente e reemergente (Werneck, 2008). Essa expansão levou ao surgimento de novos focos de transmissão e reativação em áreas previamente controladas (Barata et al. 2013). A diversidade de agentes etiológicos, hospedeiros, reservatórios e vetores caracteriza a complexidade dessa zoonose com implicação na identificação de medidas mais efetivas ao cambate dessa doença (Costa, 2005; Curti, 2009). O sucesso da transmissão não depende apenas da

interação entre os elos do ciclo de vida do agente etiológico, mas é influenciado também pelas condições ambientais como aspectos climáticos, geográficos, ecológicos. Somados ao processo desordenado da ocupação humana e condições sociais, o conjunto desses elementos pode contribuir para o maior risco de infecção (Altizer et al., 2013; Campbell-Lendrum et al.; 2015, Menezes et al., 2016, Abrantes et al, 2018; Faria et al. 2019).

1.2 – A leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) é uma enfermidade sistêmica, de evolução crônica e grave, com poucas opções terapêuticas e de alta letalidade quando não tratada (WHO, 2018). O Brasil é um dos seis países com maior registro de casos humanos, o que demonstra a complexidade do controle e baixa efetividade das medidas utilizadas na contenção dessa zoonose no país (Palatnik-de-Sousa et al. 2001; Zuben et al. 2016). A partir da década de 1980, a LV perde sua característica de doença rural e sua transmissão no ambiente urbano ganha destaque (Werneck et al., 2008; Marcondes & Rossi, 2013).

Impedir a transmissão, diminuir a morbidade e letalidade são medidas defendidas pelo programa brasileiro de vigilância e controle da LV (Brasil, 2006). Esse programa institui medidas que integram a identificação/eliminação dos reservatórios domésticos, a detecção/tratamento de casos humanos e identificação/combate aos vetores. Desde então, a efetividade dessas ações de controle é questionada, pois é crescente o número de casos da doença, principalmente na área urbana (Alvar et al. 2012). Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (2017) a transmissão autóctone da LV já foi registrada em 26 estados brasileiros.

O cão ocupa posição de destaque na epidemiologia da LV, sendo caracterizado como um importante reservatório doméstico uma vez que a ocorrência de casos caninos geralmente antecede o desenvolvimento de casos humanos (Palatnik-de-Sousa et al., 2001; Margonari et al., 2006; Lopes et al., 2010; Belo et al., 2013; Socool et al., 2017). A busca de cães infectados, seja por inquérito amostral ou censitário, é uma das principais ferramentas para o conhecimento ou monitoramento da transmissão da doença.

Além da investigação do reservatório canino, o levantamento da fauna flebotomínica também faz parte do entendimento da dinâmica de transmissão da LV. Na pesquisa da fauna é possível obter informações quantitativas, qualitativas e sazonais sobre os flebotomíneos transmissores de determinada região e, assim, esclarecer os pontos da interação do parasita, vetor e reservatório.

O entendimento do padrão de transmissão da LV é uma conjunção de fatores que não estão restritos somente a investigação do reservatório doméstico e da fauna flebotomínica. No entanto, diante da

ressignificação do cão como integrante da família e da alta competência de adaptação dos flebotomíneos, em especial da espécie *Lu. longipalpis*, esses passam a ser pontos fundamentais de pesquisa em qualquer localidade (Brasil, 2006; Andrade et al. 2012). Segundo Borges et al. (2009), em estudo realizado no município de Belo Horizonte, moradores que possuem cão em suas residências têm aumento no risco de contraírem LV de 1,87 vezes, enquanto os proprietários de dois cães têm um incremento no risco de 3,36 vezes, quando comparados a pessoas que não têm estes animais. Além disso, segundo Ferreira et al. (2013) e Virgens et al. (2008) o ambiente urbano e periurbano abriga uma abundância considerável de flebotomíneos, quando comparado com a região de mata.

Diante do perfil epidemiológico apresentado, é notada a importância da investigação de áreas de transmissão esporádica ou silenciosa para casos humanos de LV. Conhecer esse perfil, antes que a endemia se instale, é uma das recomendações do PVC-LV (Brasil, 2006), além das estratégias traçadas para as áreas endêmicas da doença.

1.3 – O reservatório canino

No ciclo de transmissão zoonótico, o cão (*Canis familiares)* ocupa posição de destaque na epidemiologia da LV no Brasil, assim como em países que margeiam o mediterrâneo (Ashford, 1996; Baneth et al., 2008; WHO, 2012). Assim como na LV humana, o Brasil apresenta alto registros de casos caninos, em que a prevalência varia de 4% a 75%, dependendo da região avaliada e dos métodos de diagnóstico utilizados (Camargo-Neves et al., 2001; França-Silva et al., 2003; Michalsky et al., 2011; Dias et al., 2007; Almeida et al., 2010; Coura-Vital et al., 2011; Felipe et al., 2011; Bigeli et al., 2012; Silveira et al., 2012; Figueiredo et al. 2014; Menezes et al., 2015; Carvalho et al. 2018).

A proximidade entre homem e cão, a alta prevalência e o grande número de animais assintomáticos fazem com que a infecção canina tenha importância considerável (Marzoch, 1985; Laurenti et al., 2013). Segundo Baneth et al. (2008), cães infectados assintomáticos apresentaram cerca de 20% de parasitismo cutâneo, condição propícia para a infecção do vetor quando faz o seu repasto sanguíneo. O cão, portanto, é considerado uma importante fonte de infecção para os vetores, sendo encontrado em todos os focos da doença humana e caracterizado como o principal reservatório doméstico na cadeia de transmissão da LV (Deplazes et al., 1995; Genaro, 2000; Maia et al., 2010). A remoção dos animais infectados é uma das medidas de controle definida por vários autores (Camargos-Neves et al., 2001; Oliveira et al., 2000; França-Silva el al., 2003; Maia et al., 2008; Prado et al., 2011) e preconizada pelo PCV-LV (Brasil, 2006).

Em um estudo de intervenção realizado por Asford et al. (1998), no município de Jacobina, estado da Bahia, áreas em que ocorreu eliminação de cães soropositivos para LVC tiveram uma redução na prevalência dessa doença no cão, variando de 36% para 10%. A área controle em que os cães foram

examinados, mas onde os cães soropositivos não foram removidos, a incidência da infecção canina veio a aumentar, variando de 16% a 27%. Além disso, houve uma diminuição significativa nos casos humanos depois do início dessa intervenção, sugerindo que a eliminação de cães soropositivos pode afetar a incidência de casos da LV canina e humana. Em um estudo mais recente, realizado por Costa et al. (2018), ao avaliarem a cobertura das atividades de controle da LV em Araçatuba, São Paulo, foi reafirmado a existência da relação entre a ocorrência da LV humana e canina, mesmo que as medidas de controle empregadas não tenham apresentado uma ampla cobertura. No entanto, não existe consenso entre os estudiosos quanto à remoção do cão impedir a transmissão da LV. Sabroza et al. (1992), Cerbino et al. (2009) e Costa (2011) não observaram associação positiva entre a infecção canina e os casos de LV humana, questionando a remoção dos cães soropositivos.

Definir a infecção do cão é um dos fatores que colabora para a falta de consenso com relação ao reservatório canino e a infecção humana. Os métodos diagnósticos empregados, principalmente os métodos sorológicos adotados pelo PVC-LV não apresentam a acurácia desejável. A sororeatividade do cão não conta com métodos diagnósticos 100% sensíveis e específicos (Dye, 1996, Ferreira et al, 2007; Grimaldi et al. 2012; Quinnel et al. 2013, Werneck, 2016). Além da falha dos métodos sorológicos, a demora em retirar o cão de área é um outro motivo que colabora para a manutenção do ciclo de transmissão. Costa et al. (2011) acreditam que a transmissão da LV entre humanos deve ser melhor investigada para se determinar a real importância deste como reservatório da doença.

Frente a essas discordâncias, e por grande pressão da sociedade, seja essa de especialistas ou de defensores da causa animal, o medicamento Milteforan®, apesar de seu alto custo, foi aprovado pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e MS (Ministério da Saúde) como tratamento da LVC no Brasil (Nota Técnica Conjunta n° 001/2016 MAPA/MS). Mesmo sendo um avanço no tratamento canino, a terapia não foi recomendada como medida de saúde pública para controle da LV e, portanto, trata-se única e exclusivamente de uma escolha do proprietário do animal, sendo de caráter individual (Brasil, 2016).

1.4 – O diagnóstico da LVC

A evolução clínica da LVC está relacionada a diferenças genéticas entre as raças e indivíduos e a ativação de resposta imunológica de cada cão (Sanchez-Robert et al. 2008). Características fenotípicas do cão, tipo de habitação, presença de outros reservatórios e status imunológico podem estar associados à maior ou menor susceptibilidade e a maior exposição à infecção por LV (Palatnik-de- Sousa et al., 2001; França-Silva et al., 2003; Barboza et al., 2006; Dantas-Torres 2006).

O processo da infecção no animal não será igual aos sinais clínicos, sendo o período de incubação da doença extremamente variável de três meses a vários anos (Nelson & Couto, 2001; Brasil, 2006; Solano-Gallego, 2009). As alterações causadas pela LVC são consequência da ação direta do parasito e da deposição de imunocoplexos em vários órgãos e tecidos afetados, condição esta que pode desencadear sinais variados, desde aparentemente sadio até o grave estado terminal (Noli, 1999; Solano- Galego, 2009). Dentre os principais sinais clínicos no cão estão as lesões cutâneas, linfoadenopatia, perda de peso, anemia, afecções oculares, onicogrifose e esplenomegalia (Brasil 2006; Diouani et al., 2008).

A diversidade de sinais clínicos ou a ausência deles faz com que o diagnóstico laboratorial da LVC, seja imprescindível para a confirmação da doença. No entanto, apesar dos avanços ocorridos em busca de testes diagnósticos mais acurados, nenhum dos existentes apresenta 100% de sensibilidade e especificidade. Estes compreendem métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares.

O diagnóstico parasitológico é eleito o padrão ouro na detecção das leishmanioses. Este consiste em uma metodologia de demonstração direta em esfregaço por aposição do tecido (*imprint*) ou no cultivo do parasita. Sua especificidade é de 100%, no entanto sua sensibilidade sofre variação de acordo com o grau de parasitismo do indivíduo, tipo de amostra avaliada, tipo de coloração utilizada e leitura das lâminas pelo observador (Baneth & Aroch 2008; Laurenti, 2009; Maia & Campino, 2011). Nos cães sintomáticos, os métodos parasitológicos podem apresentar sensibilidade que variam de 73,6% a 94,7% (Saridomichelakis et al., 2005; Moreira el al., 2007). Nos cães oligossintomáticos e principalmente nos assintomáticos, a sensibilidade desses métodos vem a ser menor que 30% (Saridomichelakis et al., 2005; Gomes et al., 2008). No entanto, esse método é invasivo e necessita de conhecimento técnico, não sendo adequado na vigilância epidemiológica (Pereira et al. 2012; Kumar et al. 2012).

O diagnóstico sorológico tem vantagens significativas para o seu emprego na deteccção das leishmanioses. Esse não é invasivo, pode ser automatizado e permite a análise simultânea de grande número de amostras (Souza et al. 2013; Mendes et al. 2013). Entre os testes mais empregados estão: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o teste imunocromatográfico. Atualmente, os métodos preconizados pelo MS para a detecção da LVC são o teste imunocromatográfico DPP® como triagem e a ELISA como método confirmatório (Nota Técnica Conjunta n° 01/2011).

O diagnóstico imunológico caracteriza-se por ser feito a partir de métodos indiretos, assim chamado por não ser possível a visualização do parasito. A intensa produção de anticorpos, principalmente altos títulos de imunoglobulina G (IgG) e menor quantidade de imunoglobulina M (IgM), causada pelo parasitismo devido à expressão policlonal de linfócito B, faz com que os métodos sorológicos sejam amplamente utilizadas tanto para o diagnóstico individual da doença, quanto para aplicação em inquérito epidemiológico (Marcondes et al., 2011). Segundo Reis et al. (2006), o tipo e a concentração de

imunoglobulina variam diante do estado clínico e carga parasitária do cão infectado, sendo observado um elevado nível de linfócitos T circulantes e uma maior expressão de MHC-II em animais assintomáticos.

O teste de ELISA foi descrito em 1971 (Engvall & Perlman, 1971), sendo que em 1976, Hommel (1976) o introduziu no diagnóstico das leishmanioses. A sensibilidade e especificidade do mesmo podem variar de acordo o antígeno utilizado ou com alterações que venha a sofrer o protocolo. A sensibilidade e especificidade da técnica podem variar entre 90 e 100% e entre 71 e 100%, respectivamente (Oliveira et al., 2005; Zanette et al., 2006; Miró et al., 2008; Silva et al., 2012). Segundo Souza et al. (2013) o antígeno total, derivado do lisado de promastigotas de *Leishmania spp.*, é o mais empregado, tendo resultados falso-positivos como recorrentes.

Os testes imunocromatográficos, que utilizam como antígeno o rK39, têm sido amplamente empregados no diagnóstico de LV humana e canina. São testes de simples execução e de resultado rápido, podendo ser realizados com amostras de sangue total, de soro, plasma, ou mesmo em eluatos (Rocha et al, 2015). Além disso, é uma técnica que não necessita de todo o aparato do laboratório, podendo ser realizado em campo. A sensibilidade e especificidade dessa técnica variam entre 77 e 91,5%, e 61 a 100%, respectivamente (Reithinger et al., 2002; Zanette, 2006; Lemos et al., 2008; Lima et al., 2010).

Carvalho et al. (2018) encontraram resultados variáveis para a sensibilidade e especificidade dos métodos sorológicos (DPP® e ELISA) de acordo com o grupo de cães investigados e o método molecular do PCR-kDNA. Para o grupo de animais sintomáticos, o DPP® apresentou sensibilidade de 95,2% e o ELISA de 95,2%. Para o grupo dos cães assintomáticos essa sensibilidade foi menor, 75,7% e 65,6% respectivamente. A especificidade também apresentou variação, sintomáticos 61,15% e 55,6% e assintomáticos 92,2% e 84,1%, respectivamente para o DPP® e ELISA.

Diante das limitações que os testes sorológicos apresentam, os mesmos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não apresentam a acurácia desejada para a detecção dos cães assintomáticos, cães provenientes de áreas endêmicas ou cães que apresentem uma resposta imune predominantemente celular (Ikeda-Garcia & Feitosa, 2006; Paltrinieri et al., 2010; Carvalho et al., 2018).

Outro meio de diagnóstico são os métodos moleculares. Este é uma ferramenta sensível e específica capaz de identificar a presença do parasito até mesmo ao nível de espécie (Yıldız Zeyrek et al., 2017). Com o progresso da biologia molecular e o advento da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR - (Saiki et al., 1985), esse tipo de método diagnóstico mostrou-se bastante acurado. Rodgers et al. (1990) apresentaram resultados que confirmaram a capacidade da técnica de PCR em detectar o kDNA equivalente a um parasita e, a partir de então, esta técnica passou a ser utilizada no diagnóstico da LV (Cupollillo et al., 1994; Degrave et al., 1994). Com o passar do tempo, muitos foram às técnicas e protocolos que envolveram o PCR na detecção de *Leishmania* ou que utilizara como alvo a região do kDNA ((Michalsky et al., 2007; Quaresma et al., 2011; Reis et al., 2013; Regina-Silva et al., 2014; de

Godoy et al., 2016; Celeste et al., 2019; Cardoso et al., 2019). Segundo Mary et al. (2004) e Yıldız Zeyrek (2017), o kDNA apresenta um dos alvos ideais para a investigação das leishmanioses, permitindo um alto limeti de detecção, garantindo alta sensibilidade.

O PCR em tempo real (qPCR) é uma variação do método molecular, e que fornece uma análise quantitativa e qualitativa em seus resultados, sendo um diagnóstico de alta especificidade para *Leishmania*. A utilização dessa técnica na identificação das leishmanioses tem demonstrado resultados interessantes em investigações epidemiológicas (Silva et al., 2017; Bennai et al., 2018; Medkour et al., 2019). Além detectar o material genético e quantifica-lo, esse permite a identificação das diferentes espécies responsáveis pela infecção (Gallzzi et a., 2018). A partir da curva de "*melting"*, utilizando como alvo a região do minicírculo do kDNA, Weirather et al. (2011) avaliaram vários conjuntos de iniciadores capazes de identificar *L. infantum, L. donovani, L. braziliensis, L. major, L. tropica, L. mexicana e L. amazonensis*. Reis et al. (2013) observaram que o diagnóstico pela qPCR obteve maior capacidade de detecção da LVC, independente do estado clínico do animal.

O diagnóstico molecular quando comparado com outras técnicas, apresenta maior sensibilidade e especificidade utilizando o mesmo material biológico (Ferreira, 2007; Solano-Gallego et al., 2009). Segundo Peixoto et al. (2015), esse diagnóstico pode ser empregado como padrão ouro, podendo assim, quando necessário, substituir o diagnóstico parasitológico. Além de melhor acurácia, essa técnica permite detectar o parasita no início da infecção, ao contrário da sorologia que tem melhor atuação em estágios mais avançados da doença. No entanto, apesar dos métodos baseados em qPCR se mostrarem muito eficazes no diagnóstico das leishmanioses, ainda não existe um método padronizado (Gallzzi et al., 2018). Além disso, essa técnica não é acessível na rotina da vigilância epidemiológica, por necessitar de reagentes e equipamentos com alto custo, de laboratório com capacidade para sua realização e de correta análise dos resultados.

1.5 – Estudo entomológico

Identificar e conhecer a distribuição geográfica dos flebotomíneos é de fundamental importância para o entendimento de fatores relacionados à transmissão de algumas doenças, principalmente as leishmanioses. Fatores climáticos e ecológicos interferem nessa distribuição (Gebre-Michael et al. 2004; Lara-Silva et al., 2015; Galvis-Ovallos et al., 2017).

Os flebotomíneos, assim como outros dípteros, são insetos de metamorfose completa, que passam pelo estágio: de ovo, larva, pupa e adulto. Na fase adulta o flebotomíneo apresenta o tamanho aproximado de 2 a 4 mm, tendo o seu corpo densamente piloso, de coloração amarela ou castanha e apresentam vôo saltado, mantendo as asas eretas quando está em repouso (Aguiar & Medeiros, 2003). Seu

desenvolvimento ocorre em locais ricos em matérias orgânicas e com alto teor de umidade (Azevedo et al., 2011).

A densidade populacional dos flebotomíneos está totalmente associada a fatores abióticos e a disponibilidade de alimento, uma vez que esses interferem no ciclo evolutivo e na sua reprodução (Andrade et al., 2010; Santos Silva et al., 2017). As modificações ambientais também podem conduzir a dinâmica populacional desses vetores, pois já é conhecido que os flebotomíneos são oportunistas, apresentam hábitos alimentares ecléticos e possuem facilidade na adaptação do ambiente urbano (Saraiva et al., 2012; Santos Silva et al., 2017).

Fatores abióticos como microclima, altitude, relevo e vegetação são inerentes ao estabelecimento dos flebotomíneos (Werneck, 2008; Sherlock, 2003; Barata eta al., 2005; Menezes et a., 2015; Abrantes eta al., 2018). Sendo assim, a investigação dessas variáveis fornece informações a cerca da dinâmica de risco de cada área com relação ao vetor, retratando a plasticidade biológica de cada espécie de flebotomíneo diante dos ambientes diversos (Salomón et al. 2015). O Brasil, até o ano de 2013, registrou mais de 229 espécies de flebotomíneos, representando 25,44% do total de espécies registradas em todo o mundo (Galati, 2003; Ready, 2013).

A espécie de flebotomíneo responsável pela transmissão da LV no novo mundo é a *Lutzomyia longipalpis* (Genaro, 2002; França-Silva et al., 2005), embora a *Lutzomyia evansi* seja o vetor de importância em parte da Colômbia e Venezuela (Travi et al., 1990; Bendezu et al., 1995). No Brasil, além da *Lutzomyia longipalpis*, a espécie *Lutzomyia cruzi* também é considerada um vetor para a LV no estado do Mato Grosso (Santos et al., 1998).

O processo de urbanização é responsável por ocasionar modificações ambientais que atuam diretamente no comportamento e no habitat dos flebotomíneos. Espécies que possuem o maior poder de adaptação são capazes de ocupar novos ambientes, garantindo maior proximidade com o meio urbano (Almeida et al., 2010). A *Lutzomia longipalpis* faz parte do grupo de espécies de flebotomíneos que apresentam capacidade de se adaptar a ambientes distintos, incluindo o meio urbano. Essa é uma espécie com alto grau de sinantropia (Lainson & Rangel, 2005; Souza et al., 2004; Carvalho et al., 2008) e com ampla distribuição no território brasileiro.

A reemergencia da LV é facilitada quando não se investigam as informações acerca da vulnerabilidade de uma região. A compreensão dos elos que compõe o ciclo de transmissão ilustra o entendimento quanto à expansão da doença e torna-se capaz de dimensionar o risco para a população humana. Dessa forma, estudos ecopidemiológicos, que permitam o entendimento sobre os vetores em áreas urbanizadas, constituem um pré-requisito para o desenvolvimento de ações apropriadas de prevenção e estratégias de conteção dessa zoonose.

1.6 – O município de Ouro Preto e a leishmaniose visceral

De acordo com dados obtidos do SINAN/SVS/MS (Brasil, 2017) a região Sudeste é a segunda maior em notificações de casos humanos de LV. No ano de 2017, o Brasil notificou 4.511 ocorrências dessa zoonose, das quais 1.094 decorreram dessa região. O estado de Minas Gerais contribuiu com 877 desses casos, sendo o estado com maior notificação do sudeste.

A notificação de casos humanos no estado de Minas Gerais se inicia na região norte por volta da década de 40. A capital mineira, Belo Horizonte apresentou sua primeira epidemia registrada em 1993, e desde então com a franca expansão da doença, tornou-se endêmica (Gontijo & Melo, 2004; Bevilacqua et al., 2001; Oliveira et al., 2001).

Realizando-se uma pesquisa via DATASUS, colocando o município de Ouro Preto, como área de residência da notificação, pode-se contatar a notificação de nove casos de LV e 25 notificações de Leishmaniose Tegumentar. A LV vem sendo notificada desde o ano de 2004 e durante o período do presente estudo, dois casos foram registrados no ano de 2017. Para a forma tegumentar essa notificação se deu desde o ano de 2001, e 2017 foi o ano que mais se notificou casos compreendenfo seis registros.

Em busca de conter a expansão da doença, o PCV-LV (Brasil, 2006) estabelece que as ações não devem ficar restritas somente às áreas endêmicas de notificação de casos humanos. A identificação de áreas silenciosas, de transmissão ou de risco, torna-se importante para o planejamento das medidas de controle ou de medidas preventivas. O monitoramento e controle do reservatório canino, bem como o levantamento entomológico, são indicados para municípios vulneráveis ou que apresentem registros esporádicos de casos humanos de LV, situação essa em que se enquadra o município de Ouro Preto, Minas Gerais.

Diante da descentralização da Vigilância Epidemiológica, a administração dos municípios não tem apresentado o suporte necessário para a realização das ações que contemplam esse programa. Sendo assim, as estratégias propostas para o controle dessa zoonose tem como uma das ações a redução do risco de propagação mediante o controle do reservatório canino e a busca de informações sobre a fauna de flebotomíneos. Dentre as estratégias adotadas, o controle vetorial e o monitoramento do reservatório canino consistem em investigações em zonas urbanas e rurais dos municípios em risco.

As prevalências das leishmanioses já foram descritas em várias regiões endêmicas brasileiras. Entretanto, o registro de casos esporádicos de LV não assegura que essas regiões não venham a fazer parte da área de expansão da doença da zona endêmica. Belo Horizonte, cidade próxima ao município de Ouro Preto, é um exemplo do processo de urbanização da LV nas cidades brasileiras. Desde 1992, a cidade convive com a doença, introduzida a partir de um município vizinho (Sabará) (Genaro, 1990; Oliveira et al. 2001). A proximidade entre as habitações, a alta densidade populacional e a grande suscetibilidade da

população à infecção contribuíram para a rápida expansão da LV no ambiente urbano. Nesse município, a LV possui ampla distribuição espacial nas nove regionais administrativas, com risco diferenciado de acometimento da doença, apesar da presença de fontes de infecção e dos susceptíveis em todo o município (Lopes et al., 2010).

A existência de casos notificados, a proximidade com áreas endêmicas, o impacto ambiental provocado pelo turismo e pela mineração e o registro esporádico de casos autóctones de LV humana, fazem com que o município de Ouro Preto venha a ser classificado como uma área esporádica para a transmissão. Dessa forma, a busca da infecção canina por LV e o conhecimento da fauna flebotomínica são ações que promovem o entendimento dos elos que envolvem o ciclo de transmissão da doença nessa região.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A descrição do perfil epidemiológico é capaz de direcionar as ações de políticas públicas voltadas à vigilância e controle de uma doença. Assim, a partir do levantamento de dados passa a ser possível entender as condicionantes de tempo, espaço e pessoa relacionados ao processo saúde-doença (Medronho et al., 2009).

Estudos de prevalência voltados a LV já foram realizados em várias regiões endêmicas no Brasil. Entretanto, áreas com transmissão esporádica ou com ausência de casos humanos nem sempre são objetos de pesquisa, situação que gera questionamentos quanto a possível expansão dessa zoonose.

A LV humana no município de Ouro Preto vem sendo notificada desde o ano de 2013, sendo transmitida de forma esporádica e sem nenhuma forma de investigação. Com isso, as justificativas para a realização desse estudo são estruturadas nas seguintes questões: (a) a proximidade do município em relação às áreas endêmicas de Belo Horizonte (266 casos notificados de LV em 2009 a 64 casos em 2017) e Mariana (10 casos de LV notificado por ano, de 2007 a 2017); (b) necessidade de identificar áreas de risco para as leishmanioses utilizando testes de diagnóstico combinados; (c) necessidade de identificar o cão em uma possível cadeia epidemiológica das leishmanioses no município; (d) levantamento da fauna flebotomínica do município (e) necessidade de caracterizar o parasito envolvido na transmissão da doença; (f) gerar parâmetros epidemiológicos para indicar e subsidiar ações de controle a serem implementadas pelos serviços de zoonose de Ouro Preto.

Sendo assim, faz-se necessário realizar estudos relacionados com essa infecção em regiões com transmissão esporádica da LV, que não apresentam padrões epidemiológicos que propiciem o conhecimento e contenção da doença.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Investigar uma área de casos esporádicos de leishmaniose humana e canina.

3.2 – Objetivos específicos

A. Validar e avaliar a acurácia das técnicas sorológicas do ELISA e DPP® em uma área de baixa transmissão;
B. Avaliar o desempenho do método sorológico em relação ao molecular na detecção da infecção por LV;
C. Estimar a prevalência da infecção canina por *Leishmania* sp. no município, utilizado diferentes métodos diagnósticos;
D. Determinar as áreas de risco para transmissão da leishmaniose visceral no município de Ouro Preto.
E. Detectar e identificar o DNA de *Leishmania* sp. em amostras de sangue total procedentes dos cães infectados do município;
F. Determinar a fauna flebotomínica do município, nos aspectos abundância, diversidade e variação sazonal da fauna flebotomínica;
G. Estimar a porcentagem de flebotomíneos naturalmente infectados;
H. Avaliar a associação entre a presença de flebotomíneos e de cães infectados e variáveis ambientais (altitude e climáticas).

METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1 - Desenho do estudo

Desenho de estudo do tipo transversal amostral foi realizado a fim de identificar a presença dos reservatórios caninos e possíveis espécies vetoras para as leishmanioses. Amostras de sangue dos cães domiciliados foram avaliadas por métodos sorológicos e molecular para o diagnóstico da infecção. Tendo como base os domicílios com presença de infecção canina, capturas sistemáticas de flebotomíneos foram executadas durante um ano hidrológico.

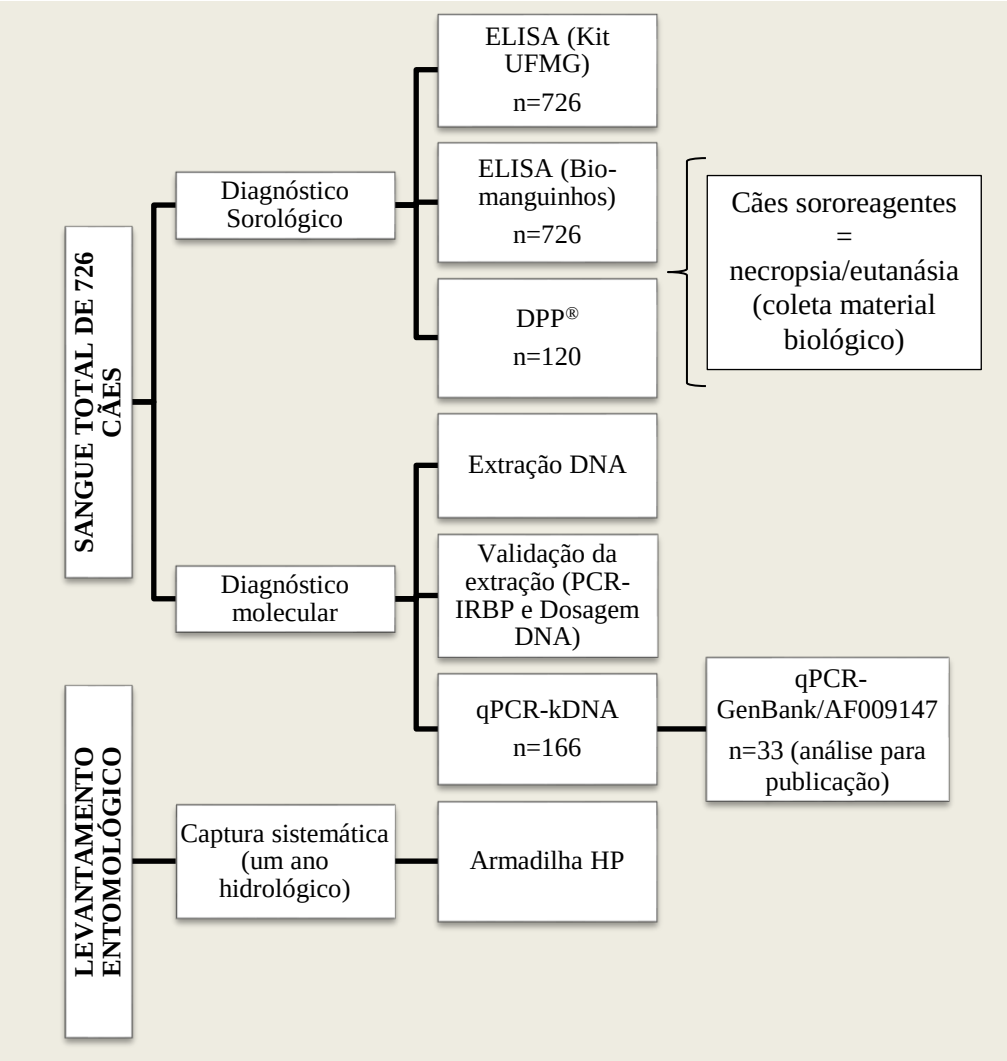


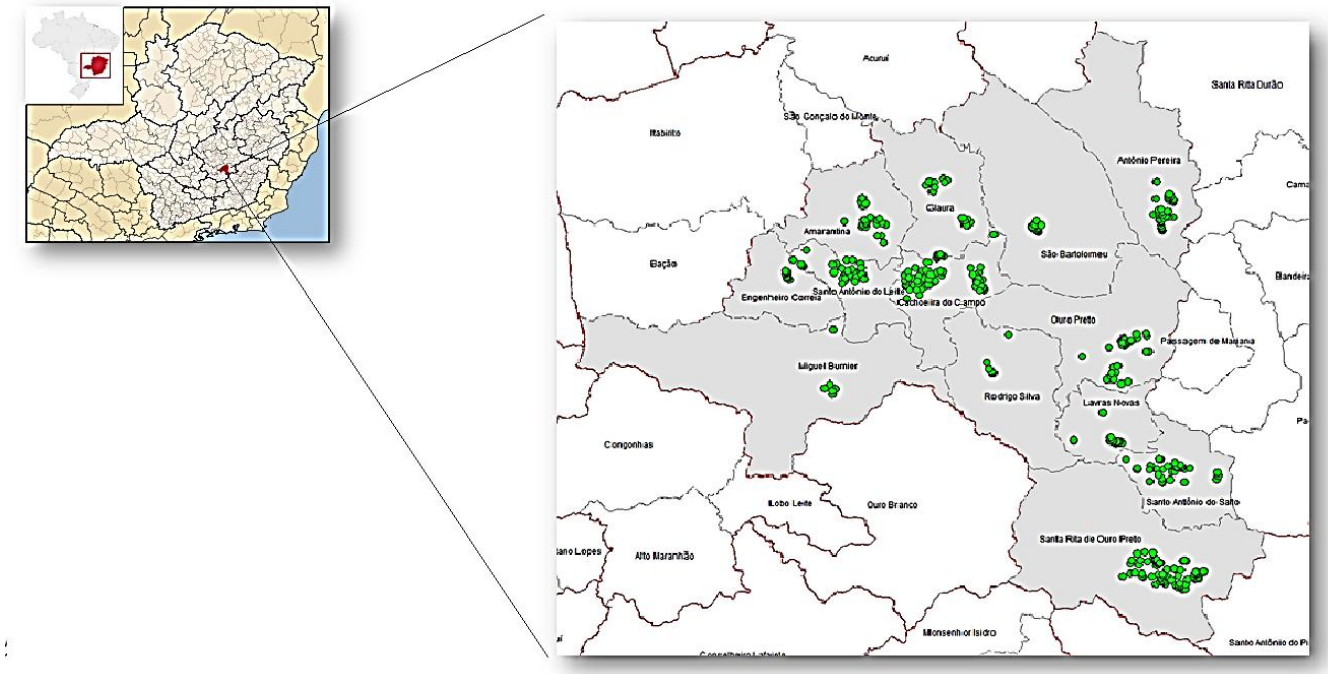
Figura 1. Diagrama do fluxo do diagnóstico da LVC, em Ouro Preto, Minas Gerais.

4.2 – Área do estudo

O presente estudo tem como área o município de Ouro Preto; localizado no Quadrilátero Ferrífero na região central da macrorregião metalúrgica de Minas Gerais (latitude 20º23'08" sul, longitude 43º30'29" oeste). Possui altitude média de 1179 metros acima do nível do mar e o clima predominante é o tropical de altitude. Segundo dados do IBGE (2017), Ouro Preto possui uma população humana estimada de 74.659 habitantes, sendo 9.161 residentes em área rural. Faz limites com os municípios de Mariana a leste, Belo Vale e Moeda a oeste, Ouro Branco, Congonhas, Catas Altas da Noruega e Itaverava ao sul, Itabirito e Santa Bárbara ao norte. Com a divisão territorial realizada no ano de 2017, o município passou a ser formado por treze distritos: sede, Amarantina, Antônio Pereira, Cachoeira do Campo, Engenheiro Correia, Glaura, Lavras Novas, Miguel Burnier, Rodrigo Silva, Santa Rita, Santo Antônio do Leite, Santo Antônio do Salto e São Bartolomeu (IBGE, 2017).

A população canina foi estimada em aproximadamente 10.000 cães, considerando a sede e os distritos. Estes dados tiveram como base a campanha de vacinação antirrábica realizada no ano de 2016.

O inquérito soroepidemiológico canino foi realizado em todas as sedes distritais e nas localidades de Bocaina (distrito de Rodrigo Silva), Coelhos (distrito de Amarantina), Mota (distrito de Miguel Burnier) e Soares (distrito de Glaura) (Figura 2).



Fonte: IGA, 2007

Figura 2. Área investigada para LVC no município de Ouro Preto, Minas Gerais, ano de 2016.

4.3 - Questões éticas e fonte de dados epidemiológicos

O presente projeto de tese foi submetido e aprovado pelo CEUA/ UFOP (2016/20) (Anexo 1).

Todos os animais investigados tiveram suas informações registradas em um formulário criado para o estudo (Anexo 2). Foram registrados: nome do cão, vacinação contra leishmaniose, sexo, porte, tamanho do pelo, onde vive e nome do proprietário, com endereço do domicílio e autorização deste quanto a participação no estudo (Anexo 3).

Para os cães positivos para leishmaniose, foi solicitado ao proprietário a autorização por escrito para realização dos procedimentos de necropsia/eutanásia e coleta de material biológico. Todos esses procedimentos foram realizados por veterinários e seguiram as normas vigentes da resolução 1000 (CFMV, 2012).

O estudo entomológico foi realizado nas áreas com presença de infecção canina (ELISA kit Bio-manguinhos positivo). Os proprietários dos domicílios selecionados para a captura de flebotomíneos, foram informados sobre o teor e os objetivos do presente trabalho e concederam autorização para a montagem das armadilhas e coleta de possíveis espécies vetoras.

4.4- Inquérito canino

4.4.1- Cálculo da amostra

A partir das informações da secretaria de planejamento do município e dos serviços de zoonose (última campanha de vacinação antirrábica realizada no ano de 2016) foi estimado um total de 7221 cães no município. Assumindo frequência desconhecida e, portanto, esperada em 50%, margem de erro aceitável de 5%, nível de confiança de 99%, efeito de desenho igual a 1, e uma perda estimada de 20% foi calculada uma amostra de 728 cães para estimar a prevalência da LV no município de Ouro Preto (Epi Info/StatCalc/Population survey or descriptive study).

4.4.2 – Processo de amostragem

No ano de 2017, durante a vacinação antirrábica realizada pelo Serviço de Zoonose da Secretaria Municipal de Saúde de Ouro Preto, duas equipes do Laboratório de Epidemiologia, composta cada uma por dois biólogos, realizaram a coleta de amostra de sangue total dos cães domiciliados. Os cães errantes foram excluídos da amostra.

A distribuição da amostra foi proporcional à densidade populacional canina de cada distrito (amostra estratificada). No local da campanha de vacinação, era solicitada a autorização do proprietário para a participação de seu cão no estudo (amostra por conveniência, determinada pelo tempo de espera para o início da coleta, e capacidade de contenção do cão pelo proprietário).

4.4.3 – Manuseio e contenção do cão

Para o manuseio e acesso ao membro anterior do cão, local de coleta da amostra de sangue, proprietário e equipe de coleta foram envolvidos. A presença do proprietário era exigida para que ajudasse no manuseio e para que deixasse o animal mais seguro e calmo. Nenhum tipo de sedativo foi utilizado para a contenção. A equipe de coleta foi responsável pela imobilização do focinho do cão conforme apresentado na figura 3. Com o focinho imobilizado e com as patas anteriores suspensas, a equipe de coleta realizava a punção da veia cefálica e a amostra de sague total era coletada.

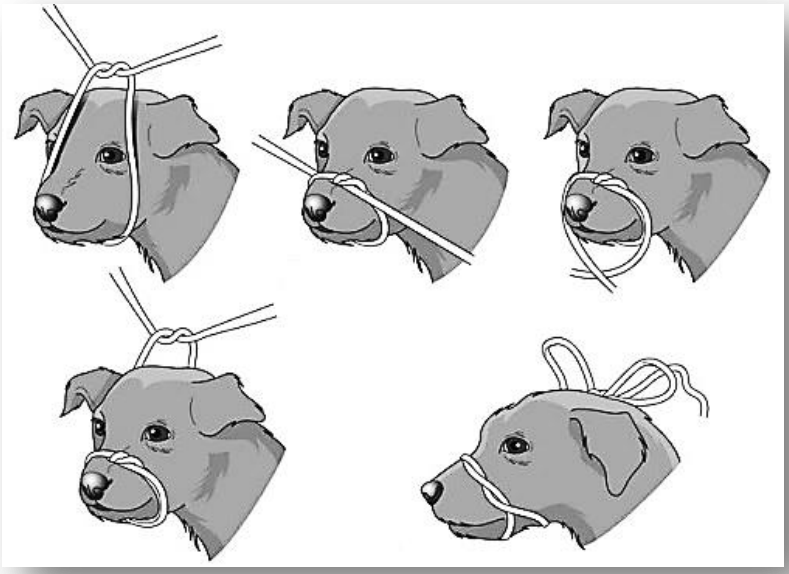


Figura 3: Imobilização do focinho do cão para a coleta da amostra de sangue total.

4.4.4 – Avaliação dos sinais clínicos dos animais

A observação e registro dos cães avaliados no inquérito foi realizada no momento da coleta da amostra. Foram avaliadas visualmente a presença de alopecia, ulceração, descamação cutânea, conjuntivite, onicogrifose, emagrecimento, dentre outras (Anexo 2). A partir dessa avaliação os animais puderam ser classificados em assintomáticos (ausência de sinais clínicos) e sintomáticos (presença de sinais clínicos) (Brasil, 2006).

4.4.5 – Obtenção e acondicionamento das amostras biológicas

A coleta das amostras foi realizada em 726 cães, através de punção da veia cefálica utilizando seringa de 10 mL, sendo que aproximadamente 4mL de sangue eram transferidos para dois tubos de coleta, com e sem EDTA.

Os tubos sem anticoagulante foram encaminhados no mesmo dia para o Laboratório de Epidemiologia para centrifugação durante 15 minutos a 3000 r.p.m, para obtenção de soro. Os mesmos foram acondicionados em frasco de 0,6 mL e armazenados a -20°C, até o momento da realização dos

exames sorológicos. Os tubos com anticoagulante foram armazenados a -20ºC até o momento da extração de DNA.

4.4.6 - Diagnóstico sorológico e critério de positividade

O diagnóstico sorológico de todas as amostras caninas (n=726) foi realizado no Laboratório de Epidemiologia da Escola de Medicina da UFOP, utilizando os métodos sorológicos ELISA kit bio-manguinhos e kit UFMG), e DPP®. O critério de infecção foi estabelecido conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (DPP®+ e ELISA +) (Nota Técnica Conjunta N°01/2011).

No protocolo ELISA (kit Bio-manguinhos) as amostras de soro foram diluídas com diluente próprio e lectina de leite; aquelas que possuíam anticorpos específicos se ligavam aos antígenos aderidos previamente na placa. Em seguida, foi adicionada imunoglobulina anti-cão marcada com enzima peroxidase, para ligação aos anticorpos, caso estes estivessem presentes. A reação foi evidenciada com a tetrametilbenzidina – TMB (substância cromógena), que pela ação da peroxidase com peróxido de hidrogênio, forma um composto de coloração azul turquesa que ao reagir com ácido sulfúrico 2M, utilizado para interromper a reação, passa a apresentar uma coloração amarela em caso reagente (positivo), sem desenvolvimento de cor nos poços em amostras não reagente (negativo). A leitura espectrofotométrica foi realizada a 450 nm. Essa técnica utiliza antígenos solúveis e purificados de *L. major-like* que foram obtidas por meio de cultura *in vitro*. O ELISA (kit UFMG) segue as mesmas etapas relatadas anteriormente, mas, se diferencia por utilizar como solução reveladora o OPD (Tampão citrato-fosfato), leitura espectrofotométrica de 492nm e ter como antígeno bruto a *L. infantum*. As lavagens, o período de encubação e "cut-off" foram determinados conforme o protocolo de cada fabricante.

O método imunocromatográfico - Dual Path Platform, produzido pela Bio-Manguinhos, utiliza a proteína recombinante K39 (rK39) como antígeno, uma sequência de 39 aminoácidos clonada da região quinase específica de *Leishmania infantum*. O mesmo foi realizado com a adição de 5 µL de sangue total do cão em poço indicado "Amostra + Tampão". Em seguida, foram adicionadas 2 gotas de solução tampão. Iniciou-se a corrida da amostra mais o tampão na membrana de nitrocelulose. Após 5 minutos ocorreu o desaparecimento de duas linhas azuis, controle e teste. Em sequência colocou-se 4 gotas da solução tampão no segundo poço intitulado como "Tampão". A leitura dos resultados foi efetuada de 10 a 15 minutos após esta etapa, quando se avaliou o resultado: negativo, aparecimento de uma linha vermelha ou positivo, duas linhas vermelhas.

4.4.7 – Eutanásia/Necropsia dos cães sororeagentes

Os responsáveis pelo Serviço de Zoonose, da Secretaria Municipal de Saúde do município de Ouro Preto, foram informados quanto à procedência dos cães sororeagentes, para serem destinados à eutanásia, conforme recomendado pelo PVC-LV (BRASIL, 2006). Esta foi realizada por médico veterinário e em conformidade com a Portaria do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2012).

Uma amostra daqueles cães foi encaminhada ao Centro de Zoonose para realização de necropsia por nossa equipe. Esta foi realizada por médico veterinário colaborador do trabalho (Dr. João Carlos França da Silva), em conformidade com a Portaria do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2012). Antes da anestesia, os animais foram sedados com solução de cloridrato de xilazina a 5% (Dopaser® - Lab. Hertape Calier), na dose de 1 mL por 10 quilogramas de peso vivo (1,1-2,2 mg/kg PV), por via intramuscular, músculo semitendinoso, utilizando-se seringa de 1, 3 ou 5mL e agulha 25 x 8. Após apresentarem estado de relaxamento muscular, os animais foram anestesiados com solução de thionembutal (Thiopentax® - Lab. Cristália), sendo 1 grama ressuspendida em 40 mL de soro fisiológico, dose de 5-15 mg/kg PV, por via endovenosa, veia cefálica, usando scalp nº 21, 23 ou 25G, de acordo com o tamanho do animal e seringa de 3, 5 ou 10ml, de acordo com o volume a ser administrado. Após este procedimento, foram aguardados cerca de 2-5 minutos até que o animal apresentasse plano anestésico profundo, evidenciado pela rotação de globo ocular, ausência de reflexos interdigitais profundos, superficiais e corneal e respiração abdominal. No protocolo de necropsia, foi realizada a coleta da medula óssea na crista da tíbia do cão, utilizando agulha 18G acoplada em uma seringa de 20 mL. Em seguida, com o animal ainda anestesiado, a eutanásia foi realizada utilizando uma dose extra de thionembutal, via endovenosa e, logo após, injeção de 20mL de solução de cloreto de potássio saturada (20% de cloreto de potássio em água bidestilada), via endovenosa. Uma vez atestado o óbito do animal, a necropsia foi realizada subsequentemente. Foi realizada incisão no flanco esquerdo para exposição dos intestinos, para coleta do fragmento de linfonodo mesentérico. Além disso, foi coletado também um fragmento do tecido do baço e da borda distal da orelha, para confecção dos esfregaços por aposição para exame parasitológico direto. Em seguida esse material biológico (da borda distal da orelha, baço e linfonodo mesentérico) foi devidamente identificado, armazenado em frascos de 1,5 mL e congelado a - 80°C para posterior realização das técnicas moleculares. A carcaça do animal foi acondicionada em saco plástico, congelado até o momento do recolhimento pelo Serviço de Zoonoses do município de Ouro Preto.

4.4.8 – Exame direto por aposição dos tecidos

Foi realizado o esfregaço por aposição dos fragmentos de tecidos (medula, baço, linfonodo mesentérico e borda distal da orelha) coletados dos cães necropsiados. Estes foram pressionados em lâminas previamente limpas e desengorduradas, fixados com solução de álcool metílico e coradas pelo método Giemsa. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica (aumento de 1000x), para procura de formas amastigotas.

4.4.9 - Diagnóstico molecular para LVC (método de comparação-Padrão Ouro)

4.4.9.1 - Extração de DNA

A extração do DNA das amostras de sangue e tecidos, seguiu a metodologia do fabricante do Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Após a extração, o DNA foi reidratado e armazenado -20ºC até o momento do uso.

Para validar o processo de obtenção do DNA, as amostras extraídas foram dosadas pelo sistema Qubit® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Além disso, as amostras ainda passaram por validação da PCR que detecta o gene constitutivo da β globina do cão (PCR IRBP). As reações da PCR-IRBP foram dirigidas à amplificação de fragmentos dos genes constitutivos de mamíferos sendo utilizados para reações de controle endógeno da qualidade e integridade do DNA extraído. O par de iniciadores utilizados foram, o IRBPfwd: 5’TCC AAC ACC ACC ACT GAG ATC TGG AC 3’ e o IRBPrev: 5’ GTG AGG AAG AAA TCG GAC TGG CC 3’, tendo como produto amplificado um segmento de 120pb (Ferreira et al, 2010). A amostra uma vez positiva para o PCR-IRBP foram avaliadas para a detecção do DNA de *Leishmania* spp.

4.4.9.2 – PCR em tempo real para detecção de Leishmania sp. *(qPCR-KDNA)*

O par de iniciadores utilizado para o gênero *Leishmania* visa à amplificação da região conservada do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) do parasito. Os iniciadores A: 5´ (C/G) (C/G) (G/C)

CC(C/A) CTA T(T/A) T TAC ACC AAC CCC 3´ e iniciador B: 5´ GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3´ (Degrave et al., 1994) amplificaram um segmento de 120 pb. Para isso, utilizou-se a técnica da reação da cadeia da polimerase em tempo real (qPCR-kDNA) e os produtos amplificados foram detectados por meio do fluoróforo SYBR® Green. A reação foi realizada em volume final de 13µL contendo a concentração de 5 picomoles de iniciador direto e reverso, utilizando um volume total de 0,5 µL de cada, 3,75µL de água, 5µL de SYBER Green, 0,25µL de $MgCL_2$ 25mM. A amplificação foi realizada em equipamento 7500 Fast Real Time System (Applied Biosystems) utilizando-se o seguinte programa: 95ºC por 10 minutos seguidos de 45 ciclos de: 95ºC por 15 segundos para desnaturação, 60ºC por 1 min para anelamento; 95ºC por 15 segundos, 60°C 1 min, 95°C 30seg.

A visualização dos resultados foi realizada em programa 7500 Software v.2.0.6 (Applied Biosystems).

4.4.9.3 – Identificação das espécies de Leishmania circulantes

A técnica de RFLP utiliza enzimas de restrição que cortam a dupla fita de DNA pelo reconhecimento de uma pequena sequência de nucleotídeos, usualmente de quatro a seis pares de bases de tamanho. O kDNA das espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* apresenta sequências suficientemente distintas para ser utilizado na diferenciação destas espécies. Segundo VOLPINI (2004), a digestão com a endonuclease HaeIII (*Haemophilus aegyptius*) possibilita a distinção das três espécies. Para a identificação das espécies de *Leishmania* nas amostras de cães "qPCRkDNA positivos" para o gênero *Leishmania* foi utilizada a enzima HaeIII , que digere *L. amazonensis* em um fragmento de 116 pb; *L. braziliensis* em dois fragmentos, de 80 e 40 pb; *L.infantum* em fragmentos de 120, 80, 60 e 40 pb. A técnica foi realizada conforme descrito por Andrade et al. (2006) com modificações. Uma mistura prévia contendo 2U (0,2µl) da enzima de restrição HaeIII (Invitrogen™), 2,0µl do tampão da enzima 10X (Invitrogen™), 7,8µl de água ultra-pura (GibcoTM) foi adicionada a 15µl de produto amplificado (PCR-kDNA), homogeneizada e incubada a 37ºC, por 4 horas, em banho-maria.

A visualização das bandas da digestão, fornecidas pela PCR- RFLP foi realizada pela eletroforese em gel de agarose 4%. Foram aplicados no gel 25µl do produto amplificado digerido pela enzima, misturados a 5 µl de tampão de corrida (azul de bromofenol). O marcador de peso molecular utilizado foi o 25 pb (InvitrogenTM) que gera 19 bandas de 25 a 450 pb, mais uma banda de 500 pb.

4.4.10 – Processamento e análise de dados

Os dados foram digitados e analisados no programa SPSS versão 22.0. A prevalência de LV foi calculada a partir da razão entre o número de cães infectados e a população canina analisada.

O desempenho das técnicas sorológicas foi avaliado através do cálculo da sensibilidade (co-positividade), especificidade (co-negatividade) e a acurácia, considerando como "padrão ouro" o diagnóstico molecular pelo qPCR-kDNA. O teste pareado de McNemar foi utilizado para avaliar a presença de diferença significativa entre as proporções de resultados positivos obtidos pelos diferentes métodos diagnósticos, assumindo como significativo quando valor p era menor que 0,05.

Para a comparação das proporções de resultados positivos, determinados pelo diagnóstico molecular (qPCR-kDNA), dos diferentes sub-grupos sorológicos, isto é, diferentes perfis sorológicos, foi utilizado o teste de qui-quadrado de Pearson, assumindo como significativo quando valor p era menor que 0,05.

Mapas temáticos foram confeccionados no programa MapInfo versão 12.5 para descrever a distribuição dos domicílios com cães infectados.

4.5 – *Levantamento entomológico*

4.5.1 – Pontos de captura

O levantamento entomológico foi realizado mensalmente no período de junho de 2017 a maio de 2018, contemplando, portanto, um ano hidrológico. A presença de cão infectado, arborização úmida - pomar de frutas, presença de galinheiro, proximidade com região de mata, foram os quesitos ambientais utilizados para seleção do ponto para instalação das armadilhas no peridomicílio. Dois pontos de captura foram determinados para cada um dos distritos/localidades em que a LVC foi soroprevalente. Os proprietários dos domicílios foram informados quanto ao projeto e seus objetivos, solicitada autorização e colaboração para execução do estudo.

4.5.2 – Captura dos flebotomíneos

O tipo de armadilha luminosa utilizada foi o modelo HP (Pugedo et al., 2005). Essa é uma armadilha que funciona com quatro pilhas grandes (1,5 volts cada) mantendo luminosidade da lâmpada e

o fluxo de ar promovido pelo funcionamento da ventoinha, no qual os insetos atraídos pela luz são sugados para um saco coletor de filó.

As capturas foram realizadas na semana da lua nova (noites de menor luminosidade). As armadilhas foram montadas ao entardecer do 1º dia de coleta e seus sacos coletores removidos no período da manhã seguinte até a manhã do último dia de coleta, de modo a manterem ligadas durante três noites consecutivas.

Em cada dia de captura, os sacos coletores foram removidos das armadilhas e os insetos capturados foram mortos em câmaras contendo éter P.A.. Em seguida foi realizada a triagem e sexagem. Os flebotomíneos fêmeas foram acondicionados em tubos contendo DMSO 6% (dimetilsulfóxido) e mantidos em freezer a -20ºC até o momento preparação, montagem e posterior realização da extração de DNA para a detecção da infecção natural. Os flebotomíneos machos foram mantidos em tubos de hemólise contendo álcool 70% e em temperatura ambiente para posterior preparação, montagem e identificação. Estes foram montados em lâmina com a cabeça em posição frontal, tórax e abdômen na horizontal.

As etapas de montagem, identificação e detecção infecção natural foram realizadas no Laboratório de Leishmanioses/IRR. A identificação foi realizada a partir da classificação proposta por Galati (2003) e por comparações com exemplares de referência existentes no mesmo laboratório.

4.5.3 – Detecção da infecção natural de flebotomíneos por Leishmania spp.

4.5.3.1 - Extração de DNA das fêmeas de flebotomíneos capturadas

O corpo das fêmeas dissecadas foi agrupado em “pools” de 2 a 10 indivíduos, formados por exemplares da mesma espécie, mesmo ponto e mesmo mês de captura ou quando necessário, individualmente. Posteriormente, a extração de DNA foi realizada, visando a detecção da infecção por *Leishmania*, utilizando o Kit de extração de tecidos e células da GE Amersham Biosciences, de acordo com especificações do fabricante.

As amostras extraídas foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop-Thermo Scientific, utilizando a faixa de leitura de 260 a 280 nm, para quantificar o DNA e analisar a qualidade do mesmo. Em seguida essas foram armazenadas a -20º C para posteriores análises moleculares.

4.5.3.2 - *Reação da polimerase em cadeia do gene constitutivo de flebotomíneos (cacofonia)*

Para a confirmação da presença de DNA de flebotomíneos nas fêmeas capturadas e consequente validação do processo de extração, foi utilizado um par de iniciadores que amplificam a região IVS6 do gene constitutivo específico (cacofonia) de flebotomíneos. A técnica foi realizada utilizando o Kit de PCR (Kit PureTaq Ready-To-Go PCR Beads/GE Healthcare), com os seguintes iniciadores: 5' GTG GCC GAA CAT AAT GTT AG 3' e 5' CCA CGA ACA AGT TCA ACA TC 3' (Lins et al., 2002).

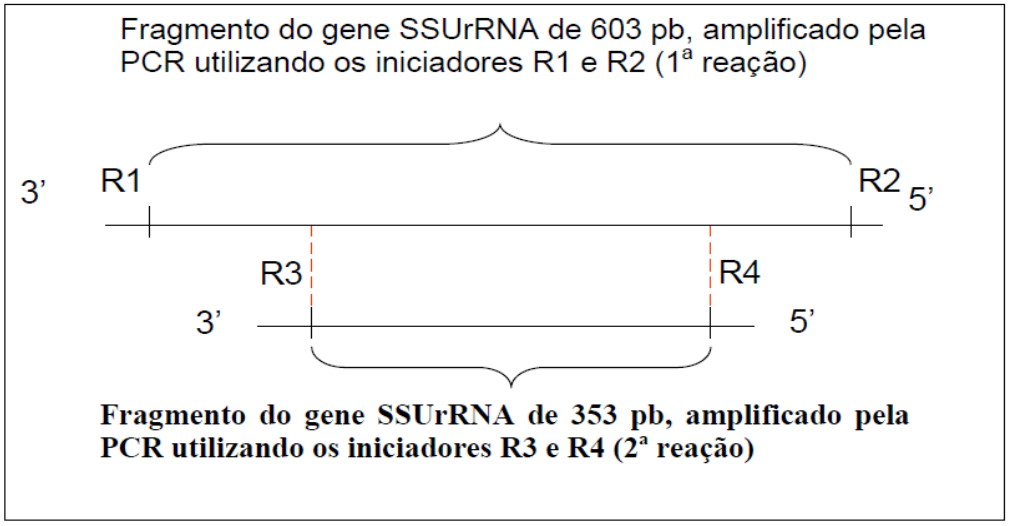
A amplificação do gene constitutivo foi realizada em equipamento termociclador automático (Applied Biosystems Veriti TM Thermal Cycler), utilizando o programa de amplificação: 94°C por 12 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação, 94ºC por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, 55°C por 10 minutos e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Em cada conjunto da reação de cacofonia, foram incluídos um controle negativo (sem DNA) e um controle positivo (DNA purificado de flebotomíneo do gênero *Lutzomyia*).

4.5.3.3 - Detecção da infecção natural das fêmeas de flebotomíneos por Leishmania spp.

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

Esta metodologia, adaptada e modificada de Cruz *et al.* (2002) foi realizada a partir de uma amplificação inicial de um fragmento de aproximadamente 603 pb, utilizando-se os iniciadores R1: 5´ GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG 3´ e R2: 5´ GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG 3´, seguida da amplificação de um fragmento de aproximadamente 353 pb, a partir do produto amplificado diluído da primeira reação, utilizando os iniciadores R3: 5´ TCC CAT CGC AAC CTC GGT T 3´ e R4: 5´ AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3´ (Figura 4).

Em todas as reações utilizou-se DNA extraído de cultura de *L. infantum* (MHOM/BR/PP75), como controle positivo e como controle negativo a amostra de DNA foi substituída por volume equivalente de H_2O para PCR.



Fonte: Eduardo de Castro Ferreira (2007)

Figura 4 - Desenho esquemático da Ln-PCR destinada a amplificar um fragmento do gene SSUrRNA de *Leishmania*.

4.5.3.4 - Análise dos produtos amplificados pelas PCR's Cacofonia e Ln-PCR

Após as amplificações das PCR's utilizando iniciadores que amplificam fragmentos do gene constitutivo de flebotomíneos (cacofonia) e do gene do SSUrRNA (Ln-PCR), estas amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 2% corados com brometo de etídeo e examinados em exposição à luz ultravioleta (UV) no capturador de imagens ImageQuant LAS 4000.

4.5.4 – Registro de dados climáticos e pluviométricos

Em todos os três dias consecutivos de captura dos flebotomíneos foram registrados dados climáticos de cada distrito/localidade obtidos através do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Os dados de temperatura, umidade relativa do ar e velocidade do vento foram obtidos por consulta diária à página http://www.inmet.gov.br. Já os dados de pluviosidade foram adquiridos por download fornecidos pela na página do Centro Nacional de Monitoramento e Alerta de Desastres Naturais (CEMADEN), adquiridos de pluviômetros automáticos, cujas informações foram disponibilizadas no site http://www.cemaden.gov.br/mapainterativo/#. Tais informações foram coletadas por um ano (ano hidrológico), durante o período de junho de 2017 a maio de 2018.

4.5.5 – Processamento e análise dos dados

De acordo com o número de flebotomíneos capturados (n=49) foi realizada análise de frequência da diversidade e riqueza de espécies, segundo localidade e variáveis climáticas (temperatura média, pluviosidade média, umidade, altitude, vento).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Foram avaliados no inquérito amostral 726 cães, distribuídos nas 13 sedes distritais e em quatro localidades rurais de Ouro Preto, incluindo a sede municipal, conforme apresentado na Tabela 1. Na maioria dos distritos, a frequência relativa dos cães amostrados superou a frequência relativa esperada para cada distrito ou localidade, de acordo com a campanha de vacinação antirábica de 2016. Nos distritos de Amarantina, Cachoeira do Campo, Sede e Rodrigo Silva a frequência relativa dos cães amostrados foi um pouco menor do que a frequência esperada para esses distritos.

Tabela 1. Distribuição dos cães segundo distrito de procedência no município de Ouro Preto, Minas Gerais, ano de 2016.

Distrito/Localidade	População canina vacinada em 2016	Frequência relativa esperada	Número de cães amostrados	Frequência relativa observada
Amarantina	293	4,1%	21	2,8%
Antônio Pereira	312	4,3%	59	8,1%
Loc. Coelhos	101	1,4%	15	2,1%
Cachoeira do Campo	974	13,5%	86	11,8%
Engenheiro Correia	99	1,3%	17	2,3%
Glaura	136	1,9%	13	1,8%
Loc. Soares	77	1,1%	18	2,5%
Lavras Novas	73	1,0%	36	5,0%
Miguel Bournier	65	0,8%	15	2,1%
Loc. Mota	111	1,5%	13	1,8%
Ouro Preto (sede)	3094	42,9%	128	17,6%
Rodrigo Silva	323	4,4%	27	3,7%
Loc. Bocaina	149	2,0%	53	7,3%
Santa Rita	661	9,2%	126	17,4%
Santo Antônio do Leite	373	5,2%	34	4,7%
Santo Antônio do Salto	189	2,6%	29	4,0%
São Bartolomeu	191	2,7%	36	5,0%
Total	**7221**	**100%**	**726**	**100%**

Os cães amostrados eram em sua maioria machos (n=431; 59,4%), de porte médio à grande (n=508; 70,0%), possuíam pelo curto (n=450; 62,0%) e quase metade desses (n=379; 52,2%) permaneciam restritos ao domicílio, não tendo acesso à rua. Além disso, a maioria dos animais não apresentaram sinais clínicos sugestivos para LV, sendo esses classificados como assintomáticos. Dos animais sintomáticos (n=156; 21,5%), os sinais clínicos observados foram: emagrecimento (n=69; 44,2%), onicogrifose (n=31; 19,9%), ceratoconjutivite (n=10; 6,4%), paresia dos membros posteriores (n=1; 0,80%) e dermatite localizada ou generalizada (n=39; 25,0%).

Amostra de soro destes cães (n=726) foi avaliada pelo diagnóstico sorológico (ELISA e DPP®) e pelo diagnóstico molecular (qPCR-kDNA). A tabela 2 apresenta o detalhamento da soropositividade da LVC, conforme a classificação do método ELISA e "kit" diagnóstico empregado em cada amostra avaliada. O número de amostras classificadas como indeterminadas (zona cinza) foi maior pelo método ELISA (kit UFMG) do que pelo método ELISA (kit Bio-manguinhos). Das 60 amostras positivas pelo Kit Bio-manguinhos apenas 10 foram positivas pelo kit UFMG (16,7%), indicando baixa co-positividade entre os métodos. Enquanto das 659 amostras negativas pelo Kit Bio-manguinhos, 98,2% foram concordantes com o kit UFMG, indicando uma co-negatividade de 92%. Tanto o valor preditivo positivo quanto o negativo foram iguais a 90%.

Tabela 2: Soropositividade da LVC pelo método ELISA conforme o fabricante no município de Ouro Preto, Brasil, Minas Gerais, ano de 2016.

	Kit Bio-manguinhos			
Kit UFMG	**Positivo**	**Negativo**	**Indeterminado**	**Total**
Positivo	10 (16,7%)	1 (0,1%)	0 (%)	11 (1,5%)
Negativo	46 (76,7%)	647 (98,2%)	6 (85,7%)	699 (96,3%)
Indeterminado	4 (6,6%)	11 (1,7%)	1 (14,3%)	16 (2,2%)
Total	60 (100%)	659 (100%)	7 (100%)	726 (100%)

As amostras classificadas pelo ELISA (kit-Bio-manguinhos) como reagentes (n=60), indeterminadas (n=7) e um percentual de amostras negativas (n=99) passaram por avaliação do método do DPP®. Das 15 amostras positivas pelo DPP®, 14 (93,3%) foram confirmadas pelo kit-Bio-manguinhos e 10 (66,7%) amostras confirmadas pelo kit UFMG. As amostras negativas no DPP e positivas pelo ELISA (kit Bio-manguinhos) apresentaram uma carga parasitaria variando de 2,8 a 5 parasitos por mL de sangue

total. Os sete resultados dentro da faixa de zona cinza (indeterminados) pelo ELISA (kit Bio-manguinhos) apresentaram resultado negativo pelo DPP®, com densidades ópticas baixas variando entre 0,103 e 0,214 (Média = 0,140; desvio padrão = 0,035) (Tabela 3).

Tabela 3: Soropositividade conforme o método diagnóstico empregado para a descrição da frequência da LVC, no município de Ouro Preto, Brasil, Minas Gerais, ano de 2016.

		DPP®	
Kit Bio-manguinhos	**Positivo**	**Negativo**	**Total**
Positivo	14 (93,3%)	46 (43,8%)	60 (49,2%)
Negativo	1 (6,7%)	52 (49,5%)	53 (45,0%)
Indeterminado	0 (0,0%)	7 (6,7%)	7 (5,8%)
Total	15 (100%)	105 (100%)	120 (100%)
Kit UFMG	**Positivo**	**Negativo**	**Total**
Positivo	10 (66,7%)	1 (1,0%)	11 (9,2%)
Negativo	2 (13,3%)	93 (88,5%)	95 (79,2%)
Indeterminado	3 (20,0%)	11 (10,5%)	14 (11,6%)
Total	15 (100%)	105 (100%)	120 (100%)

Diante da comparação realizada a partir do método molecular (qPCR-kDNA), em que as amostras positivas também foram confirmadas pela técnica qPCR-GenBank/AF009147, foi possível avaliar o índice de desempenho dos métodos sorológicos (ELISA e DPP®). Considerando como padrão ouro (método de referência) o qPCR (kDNA), tal análise permitiu mensurar a acurácia e validade do diagnóstico sorológico, realizando as seguintes avaliações: verdadeiro positivo (VP), falso negativo (FN), sensibilidade (co-positividade), especificidade (co-negatividade), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e kappa (Tabela 4). Os resultados da validação demonstraram falhas na detecção da infecção do reservatório canino. Todos os testes sorológicos apresentaram sensibilidades menores que 50%. O ELISA (kit UFMG) foi o método com o menor valor de sensibilidade (19,4%) e maior número de falso negativos (n=25). Com relação à especificidade, o método ELISA (kit Bio-manguinhos) apresentou o menor valor de especificidade (62,2%) e elevado número de falsos positivos (n= 48). Os resultados do valor preditivo positivo se revelaram baixos, não ultrapassando 54,5%. O valor

de kappa identificou uma concordância baixa para todos os métodos avaliados (ELISA (kit Bio-manguinhos) kappa=0,2%; ELISA (kit UFMG) kappa=19%; DPP® kappa=36,8%).

Tabela 4: Desempenho dos métodos sorológicos em comparação ao método molecular (qPCR-kDNA) na investigação da prevalência da LVC no município de Ouro Preto, Minas Gerais, ano de 2016.

Método Sorológico	VP	FN	FP	VN	Total	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	p*	kappa (%)
ELISA (Kit Bio-manguinhos)	12	20	48	79	159	37,5	62,2	20,0	79,8	0.0007	0,2
ELISA (kit UFMG)	6	25	5	114	150	19,4	95,8	54,5	82,0	0.0003	19,2
DPP®	7	7	8	58	80	50,0	87,9	46,6	89,2	0.7962	36,8

Nota: (IC) VP = Verdadeiro Positivo, FN = Falso Negativo, FP = Falso Positivo, VP = Verdadeiro Positivo, VN = Verdadeiro Negativo, S = Sensibilidade, E = Especificidade, VPP = Valor Preditivo Positivo, VPN = Valor Preditivo Negativo * Valor p do Qui-quadrado de McNemar

Os resultados obtidos pela técnica qPCR-KDNA (valor de referência) com subgrupos de associação dos três métodos sorológicos estão apresentados na Tabela 5. Considera-se que esForam estabelecidos três subgrupos: negativo (ELISA-), indeterminado (DPP®-/ELISA+, DPP®-/ELISA ZC, DPP®+/ELISA ZC) e positivo (ELISA+/DPP®+). Cada subgrupo representa uma classificação sorológica do animal, a partir do critério de eutanásia do MS (Norma Técnica 2011). O valor preditivo negativo do ELISA Kit-Biomanguinhos foi de 79,8% e 88,7% para os resultados negativos e indeterminados, respectivamente, enquanto que o valor preditivo positivo foi de 50%. Para o kit UFMG, os valores preditivos negativos foram, respectivamente, iguais a 82% e 87,5%, e o valor preditivo positivo igual a 40%.

Tabela 5. Comparação de positividade entre os grupos sorológicos e o método molecular (qPCR-kDNA) na investigação da prevalência da LVC, no município de Ouro Preto, Brasil, Minas Gerais, ano de 2016.

	Grupo Sorológico	qPCR-kDNA		
		Positivo	**Negativo**	**Total de Amostras**
Kit Bio-Maguinhos	ELISA -	20 (6,0%)	79 (59,4%)	99 (59,7%)
	ELISA ZC / DPP® -	1 (3,0%)	6 (4,5%)	7 (4,2%)
	ELISA + / DPP®-	5 (15,2%)	41 (30,8%)	46 (27,7%)
	ELISA ZC / DPP® +	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	ELISA + / DPP® +	7 (21,3%)	7 (5,3%)	14 (8,4%)
	TOTAL	33 (100,0%)	133 (100,0%)	166 (100,0%)
Kit UFMG	ELISA -	25 (75,8%)	115 (86,5%)	140 (84,2%)
	ELISA ZC / DPP® -	1 (3,0%)	11 (8,1%)	12 (7,3%)
	ELISA + / DPP®-	0 (0,0%)	1 (0,8%)	1 (0,6%)
	ELISA ZC / DPP® +	1 (3,0%)	2 (1,7%)	3 (1,8%)
	ELISA + / DPP® +	6 (18,2%)	4 (3,1%)	10 (6,1%)
	TOTAL	33 (100,0%)	133 (100,0%)	166 (100,0%)

Nota: ELISA - (Teste imunoenzimático negativo) ELISA + (Teste imunoenzimático positivo), ELISA ZC (Teste imunoenzimático indeterminado), DPP® - (teste cromatográfico negativo), DPP® + (teste cromatográfico positivo), qPCR-kDNA (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real - Ácido desoxirribonucléico do cinetoplasto).

Para os métodos que avaliaram o número total de amostras (n=726), o maior valor de prevalência foi encontrado pelo ELISA (Bio-manguinhos). Dos métodos que avaliaram somente uma parcela dessas amostras, o diagnóstico do qPCR-kDNA foi o que apresentou o maior valor de prevalência. Os resultados referentes à avaliação do soroprevalência canina, determinada pela concordância de reatividade entre o método DPP® e ELISA (Biomanguinhos), métodos adotados pelo MS, revelaram que o município de Ouro Preto apresentou uma soroprevalência de 1,93% (14/726) (Figura 5).

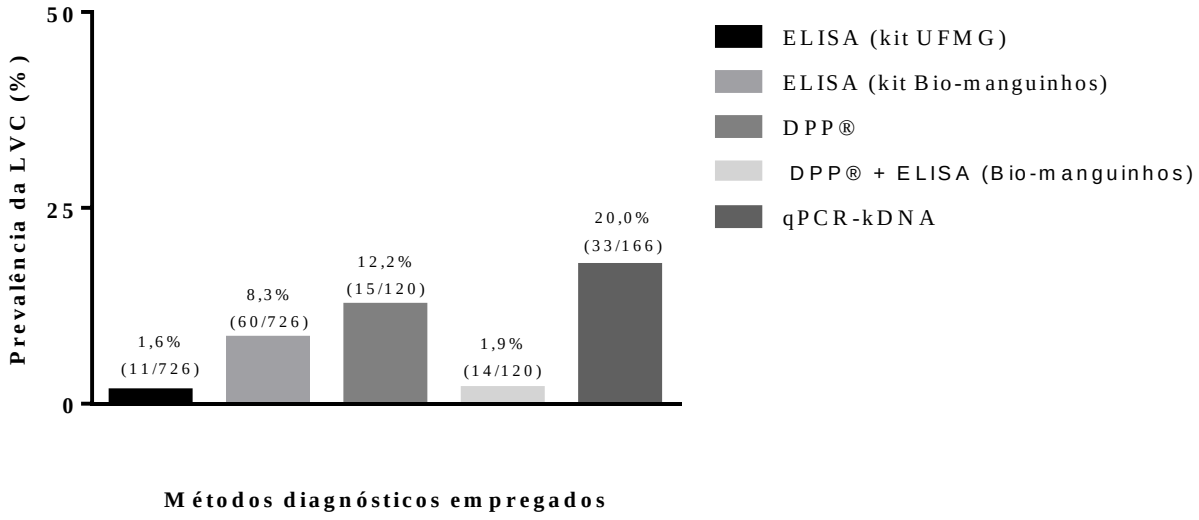


Figura 5: Prevalência da LVC no município de Ouro Preto, conforme o método diagnóstico empregado.

A figura 6 A apresenta o mapa de distribuição da LVC no município de Ouro Preto, ano de 2016, considerando o método diagnóstico ELISA (Bio-manguinhos) e a figura 6 B os resultados do ELISA (kit UFMG). Para o ELISA (kit Bio-manguinhos) apenas o distrito de Engenheiro Corrêa não apresentou casos de LVC. Cães com sorologia indeterminada foram observados em Santa Rita, Ouro Preto, Antônio Pereira, São Bartolomeu, Miguel Burnier e Loc. Motta. Já para o ELISA (kit UFMG), a soropositividade canina ocorreu nos distritos de Antônio Pereira, Loc. Bocaina, Lavras Novas e Cachoeira do Campo. Os sete cães indeterminados eram procedentes dos distritos de Antônio Pereira, Santo Antônio do Salto, Santa Rita, Lavras Novas, Cachoeira do Campo, Santo Antônio do Leite e Amarantina.

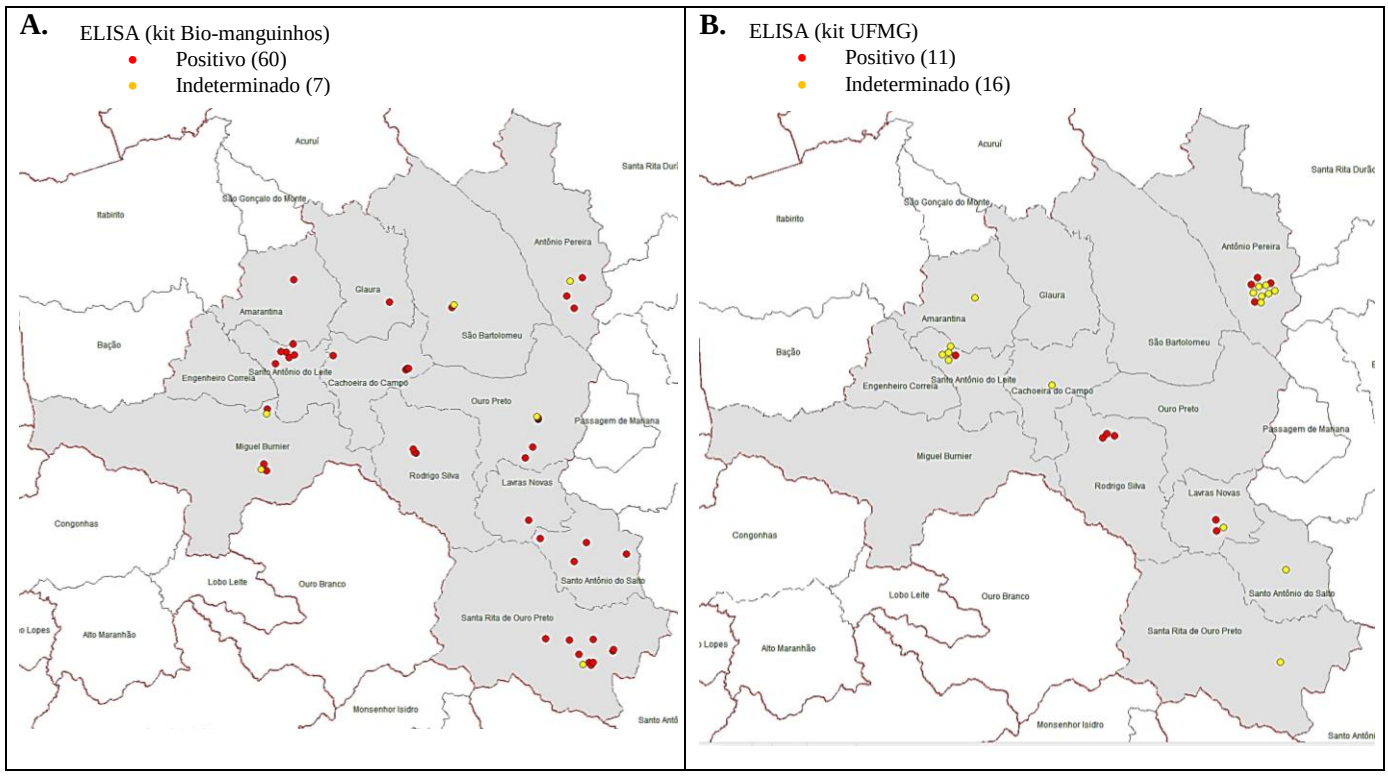


Figura 6. Distribuição geográfica dos pontos de coleta de cães soropositivos ( ) e indeterminados ( ), segundo a técnica do ELISA kit Bio-mangunhos (A) e kit UFMG (B), no município de Ouro Preto, em 2016.

Considerando como critério de positividade o resultado do qPCR-kDNA, 19,9% (33/166) seria a provável prevalência da infecção canina no município de Ouro Preto. Os distritos com LVC foram: Amarantina 0,6% (1/166), Cachoeira do Campo 5,4 % (9/166), São Bartolomeu 0,6% (1/166), Santo Antônio do Salto 1,2% (2/166), Santa Rita 2,4% (4/166), Loc. Mota 0,6% (1/166), e a Sede do município 3,0% (5/166). Além disso, existiram distritos em que a LVC foi positiva tanto para o método sorológico quanto para o método molecular (qPCR-kDNA), foram eles: Lavras Novas: 1,2% (2/166), Rodrigo Silva 3,0% % (5/166) e Antônio Pereira 1,8% (3/166). Apenas o distrito de Engenheiro Correia, Santo Antônio do Leite e Glaura não apresentaram cães infectados pelo q PCR-kDNA (Figura 7).

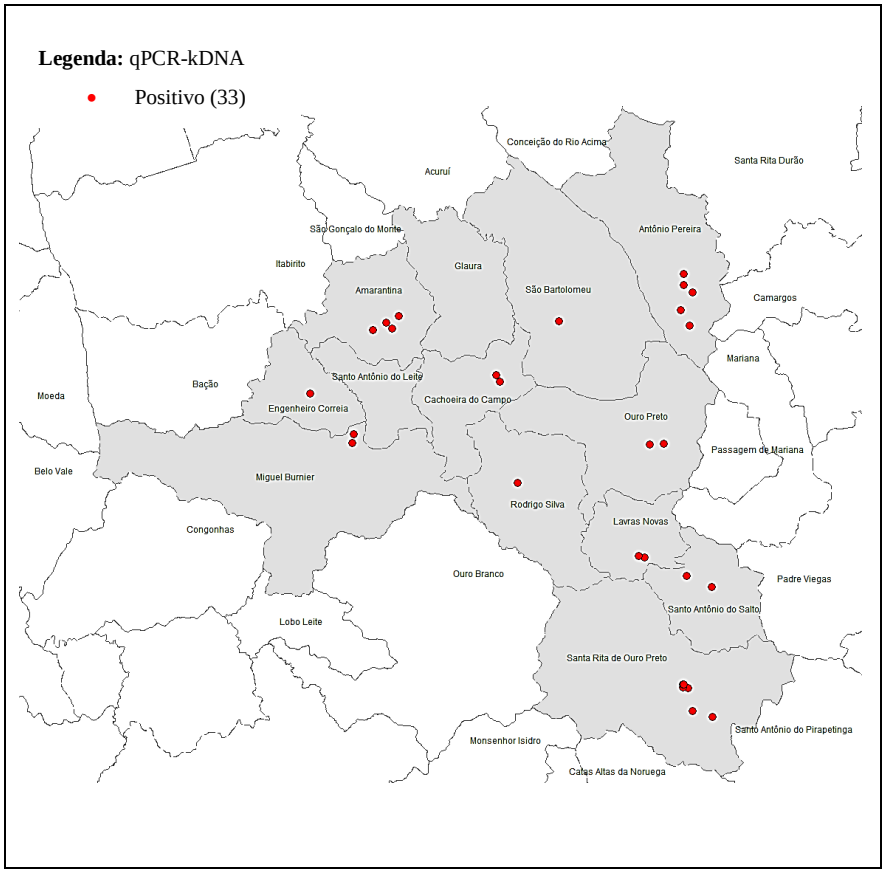


Figura 7. Distribuição geográfica dos pontos de coleta de cães positivos pelo método molecular (qPCR-kDNA), no município de Ouro Preto, em 2016.

Na Tabela 6 estão apresentados os percentuais de cães que seriam indicados para realização de eutanásia, de acordo com a norma técnica PVC-LV (BRASIL, 2011), onde a positividade no método sorológico ELISA (Bio-manguinhos) é que determina a infecção do cão por LV, e seu respectivo resultado na qPCR-kDNA. Assim, 78% das amostras dos subgrupos sorológicos que não seriam encaminhadas para exame confirmatório permaneceram na área como falso-negativos. No subgrupo sorológico ELISA +/DPP®+ apenas 21,2% das amostras foram confirmadas positivas pelo qPCR-kDNA.

Tabela 6 - Percentual de positividade do diagnóstico molecular (qPCR-kDNA) em relação aos grupos sorológicos que determinam ou não a eutanásia dos cães segundo a norma técnica (Brasil 2011), no município de Ouro Preto, no ano de 2016.

Resultado Sorológico	qPCR-kDNA		Total de Amostras
	Positivo	Negativo	
ELISA-, DPP®-/ELISA ZC, DPP®+/ELISA ZC, DPP®-/ELISA +	26 (78,8%)	126 (94,7%)	152 (91,6%)
DPP® +/ELISA +	7 (21,2%)	7 (5,3%)	14 (8,4%)
Total de amostras	33 (100%)	133 (100%)	166 (100%)

Nota: ELISA - (Teste imunoenzimático negativo) ELISA + (Teste imunoenzimático positivo), ELISA ZC (Teste imunoenzimático indeterminado), DPP® - (teste cromatográfico negativo), DPP® + (teste cromatográfico positivo), qPCR-kDNA (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real - Ácido desoxirribonucléico do cinetoplasto). $p < 0,0001$

Considerando o critério de positividade (DPP® +/ELISA +) determinado pelo MS brasileiro, a infecção canina no município de Ouro Preto, estaria presente em seis distritos. Os distritos de Amarantina 0,3% (2/726), Antônio Pereira 0,5% (4/726), Glaura 0,15% (1/726), Lavras Novas 0,15% (1/726), Rodrigo Silva 0,3% (2/726) e Santo Antônio do Salto 0,5% (4/726) foram os únicos a apresentar cães positivos para LV (Figura 8).

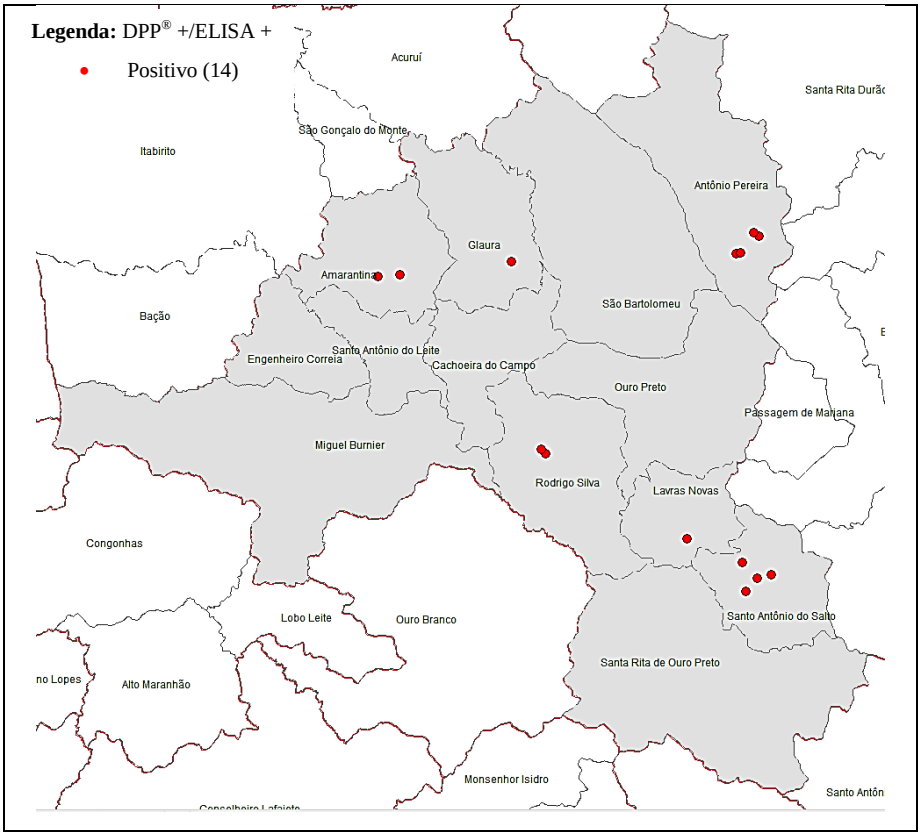


Figura 8. Distribuição geográfica dos pontos de coleta de cães positivos ( ) e negativos ( ) pelo método sorológico (DPP® +/ELISA +), no município de Ouro Preto, em 2016.

Dos animais encaminhados para eutanásia, segundo o resultado do ELISA (kit Bio-manguinhos), foi possível a realização da necropsia de apenas dois (n=2/60). Esses dois cães apresentaram sinais clínicos de LV, um deles possuía como sinais o emagrecimento e onicogrifose e o outro possuía dermatite localizada na ponta da orelha. A presença do DNA do parasita pelo diagnóstico molecular (qPCR-kDNA) foi observada nas duas amostras em todos os tecidos avaliados linfonodo mesentérico, borda distal da orelha, medula e baço. No teste parasitológico de *imprinting* desses tecidos foram encontradas formas amastigotas em todos os tecidos, exceto na pele de um desses cães.

Em todos os tecidos positivos acima e em 30,3% das amostras de sangue total (10/33) dos cães positivos pela PCR-kDNA, foram identificadas presença de DNA pela técnica do PCR-RFLP. A espécie encontrada em todas elas foi a *L. infantum* (Figura 9).

Figura 9: Fragmentos gerados pelo PCR-RFLP em gel de agarose 4,0%, tendo como objetivo a caracterização das espécies de *Leishmania* pela enzima Hae III. Pb (pares de base) PM (peso molecular - 120 pares de bases), CN (controle negativo), A^1 a A^{14} (amostras dos cães do estudo), La (*L. amazonensis*), Lb (*L. braziliensis*) e Li (*L. infantum*). As Amostras A^2, A^5 e A^6 foram identificadas como *L. infantum*.

A infecção canina, no município de Ouro Preto, é uma confirmação da transmissão da LV. Em busca de maiores esclarecimentos epidemiológicos quanto à situação dessa doença nesta região, o estudo entomológico também foi realizado. A captura de flebotomíneos foi estabelecida em sete pontos, todos eles em peridomicílios de residências que apresentavam cães soropositivos (DPP® +/ELISA **+)** (Figura 10). Os pontos de coleta apresentavam altitudes distintas, sendo o distrito de Antônio Pereira o de menor altitude média (860m) e o distrito de Lavras Novas o de maior (1369 m). Foi capturado o total de 49 flebotomíneos em todos os pontos estabelecidos, independente da altitude, sendo que o *Lu. longipalpis* foi encontrado apenas nos distritos de Antônio Pereira e Cachoeira do Campo. Os números de exemplares de flebotomíneos, coletados no período de um ano de acordo com sexo, infecção canina, altitude e distrito de coleta estão apresentados na Tabela 7.

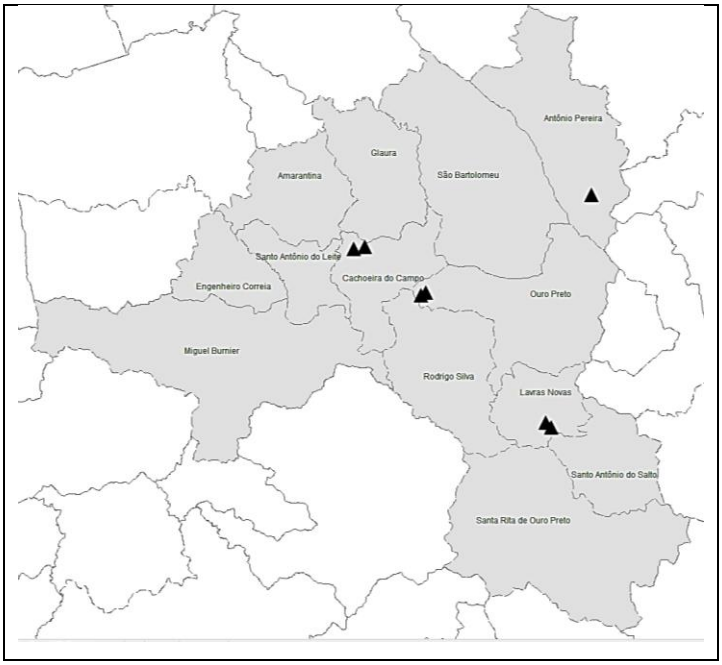


Figura 10: Pontos de coleta entomológica no município de Ouro Preto, em 2017.

Tabela 7: Número de flebotomíneos capturados no período de junho de 2017 a maio de 2018, de acordo com o sexo, distrito de coleta e altitude dos pontos de coleta, no município de Ouro Preto, Minas Gerais.

Distritos	**Altitude (m) Média (ponto de captura)**	**Número de flebotomíneos**		
		Machos	**Fêmeas**	**Total**
Antônio Pereira	860	2 (10,5%)	2 (6,7%)	4 (8,2%)
Bocaina	1109	7 (36,8%)	10 (33,3%)	17 (34,7%)
Cachoeira do Campo	1039	9 (47,4%)	17 (56,7%)	26 (53,0%)
Lavras Novas	1369	1(5,3%)	1 (3,3%)	2 (4,1%)
Total	**-**	**19 (100%)**	**30 (100%)**	**49(100%)**

O número total de fêmeas de flebotomíneos coletados foi de 30 (61,2%) e de machos 19 (38,8%). A razão de fêmeas/machos foi de 1,57. O distrito de Cachoeira do Campo foi o local com o maior número de flebotomíneos capturados. Ao contrário do que era esperado, o distrito de maior frequencia da LVC (Antônio Pereira) foi o que apresentou o maior número de *Lu. longipalpis* (n=3). Ao comparar altitude e número de possíveis vetores para LV, nota-se que os distritos localizados em altitude menores

apresentaram o maior número de coleta, levando em consideração que o distrito de Antônio Pereira não obedeceu a esse tipo de observação.

Do total de 49 espécimes capturada, apenas dois exemplares não foram identificados. A identificação realizada conforme classificação proposta por Galati (2003) revelou a presença de oito gêneros e o total de 12 espécimes nos distritos avaliados. A fauna de flebotomínica, encontrada no município de Ouro Preto, foi: *Lutzomyia longipalpis* (Lutz&Neiva, 1912) (8,16%); *Evandromyia lenti* (Mangabeira, 1938) (18,37%); *Brumptomyia* spp. (França & Parrot, 1921) (8,17%); *Brumptomyia troglodytes* (Lutz, 1922) (2,04%), *Brumtomyia ortizi* (Silva & Falcão 1971) (6,12%), *Evandromyia cortelezzii* (Brethes, 1923) (4,09%), *Evandromyia termitophila* (Martins, Falcão & Silva, 1964) (2,04%); *Migonemyia migonei* (França, 1920) (8,16%), *Pintomyia fischeri* (Pinto, 1926) (14,29%), *Pintomyia misionensis* (Castro, 1959) (2,04%), *Psychodopygus lloydi* (Antunes, 1937) (24,48%) *e Psychodopygus* sp. (Foratttini, 1971) (2,04%) A espécie *Psychodopygus lloydi* foi a que apresentou a maior número de exemplares capturados (n=12). As espécies *Brumptomyia troglodytes*, *Evandromyia termitophila* e *Pintomyia misionensis* tiveram apenas um exemplar coletado. A Tabela 8 apresenta o sexo e as espécies de flebotomíneos que foram resultantes do estudo entomológico realizado no município de Ouro Preto.

Tabela 8: Espécies identificadas, sexo e número de flebotomíneos capturados no estudo entomológico realizado, no município de Ouro Preto, Minas Gerais, no período de junho de 2017 a maio de 2018.

Flebotomíneos identificados	Machos	Fêmeas	Total	Porcentagem
Evandromyia lenti	2	7	9	18,37%
Brumptomyia spp.	1	3	4	8,17%
Brumptomyia troglodytes	1	-	1	2,04%
Brumtomyia ortizi	3	-	3	6,12%
Evandromyia cortelezzii	1	1	2	4,09%
Evandromyia termitophila	-	1	1	2,04%
*Lutzomyia longipalpis**	2	2	4	8,16%
*Migonemyia migonei**	3	1	4	8,16%
Pintomyia fischeri	2	5	7	14,29%
Pintomyia misionensis	-	1	1	2,04%
Psychodopygus lloydi	4	8	12	24,48%
Psychodopygus sp.	-	1	1	2,04%
Total	**19**	**30**	**49**	**100%**

* Espécies suspeitas de serem vetoras de *Leishmania* spp.

A captura da espécie *Lu. longipalpis*, foi realizada em dois distritos do município de Ouro Preto, o distrito de Antônio Pereira e o distrito de Cachoeira de Campo. As espécies *Pintomyia fischeri* e *Psychodopygus lloydi* foram encontradas em dois distritos vizinhos, Rodrigo Silva (localidade Bocaina) e Cachoeira do Campo. Embora o número de flebotomíneos capturados não tenha sido alto, a diversidade de espécies encontradas superou o número de pontos de captura. O distrito de Cachoeira do Campo apresentou oito espécies capturadas. A seguir, a Tabela 9 revela a diversidade de flebotomíneos capturados e seus pontos de captura no município de Ouro Preto.

Tabela 9: Diversidade de flebotomíneos capturados e sua origem de captura no município de Ouro Preto, no período de junho de 2017 a maio de 2018.

Espécies	**Distritos de Coleta**				**Total**
	Antônio Pereira (860m)	**Bocaina (1109 m)**	**Cachoeira Campos (1039 m)**	**Lavras Novas (1369 m)**	
Evandromyia lenti	-	-	8	1	9
Brumptomyia spp.	-	4	-	-	4
Brumptomyia troglodytes	-	-	-	1	1
Brumtomyia ortizi	-	3	-	-	3
Evandromyia cortelezzii	1	-	1	-	2
Evandromyia termitophila	-	1	-	-	1
*Lutzomyia longipalpis**	3	-	1	-	4
*Migonemyia migonei**	-	-	4	-	4
Pintomyia fischeri	-	1	6	-	7
Pintomyia misionensis	-	-	1	-	1
Psychodopygus lloydi	-	8	4	-	12
Psychodopygus sp.	-	-	1	-	1
Total	**4**	**17**	**26**	**2**	**49**

* Espécies suspeitas de serem vetoras de *Leishmania* spp.

O estudo entomológico permitiu que dados climáticos fossem contrastados com o número de flebotomíneos capturados em cada mês. Os dados de temperatura, umidade relativa do ar, precipitação pluviométrica mensal e velocidade do vento foram os registrados. Observa-se um maior número de flebotomíneos coletados nos meses em que ocorreram maiores temperaturas (Figura 11), maior umidade relativa do ar (Figura 12) e maior precipitação (Figura 13). A figura 14 demonstra que os meses em que a velocidade do vento foi menor, foram os mais propícios para a captura do vetor.

Figura 11: Gráfico de distribuição dos flebotomíneos capturados com relação à temperatura (°C), no município de Ouro Preto, Minas Gerais, no período de junho de 2017 a março de 2018.

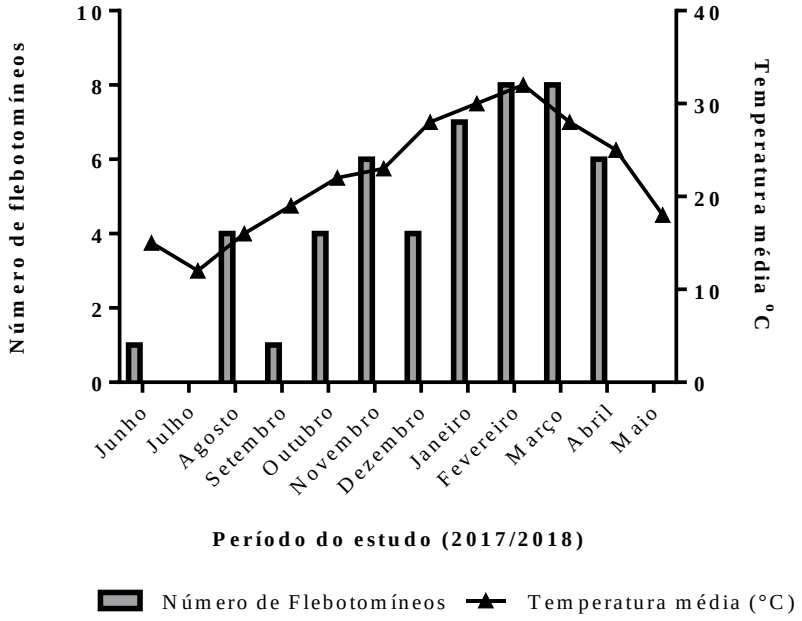


Figura 12: Distribuição dos flebotomíneos capturados com relação à umidade relativa do ar (%), no município de Ouro Preto, Minas Gerais, no período de junho de 2017 a março de 2018.

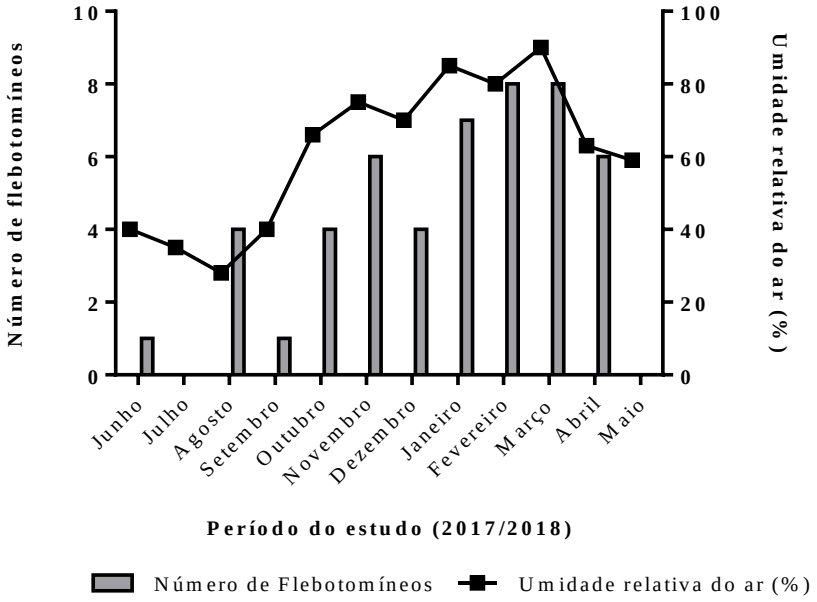


Figura 13: Distribuição dos flebotomíneos capturados com relação à precipitação (mm), no município de Ouro Preto, Minas Gerais, no período de junho de 2017 a março de 2018

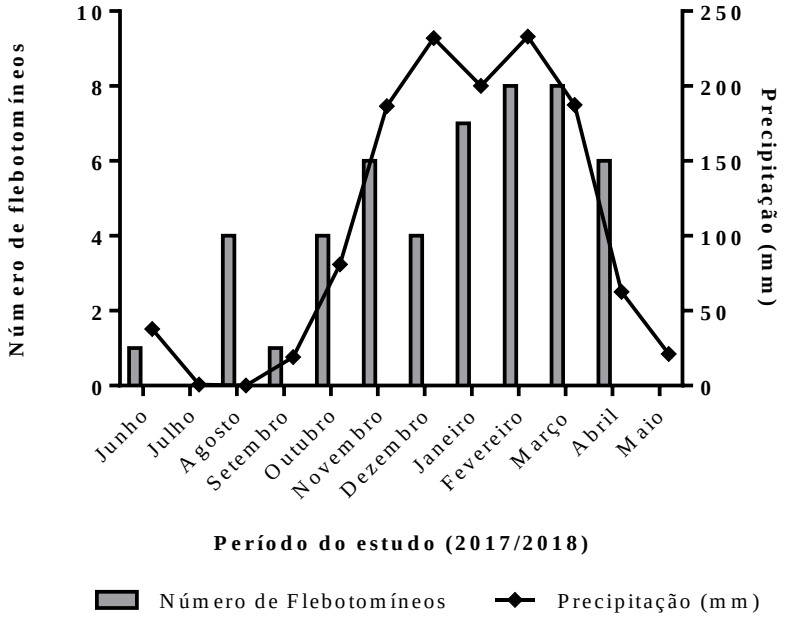
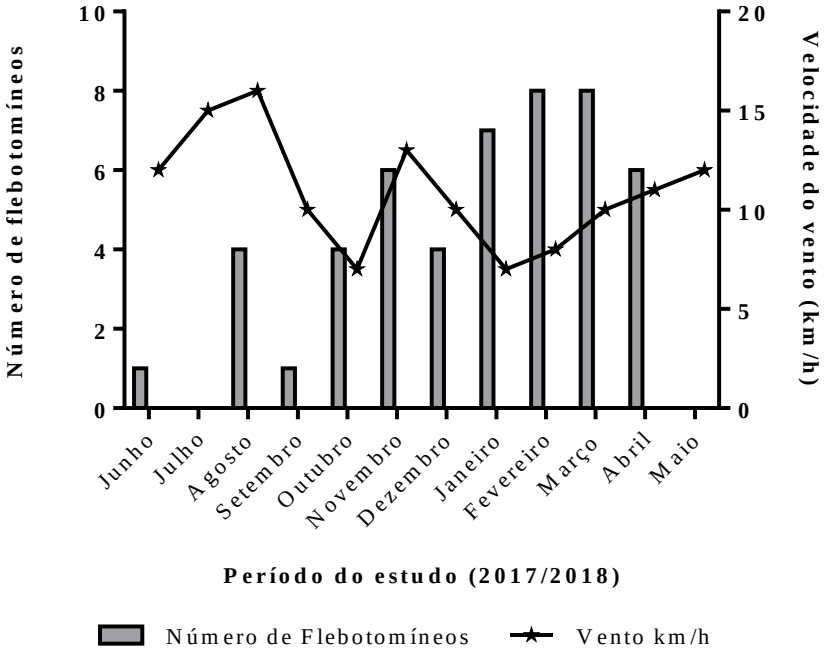


Figura 14: Distribuição dos flebotomíneos capturados com relação à velocidade do vento (km/h), no município de Ouro Preto, Minas Gerais, no período de junho de 2017 a março de 2018.



A infecção natural não foi evidenciada em nenhuma amostra das fêmeas (n=30) de flebotomíneos coletados. O PCR cacofonia (gene constitutivo do DNA de flebotomíneos) foi positivo para todas as amostras, não detectando nenhum amplificado do DNA de *Leishmania*. Essa técnica não somente avaliou a presença de infecção das amostras, como também validou o processo de extração do DNA.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A investigação realizada no presente estudo, contou com um inquérito amostral em que a frequência dos cães avaliados superou a frequência esperada para a maior parte dos distritos ou localidades, de acordo com a campanha de vacinação antirábica do ano de 2016. A infecção canina por LV foi definida por diferentes métodos diagnósticos, e foi calculada a acurácia e os índices de validade dos testes empregados. A baixa concordância dos métodos sorológicos com o método molecular foi observada. O método ELISA (kit Bio-maguinhos) apresentou 37,5% e 62,2% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. O mesmo método, porém, de fabricante diferente (kit-UFMG) obteve o menor resultado de sensibilidade (19,4%) e alta especificidade (95,8%). O método cromatográfico DPP® também revelou comportamento similar, baixa sensibilidade (50%) e maior especificidade (87,9%). Os valores do Kappa não ultrapassaram o valor de 36,8%. A prevalência da LVC no município de Ouro Preto, considerando a concordância dos métodos sorológicos DPP® e ELISA (Bio-manguinhos) foi de 1,93%. No entanto, considerando o diagnóstico molecular (qPCR-kDNA), cães estavam infectados e a prevalência da infecção passou a ser de 20,0%, indicando áreas de expansão da doença. A espécie responsável pela infecção dos cães foi a *L. infantum.* A prevalência da LVC variou significativamente entre as áreas avaliadas e o principal vetor da doença, o *L. longipalpis*, foi encontrado em dois distritos do município.

O cão doméstico é considerado o reservatório de maior importância epidemiológica para LV, sendo a principal fonte da infecção em áreas urbanas (Teles et al., 2015; Werneck, 2016). A detecção precisa do animal infectado é crucial para reduzir a transmissão da doença para os humanos e conter a disseminação geográfica (Anfossi et al., 2018). A estreita proximidade com o homem, a suscetibilidade ao parasito, o alto parasitismo cutâneo, a permanência do cão assintomático por um grande período de tempo e a elevada prevalência da doença nesses animais faz com que a o reservatório canino seja incluído na dinâmica de controle da LV (Dantas-Torres et al., 2019). Sendo assim, o manual de vigilância e controle da LV (Brasil, 2006) determina o inquérito canino como uma das ferramentas de fundamental relevância (Peixoto et al., 2015), tendo o delineamento amostral e a acurácia dos métodos diagnósticos como pontos primordiais para o sucesso das medidas de intervenção.

A população de 726 cães avaliados, contou em sua maioria com animais de médio a grande porte (n=508; 70,0%), que possuíam pelo curto (n=450; 62,0%) e não permaneciam soltos na rua (n=379; 52,2%). De acordo com França e Silva et al (2003) cães com pelo curto, e de determinadas raças apresentam maior suscetibilidade à infecção por LV. As características observadas nesta amostra também foram semelhantes às observadas por de Almeida Leal et al. (2017), que as definiram como fatores de risco associados para a LV. Segundo esses autores, cães de tamanho médio possuíam de 1,3 a 1,8 vezes

mais chances de serem infectados por LV, além disso, terem pelo curto e o fato de dormirem no quintal faziam com que esses tivessem 1,8 e 2,6 vezes mais chances de adquirirem a doença respectivamente.

Quanto aos sinais clínicos sugestivos para LVC, a investigação no município de Ouro Preto, se deu em animais em sua maioria assintomáticos (78,5%). A falta de sinais clínicos é uma condição observada na maioria dos cães soropositivos para a LV, sendo esses capazes de infectar o vetor e manterem o ciclo de transmissão (Coura-Vital et al., 2011; Abrantes, 2018).

O emagrecimento (n=69; 44,2%) e dermatite localizada/generalizada (n=39; 25,0%) foram os sinais mais recorrentes quando o cão apresentava sinais sugestivos para a doença. Figueiredo et al. (2014) em estudo no município de Colares, estado do Pará, também observou que as alterações cutâneas foram um dos sinais mais frequentes nos cães sororeagentes. No entanto, tanto nos estudos de Figueiredo et al. (2014) quanto nos estudos de Silva et al. (2017) a maioria dos cães sororeagentes para a LV não apresentavam nenhum sintoma da doença.

A avaliação clínica é complexa, sendo apenas uma das informações para o diagnóstico da LVC. Estudos apontam que mais da metade da população canina infectada permanece assintomática e, quando os sinais clínicos aparecem, esses podem ser facilmente confundidos com outras enfermidades (Ikeda-Garcia & Feitosa, 2006; Queiroz et al., 2010). Diante dessa complexidade, o diagnóstico clínico deve ser associado a outros métodos para uma informação mais precisa sobre a existência da infecção (Freitas et al., 2012).

O método sorológico é amplamente empregado no diagnóstico da LVC, sendo um dos principais determinantes da infecção em inquéritos caninos. No entanto, a acurácia desse diagnóstico vem sendo questionada. Segundo Romero & Boelaert (2010), Grimaldi et al. (2012) e Werneck (2016) falhas nos métodos sorológicos são um dos fatores que contribuem para a ineficiência das ações de vigilância e controle da LV.

Atualmente, de acordo com o que é preconizado pelo MS (norma técnica 2011), o método ELISA (kit Bio-manguinhos) é o teste sorológico empregado como confirmatório para a constatação da infecção do cão. De acordo com as avaliações de Ferreira et al. (2007), da Silva et al. (2012) e Laurenti et al. (2014) este método apresenta uma maior sensibilidade do que especificidade, contrariando o seu emprego como método de confirmação do diagnóstico. No presente estudo ao ser comparado o ELISA (kit Bio-manguinhos) com o (kit UFMG) foi observado que o primeiro identificou um maior número de cães infectados (n=60) e um menor número de indeterminados (n=7). Destes apenas 10 cães permaneceram como positivos e um como indeterminado pelo ELISA kit (UFMG). A variação e pouca concordância entre esses métodos podem ser explicadas pelo antígeno utilizado em cada kit. O ELISA (kit Bio-manguinhos) utiliza o antígeno não específico para *Leishmania* viscerotropica (*Leishmania* major-like) diferentemente do ELISA (kit UFMG) que utiliza antígeno bruto, porém específico (*L. infantum*).

Segundo Assis et al. (2008) variações de sensibilidade e especificidade podem ocorrer quando antígenos brutos de *Leishmania* spp. são empregados. Os antígenos brutos de modo geral tendem a apresentar maiores sensibilidades quando comparado aos antígenos específicos (Rodríguez-Cortés et al., 2010). No entanto, o antígeno bruto favorece reações cruzadas com outras doenças (Rosário et al. 2005) visto que os animais investigados também poderiam estar com co-infecções.

A partir de 2011, o Ministério da Saúde brasileiro adotou o método cromatográfico DPP® como um dos testes diagnósticos para a LV. Este substituiu o método de imunofluorescência indireta (IFI) e foi estabelecido como método de triagem (Coura-Vital et al., 2014). Estudos apontam para questionamentos quanto à efetividade desse algoritmo, na medida em que o DPP® é título dependente, mantendo muitos cães falsos negativos nas áreas endêmicas (Grimaldi et al., 2012; de Santis et al., 2013). Segundo Grimaldi et al. (2012) e Quinnell et al. (2013), os testes cromatográficos baseados no antígeno rk39 apresentam sensibilidades baixas para serem utilizados como parâmetros para medidas de controle da LVC. Neste estudo o método DPP® identificou apenas 23% (n=14) das 60 amostras positivas pelo ELISA (kit Bio-manguinhos) e os sete cães com absorbância dentro da faixa de zona cinza (indeterminados) apresentaram resultado negativo neste teste.

Ao contrário, o kit UFMG em relação ao DPP® apresentou maior co-negatividade (88,5%) do que co-positividade (66,7%). A concordância entre esses métodos pode estar associada às semelhanças entre os antígenos utilizados. Ambos os diagnósticos apresentam antígenos quimicamente definidos e específicos do parasita *L. infantum*, o que faz com que esses sejam mais concordantes. A associação em série desses métodos diagnósticos favorecem a alta especificidade, mas, no entanto menor capacidade de detecção da infecção. Lopes et al. (2017) observou que os métodos sorológicos (DPP® e ELISA) são precisos na identificação de animais infectados, mas a baixa sensibilidade faz com que esses deixam de identificar um número não desprezível de falso negativos. Teixeira et al. (2019) em um estudo destinado a validar os testes sorológicos para LVC, constatou que os métodos do ELISA (antígeno específico rK39) e o DPP® possuíam sensibilidades baixas (37,68% e 21,74% respectivamente) e alta especificidades (92,59% e 83,33% respectivamente), concluído que os índices de sensibilidade devem ser a prioridade no desenvolvimento de novos testes sorológicos, principalmente para o grupo de cães assintomáticos.

Em relação ao qPCR (kDNA), os métodos sorológicos demonstram apresentar falhas diminuindo a validade e a acurácia entre esses métodos. Em estudos de validação como este, que utilizaram o método molecular como referência, foi possível concluir que a concordância dos métodos sorológicos variou de baixa a moderada, gerando impacto nas medidas de controle quanto à eliminação do reservatório canino (Lopes el al., 2017; Teixeira et al., 2019). Em relação ao kDNA, o método ELISA (kit Bio-manguinhos) obteve baixo índice de sensibilidade (37,5%) e especificidade (62,2%) não sendo esse eficiente na identificação de 20 cães (62,5% de falsos negativos). Comportamento similar foi observado no método

ELISA (kit-UFMG), em que o número de cães falso negativos foi igual a 25, equivalente a 80,6%. A falta de precisão desses métodos deixou de identificar uma parcela considerável de animais infectados, que permaneceram na área e que poderiam ser responsáveis pela manutenção do ciclo de transmissão da LV. O teste cromatográfico DPP® também não apresentou bom desempenho, apesar de ter sido avaliado em uma subamostra, podendo ter deixado 50% de falsos negativos na área. A falta de significância ($p = 0.79$) entre o DPP e o qPCR pode estar atrelada ao número e tipo de amostras investigadas pelo teste. Passaram por investigação do DPP® apenas 120 amostras que já haviam sido classificadas pelo método do ELISA (kit Bio-manguinhos) como: positivas, negativas ou indeterminadas.

O desempenho do diagnóstico molecular fez com que este fosse escolhido como padrão de comparação (padrão ouro) para avaliar o índice de desempenho dos métodos sorológicos (ELISA e DPP®). Segundo Carson et al. (2010), o método da PCR quantitativa (qPCR) passa a ser considerado o método mais confiável por apresentar alta sensibilidade. De acordo com o alvo escolhido a sensibilidade desse teste é capaz de detectar entre 0,001 a 0,1 parasitas por reação. A maioria dos testes moleculares destinados à detecção de espécies de *Leishmania* tem como alvo os minicírculos de DNA contidos cinetoplasto do parasito (kDNA) (Travi et. al, 2018). Segundo Yıldız Zeyrek et al. (2017) o kDNA é um dos alvos ideais para o diagnóstico de leishmanioses.

Vários protocolos baseados na qPCR têm sido descritos para *Leishmania*, e muitas sequências alvo já foram identificadas, como também um grande número de iniciadores específicos foram desenhados (Hussain et al. 2017). O minicirculo do kDNA é o alvo mais descrito dessa técnica e sua vantagem está no alto número de cópias, garantindo maior sensibilidade no diagnóstico (Galluzzi et al. 2018). Por isso, a escolha deste para a validação do inquérito realizado nesse presente estudo. No entando, essas multicópias do minicículo do kDNA podem afetar a quantificação da carga parasitária de uma amostra, sofrendo esse número variação entre as espécies de *Leishmanias* ou entre isolados de uma única espécie (Mary et al., 2004; Weirather et al. 2011). Sendo assim, tal fato justifica a ausência de resultados de quantificação doa animais positivos deste estudo.

Entendendo as limitações ao se utilizar o alvo do minicírculo do kDNA e tendo o intuito de descrever a relação entre parasitemia do cão e diagnóstico sorológico, deverá ser adicionado a esse estudo a quantificação a partir de um gene de cópia única. Alvos genômicos, como descritos por Bretagne et al. (2001), possuem melhor precisão quantitativa. Mas estes não poderiam ter sido pensados para toda a conduta do presente estudo, pois possuem baixa sensibilidade, não detectando amostras de baixas cargas parasitárias que poderiam acontecer em cães assintomáticos ou em início de infecção.

O resultado do kappa para todos os métodos sorológicos se revelou fraco. Essa discordância entre os métodos sorológicos e o qPCR (kDNA) pode estar relacionada a maioria dos animais positivos apresentarem uma baixa carga parasitária (<50 parasitos/mL), ausência de sinais clínicos (n=24) e baixa resposta imunológica (diagnóstico sorológico negativo com DO < 0,170 nm). Os resultados encontrados vem ao encontro do que foi afirmado por Solano-Galego et al. (2011) e Torrecilha et al. (2016) quando definem que o diagnóstico da LVC é mais fácil em animais sintomáticos, por esses apresentarem altos níveis de anticorpos e uma maior carga parasitária no sangue e nos tecidos. Reis et al. (2006) relataram que o tipo e a concentração de imunoglobulina podem variar de acordo com o estado clínico e carga parasitária do cão infectado. Segundo Riboldi et al. (2018), o método molecular é uma alternativa precisa de diagnóstico para a LVC, especialmente em cães assintomáticos em áreas não endêmicas.

Os inquéritos caninos, principalmente em áreas não endêmicas e de transmissão esporádica como o município de Ouro Preto, necessitam de métodos que apresentem um menor número de falsos negativos e que sejam mais sensíveis na detecção do parasito, frente à baixa prevalência esperada e consequente necessidade de se utilizar métodos com maior valor preditivo dos resultados negativos. No entanto, os valores de especificidade não são menos importantes, pois determinam a eliminação do cão. De acordo com Pessoa-e-Silva et al. (2019) resultados falso-positivos e falso-negativos podem estar ocorrendo nos programas de controle e, dessa forma a estratégia de eutanásia dos cães infectados deve ser repensada e discutida. Em relação ao qPCR (kDNA), o ELISA (kit UFMG) foi o que apresentou maior especificidade (95,8%), seguido do DPP (87,9%). O ELISA (kit Bio-manguinhos), em função de sua alta sensibilidade, apresentou menor especificidade (62,2%). De forma que os primeiros, ao contrário do proposto, deveriam ser utilizados como métodos confirmatórios e não como triagem, como atualmente definido para o DPP®.

A estreita relação de casos caninos e humanos para a LV (Troncarelli et al., 2012; Campos et al., 2017) faz com que a eliminação do reservatório ainda prevaleça como medida de controle. Os estudos de França-Silva el al. (2003), Maia et al. (2008) e Costa et al. (2013) demonstram relação positiva entre a eliminação de cães infectados e a diminuição dos casos de LV humana. Porém, Costa (2011), Dantas-Torres et al. (2019) e Pessoa-e-Silva et al. (2019) apontam que tal medida não é eficiente na contenção da doença. Um dos motivos, para a controvérsia entre os autores, pode estar relacionado à baixa acurácia dos inquéritos sorológicos, fato esse que possibilita a permanência de cães infectados na área, garantindo a permanência da dinâmica de transmissão da LV (Costa et al., 2018). Além disso, é importante considerar que existe a dificuldade de operacionalização do diagnóstico diante do grande número de amostras geradas pelos inquéritos censitários caninos, a rápida reposição de cães em substituição aos animais eliminados e a pouca atuação da educação em saúde no controle da doença.

Desde o ano de 2001, o município de Ouro Preto vem registrando casos esporádicos de LV humana. Segundo dados do SINAN/SVS/MS (2018), foram notificados oito casos de LV entre os anos de

2010 a 2017, sendo quatro destes confirmados como autóctones. No entanto, mesmo diante desse registro de casos, pouca atenção tem sido dada à infecção. Os resultados de frequência da LVC e do estudo epidemiológico são as primeiras informações quanto à transmissão da doença no município.

O presente estudo descreveu distintos percentuais de prevalência, considerando os diferentes métodos diagnósticos que foram utilizados. Levando em consideração a prevalência determinada pela concordância de reatividade entre o método DPP® e ELISA (Biomanguinhos), métodos adotados pelo MS, o município de Ouro Preto apresentou 1,93% (14/726) de prevalência da LVC, atingindo seis áreas distritais: Amarantina, Antônio Pereira, Glaura, Lavras Novas, Rodrigo Silva e Santo Antônio do Salto. Considerando o diagnóstico molecular (qPCR-kDNA), a prevalência foi mais elevada (19,9%) e descrevendo uma maior área de transmissão da doença (apenas três distritos não tiveram cães infectados). Tais dados demonstram a presença do reservatório canino e classificam o município de Ouro Preto como área esporádica de transmissão para LV (<2,4 casos nos últimos 5 anos), segundo o manual de controle e vigilância da LV (Brasil, 2016).

Estudo semelhante a este, foi realizado por Riboldi et al. (2018) em uma nova área de expansão da LV na região metropolitana do Paraná. Esses pesquisadores utilizaram os métodos sorológicos preconizados pelo MS (DPP® e ELISA Bio-manguinhos) e também o qPCR como meios para descrever a prevalência. O diagnóstico molecular detectou 4% de prevalência da LVC ao contrario dos métodos sorológicos que só constataram 1,7% de cães infectados. Utilizando o kit UFMG associado ao DPP® essa prevalência foi menor (1,4%). Em Minas Gerais, no município Formiga, utilizando métodos sorológicos semelhantes (DPP® e ELISA), diagnóstico molecular a partir do LnPCR e investigando também uma área recente para transmissão da LV, Menezes et al. (2015) observaram uma prevalência de 5,8% e 7,9% para o diagnóstico sorológico e molecular respectivamente, registrando que dez cães estavam infectados por *L. infantum* e três por *L. braziliensis* no município de Formiga. Assim como nesse último estudo, Ouro Preto identificou dez cães infectados por *L. infantum* apontando a circulação e o risco de transmissão da LV para humanos.

O georeferenciamento e construção de mapas temáticos permitiram a compreensão dos padrões espaciais da doença, sugerindo que alguns fatores ambientais como altitude e clima estariam associados à ocorrência da transmissão. Vários autores tem utilizado essa metodologia para o monitoramento das medidas de controle e planejamento em saúde (Machado-Coelho et al., 1999; Margonari et al., 2006; Prado et al., 2011; Mayrink et al., 2013; Borges et al., 2014; Menezes et al., 2015; Toledo et al., 2017). Os mapas de distribuição geográfica da LVC, fornecidos por este estudo, demonstram uma distribuição heterogênea da doença quanto aos métodos de investigação utilizados. O diagnóstico do ELISA (kit Bio-manguinho) apresentou uma ampla área de infecção, ao contrário do kit-UFMG, que determinou apenas quatro distritos com cães infectados. A concordância dos métodos preconizados pelo MS (DPP® e ELISA)

delimitou uma menor área de transmissão. O diagnóstico molecular demonstrou que quase todo o município de Ouro Preto, está sobe o risco de infecção humana, tendo detectado o reservatório canino em quase todas as sedes distritais e apresentando a existência da dispeção da zoonose. Esses resultados sugerem que a doença possa teradentrado no município a partir de áreas endêmicas como Belo Horizonte (83 casos humanos notificados em 2017) e de transmissão esporádica como Mariana e Itabirito (2 casos humanos nos últimos 5 anos) (SINAM 2018). Tal suposição foi levantada, por que as áreas com maior prevalência da infecção canina, detectada tanto por sorologia quanto pelo diagnóstico molecular, são aquelas que fazem limites ou que apresentam maior fluxo de pessoas provenientes desses locais.

Adaptação de reservatórios e vetores a ambientes modificados geram diferentes padrões de transmissão e fazem com que a LV apresente complexidade de controle (Curti, 2009; Ferreira et al., 2012; Maia et al., 2018). A expansão dessa doença no meio urbano e periurbano tem como fator significativo a modificação do ambiente (Teles et al., 2015; Silva et al., 2016). A intervenção do homem no meio elimina os habitats naturais de vetores e reservatórios e faz com que os seres humanos venham a participar do ciclo de transmissão da doença (Antonialli et al., 2007). Ouro Preto por ser um município turístico, universitário e que possui a mineração como uma das suas fontes de economia, certamente convive e sofre com possíveis consequências da ação antrópica. Fatores como migração/turismo, movimentação de animais, interferência do homem no ambiente, extrativismo mineral, uso inadequado do solo, ocupação de áreas de forma inadequada, são condições que contribuem para a transmissão da LV (Gontijo & Melo, 2004; Baneth et al., 2008; Miró et al., 2008; Werneck, 2008; Cerbino-Neto et al., 2009; Scandar et al., 2011; Torres-Guerrero, 2017).

O município de Ouro Preto, apesar de baixa abundância de espécimes, apresentou uma grande riqueza de espécies. O estudo entomológico permitiu identificação de 12 espécies de flebotomíneos pertencente a seis gêneros. O distrito de Cachoeira do Campo foi o que apresentou maior diversidade, tendo sido capturado nesse local, oito espécies de flebótomíneos.

A principal espécie vetora dessa zoonose, a *L. longipalpis*, foi capturada nos distritos de Antônio Pereira e Cachoeira do Campo que apresentam proximidades com áreas endêmicas (Mariana e Itabirito, Belo Horizonte, respectivamente) e estão próximos a rodovias de acesso ao município. Cardim et al. (2016) observaram que a expansão dos casos humanos de LV ocorridos na região oeste do estado de São Paulo parece estar relacionada ao fluxo de pessoas, mercadorias e serviços por ferrovias e, principalmente, por rodovias da região. A expansão da LV canina e humana no município de Belo Horizonte vem sendo observada desde 1993 e, Belvilacqua et al. (2001) descreveram que essa zoonose foi introduzida a partir de foco existente no município vizinho de Sabará.

Este estudo foi o primeiro relato sobre a fauna flebotomínica do município de Ouro Preto. Dentre as espécies epidemiologicamente importantes além do *Lu. longipalpis*, também foi identificada a espécie

Migonemyia migonei. Esta última é predominantemente encontrada em áreas endêmicas, apresentando grande relevância epidemiológica para a transmissão LTA (Dias et al., 2017; Loiola et al., 2007; Brazil et al., 2011; Pere-Dias et al., 2016). O município de Ouro Preto, segundo registros do SINAN/SVS/MS, desde o ano de 2001 registra casos de LTA. Até o ano de 2017 já foram registrados 25 casos, sendo que todos os casos foram definidos como autóctones. Tal registro sugere que a espécie *Migonemyia migonei* pode estar associada à transmissão de *L. braziliensis* na região. No entanto, alguns estudos demonstram que flebótomos dessa espécie foram também encontrados infectados por *L. infantum*, sugerindo que esses podem ser vetores potenciais da LV em locais sem registo de *Lu. longipalpis* (Carvalho et al., 2010; Moya et al., 2015).

Dentre a fauna de flebotomíneos coletada, observou-se que dos 49 insetos capturados, oito (16,32%) pertenciam a três espécies distintas de flebotomíneos do gênero *Brumptomyia*. Os flebotomíneos desse gênero não possuem importância epidemiológica na transmissão das leishmanioses. Estes foram coletados no distrito de Lavras Novas e no distrito de Rodrigo Silva (Loc. Bocaina), locais com prevalência de LVC.

A espécie encontrada em maior número (24,5%) foi a *Psychodopygus lloydi*. Essa é comumente encontrada principalmente na região sudeste do Brasil, e estudos realizados em Minas Gerais levantam suspeitas quanto a sua capacidade vetorial (de Lima Carvalho et al., 2011; Quaresma et al., 2012; Rego et al., 2015). Tonelli et al. (2017) sugere que a espécie *Psychodopygus lloydi* pode estar envolvida com a transmissão da LTA no estado de Minas Gerais, afirmando que em sua investigação no Parque Natural do Caraça essa espécie foi encontrada infectada por *L. braziliensis*.

Espécies do gênero *Evandromyia* foram capturadas em todos os distritos, sendo representadas por três espécies: *Evandromyia cortelezzii*, *Evandromyia lenti* e *Evandromyia termitophila*. O comportamento não vetorial, não antropofílico, silvestre e refratário ao desenvolvimento de espécies de *Leishmania* sp. (Young & Duncan 1994; Brazil et al., 1997; Rangel & Lainson, 2005) vem sendo questionado nesse gênero. Dados de Rosa et al. (2012) em estudos realizados na Argentina, reforçam a hipótese de que os membros do complexo cortelezzii atuam como vetores das leishmanioses. Nos estudos entomológicos realizado por Margonari et al. (2010) e Paiva et al. (2010) espécies do gênero *Evandromyia* foram encontrados infectados por *L. braziliensis.* Os trabalhos de Carvalho et al. (2008) e Saraiva et al.(2010) capturaram as espécies *E. cortelezzii*, *E. lenti*, respectivamente, infectadas por *L. infantum*. Essa infecção da espécie *E. cortelezzii* também foi relatada por Lana et al (2018) em Ipatinga, município de Minas Gerais endêmico para LV. Recentemente, Lopes et al. (2019) em seu estudo no município de Itaúna, Minas Gerais, também capturaram essas três espécies do gênero *Evandromyia* e relataram a infecção de todas elas por *L. infantum*.

O gênero *Pintomyia* foi observado na captura e representado por duas espécies: *Pintomyia fischeri* (14,29%) *e Pintomyia misionensis* (2,4%), sendo a primeira uma das mais frequentes entre as espécies capturadas, tendo sido registradas no distrito de Rodrigo Silva (Loc. Bocaina) e Cachoeira do Campo. Mesmo sendo de pouca importância epidemiológica para a LV, a espécie *P. fischeri* foi questionada no estudo de Galvis-Ollavos et. al.(2017) como um vetor potencial para *L. infantum*, onde os parâmetros de suscetibilidade à infecção e expectativa de vida foram investigados.

O único exemplar do gênero *Psychodopygus* sp. foi encontrado no distrito de Cachoeira do Campo e sua identificação, quanto à espécie, não foi possível pela ausência de algumas estruturas morfológicas essenciais que foram perdidas durante o processo de captura/triagem. Esse gênero foi encontrado entre as espécies mais abundantes capturadas em um estudo realizado no Parque Estadual do Rio Doce, área endêmica para a LTA (de Souza et al., 2015).

A compreensão sobre transmissão das leishmanioses vai muito além da identificação/infecção das espécies de flebotomíneos. A infecção natural por *Leishmania sp.* fornece informações sobre o parasito circulante, mas ainda não define o hospedeiro invertebrado como vetor. No entanto, a taxa de flebotomíneos infectados e a identificação correta do parasito são dados primordiais para estudos sobre a capacidade vetorial e epidemiológica das leishmanioses. Nenhum flebotomíneo coletado no presente estudo foi identificado positivo para infecção natural, apenas a identificação da fauna foi relatada. Segundo Michalsky et al. (2011), mesmo em área endêmica, a taxa de infecção natural no vetor é considerada baixa.

O baixo número de flebotomíneos capturados no município de Ouro Preto era esperado, por ser classificado como uma área de transmissão esporádica para a LV, e ainda pelo fato da área apresentar clima tropical de altitude, não se tinha a perspectiva de uma alta densidade vetorial. Outros municípios com transmissão esporádica como observado por Menezes et al. (2015) no município de Formiga, Minas Gerais, apresentaram também uma baixa densidade vetorial (224 espécimes) quando comparado com municípios endêmicos, tais como Belo Horizonte, Montes Claros, Governador Valadares (Michalsky et al. 2005; Saraiva et al., 2017; Cardoso et al., 2019).

Quanto ao sexo, a razão sexual entre machos/fêmeas foi de 1:1,5, se contrapondo aos resultados encontrados por Almeida et al. (2010) e Silvino et. al. (2017) que observaram uma razão de machos/fêmeas de 3,74:1 e 2,46:1, respectivamente. Normalmente os estudos revelam um maior número de machos capturados em relação às fêmeas, devido ao comportamento sexual desses insetos. Machos acompanham as fêmeas a fim de garantir a fertilização.

A densidade vetorial foi comparada com a altitude e também com as variáveis climáticas. Nota-se que o maior número de flebotomíneos foi capturado em distritos com altitudes entre 1039 a 1109 metros. Resultado semelhante também foi observado por Yared et al. (2017) na região noroeste da Etiópia, onde

vetores para as leishmanioses foram registrados em altitudes que variaram de 500 a 1100 metros. Segundo Vélez et al. (2019) altitudes superiores a 800 metros demonstram uma correlação negativa com a infecção de cães por LV. O estudo de Margonari et al, (2006) observou uma maior prevalência da LVC em Belo Horizonte, em áreas com altitudes entre 780 e 880 metros. Gálvez et al. (2010) ponderou que maiores altitudes promoveriam um ambiente mais hostil ao flebotomíneo. Mesmo diante dessas observações, o presente estudo registrou prevalência de transmissão da LVC e presença de flebotomíneos em áreas até 1369 metros, como no distrito de Lavras Novas.

Muitos estudos demonstram a relação existente entre variáveis climáticas, densidade vetorial e até mesmo a adaptação das espécies vetoras a essas condições (Barata et al.,2013; de Andrade et al., 2014; Koch et al.,2017; Chalghaf et al., 2018). Sabe-se que o município de Ouro Preto apresenta clima tropical de altitude, específico das regiões de montanha, apresentando variáveis climáticas correspondentes a essas características. Mesmo sendo uma área de clima ameno, foi possível observar que os meses de maior temperatura, umidade relativa do ar e de maiores pluviosidades influenciaram uma maior densidade vetorial. Essas comparações entre dados climáticos (temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade) também foi realizada por Michalsky et al. (2009) em seu estudo realizado em Montes Claros, onde observou uma associação positiva com a densidade do o *Lu. longipalpis*. Resende et al. (2006) e Saraiva et al. (2015) também registraram uma maior densidade vetorial nos períodos quentes, úmidos e de maiores volumes de chuva. Esses fatores interferem positivamente no desenvolvimento das larvas favorecendo um maior número de flebotomíneos (Forattini, 1973).

A maior velocidade do vento, observada nos meses de julho e agosto tiveram uma relação negativa quanto ao número de flebotomíneos capturados no município de Ouro Preto. Segundo Oliveira et al. (2010), em seu estudo no estado do Mato Grosso do Sul, observou que baixa velocidade do vento pode favorecer o aumento populacional dos vetores das leishmanioses.

Os achados do presente estudo demonstram que o município de Ouro Preto se encontra em risco para a LV humana, com a necessidade urgente de implementar ações de vigilância e controle para prevenir uma futura expansão. Sendo comprovadas a existência de reservatórios caninos, a presença do vetor *Lu. longipalpis* e a circulação do agente etiológico *L. infantum*.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

As informações obtidas nesse estudo elucidaram pela primeira vez, elos do ciclo de transmissão da LV no município de Ouro Preto, permitindo estabelecer as seguintes conclusões:

- Todos os distritos do município apresentaram cães infectados por LV, seja pela sorologia ou pela PCR;
- A espécie de leishmania circulante nos cães infectados foi a *L. infantum*;
- O método diagnóstico molecular indica que 33,3% dos resultados sorológicos são falso-negativos, demonstrando que os métodos sorológicos empregados pelo MS apresentam falhas na detecção de cães infectados;
- O grande número de cães falsos negativos mantidos nos distritos, por não atenderem aos critérios de eutanásia preconizados pelo MS, devem reduzir a efetividade das ações de controle adotadas pelo centro de zoonose;
- O diagnostico molecular foi o que apresentou maior sensibilidade na detecção de cães infectados;
- O principal vetor da LV existente no município foi o *Lu. longipalpis*;
- A LVC está dispersa pelo município, colocando em risco sua população humana, indicando a necessidade urgente de implementar ações de vigilância e controle para prevenir uma maior expansão.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

8. LIMITAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo contou com um delineamento amostral que superou a frequência esperada para quase todas as áreas investigadas no município de Ouro Preto. Apenas quatro distritos (Amarantina, Cachoeira do Campo, Sede e Rodrigo Silva) dos treze investigados não tiveram o número amostral superior à frequência esperada. No entanto, a sede municipal foi o único local que apresentou grande distanciamento da amostra planejada. Além disso, a existência de somente duas equipes de coleta, a dificuldade de contenção do animal e o consentimento do proprietário do cão certamente, podem ter contribuído para um menor número de amostras investigadas na sede.

O diagnóstico sorológico utilizando o método DPP® não avaliou todas as amostras, conforme determinado pelo MS. Dispusemos de quantidade suficiente de testes apenas para confirmar uma subamostra de cães positivos e indeterminados para o método do ELISA.

Assim como o diagnóstico sorológico é afetado pelo estado clínico do cão, o resultado do diagnóstico molecular é influenciado pelo tipo de amostra analisada. Apesar do sangue total não ser a melhor amostra a ser investigada, e saber-se que apresenta baixa parasitemia e maior número de inibidores da PCR de acordo com o processo de extração do DNA (Reithinger et al. 2003), foi a amostra biológica escolhida por ser menos invasiva e de mais fácil coleta. Entretanto, apesar dessas limitações observamos uma maior positividade por esse método do que pelos testes sorológicos.

Segundo Dias et al. (2007) o ideal de um estudo entomológico é ter um período de coleta de no mínimo dois anos consecutivos. No entanto, tal recomendação não foi aplicada ao presente estudo em virtude do custo financeiro para mais um ano de coleta. Mesmo diante dessa limitação foi possível capturar espécies vetoras para as leishmanioses e ainda, espécies do gênero *Brumptomyia* com poucos registros no Brasil.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abranches P, Campino L, Santos-Gomes GM. **Leishmaniose visceral canina: novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controle da leishmaniose visceral humana**. Acta Med Port.11(10): 871-5, 1998.

Abrantes, T. R., Werneck, G. L., Almeida, A. S. D., & Figueiredo, F. B. **Environmental factors associated with canine visceral leishmaniasis in an area with recent introduction of the disease in the state of Rio de Janeiro, Brazil.** Cadernos de saude publica, 34(1); 2018.

Aguiar GM, Medeiros WM. **Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil.** In EF Rangel, R Lainson (eds), Flebotomíneos do Brasil, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 207-255, 2003.

Almeida ABPF, Mendonça, AJ.; Sousa VRF. **Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil**. Ciência Rural. Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1610-1615, 2010.

Almeida Leal, G. G., Carneiro, M., da Costa Pinheiro, A., Marques, L. A., Ker, H. G., Reis, A. B., & Coura-Vital, W. **Risk profile for Leishmania infection in dogs coming from an area of visceral leishmaniasis reemergence.** Preventive veterinary medicine, 150, 1-7, 2018.

Alvar J., Vélez I.D., Bern C., Herrero M., Desjeux P., Cano J., *et al*. **Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence.** PLoS One, 7, Article e35671, 2012.

Andrade HM, Reis AB, Dos Santos SL, Volpini, AC, Marques MJ, Romanha, et al. **Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally infected dogs.** Vet. Parasitol. n 140, p. 231–238, 2006.

Andrade AJ, Dantas-Torres F. **Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the state of Minas Gerais, Brazil.** Neotrop Entomol. 39(1):115-23, 2010.

Andrade, A. R. O., da Silva, B. A. K., Cristaldo, G., de Andrade, S. M. O., Paranhos Filho, A. C., Ribeiro, A., ... & Andreotti, R.. **Spatial distribution and environmental factors associated to phlebotomine**

fauna in a border area of transmission of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. Parasites & vectors, 7(1), 260, 2014.

Anfossi, L., Di Nardo, F., Profiti, M., Nogarol, C., Cavalera, S., Baggiani, C., ... & Rosati, S. **A versatile and sensitive lateral flow immunoassay for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis.** Analytical and bioanalytical chemistry, 410(17), 4123-4134, 2018.

Antonialli, S. A. C., Torres, T. G., Paranhos Filho, A. C., & Tolezano, J. E. . **Spatial analysis of American visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul state, Central Brazil.** Journal of infection, 54(5), 509-514, 2007.

Ashford, David A. et al. **Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil.** The American journal of tropical medicine and hygiene. v. 59, n. 1, p. 53-57, 1998.

Ashford, Richard W. **Leishmaniasis reservoirs and their significance in control.** Clinics in dermatology 14.5, 523-532, 1996.

Ashford, R. W.; Desjeux, P.; Deraadt, P. . **Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis.** Parasitology Today, 8: 104-103, 1992.

Assis, T. S. M. D., Braga, A. S. D. C., Pedras, M. J., Barral, A. M. P., Siqueira, I. C. D., Costa, C. H. N., ... & Caldas, A. D. J. M. **Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana.** Epidemiologia e Serviços de Saúde, 17(2), 107-116, 2008.

Azevedo PCB, Lopes GN, Fonteles RS, Vasconcelos GC, Moraes JLP, Rebelo JMM. **The effect of fragmentation on Phlebotomine communities (Díptera: Psychodidae) in areas of Ombrophilous Forest in São Luís, State of Maranhão, Brazil.** Neotropical Entomology, 40(2):271-277, 2011.

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

Barata, R. A., Peixoto, J. C., Tanure, A., Gomes, M. E., Apolinário, E. C., Bodevan, E. C., ... & Pinheiro, A. D. C.. **Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil.** BioMed research international, 2013.

Barboza CPM, Gomes Neto CMB; Leal DC, et al. **Estudo de coorte em áreas de risco para Leishmaniose visceral canina, em municípios da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil.** Rev. Bras. Saúde Prod. An. v. 7, n. 2, p.152- 163, 2006.

Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simoes TC, Nascimento BW, et al. . **Factors associated with visceral leishmaniasis in the Americas: a systematic review and meta-analysis.** PLoS Negl Trop Dis, 7: e2182, 2013.

Bendezu H, Moreno G, Villegas E, Oviedo M. Bionomía de los vectores de leishmaniasis visceral en el Estado Trujillo, Venezuela. V. **Preferencias alimentarias de poblaciones silvestres *Lutzomyia longipalpis* y *Lu. evansi*.** Bol Dir Malariol San Amb. 35 (Suppl. 1): p. 45-52, 1995.

Bennai, K., Tahir, D., Lafri, I., Bendjaballah-Laliam, A., Bitam, I., & Parola, P. **Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA and host blood meal identification in Phlebotomus in a hypoendemic focus of human leishmaniasis in northern Algeria.** PLoS neglected tropical diseases, 12(6), 2018.

Bern C, Maguire JH, Alvar J. **Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis.** PLoS Negl Trop Dis. 2(10):e313, 2008.

Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, Vidaud M, Deniau M. **Realtime PCR as a new tool for quantifying Leishmania infantum in liver in infected mice.** Clin Diagn Lab Immunol 8: 828–831, 2001.

Bevilacqua, P.D. et al **. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., Belo Horizonte , v. 53, n. 1, p. 1-8, Feb. 2001 .

Bigeli, JG, Oliveira Junior WP, Teles NMM. **Diagnosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of**

Palmas, state of Tocantins, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 45(1):18-23, 2012.

Borges, L. F. N. M., Lopes, E. G. P., de Freitas, A. C. P., Silva, M. X., Haddad, J. P. A., da Silva, J. A.,... & de Magalhães Soares, D. F.. **Prevalência e distribuição espacial da leishmaniose visceral em cães do município de Juatuba, Minas Gerais, Brasil.** Ciência Rural, 44(2), 352-357, 2014.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Brasília.** 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Nota Técnica conjunta nº 1/2011 CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS, 2011.** Brasília: DVDT, 2011.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Ministério da Saúde. Registro do produto de uso veterinário denominado Milteforan 2% Solução Oral para cães. **Nota técnica conjunta nº001/2016- MAPA/MS, de 17 de agosto de 2016.** Disponível em < http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/notatecnica.pdf>, acesso no dia 13 de janeiro de 2020.

Brazil R P; Carneiro, V. L. ; Andrade Filho, ; D, J. ; Alves, J. C. M. ; Falcão, A. L. . **Biology Of Lutzomyia Lenti (Diptera:Psychodidae).** Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Paraná, V. 26, P. 191-193, 1997.

Camargo-Neves V.L.F de, Katz G., Rodas L.A.C., Poletto D.W., Lages L.C., Spinola R.M.F., Cruz O.G. **Use of spacial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, São Paulo, Brazil, 1998 – 1999.** Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro; 17 (5): 1263-7, 2001.

Campos R, Santos M, Tunon G, Cunha L, Magalhães L, Moraes J, et al. **Epidemiological aspects and spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil. Geospatial Health**. 12(1):503, 2017.

Cardim, M. F. M., Guirado, M. M., Dibo, M. R., & Chiaravalloti Neto, F. . **Visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil: spatial and space-time analysis.** Revista de saude publica, 50, 48, 2016.

Cardoso MS, Bento GA, de Almeida LV, de Castro JC, Reis-Cunha JL, Barbosa VA, et al. **Detection of multiple circulating Leishmania species in *Lutzomyia longipalpis* in the city of Governador Valadares, southeastern Brazil.** PLoS One. 2019;14(2):e0211831. Epub 2019/02/06.

Carson, C., Quinnell, R. J., Day, M. J., & Courtenay, O.. **Comparison of monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of canine IgG1 and IgG2, and associations with infection outcome in Leishmania infantum naturally infected dogs.** Veterinary immunology and immunopathology, 133(2-4), 264-268, 2010.

Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcão AL, Rocha ACVM, Gontijo CMF. **Naturally infected Lutzomyia sandflies and the transmission of leishmaniasis in an endemic area of Brazil.** Vector Borne Zoonotic Dis, 8: 407-414, 2008.

Carvalho, F., Riboldi, E., Bello, G., Ramos, R., Barcellos, R., Gehlen, M., . . . Rossetti, M. **Canine visceral leishmaniasis diagnosis: A comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs.** Epidemiology and Infection, 146(5), 571-576, 2018.

Carvalho, M. R., Valença, H. F., Da Silva, F. J., de Pita-Pereira, D., de Araújo Pereira, T., Britto, C., ... & Brandão Filho, S. P.. **Natural Leishmania infantum infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil.** Acta Tropica, 116(1), 108-110, 2010.

Cerbino-Neto, J, Werneck GL, Costa, CHN. **Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil.** Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 25, n. 7, p. 1543- 1551, 2009.

Chalghaf, B., Chemkhi, J., Mayala, B., Harrabi, M., Benie, G. B., Michael, E., & Salah, A. B. **Ecological niche modeling predicting the potential distribution of Leishmania vectors in the Mediterranean basin: impact of climate change**. Parasites & vectors, *11*(1), 461, 2018

Clabon, D. M. **Leishmaniasis: trends in epide miology, diagnosis and treatment.** Rijeka: InTech, 2014.

Conselho Federal de Medicina Veterinária - FCVM. Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012. **Estabelece procedimentos e métodos de eutanásia em animais e outras medidas.** Publicado no Diário Oficial de 2012.

Costa J. M. L. **Epidemiologia das leishmanioses no Brasil.** Gaz Med Bahia. 75(1): 3-17, 2005.

Costa D. N., Codeço C.T., Silva M.A., Werneck G.L.**Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis.** PLoS Negl. Trop. Dis, 7, p. e2355, 2013.

Costa, C. H. N. **How effective is culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? a critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop, vol.44, n.2, pp. 232-242, 2011.

Costa, D. N. C. C., Bermudi, P. M. M., Rodas, L. A. C., Nunes, C. M., Hiramoto, R. M., Tolezano, J. E., ... & Chiaravalloti, F. **Leishmaniose visceral em humanos e relação com medidas de controle vetorial e canino.** Rev. Saúde Pública, 52, 2018.

Coura-Vital W, Marques MJ, Veloso VM, Roatt B M, Aguiar-Soares RD, Reis LE, Braga SL, Morais M.H, Reis AB, Carneiro M**. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods.** PLoS Negl Trop Dis. 5(8), pp. 1291, 2011.

Coura-Vital, W., Ker, H. G., Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. O., de Almeida Leal, G. G., das Dores Moreira, N., ... & Carneiro, M. **Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis.** PLoS One, 9(3), 2014.

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

Cruz I., Nieto J., Moreno J., Cañavate C., Desjeux P., Alvar J. ***Leishmania*/HIV co-infections in the second decade.** Indian Journal of Medical Research, 123, pp. 357-388, 2006.

Cupolillo E., Grimaldi G. Jr., Momen H. **A general classification of New World Leishmania using numerical zymotaxonomy**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 50:296-311, 1994.

Curti MCM; et al. **Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana na região Noroeste do Estado do Paraná.** Rev Ciênc Farm Básica Apl. , 30(1): 63-68, 2009.

Dantas-Torres F. **Current epidemiological status of visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil**. Rev Saude Pub, 40:537–541, 2006.

Dantas-Torres, F., Miró, G., Bowman, D. D., Gradoni, L., & Otranto, D. **Culling dogs for zoonotic visceral leishmaniasis control: the wind of change.** Trends in parasitology, *35*(2), 97-101, 2019.

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, & Lopes U. **Use of Molecular probes and PCR for detection and typing of Leishmania – a mini review.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 89 (3): 463-469, 1994.

Deplazes, P, Smith, NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J. **Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites.** Parasite Immunol, v.17, n.9, Sep, p.451-8, 1995.

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

Diouani MF, NBA Bouafif, et al. **Dogs *L. infantum* infection from an endemic region of the north of Tunisia: a prospective study.** Archives de l'Institut Pasteur de Tunis, 85(1-4): 55-61, 2008.

Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 55: 125130, 1996.

Engvall E. & Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Quantitative assay of immunoglobulin G.** Immunochem, 8:871-874, 1971.

Faria F. T. G., et al. **Perfil epidemiológico de pacientes diagnosticados com leishmaniose visceral humana no Brasil.** C&D - Revista Eletrônica da FAINOR; 12 (3): 485-501, 2019

Ferreira E. C. et al. **Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in areas endemic for leishmaniasis.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, vol.105, n.7, pp. 895-898, 2010.

Ferreira E. C., De Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DY, Silva ES, Schalling H, Gontijo Cm. **Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations.** Vet Parasitol; 146(3-4): 235-241, 2007.

Figueiredo MJ, de Fátima M, et al. **Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina.** Ciênc. anim. bras. , vol.15, n.1, pp. 102-106, 2014.

Forattini OP 1973. **Entomologia Médica. Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses, Bartonelose.** Edgard Blücher, São Paulo, 658 pp.

França-Silva JC, Barata, Coste RT, Monteiro EM, Machado-Coelho GLL, Vieire EP, Prata A, Mayrink W, Nascimento E, Fortes-Dias CL, Silva JC, Dias ES. **Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha municipality, Minas Gerais, Brazil.** Vet Parasitol, 131: 213-220, 2005.

França-Silva, João C; Costa, Roberto TDA; Siqueira, AM. et al. **Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil.** Veterinary parasitology, v. 111, n. 2-3, p. 161–73, 2003.

Freitas JC, Nunes-Pinheiro DC, Neto B, Santos G, Abreu C, Braga R, et al. **Alterações clínicas e laboratoriais em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*.** Rev Soc Bras Med Trop.,45(1):24-9, 2012.

Galati, Eunice Aparicida Bianchi. **Classificação de Phlebotominae.** In: Rangel, Elizabete F.; Lainson, Ralph (Org.), Flebotomíneos do Brasil, Rio de janeiro: Fiocruz; p: 23-51, 2003.

Galluzzi, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A. *et al*. **Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis** . Parasites Vectors 11, 273, 2018.

Gálvez, R., Miró, G., Descalzo, M. A., Nieto, J., Dado, D., Martín, O., ... & Molina, R.. **Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain).** Veterinary parasitology, 169(3-4), 327-334, 2010.

Galvis-Ovallos, F., da Silva, M. D., da Silva Bispo, G. B., de Oliveira, A. G., Neto, J. R. G., dos Santos Malafronte, R., & Galati, E. A. B. . **Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: Pintomyia fischeri as potential vector of Leishmania infantum.** Parasite, 24, 2017.

Gebre-Michael, T., Balkew, M., Ali, A., Ludovisi, A., & Gramiccia, M. **The isolation of Leishmania tropica and L. aethiopica from Phlebotomus (Paraphlebotomus) species (Diptera: Psychodidae) in the Awash Valley, northeastern Ethiopia.** Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene, 98(1), 64-70, 2004.

Genaro O, Costa CA, Willins P. et al. **Ocorrência de calazar em área urbana da grande Belo Horizonte, MG.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.23, p.121, 1990.

Genaro O. **Leishamniose visceral americana.** In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM. Parasitologia humana. São Paulo: Atheneu, p. 56-72, 2000.

Godoy NS, Andrino ML, de Souza RM, et al. **Could kDNA-PCR in Peripheral Blood Replace the Examination of Bone Marrow for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis?** J Parasitol Res, 2016:1084353, 2016.

Gomes, Y.M.; Cavalcanti, M.P.; Lira, R.A.; Abath, F.G.; Alves, L.C. **Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biothecnological advances.**The Veterinary Journal. Jan;175(1):45-52, 2008.

Gontijo, CMF & Melo MN. **Leishmaniose Visceral no Brasil.** Rev. Bras. Epidemiol. Vol. 7, Nº 3, 2004.

Grimaldi G, Teva A, Ferreira, A L et al. **Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 106, n. 1, p. 54–9, 2012.

Hommel M. **Enzymaimmunoassay in leishmaniasis.** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 70:15-16, 1976.

IBGE. Censo Demográfico 2017 - **População Ouro Preto.** Resultados do universo, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017.

Hossain F., Ghosh P., Khan M. A. A., Duthie M. S., Vallur A. C., Picone A., et al. **Realtime PCR in detection and quantitation of Leishmania donovani for the diagnosis of visceral leishmaniasis patients and the monitoring of their response to treatment.** PLoS One. 12: e0185606, 2017

Ikeda-Garcia, F. A.; Feitosa, M. M. **Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. Clínica Veterinária, São Paulo, n. 62, p. 32-38, 2006.

Koch, L. K., Kochmann, J., Klimpel, S., & Cunze, S.. **Modeling the climatic suitability of leishmaniasis vector species in Europe.** Scientific reports, *7*(1), 13325, 2017.

Kumar S., Kumar D., Chakravarty J., Rai M., Sundar S. **Identification and characterization of a novel *Leishmania donovani* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis.** Am J Trop Med Hyg 86:601–605, 2012.

Lainson, Ralph; Rangel, Elizabeth F. ***Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 811-827, Dec. 2005.

Lana, R. S., Michalsky, É. M., Lopes, L. O., Lara-Silva, F. O., Nascimento, J. L., Pinheiro, L. C., ... & Dias, E. S. (2018). **Ecoepidemiological aspects of visceral leishmaniasis in an endemic area in the Steel Valley in Brazil: an ecological approach with spatial analysis.** PloS one, 13(10), e0206452, 2018.

Laurenti, M. D., de Santana Leandro Jr, M. V., Tomokane, T. Y., De Lucca, H. R. L., Aschar, M., Souza, C. S. F., ... & da Matta, V. L. R. **Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis.** Veterinary parasitology, 205(3-4), 444-450, 2014.

Laurenti, M. D.; Rossi, C. N.; Matta, V. L. R.; Tomokane, T. Y.; Corbett, C. E. P.; Secundino, N. F. C.; Pimenta, P. F. P.; Marcondes, M. **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, 2013.

Laurenti, M.D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral canina. *Bepa*, v.67, p.13-23, 2009.

Lemos, EM, Laurenti MD, Moreira MA, Reis AB, Giunchetti R C, Raychaudhuri S, Dietze R. **Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease.** Acta Tropica. Basel, v. 107, n. 2, p. 205-207, 2008.

Lima Carvalho, G. M., De Vasconcelos, F. B., Da Silva, D. G., Botelho, H. A., & Filho, J. D. A.. **Diversity of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil.** Journal of medical entomology, *48*(4), 764-769, 2011.

Lima Celeste, J. L. ; Caldeira, R. L. ; da Fonseca Pires, S. ; Silveira, K.D, ; soares, R. P.; de Andrade, , H. M . **Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Leishmania amazonensis* in skin samples**. Experimental Parasitology, v. 19, p. 38-44, 2019.

Lima VM, Fattori KR, Meichelin AF, Silveira Neto L, Vasconcelos RO. **Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis.** Veterinary Parasitology. Amsterdam, v. 173, n. 3-2, p. 330-333, 2010.

Lins, R. M. M. A., et al. **Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies** Insect molecular biology 11.2: 117-122, 2002.

Loiola, C. F., Silva, D. A. D., & Galati, E. A. B. . **Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and species abundance in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Minas Gerais, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 102(5), 581-585, 2017.

Lopes E,G.P., Magalhães D.F., Silva J.A., Haddad J.P.A., Moreira E.C. **Temporal and spatial distribution of leishmaniasis in humans and dogs from Belo Horizonte-MG, 1993–2007.** Arq Bras Med Vet Zootec, 62: 1062–1071, 2010.

Lopes, E. G., et al. **Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected.** Epidemiology & Infection, 145.12: 2436-2444, 2017.

Lopes, J. V. ; Michalsky, E.M. ; Pereira, N. C. L. ; Lara-Silva, F. O. ; Lana, R. S. ; Fortes-Dias, C. L. ; Dias, E. S. . **Entomological Studies in Itaúna, Brazil, an Area With Visceral Leishmaniasis Transmission: Fauna Survey, Natural Leishmania Infection, and Molecular Characterization of the Species Circulating in Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae).** Journal of Medical Entomology, v. 23, p. tjz061, 2019.

Machado-Coelho, G. L., Assunção, R., Mayrink, W., & Caiaffa, W. T.. **American cutaneous leishmaniasis in Southeast Brazil: space-time clustering.** International journal of epidemiology, 28(5), 982-989, 1999.

Maia C, Nunes M, Cristóvão J, Campino L. **Experimental canine leishmaniasis: clinical,parasitological and serological follow-up.** Acta Trop, v.116, n.3, dec, p.193-9, 2010.

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

Marcondes M, Biondo AW, Gomes AAD, Silva ARS, Vieira RF C; Camacho AA; Quinng J, Chandrashekarg R. **Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of Leishmania chagasi in dogs.** Veterinary Parasitology. Philadelphia, v. 175, n. 1, p. 15-19, 2011.

Margonari, C., Menezes, J. A., Rocha, M. N., Maia, K. N., Éder de Oliveira, M., Luisa Fonseca, A., ... & Soares, R. P. . **Public knowledge about and detection of canine visceral leishmaniasis in urban Divinópolis, Brazil.** Journal of tropical medicine, 2012.

Margonari, Carina et al . **Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 31-38, Feb. 2006.

Marzochi MC, Coutinho SG, et al. **Leishmaniose Visceral Canina no Rio de Janeiro – Brasil.** Cad. Saúde pública, 1 (4) 432 – 446, 1985.

Mary C., Faraut F., Lascombe L., Dumon H. **Quantification of Leishmania infantum DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity.** J Clin Microbiol. 42:5249–55, 2004**.**

Mayrink, W., Mendonça-Mendes, A., de Paula, J. C., Siqueira, L. M. V., Marrocos, S. D. R., Dias, E. S., ... & Machado-Coelho, G. L. L.. **Cluster randomised trial to evaluate the effectiveness of a vaccine against cutaneous leishmaniasis in the Caratinga microregion, south-east Brazil.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 107(4), 212-219, 2013.

Medkour, H., Davoust, B., Levasseur, A., & Mediannikov, O. **Molecular Evidence of *Leishmania infantum* and *Leishmania guyanensis* in Red Howler Monkey (Alouatta seniculus) from French Guiana.** Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2019.

Medronho, R. A., Bloch, K. V., Luiz, R. R., & Werneck, G. L. . **Epidemiologia.** 2ª edição. Rio de Janeiro: Atheneu, 2009.

Mendes T. A. O., Reis Cunha J. L., de Almeida Lourdes R., Rodrigues Luiz G. F., Lemos L. D., Santos A. R., da Câmara A. C., Galvão L. M., Bern C., Gilman R. H , Fujiwara R. T., Gazzinelli R. T., Bartholomeu D. C. **Identification of Strain-Specific B-cell Epitopes in *Trypanosoma cruzi* Using Genome-Scale Epitope Prediction and High-Throughput Immunoscreening with Peptide Arrays**. PLoS Negl Trop Dis 7(10): e2524, 2013.

Menezes JA, Ferreira E de C, Andrade-Filho JD, de Sousa AM, Morais MHG, Rocha AMS, et al. **An integrated approach using spatial analysis to study the risk factors for leishmaniasis in area of recent transmission.** Biomed Res Int., 2015:621854, 2015.

Michalsky EM, Guedes KS, Silva FOL, França-Silva JC, Dias CLF, Barata RA, Dias ES. **Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 44: 58-62, 2011.

Michalsky, E. M. ; França-Silva, J. C. ; Costa, R. T. ; Costa, D. C. ; Barata, R. A. ; Paula, E. V. ; Machado-Coelho, G. L. L. ; Rocha, M. F. ; Dias, E.S. . **Leishmaniose Visceral:estudo de**

flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical JCR, Uberaba, v. 38, n.2, p. 147-152, 2005.

Michalsky, E. M. ; Guedes, K. S. ; Lara-Silva, F. O. ; Lara-Silva, F. O. ; França-Silva, J. C. ; Fortes-Dias, C. L. ; Dias, E.S. ; Barata, R. A. . **Natural Infection with Leishmania infantum chagasi in Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis (Diptera: Psychodidae) sandflies captured in the municipality of Janauba, state of Minas Gerais, Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Impresso), v. 44, p. 58-62, 2011.

Michalsky, É. M. et al . **Association of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) population density with climate variables in Montes Claros, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro , v. 104, n. 8, p. 1191-1193, 2009.

Michalsky, EM, Rocha MF, Lima ACVMR, França-Silva JC, Ires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, Santos SL, Barata RA, Omamnha AJ, Fortes-Dias CL, Dias ES. **Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies.** Vet Parasitol, v.147, 1-2, p. 67-76, 2007.

Migonemyia migonei (França, 1920),

Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. **Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two.** Trends in ParasitologyOxford, v. 24 n. 8, p. 371-378, 2008.

Moreira, M. A. B. et al**. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of Leishmaniasis in dogs with different clinical signs.** Veterinary Parasitology, v.145, n.3-4, p.245-252, 2007.

Moya, S. L., Giuliani, M. G., Acosta, M. M., Salomón, O. D., & Liotta, D. J. . **First description of Migonemyia migonei (França) and Nyssomyia whitmani (Antunes & Coutinho) (Psychodidae: Phlebotominae) natural infected by Leishmania infantum in Argentina.** Acta tropica, 152, 181-184, 2015.

Nelson RW & Couto CG. **Doenças protozoárias polissistemicas**. In: NELSON et al. Medicina interna de pequenos animais. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 104, p 1031-1038, 2001.

Noli C. **Leishmaniosis canina**.Walthan Focus, v.9, n.2, p.16-23, 1999.

Oliveira C.L, Assunção R.M, Reis I.A. et al. **Spacial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1997**. Cad. Saúde Pública, v.7, p.1231-1239, 2001.

Oliveira L. S, Julião S Souza V.M.M, Freitas D.S, Souza B.M.P. S, et al. **A utilização da imunofluorêscencia indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença.** Ciência Animal Brasileira, 6: 16 41-47, 2005

Oliveira Lara-Silva, F., Michalsky, É. M., Fortes-Dias, C. L., Fiuza, V. D. O. P., Pessanha, J. E. M., Regina-Silva, S., ... & Machado-Coelho, G. L. L. **Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil.** Acta tropica, 148, 128-136, 2015.

Oliveira, G. M. G. de et al . **Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Município de Três Lagoas, área de transmissão intensa de leishmaniose visceral, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.** Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua, v. 1, n. 3, p. 83-94, 2010.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). **Leishmanioses - Informe Epidemiológico das Américas. Inf Leishmanioses.** n 6:p. 1-7, 2018.

Palatnik-de-Sousa, C.B., Day, M.J. **One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis**. Parasit. Vectors. (4) 1, pp. 1–10. 2011.

Paltrinieri, S.; Solano-Gallego, L.; Fondati, A.; Lubas, G.; Gradoni, L.; Castagno, M.; Crotti, A.; Maroli, M.; Oliva, G.; Roura, X.; Zatelli, A.; Zini, E. **Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 36, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

Peixoto, H. M., de Oliveira, M. R. F., & Romero, G. A. S. **Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in B razil: systematic review and meta-analysis.** Tropical Medicine & International Health, *20*(3), 334-352, 2015.

Pereira V. R., Reis L. C., Souza M. A., de Oliveira A. P., de Brito M. E., Lage P. S., Andrade M. C., Rocha R. D., Martins-Filho O. A. **Evaluation of anti-lived and anti-fixed *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis.** Diagn Microbiol Infect Dis 74:292–298, 2012.

Peres-Dias, Quezia Nunes et al. . **Sand fly species composition (diptera: psychodidae: phlebotominae) in the municipality of cantagalo , an area with sporadic cases of human cutaneous leishmaniasis in Rio de Janeiro state, Brazil.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo vol. 58: 50, 2016.

Pessoa-e-Silva, R., Vaitkevicius-Antão, V., de Andrade, T. André Santos, de Oliveira Silva, A. Caroliny, de Oliveira, G. Aparecida, Trajano-Silva, L. Adrianne Mendonça, Nakasone, E. Kevin Nakasone, & de Paiva-Cavalcanti, M. **The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems.** Experimental parasitology, 199, 9-16, 2019.

Prado PF, Rocha MF, Sousa JF, Caldeira DI, Paz GF, Dias ES. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. Rev Soc Bras Med Trop, 44(5):561-6, 2011.

Prado PF, Rocha MF, Sousa JF, Caldeira DI, Paz GF, Dias ES. **Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009.** Rev Soc Bras Med Trop., v.44 n.5, 2011.

Pugedo H, Barata RA, França-Silva JC, Silva, JC, Dias ES. **HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos.** Rev Soc Bras Med Trop. 38: 70-72, 2005.

Quaresma, P. F., Carvalho, G. M. D. L., Ramos, M. C. D. N. F., & Andrade Filho, J. D.. **Natural Leishmania sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 107(4), 480-485, 2012.

Quaresma, P. F., Rêgo, F. D., Botelho, H. A., da Silva, S. R., Moura, A. J., Neto, R. G. T., ... & Gontijo, C. M. F. **Wild, synanthropic and domestic hosts of Leishmania in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 105(10), 579-585, 2011.

Queiroz, N. M. G. P. et al. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,** v. 19, n. 1, p. 34-40, 2010.

Quinnell R J, Carson C, Reithinger R, Garcez Lourdes M; Courtenay O. **Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis.** PLoS neglected tropical diseases, v. 7, n. 1, p. e1992, 2013.

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

Regina-Silva, S., Fortes-Dias, C. L., Michalsky, É. M., França-Silva, J. C., Quaresma, P. F., da Rocha Lima, A. C. V., ... & Dias, E. S. **Evaluation of parasitological examination, kDNA polymerase chain reaction and rK39-based immunochromatography for the diagnosis of visceral leishmaniasis in seropositive dogs from the screening-culling program in Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 47(4), 462-468, 2014.

Rêgo, F. D., Rugani, J. M. N., Shimabukuro, P. H. F., Tonelli, G. B., Quaresma, P. F., & Gontijo, C. M. F. . **Molecular detection of Leishmania in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cutaneous leishmaniasis focus at Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil.** PLoS One, 10(4), e0122038, 2015.

Reis AB, et al. **Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis.** Res. Vet. Sci., 81 pp. 68-75, 2006.

Reis, L. E. S., Coura-Vital, W., Roatt, B. M., Bouillet, L. É. M., Ker, H. G., de Brito, R. C. F., ... & Carneiro, C. M. **Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection.** Veterinary parasitology, 197(3-4), 498-503, 2013.

Reis, Lisiane Lappe dos et al. . **Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba, v. 50, n. 5, p. 638-645, Sept. 2017.

Reithinger R; Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. **Rapid Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs: Comparative Study Using an Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR.** Journal of Clinical Microbiology. Washington, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, 2002.

Reithinger, R., Mohsen, M., Aadil, K., Sidiqi, M., Erasmus, P., & Coleman, P. G.. **Anthroponotic cutaneous leishmaniasis, Kabul, Afghanistan**. Emerging Infectious Diseases, 9(6), 727, 2003.

Resende MC, Camargo MCV, Vieira JRM, Nobi RCA, Porto NMN, Oliveira CDL, et al. **Seazonal variation of Lutzomyia longipalpis in Belo Horizonte, State of Minas Gerais.** Rev Soc Bras Med Trop. 39(1):51-55, 2006.

Riboldi, E., Carvalho, F., Romão, P. R. T., Barcellos, R. B., Bello, G. L., Ramos, R. R., ... & Dallegrave, E.. **Molecular method confirms canine Leishmania infection detected by serological methods in non-endemic area of Brazil.** The Korean journal of parasitology, 56(1), 11, 2018.

Rocha, A. M. S., Queiroz, E. M., Dornelas, I., Vieira, A. F. ; Godoy, L., Ferreira, E. C., Reis, V. W., Batista, A. P., Dias, E. S., Andrade, H. M., Marinho, C. C., Costa, J. S., França-Silva, J.C.; Machado-Coelho, G.L.L. . **Prevalence of Canine Visceral Leishmaniasis in the Xakriabá**

Indigenous Land, Minas Gerais State, Southeast Brazil, 2011. International Journal of Epidemiology, v. 44, p. i160-i160, 2015.

Rodgers, M.R.; Popper, S.J.; Wirth, D.F. **Amplificationof kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosisof Leishmania.** Experimental Parasitology, v.71, n.3, p.267-275, 1990.

Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., Francino, O., López-Fuertes, L., Timón, M., & Alberola, J. **Leishmania infection: laboratory diagnosing in the absence of a "gold standard".** The American journal of tropical medicine and hygiene, *82*(2), 251-256, 2010.

Romero, G. A., & Boelaert, M. **Control of visceral leishmaniasis in Latin America—a systematic review.** PLoS neglected tropical diseases, 4(1), e584, 2010.

Rosa, J., Pereira, D. P., Brazil, R. P., Andrade Filho, J. D., Salomón, O., & Szelag, E. . **Natural infection of cortelezzii complex (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) with *Leishmania braziliensis* in Chaco, Argentina.** Acta tropica, 123(2), 128-131, 2012.

Rosário, E., Genaro, O., França-Silva, J., Costa, R., Mayrink, W., Reis, A., Carneiro, M. **EvaluationofenzymeinkedimmunosorbentassayusingcrudeLeishmaniaandrecombinantantigens as a diagnosticmarker for canine visceral leishmaniasis.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 100, 197-203, 2005.

Ross R. **Not on the bodies recentttly described by Leishmanian and Donovan. Further notes on leishman's bodies.** Br Med J,. v. 2; 1261-1401, 1903.

Sabroza P.C., Toledo L.M. & Osanai C.H. **A organização do espaço e os processos endêmico-epidêmicos. In*:* Saúde, Ambiente e Desenvolvimento** (M. C. Leal, P. C. Sabroza, R. H. Rodriguez & P. M. Buss, org.). Rio de Janeiro: ABRASCO/São Paulo: Editora Hucitec, v. II, pp. 57-77, 1992.

Saiki R.K., Sharf S., Falcona F., Mullis K., Horn G., Erlich H., Arnhein N. **Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.** Science 230: 1350-1354, 1985.

Saiki R. K, Sanches S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A & Anheim N. **Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia**. Science, 230:1350-1354, 1985.

Salomón O. D., Feliciangeli M. D., Quintana M. G., Afonso M. M., Rangel E. F. ***Lutzomyia longipalpis* urbanization and control.** Mem Inst Oswaldo Cruz . 110(7):831-46, 2015.

Sanchez-Robert E, Altet L, Utzet-Sadurni M, Giger U, Sanchez A, Francino O. **Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis.** Veterinary Research, 39(3): 36, 2008.

Santis B, Santos EG, Souza CS, Chaves SA. **Performance 169 of DPP™ immunochromathographic rapid test (IRT) for canine visceral leishmaniasis: comparison with other serological methods in suspected dogs from Cuiab., Mato Grosso State, Brazil.** Braz J Vet Res Anim Sci. 50(3):198-205, 2013.

Santos, S. D., Arias, J., Ribeiro, A. A., Hoffmann, M. D. P., Freitas, R. D., Malacco, M. A. F., ... & Labuza, T. P. **Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis**. *Medical and veterinary entomology*, *12*(3), 315-317, 1998.

Santos Silva, J., Caranha, L., Moura Santos, F.K. et al. **Sand fly (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) abundance and diversity in areas affected by the São Francisco River transposition project in Ceará State, Brazil.** Parasites Vectors 10**,** 403; 2017.

Saraiva L, Andrade-Filho JD, Silva SO, Andrade ASR, Melo MN. **The molecular detection of different Leishmania species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 105: 1033–1039, 2010.

Saraiva, L., Reis, A. S., Rugani, J. M. N., Pereira, A. A. S., Rêgo, F. D., da Rocha, A. C. V. M., ... & Andrade Filho, J. D. . **Survey of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in an environmentally protected area in Brazil.** PloS one, 10(8), e0134845, 2015.

Saraiva, L. et al **. Seasonality of sand flies (Diptera: Psychodidae) and Leishmania DNA detection in vector species in an area with endemic visceral leishmaniasis.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro , v. 112, n. 4, p. 309-318, 2017.

Saridomichelakis, M.N., Mylonakis,M.E., Leontides, L.S., Koutinas, A.F., Billinis, C., Kontos, V. **Evaluation of lymph node and Bone Marrow cytology in the diagnosis of canine Leishmaniasis (Leishamnaia Infantum) in symptomatic and assymptomatic dogs.** American Journal of Tropical. Medicine. Hygiene, pág. 82–86, v. 73, 2005.

Scandar, S. A. S., Silva, R. A. D., Cardoso-Júnior, R. P., & Oliveira, F. H. . **Ocorrência de leishmaniose visceral americana na região de São José do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil.** BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online), 8(88), 13-22, 2011.

Sherlock IA. **Importância Médico-Veterinária: A importância dos flebotomíneos.** In Rangel EF & Lainson R, editores. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 15-21, 2003.

Silva et al. **Fatores associados à leishmaniose visceral na área endêmica de Codó, estado do Maranhão, Brasil.** Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção, v. 6, n. 2, p. 74-80, 2016.

Silva JP, Werneck GL, Macedo EC, Carvalho H, Cruz MSP. **Fatores associados à infecção por *Leishmania chagasi* em cães domiciliados de Teresina, Estado do Piauí, Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Brasília, v. 45, n. 4, p. 480-484, 2012.

Silva, J. D., Melo, D. H., Costa, J. A., Costa, D. F., Silva, M. A., Azevedo, S. S., & Alves, C. J. **Leishmaniose visceral em cães de assentamentos rurais.** 1. Pesq. Vet. Bras, 37(11), 1292-1298, 2017.

Silva, José D. et al. **Leishmaniose visceral em cães de assentamentos rurais.** Pesq. Vet. Bras., vol.37, n.11, pp.1292-1298, 2017.

Silveira, FT, Carneiro LA., Ramos PK., Chagas EJ, Lima, LV, Campos MB, Laurentti MD, Gomes CM, Corbett CE. **A crosssectional study of canine *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil ratifies a higher prevalence of specific IgG-antibody response than**

delayedtype hypersensitivity in symptomatic and asymptomatic dogs. Parasitology Research, Berlin, v. 111, n. 4, p. 1513-1522, 2012.

Silvino, A. C. S., Silva, K. B., Sousa-Paula, L. C., Dias, R. V., & Braga, P. E. T.. **Caracterização de flebotomíneos em bairros de Sobral, Ceará.** Rev Biol, 17, 12-7, 2017.

Sistema de Informação de Agravos de Notificações – SINAN. **Dados Epidemiológicos e estatística da Leishmaniose Visceral.** 2017. Disponível em: < http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153 >. Acesso em: 10 abr. 2018.

Soccol T.V., Pasquali A.K.S., Pozzolo E.M., Leandro Ad.S., Chiyo L., et al. **More than the eyes can see: The worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border.** PLOS ONE. 12 (12), 2017.

Solano-Gallego L; Koutinas A; Miró G, et al. **Directions For The Diagnosis, Clinical Staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis.** Veterinary parasitology, 28; v. 165, n. 1-2, p. 1–18, 2009.

Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., ... & Baneth, G. **LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis.** *Parasites & vectors*, *4*(1), 86, 2011.

Souza CM, Pessanha JE, Barata RA, Monteiro EM, Costa DC, Dias ES. **Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil**. Mem Inst Oswaldo Cruz, 99: 795-803, 2004.

Souza A. P., Soto M., Costa J. M. L., Boaventura V. S., Oliveira C. I., Cristal J. R., Barral-Netto M., Barral A. **Towards a More Precise Serological Diagnosis of Human Tegumentary Leishmaniasis Using *Leishmania* Recombinant Proteins**. PLoS ONE 8(6): e66110, 2013.

Souza, C. F., Brazil, R. P., Bevilacqua, P. D., & Andrade Filho, J. D. . **The phlebotomine sand flies fauna in Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil.** Parasites & vectors, 8(1), 619, 2015.

Teixeira, A. I. P. et al . **Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a challenge for current and future tests.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 114, e180452, 2019.

Teles, A. P. S. et al. **Fatores de risco associados à ocorrência da Leishmaniose Visceral na área urbana do município de Campo Grande/MS.** Hygeia, v. 11, n. 21, p. 35- 48, 2015.

Toledo, C. R. S., de Almeida, A. S., de Miranda Chaves, S. A., Sabroza, P. C., Toledo, L. M., & Caldas, J. P.. **Vulnerabilidade à transmissão da leishmaniose visceral humana em área urbana brasileira.** Revista de Saúde Pública, *51*, 1-11, 2017.

Tonelli, G. B., Tanure, A., Rêgo, F. D., de Lima Carvalho, G. M., Simões, T. C., & Andrade Filho, J. D.. **Aspects of the ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the Private Natural Heritage Reserve Sanctuary Caraça.** PLoS One, 12(6), e0178628, 2017.

Torrecilha, R.B. P.; Utsunomiya, Y. T.; Bosco, A. M.; Et Al. **Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis.** Preventive Veterinary Medicine, v. 132, p. 83–87, 2016.

Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R.. **Leishmaniasis: a review.** F1000Research, 6, 2017.

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

Travi, B. L., Cordeiro-da-Silva, A., Dantas-Torres, F., & Miro, G.. **Canine visceral leishmaniasis: diagnosis and management of the reservoir living among us.** PLoS neglected tropical diseases, 12(1), e0006082, 2018.

Troncarelli M.Z., Carneiro D.M.V.F. & Langoni H. **Visceral Leishmani-osis: an old disease with continuous impact** on Public Health, p.263-282, 2012.

Van Eys G.J., Schoone G.J., Kroon N.C., Ebeling S.B.. **Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of Leishmania parasites.** Mol Biochem Parasitol, 51, pp. 133-142, 1992.

Vélez, I. D., Gilchrist, K., Arbelaez, M. P., Rojas, C. A., Puerta, J. A., Antunes, C. M., ... & Modabber, F.. **Failure of a killed Leishmania amazonensis vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 99(8), 593-598, 2005.

Virgens, T.M., Santos, C.B., Pinto, I.S., Silva, K.S., Leal, F.C. & Falqueto, A. **Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) in an American tegumentary leishmaniasis transmission area in northern Espírito Santo state, Brazil.** Cad. Saúde Públ. 24(12): 2969-2978, 2008.

Werneck, G. L. . Geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. Cadernos de saude publica, 24, 2937-2940, 2008.

Werneck, Guilherme L. . Controle da leishmaniose **visceral no Brasil: o fim de um ciclo?**. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 32, n. 6, 2016.

Weirather J. L., Jeronimo S. M., Gautam S., Sundar S., Kang M., Kurtz M., Haque R., Schriefer A., Talhari S., Carvalho E.M., Donelson J.E., Wilson M.E. **Serial Quantitative PCR Assay for Detection, 75 Species Discrimination, and Quantification of *Leishmania spp.* in Human Samples.** J Clin Microbiol 49(11): 3892-3904, 2011.

World Health Organization – WHO et al. **Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis.** World Health Organization, 2012.

World Health Organization – WHO. **Leishmaniasis, Fact sheet.** Disponível em: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: 15 jan. 2018.

Yared S., Gebresilassie A., Akililu E., Deribe K., Balkew M., Warburg A., Hailu A., Gebre-Michael T. **Diversity and altitudinal distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral leishmaniasis endemic areas of northwest Ethiopia.** Acta Trop. 176:1–10, 2017.

Yıldız, M., Demir, N., Ünver, H., & Sahiner, N. **Synthesis, characterization, and application of a novel water-soluble polyethyleneimine-based Schiff base colorimetric chemosensor for metal cations and biological activity.** Sensors and Actuators B: Chemical, 252, 55-61; 2017.

Young DG & Duncan MA. **Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae).** Memoirs of the American Entomological Institute, 54: 881 pp., 1994.

Young, D.G., Lawyer, P.G. . **New world vectors of the Leishmaniases, in: Current Topics in Vector Research**. Harriz, K.F. (Eds). Spring-Verlag, New York, pp.29-71, 1987.

Zanette MF. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina** [dissertação de mestrado]. Araçatuba (SP): Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterináriada Unesp; 2006.

Zuben, AP B, Von Donalísio M.R. **Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros**. Cad. de Saude Pública. 32: 6, pp. 1–11, 2016.

ANEXOS

10. ANEXOS

Anexo I

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559 -1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br

OFÍCIO CEUA Nº. 184/2016, de 14 de Dezembro de 2016

Ilustríssimo(a) Senhor(a)
Professor(a) Doutor(a) George Luiz Lins Machado Coelho
DECME/EMED

Senhor(a) Pesquisador(a),

Estamos enviando o certificado de aprovação do protocolo nº. **2016/20**, intitulado **"*Estudo sobre a leishmaniose visceral canina no município de Ouro Preto, Minas Gerais.*"**.

2. Atendendo ao art. 6º, IX, da Resolução Normativa CONCEA nº 1, de 09.07.2010, solicitamos que encaminhe a CEUA/UFOP o relatório final do projeto, após executá-lo, conforme modelo do *site* da CEUA.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Lenice Kappes Becker
Coordenadora da CEUA/UFOP.

Anexo II

UFOP – UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE MEDICINA
Laboratório de Epidemiologia de Doenças Parasitárias
Prédio da Medicina: Campus Universitário UFOP
Sala 203 Telefone 35591004
Morro do Cruzeiro – CEP 35400-000

Projeto: Ecoepidemiologia das Leishmanioses no Município de Ouro Preto

Nome do cão:	**Origem do animal:** ( ) Ouro Preto ( ) Outra cidade: _____	**Código amostra:**
Proprietário:	**Endereço/Localidade:**	
Coordenadas: X_____/ **Y**_____ **Elevação:** _____		
Sexo: ( ) Fêmea ( ) Macho **Porte:** ( ) Pequeno ( ) Médio ( ) Grande **Pelo:** ( ) Curto ( ) Médio ( ) Longo	**A maior parte do tempo o cão fica:** ( ) No domicílio, preso dentro da residência ( ) Solto, tendo acesso à rua	**Temperamento do Cão:** ( ) Não agressivo ( ) Agressivo
Ectoscopia: ( ) Ceratoconjutivite ( ) Opacificação de Córnea ( ) Hiperqueratinização do focinho ( ) Dermatite - localizada ( ) Dermatite – generalizada ( ) Alopecia ( ) Emagrecimento ( ) Onicogrifose ( ) Infecções Secundárias ( ) Paresia de membros posteriores		
Classificação Geral: ( ) Assintomático ( ) Sintomático		

Anexo III

UFOP – UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE MEDICINA
Laboratório de Epidemiologia de Doenças Parasitárias
Prédio da Medicina: Campus Universitário UFOP
Sala 203 Telefone 35591004
Morro do Cruzeiro – CEP 35400-000

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Caro(o) morador(a),

Você está sendo convidado (a) a participar do estudo: **"Ecoepidemiologia das Leishmanioses no município de Ouro Preto, Minas Gerais"**. Esse trabalho tem o objetivo de determinar a prevalência da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) no município de Ouro Preto. Uma amostra de cães domiciliados no município, será diagnosticada para Leishmaniose Visceral (LV). Sua residência foi escolhida para essa investigação e, sendo assim, a coleta do sangue do seu cão será realizada. Os profissionais responsáveis pela pesquisa são professores, pesquisadores e alunos da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Segue descrito abaixo, os contatos desses profissionais e esses poderão ser procurados e questionados a qualquer momento sobre os objetivos da pesquisa. Você pode ou não aceitar a participar da pesquisa, sendo que sua não aceitação não acarretará a você danos ou diferença de cuidado. Além disso, você poderá recorrer a Comissão de Ética em Pesquisa Animal da UFOP a qualquer momento para esclarecimento de questões éticas. Sua participação será espontânea e não te causará nenhum custo. Todos os exames serão custeados pela pesquisa. Todos os dados e informações coletadas serão sigilosas e sua identidade não será revelada. As amostras biológicas (sangue) e as informações coletadas serão guardadas por cinco anos no Laboratório de Epidemiologia das Doenças Parasitárias da Escola de Medicina da UFOP, sob a guarda do coordenador da pesquisa (prof. George Luiz Lins Machado Coelho) e serão utilizados exclusivamente para essa pesquisa. Se tiver alguma dúvida, pode nos perguntar e, depois de esclarecidas, você poderá ou não aceitar participar. Se aceitar, favor assinar abaixo.

Agradecemos a sua atenção.

Eu,_____, identidade _____ fui informado das características da pesquisa e concordei em participar da mesma. Não terei nenhum gasto e também não serei recompensado financeiramente pela simples participação. Em qualquer momento, por vontade própria e sem necessidade de explicações, posso recusar-me a participar.

Assinatura:_____

Contatos: George Luiz Lins Machado Coelho/ gmcoelho@medicina.ufop.br

Ana Maria Sampaio Rocha / anasampaiorocha@hotmail.com

Laboratório de Epidemiologia das Doenças Parasitárias / Escola de Medicina/ UFOP/ telefone: (31) 3559-1004.

Comissão de Ética em Pesquisa Animal – UFOP/ Telefone: (31) 3559-1368; e-mail:ceau@prop.ufop.br