

Universidade de Brasília
Núcleo de Medicina Tropical
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Rafaella Albuquerque e Silva

**Avaliação do comportamento de *Lutzomyia longipalpis*
(Phlebotominae) em áreas de transmissão intensa
submetidas à intervenção com coleiras impregnadas com
deltametrina a 4% para controle de leishmaniose visceral**

Brasília, 2018

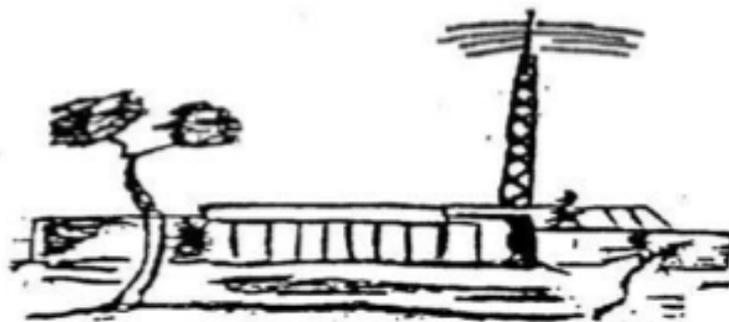
Avaliação do comportamento de *Lutzomyia longipalpis* (Phlebotominae) em áreas de transmissão intensa submetidas à intervenção com coleiras impregnadas com deltametrina a 4% para controle de leishmaniose visceral

Rafaella Albuquerque e Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para a obtenção do título de doutor em Medicina Tropical, na área de concentração: Biologia das doenças infecciosas e parasitárias.

Orientador: Prof Dr Gustavo Adolfo Sierra Romero

Co-Orientador: Dra Elizabeth Ferreira Rangel



Brasília

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

ASI586a Albuquerque e Silva, Rafaella
Avaliação do comportamento de *Lutzomyia longipalpis* (Phlebotominae) em áreas de transmissão intensa submetidas à intervenção com coleiras impregnadas com deltametrina a 4% para controle de leishmaniose visceral / Rafaella Albuquerque e Silva; orientador Gustavo Adolfo Sierra Romero; co-orientador Elizabeth Ferreira Rangel. -- Brasília, 2018.
161 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Arte) -- Universidade de Brasília, 2018.

1. Leishmanios visceral. 2. *Lutzomyia longipalpis*. 3. Coleira. 4. Deltametrina. 5. Cães. I. Adolfo Sierra Romero, Gustavo, orient. II. Ferreira Rangel, Elizabeth, co-orient. III. Título.

DATA DA DEFESA

27 de março de 2018

Banca Examinadora

Professor Doutor Gustavo Adolfo Sierra Romero (Presidente)

Universidade de Brasília

Dr. Fredy Ovallos Galvis (Membro)

Universidade de São Paulo

Prof. Dr. José Angelo Lindoso (Membro)

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Marcos Takashi Obara (Membro)

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves (Suplente)

Universidade de Brasília - UnB

Aos meus pais, Daniel e Julia
À minha esposa, Juliana Belchior
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A elaboração dos agradecimentos, dentre todas as atividades desenvolvidas nesta tese, foi o momento mais simples e ao mesmo tempo mais feliz de todo o meu processo de crescimento pessoal e profissional atingido nestes últimos 5 anos. Agradecer para mim é fácil porque fortalece a minha concepção de que não fazemos nada sozinhos, de que precisamos de ajuda, e o mais importante: de que podemos ter ajuda. Ajuda de verdade. Ajuda sem necessariamente ficarmos “devendo” algum favor. Ajuda de um grupo imenso de pessoas que são naturalmente boas, altruístas, e que vieram para este plano exatamente para ajudar ao próximo. É assim que eu me sinto neste momento de escrita dos agradecimentos. Feliz. Realizada.

Começo falando dos meus pais, Daniel e Júlia. Talvez tudo no âmbito profissional eu tenha feito pensando não somente na minha realização, mas na realização deles também. Eles sempre me estimularam demais ao estudo. Sempre me fazendo entender que isso era tudo o que eles iriam me deixar de herança. E que herança hein? Fizeram-me entender que através do estudo eu poderia ser e fazer o que eu quisesse (no âmbito do bom senso, lógico). Todos os preceitos básicos da ética e da moral eu adquiri da minha criação. Ser honesta sempre. Ajudar o próximo (mesmo que eles não sejam tão próximos assim.. rs). Trabalhar duro. E não aceitar o “não” inicial que a vida pode nos trazer. Eles realmente são a minha base. A minha inspiração. O meu tudo.

Agradeço imensamente a minha esposa, Juliana Belchior. Ela conseguiu me fazer entender o significado de companheirismo. Vai para além da divisão uniforme de tarefas que assumimos no casamento, da divisão de contas e até além do escutar os problemas do dia a dia. O companheirismo vem do respeito mútuo, da preocupação em evitar mínimas coisas que influenciariam na harmonia do casal e do cuidado com o outro. A Juliana toma todos os meus “problemas” para si como se fossem dela também. Eu poderia dizer aqui que esta tese também é dela. É graças a ela. E não porque ela

entendeu todas as limitações de horas que tivemos juntas, todas as saídas que deixamos de fazer e todos os finais de semana que ficamos em casa. Mas porque ela trabalhou junto comigo. Por todas as noites e sábados que estávamos juntas na UnB, macerando flebotomíneos e fazendo extrações de DNA. Por todos os flebotomíneos que dissecamos e preparamos para a montagem. Por todas as planilhas e análise de dados que fizemos juntas. E por todas as vezes que ela me consolou quando as etapas do processo estavam dando errado. Eu tive (tenho) muita sorte. E espero que esta sorte dure para sempre.

Agradeço ao meu orientador, Gustavo Romero, pela leveza com que foi conduzido o período do meu doutorado, pela sua simplicidade e humildade no momento das sugestões/questionamentos. Talvez ele nem saiba disso, mas eu sou fã dele. E essa admiração inicialmente foi pelo profissional que ele é, mas depois desse período que dividimos, eu virei fã da pessoa que ele é. Honesto, ético e extremamente humilde. Fez-me acreditar mais nas pessoas. Falando dele, lembro da sua esposa, Regina Fernandes. Que bom que pessoas boas se encontram. Que bom que eles se encontraram. Que bom que juntos eles conseguem orientar e ajudar pessoas, alunos. Ela me acalmou no momento final quando eu estava preocupada com os prazos, com a escrita e com a apresentação.

Agradeço a Dra Elizabeth Rangel, minha co-orientadora, por todo o conhecimento repassado no âmbito da entomologia. Ela sempre foi uma referência para mim. Teve toda a paciência de discutir ponto por ponto da minha tese por telefone, uma vez que estava sem acesso a internet. Para ela, o meu muito obrigada.

Agradeço ao Dr Guilherme Werneck e a Dra Lucia Santana pelo auxílio na análise de dados. Ambos são profissionais de excelência, extremamente atarefados, que disponibilizaram tempo para me ajudar. O meu muito obrigada!

A equipe do GT-Leishmanioses do Ministério da Saúde: Lucas Edel e Marcia Sousa. Eles estimularam e proporcionaram a execução do estudo, sempre me auxiliando, contribuindo com sugestões. Além de deixar o meu dia

mais feliz. Trabalho no MS há 7 anos e quem conhece o grupo sabe o quanto somos unidos e harmônicos. Ainda relacionado ao MS, agradeço aos meus superiores diretos da Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis (CGDT), Renato Vieira e Francisco Edilson, que possibilitaram a realização do projeto, me apoiaram provendo toda a logística para que eu conseguisse executá-lo.

Não poderia deixar de agradecer a ajuda dos colegas Jorge, Fabrício, Luiz e Asevedo, da Secretaria de Saúde do estado do Ceará. Eles fizeram as capturas de campo e a identificação taxonômica dos exemplares capturados. Além disso, eles são meus companheiros de longa data na saúde pública. São pessoas comprometidas com o trabalho e sempre prontas para servir. Agradeço também a equipe do Centro de Controle de Zoonoses de Montes Claros, Marília e Ronaldo. Ambos foram fundamentais para a realização do projeto. Eu ganhei dois grandes amigos. Com o Ronaldo aprendi ainda mais como realizar a abordagem da população em campo. Ele me fez companhia em todas as atividades de monitoramento de Montes Claros, sempre com muita boa vontade e disposição. A Marília é uma pessoa indescritível. Talvez uma das pessoas mais humanas que eu já conheci. Me deu abrigo e conforto em todas as vezes que eu fui a Montes Claros. Ajuda a todo mundo e tem o coração do tamanho do mundo. De longe, uma das melhores “aquisições” que eu já tive.

Durantes esses 5 anos, conheci um grande parceiro, que se demonstrou ao longo do tempo um grande amigo: Andrey Andrade. Ele entrou na minha vida depois da sua chegada na UnB como professor visitante e eu tenho certeza de que essa amizade vai perdurar para sempre. Ele simplesmente foi fenomenal. Me ajudou em todo o processamento das amostras coletadas, acompanhando os estudantes de iniciação científica e identificando os flebotomíneos coletados. Ele tornou-se um irmão. Um brother. Uma inspiração. Um príncipe. Ele e toda a sua família moram no meu coração.

Agradeço demais a toda a equipe do Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da UnB, em especial ao Prof Rodrigo, Dra

Renata e Tauana. Durante todo o período de processamento dos flebotomíneos, eu utilizei a infraestrutura do laboratório. As pessoas de lá sempre me trataram bem, com empatia. A Renata me ajudou (MUITO) na montagem dos exemplares. A ajuda dela, com toda certeza, possibilitou a celeridade desta etapa da tese.

Agradeço a equipe do Laboratório Interdisciplinar de Biociências, em especial a Profa Nadjar e a Thais. A Thais me auxiliou quanto ao processo de extração de DNA dos *Lutzomyia longipalpis* e a realização da qPCR. A Profa Nadjar me estimulou. Me estimulou nas sextas-feiras a noite quando eu e a Ju ficávamos no laboratório. Me estimulou quando tínhamos que vir no sábado. Talvez o processo de estimulação dela seja tão natural, que ela não perceba como essa energia que ela tem faz bem àqueles que estão a sua volta. Só o bom dia dela, cedo da manhã, com um sorriso no rosto, faz com que você queira ter um bom dia mesmo. Rs. Ela é uma pessoa de coração bom. De energia boa. E esse período pequeno de convívio com ela, me fez bem.

Agradeço aos meus dois estudantes de iniciação científica, Bruno Beust e Gabriel Salmen. Passamos um ano de bolsa trocando experiências. Eu ensino tudo o que sei sobre flebotomíneos e eles me ensinando a orientar. Eu aprendi a estar do “outro” lado. Rs. Eles participaram de todo o processo de identificação dos flebotomíneos coletados. Dissecaram, diafanizaram e montaram as lâminas.

Agradeço a todas as pessoas que, mesmo não trabalhando na mesma área que eu, transformam os meus dias mais ricos de momentos felizes.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tese: Avaliação do comportamento de *Lutzomyia longipalpis* (Phlebotominae) em áreas de transmissão intensa submetidas à intervenção com coleiras impregnadas com deltametrina a 4% para controle de leishmaniose visceral

Tabela 1. Informações sobre tipo de transmissão de LV em municípios sem *Lu. longipalpis*, principais espécies flebotomínicas encontradas e infecção natural, Brasil, 2017.....50

Artigo 1. Avaliação da população de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) em áreas de transmissão intensa submetidas a intervenção com coleiras impregnadas com deltametrina a 4% para o controle de leishmaniose visceral.

Tabela 1. Fórmulas utilizadas para calcular a taxa de infestação domiciliar e abundância relativa98

Tabela 2. Modelo de regressão de Poisson. Avaliação entre a intervenção, sítio de captura e abundância de *Lutzomyia longipalpis*, de acordo com o período de agregação temporal (bimestre), Montes Claros, MG.....99

Tabela 3. Modelo de regressão de Poisson. Avaliação entre a intervenção, sítio de captura e abundância de *Lutzomyia longipalpis*, de acordo com o período de agregação temporal (bimestre), Fortaleza, CE.....100

LISTA DE FIGURAS

Tese: Avaliação do comportamento de *Lutzomyia longipalpis* (Phlebotominae) em áreas de transmissão intensa submetidas à intervenção com coleiras impregnadas com deltametrina a 4% para controle de leishmaniose visceral.

Figura 1. Casos de leishmaniose visceral em países com maior número de casos das Américas, 2001 a 2015.....	20
Figura 2. Casos de leishmaniose visceral por estado brasileiro, 2006-2015.....	22
Figura 3. Casos de leishmaniose visceral segundo sexo e idade, Brasil, 2007-2016.....	26
Figura 4. Taxa de letalidade por LV, Brasil, 2007-2016.....	27
Figura 5. Casos de coinfeção LV/HIV segundo sexo e faixa etária, Brasil, 2007 a 2016.....	28
Figura 6. Ciclo de vida de flebotomíneos. A. Ovo; B. Larva; C. Pupa; D. Adulto.....	45
Figura 7. Estrutura utilizada para identificação taxonômica de flebotomíneos - Cibário.....	46
Figura 8. Estrutura utilizada para identificação taxonômica de flebotomíneos – Genitália. A. Genitália fêmea; B. Genitália macho.....	46
Figura 9. Caracteres utilizados para identificação taxonômica. A: Genitália da fêmea de <i>Lu. longipalpis</i> . B: cibário de <i>Lu. longipalpis</i> . C: Genitália masculina de <i>Lu. longipalpis</i>	49
Figura 10. Mapa de Montes Claros, MG. Os pontos pretos representam as áreas controle e os pontos vermelhos as áreas de intervenção.....	65
Figura 11. Mapa de Fortaleza, CE. Os pontos pretos representam as áreas controle e o ponto vermelho a área de intervenção.....	65
Figura 12. Coleira Scalibor®.....	66
Figura 13. Fórmulas para cálculo das taxas de infestação domiciliar ¹ e abundância relativa do vetor ²	69

Artigo 1. Avaliação da população de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) em áreas de transmissão intensa submetidas a intervenção com coleiras impregnadas com deltametrina a 4% para o controle de leishmaniose visceral.

Figura 1. Município de Montes Claros, MG. Pontos pretos indicam a área controle enquanto que pontos vermelhos indicam a área de intervenção.....93

Figura 2. Município de Fortaleza, CE. Pontos pretos indicam a área controle enquanto que pontos vermelhos indicam a área de intervenção.....94

Figura 3. Número de *Lutzomyia longipalpis* capturados por bimestre e pluviosidade observada durante o período de estudo. A. Fortaleza/CE. B. Montes Claros/MG, Brasil, de 2013 a 2015.....95

Figura 4. Número total de *Lutzomyia longipalpis* capturados por bimestre e área de intervenção (com e sem o uso de colares impregnados nos cães) de Montes Claros (MG) e Fortaleza (CE), Brasil, de 2013 a 2015.....96

Figure 5. Número de flebotomíneos capturados por bimestre, sítio de captura (intra e peridomicílio), área de intervenção (áreas com e sem a coleira) em Montes Claros e Fortaleza.....97

Artigo 2. Estamos desperdiçando um caracter de taxonomia útil? O caso da pigmentação do tórax para identificação de *Lutzomyia longipalpis*.

Figura 1. Fluxograma de identificação taxonômica no estudo.....109

Figura 2. Diferença no padrão de coloração do tórax de *Lutzomyia longipalpis* e *Evandromyia cortelezzii*/*Ev. sallesi*.....110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AR – Abundância relativa
- CCR5 - Receptor quimiocina tipo 5
- ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática
- HIV - Vírus da imunodeficiência humana
- ID – taxa de infestação domiciliar
- IFN δ - Interferon gama
- IFI - Imunofluorescência indireta
- IL-2 - Interleucina 2
- IL-4 - Interleucina 4
- IL-10 - Interleucina 10
- IL-12 - Interleucina 12
- LV – Leishmaniose visceral
- LVC - Leishmaniose visceral canina
- NK - Células natural killers
- OPS/MS - Organização Panamericana de Saúde/Organização Mundial de Saúde
- OR – Odds ratio
- PNVC-LV - Programa Nacional de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
- MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
- SIM - Sistema de Informação de Mortalidade
- SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação
- SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde
- TCD4⁺ - Linfócitos T auxiliares
- TCD8⁺ - Linfócitos T citotóxicos
- TGF- β - Transforming growth factor beta
- Th₁ - Linfócitos T auxiliares
- TR-DPP-LVC - Teste rápido de imunocromatografia em plataforma de duplo percurso

FINANCIAMENTO

Apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Bolsa de doutorado: Rafaella Albuquerque e Silva.

Apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Bolsa de iniciação científica: Gabriel Salmen Raffoul; Bruno Best Quint

Apoio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) – Aquisição de insumos para extração de DNA e realização da RT-PCR.

Apoio financeiro da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde.

ÍNDICE

1. Introdução.....	20
1.1 Leishmaniose visceral.....	20
1.2 Leishmaniose visceral canina.....	28
1.3 Medidas relacionadas à vigilância e controle de reservatórios.....	32
1.4 Flebotomíneos.....	41
1.4.1 Biologia de flebotomíneos.....	41
1.4.2 Identificação taxonômica de flebotomíneos.....	46
1.4.3 Capacidade e competência vetorial.....	49
1.4.4 <i>Lutzomyia longipalpis</i>	53
1.5 Medidas relacionadas à vigilância e controle de vetores.....	56
2. Justificativa.....	62
3. Objetivos.....	63
3.1 Objetivo geral.....	63
3.2 Objetivos específicos.....	63
4. Material e métodos.....	64
4.1 Área de estudo.....	65
4.2 Intervenção.....	65
4.3 Escolha dos locais de captura.....	67
4.4 Captura de flebotomíneos.....	67
4.5 Identificação de flebotomíneos.....	68
4.6 Análise estatística.....	68
5. Resultados.....	70
5.1 Capítulo 1. Avaliação de populações de <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) em áreas de transmissão intensa submetidas à intervenção com coleiras impregnadas com deltametrina a 4% para controle de leishmaniose visceral.....	70

5.2 Capítulo 2. Estamos desperdiçando um caracter de taxonomia útil? O caso da pigmentação do tórax para identificar <i>Lutzomyia longipalpis</i>	101
6. Considerações finais.....	111
7. Conclusões.....	115
8. Referências.....	116
9. Apêndice 1.....	142
10. Apêndice 2.....	151

Resumo

SILVA, RAFAELLA A. Avaliação do comportamento de *Lutzomyia longipalpis* (Phlebotominae) em áreas de transmissão intensa submetidas à intervenção com coleiras impregnadas com deltametrina a 4% para controle de leishmaniose visceral. Tese (Doutorado em Medicina Tropical, Área de Concentração em Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

Existe pouca informação do efeito do uso generalizado de coleiras impregnadas com deltametrina para o controle da leishmaniose visceral canina na população de flebotomíneos. O objetivo deste trabalho foi estudar aspectos comportamentais de *Lutzomyia longipalpis* em áreas submetidas à intervenção com coleira impregnada com deltametrina a 4% (Scalibor) e áreas sem intervenção, em dois municípios brasileiros, Fortaleza (CE) e Montes Claros (MG). Foram realizadas capturas de flebotomíneos durante 30 meses em quatro bairros com transmissão intensa de LV em duas cidades. Em Fortaleza, foram avaliados três pontos na área submetida à intervenção e nove pontos na área sem intervenção (controle), enquanto que em Montes Claros foram escolhidos 10 pontos de capturas, cinco da área de intervenção e cinco na área sem intervenção. Calculou-se as taxas de infestação domiciliar, abundância relativa e distribuição de *Lu. longipalpis* por ponto e sítio de captura (intra e peridomicílio). No total foram capturados 4.373 flebotomíneos (1.494 no intradomicílio e 2.879 no peridomicílio) e 40.797 flebotomíneos (8.359 no intradomicílio e 32.438 no peridomicílio) em Fortaleza e Montes Claros, respectivamente. A taxa de infestação em ambos municípios foi de 100%, com abundâncias relativas diferentes. Em Fortaleza, a relação macho:fêmea foi de 2,4:1; sendo 2,3:1 nas áreas de intervenção e 3,1:1 na área controle. Em Montes Claros, a relação geral macho-fêmea foi

de 9,07:1; sendo 12,03:1 nas áreas de intervenção e 8,15:1 na área controle. O encoleiramento canino esteve associado a redução na quantidade de insetos capturados de 15% ($p = 0,004$) e 60% ($p < 0,001$) nas cidades de Montes Claros e Fortaleza, respectivamente. Observou-se menor abundância do vetor nas áreas submetidas à intervenção, o que sugere efeito do uso das coleiras impregnadas com inseticida na população de flebotomíneos.

Palavras-chave: leishmaniose visceral; *Lutzomyia longipalpis*; colares impregnados; deltametrina; cães.

Abstract

SILVA, RAFAELLA A. Evaluation of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) population in areas of intense transmission submitted to the intervention of 4% deltamethrin-impregnated collars for the control of visceral leishmaniasis. Thesis (Doctoral Degree in Tropical Medicine, Concentration Area in Biology of Infectious and Parasitic Diseases) – Postgraduate Program in Tropical Medicine, University of Brasilia, , Brasília, 2018.

There is little information on the effect of the use of deltamethrin-impregnated dog collars for the control of canine visceral leishmaniasis over the phlebotomine population. The objective of this work was to evaluate the impact of the use of 4% deltamethrin-impregnated collars (Scalibor®) in populations of *Lutzomyia longipalpis* by comparing areas submitted to the intervention to areas without this intervention. Phlebotomine captures were carried out for 30 months in four neighborhoods with intense VL transmission in Fortaleza e Montes Claros. We calculated the rates of domicile infestation, relative abundance and *Lu. longipalpis* distribution per point, capture location (intra and peridomicile areas) and area (intervention and non-intervention). In the control area from Fortaleza, the relative abundance was 415 specimens per capture point, whereas in the intervention area it was 159.25, while in Montes Claros, the relative abundance was 5,660 specimens per capture point in control areas, whereas in the intervention area it was 2,499.4. The use of dog collars was associated with reduction of captured insects of 15% ($p = 0.004$) and 60% ($p < 0.001$) in Montes Claros and Fortaleza, respectively. We observed a lower vector abundance in the intervention areas, which suggests an effect of the insecticide-impregnated collars on phlebotomine population.

Key words: visceral leishmaniasis; *Lutzomyia longipalpis*; impregnated collars; deltamethrin; dogs.

1. Introdução

1.1 Leishmaniose visceral humana (LV)

A leishmaniose visceral (LV) é uma das antropozoonoses transmitidas por dípteros vetores de maior relevância no mundo e está associada à infecção por protozoários do gênero *Leishmania*. A LV ocorre mais frequentemente à infecção pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum*. A doença acomete principalmente pessoas de baixa renda em países em desenvolvimento.

Apresenta distribuição mundial, afetando principalmente Índia, Nepal e Bangladesh, no sul da Ásia, Sudão e Sudão do Sul e Etiópia, na região leste da África e o Brasil, nas Américas (OPS/OMS). No continente americano, no período de 2001 a 2015, foram confirmados 52.176 casos de LV, com média anual de 3.478 (Figura 1). Dos países das Américas, o Brasil é o que concentra o maior número de casos, com mais de 90% dos casos registrados pelos sistemas de notificação vigentes (OPS/OMS 2016).

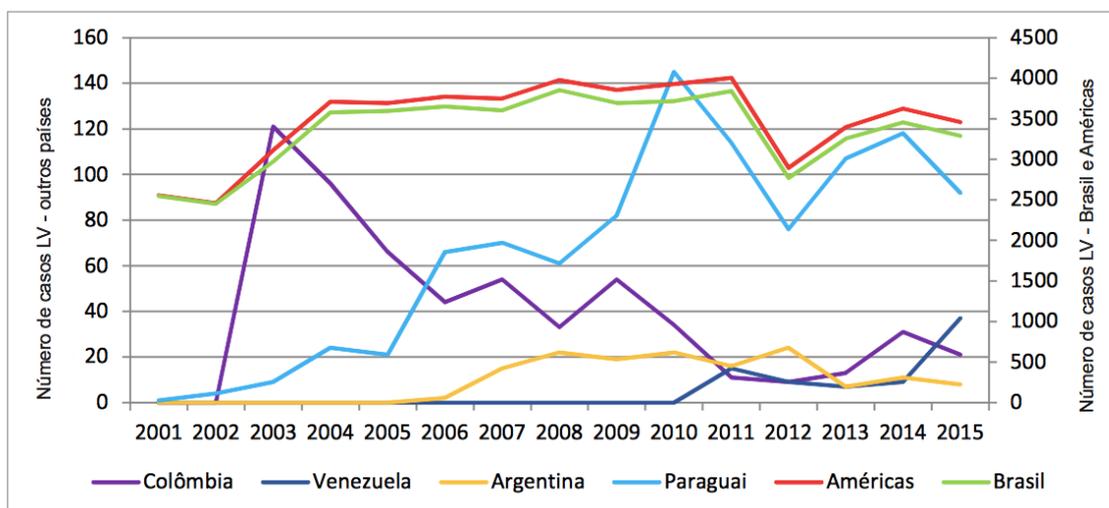


Figura 1 – Casos de leishmaniose visceral em países com maior número de casos das Américas, 2001 a 2015. Fonte: SisLeish, OPS/MS

No Brasil, a LV é considerada uma doença em expansão, uma vez que até 1980 sua ocorrência era exclusiva de municípios pertencentes a região Nordeste e, atualmente, todas as regiões do país confirmam casos anualmente (Figura 2). Os estados do Amazonas, Acre, Amapá e Rondônia não possuem casos humanos de LV, entretanto estes dois últimos já confirmaram casos autóctones de LV canina (Brasil, 2017).

A região Nordeste foi aquela em que historicamente a LV foi evidenciada, uma vez que Henrique Penna, pesquisador da Fundação Rockefeller do Rio de Janeiro, em 1934, ao examinar amostras de vísceras de pacientes com suspeita de terem morrido por febre amarela na região nordeste, descobriu que vieram a óbito por LV. A partir daí foram iniciados estudos nessa região, pois sugeriu-se que o Nordeste constituísse o foco de transmissão mais importante na época, em especial no estado do Ceará. Entretanto, as autoridades de saúde dos estados, incluindo o estado do Ceará, não apoiaram os pesquisadores, e, somente em 1953, quando mais de 100 pessoas do município de Sobral/CE vieram a óbito por LV, foram realizadas investigações epidemiológicas no local. Ademais, foi neste período a descoberta de dípteros da espécie *Lutzomyia longipalpis* s.l. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) infectados por *L. infantum* (que na época foi considerada como sendo *L. donovani*) bem como a presença de raposas infectadas por este mesmo parasito (Deane & Deane, 1954). Após a confirmação da infecção natural de *Lu. longipalpis* s.l., avaliações objetivando a confirmação da competência vetorial desta espécie na transmissão de *L. infantum* foram realizadas, em mais de uma ocasião. Dessa forma *Lu. longipalpis* foi caracterizado como o principal vetor da LV no Brasil (Lainson & Rangel 2005).

Atualmente, o estado do Ceará permanece como prioritário para Ministério da Saúde no controle desta doença, sendo a sua capital, Fortaleza, o município com maior número de casos do país desde 2010. Neste estado, 140 dos 184 municípios notificaram casos de LV, demonstrando a ampla dispersão da doença no estado. Além do Ceará, na região Nordeste destacam-se os estados do Maranhão e do Piauí, com as capitais albergando

14% e 28% dos casos confirmados no Brasil respectivamente (Costa et al. 1995, Mendes et al. 2002, Cavalcante & Vale 2014).

Na região Sudeste, a doença está distribuída em todos os estados, entretanto, enfatiza-se a relevância do estado de Minas Gerais, devido a sua grande extensão territorial, bem como à alta frequência e ampla distribuição de casos da doença. Em 2015, Minas Gerais foi o terceiro estado em número de casos. A capital, Belo Horizonte, faz parte dos 10 municípios com maior número de casos no período de 2010 a 2015 e é um dos municípios brasileiros com a maior taxa de letalidade do país (Bevilacqua et al. 2001, Lopes et al. 2010) (Brasil, 2017).

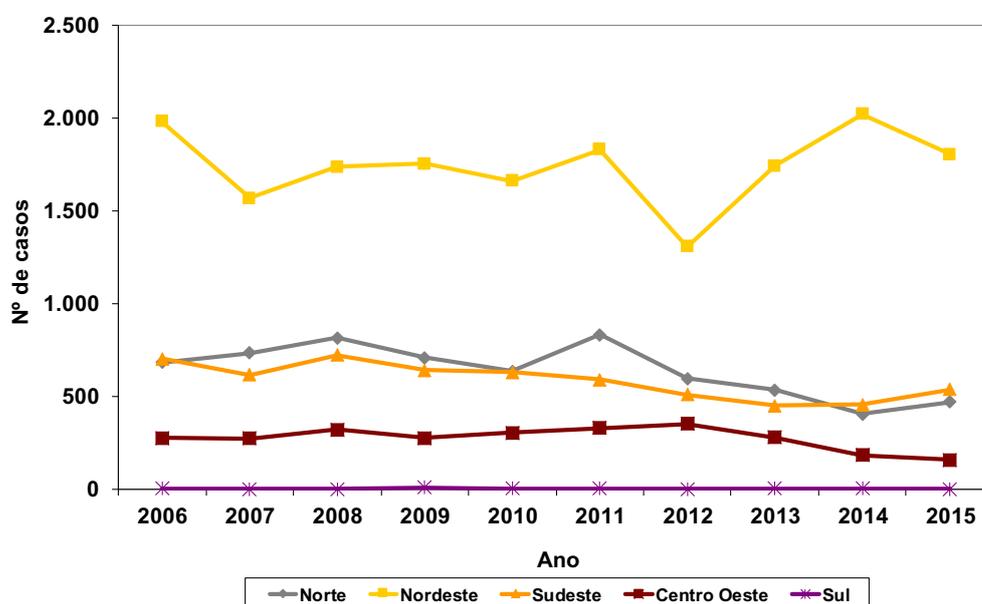


Figura 2. Casos de leishmaniose visceral por estado brasileiro, 2006-2015.

Fonte: SVS/MS

Das regiões com transmissão, a região Sul foi a última a registrar casos autóctones de LV humana. Em 2010, foi confirmado o primeiro caso no estado do Rio Grande do Sul, no município de São Borja, fronteira com a Argentina. Em 2015, no Paraná, foram confirmados quatro casos em Foz do Iguaçu, município pertencente a Tríplice Fronteira – Brasil, Argentina e Paraguai. Mais recentemente, em 2017, três casos foram confirmados em Florianópolis, município que já possuía casos de LV canina desde 2010 (Brasil, 2017).

A dinâmica da transmissão da LV está relacionada com a flutuação da população de vetores e reservatórios, naturais e domésticos, decorrente de mudanças ambientais, climáticas e sociais ocasionadas pelo processo de urbanização das cidades. O desequilíbrio ambiental acarreta desalojamento dos vetores e reservatórios silvestres, o que favorece a necessidade de adaptação ao ambiente antropizado. O incremento da densidade populacional causado pelo êxodo rural contribui para o crescimento do número de moradias em condições favoráveis à sobrevivência e adaptação de vetores, tais como: acúmulo de lixo, falta de saneamento básico e presença de animais (Shaw 2007, Cardim et al. 2013). As mudanças climáticas influenciam o comportamento e alcance dos vetores e reservatórios, sendo demonstrada possível expansão de *Lu. longipalpis* para áreas anteriormente consideradas como não receptivas, acompanhando alterações climáticas (Peterson et al. 2017). Além disso, análises climáticas considerando os fenômenos El Niño e La Niña demonstraram alteração da incidência de casos de LV durante esses fenômenos, aumentando durante o El Niño e diminuindo durante La Niña (Cardenas et al. 2006, González et al. 2010).

A manifestação clínica da doença, por outro lado, depende principalmente de fatores intrínsecos ao hospedeiro. Considera-se atualmente que a maior parte da população humana afetada pela infecção por *L. infantum* no Brasil seja assintomática (Carranza-Tamayo et al., 2016; dos Santos et al., 2017). O tipo de resposta imune desencadeada pela infecção por *L. infantum*, é fundamental para o aparecimento de sinais e sintomas da doença. Hospedeiros imunocompetentes desenvolvem tanto a resposta imune inata, mediada por macrófagos, células NK e IFN δ ; como imune adaptativa, com predominância de células Th₁, o que controla a evolução da infecção, impedindo o surgimento da doença. Este tipo de resposta, mais específica a patógenos intracelulares, ocorre em pacientes resistentes á infecção, denominados assintomáticos. Hospedeiros sintomáticos possuem um perfil de resposta imune adaptativa para Th₂, com participação das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β , caracterizando resposta inadequada para o controle da

infecção por *L. infantum* (Sharma & Singh 2009, Mansueto et al. 2011, Bhattacharya & Ali 2013).

A imunossupressão provocada comumente devido a infecções virais, como o HIV, é outro fator a ser considerado. Em pacientes coinfetados LV/HIV, a ativação de linfócitos TCD4⁺ provoca aumento dos receptores CCR5 na superfície celular. O CCR5 é o co-receptor para a entrada do vírus do HIV nas células, e o seu aumento eleva a permeabilidade da célula a infecção pelo vírus, acelerando a progressão da doença. Ademais, linfócitos TCD4⁺ ativados produzem IL-2, que ativa fatores de transcrição e estimula a replicação do vírus do HIV, com posterior lise dos linfócitos TCD4⁺ infectados. Com a redução dos linfócitos TCD4⁺, não há produção suficiente de IFN δ ou IL-12 para estimular a resposta celular específica contra *L. infantum* (Alvar et al. 2008, Saharia & Koup 2013). O papel dos pacientes co-infetados na transmissão da doença para a população humana, ainda não foi plenamente esclarecido (Ferreira et al., 2018).

A administração de drogas imunossupressoras, em situação de pacientes submetidos a transplantes de órgãos pode resultar na ativação de infecções ocultas (Alvar et al. 2008, Van Griensven et al. 2014). Neste contexto, a LV geralmente ocorre como uma complicação tardia após o transplante, com um atraso médio de 18 meses entre transplante e início da doença. No entanto, esse atraso varia de acordo com o tipo de órgão transplantado. Pacientes submetidos a transplante de fígado desenvolvem, em média, a doença 6 meses após a cirurgia, enquanto àqueles que realizam transplante de rim desenvolvem em 18 meses (Antinori et al. 2008). O número de relatos de LV em pacientes submetidos a transplantes é maior naqueles que realizam transplante de rim (Moroni & Bossi 1995, Silva et al. 2013).

A idade é outro fator associado à qualidade da resposta imunológica desenvolvida, o que impacta na carga parasitária apresentada pelo paciente e a gravidade da doença. Zacarias et al. (2017) avaliaram 625 pacientes em uma coorte aberta com o objetivo de avaliar a relação entre a carga de *L. infantum*, quantificada por qPCR, e a idade dos pacientes. Pacientes com um ano de vida apresentaram carga parasitária elevada que decresceu nos anos

subsequentes. Na faixa etária de 10 a 20 anos a carga atingiu o seu mínimo e então voltou a aumentar gradualmente. Os extremos de idade apresentaram maior carga parasitária, fenômeno provavelmente atribuível à imaturidade do sistema imunológico nos primeiros anos de vida e na imunosenescência da idade avançada (Goenka & Kollmann 2015, Bandaranayake & Shaw 2016).

A desnutrição também está relacionada a imunossupressão. Deficiência de micronutrientes, como vitamina A e zinco, influenciam, de maneira negativa, a imunidade celular (Hughes & Kelly 2006). Avaliações relacionando a desnutrição com a gravidade da expressão clínica de LV já foram realizadas em pacientes menores de 15 anos. Badaro et al. (1986) demonstraram que pacientes com LV grave tinham evidências de desnutrição, condição não observada em pacientes assintomáticos ou com infecção subclínica. Efeitos da desnutrição sob a carga parasitária também já foram confirmados. A desnutrição avaliada, em menores de cinco anos, a partir dos indicadores índice de nutrição peso-para-idade e IMC-para-idade demonstraram que a carga parasitária de *L. infantum* foi quatro vezes maior do que em pacientes sem desnutrição (Zacarias et al. 2017).

O Programa de Controle e Vigilância da LV (PCV-LV) do Ministério da Saúde preconiza o uso de provas diagnósticas somente em pacientes suspeitos, ou seja, aqueles residentes em áreas endêmicas que apresentam febre prolongada, anemia e hepatoesplenomegalia. Entretanto, estudos demonstram que uma parcela muito pequena dos pacientes infectados, cerca de 10 a 20%, desenvolve a doença (Badaro et al. 1986, Hommel 1999). Dessa forma, podemos estimar que para cada caso confirmado, temos de cinco a nove casos assintomáticos, demonstrando que a força de infecção é bem maior do que aquela detectada pelo sistema de saúde por meio das notificações dos casos sintomáticos. A presença da infecção assintomática poderia ser relevante para alguns cenários endêmicos em relação à segurança da transfusão de sangue e hemoderivados pelo risco potencial de transmissão por essa via. Esta hipótese tem sido recentemente investigada e certamente merecerá atenção no futuro (Asfaram et al., 2017, Monteiro et al., 2016).

Em 2016, foram confirmados 3.200 casos humanos, com incidência de 1,6 casos/100.000 habitantes. O sexo masculino e a faixa etária de 0 a 10 anos concentraram o maior percentual, com 66,2% e 39% dos casos respectivamente (Figura 3).

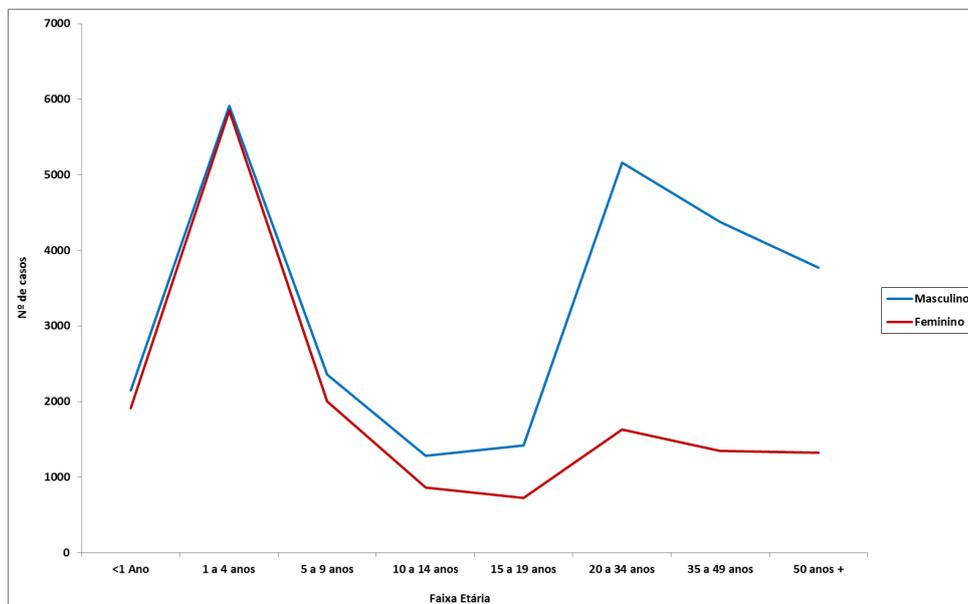


Figura 3. Casos de leishmaniose visceral segundo sexo e idade, Brasil, 2007-2016. Fonte: SVS/MS.

A letalidade em 2016 foi de 7,8%, a maior registrada desde 2006 (Figura 4). O aumento da letalidade ao longo dos anos pode estar associada a diversos fatores, dentre eles o diagnóstico e tratamento tardio dos casos. Caso não tratada, a LV evolui para o óbito em 90% dos casos e, mesmo tratada apropriadamente, cerca de 10% dos casos evoluem para óbito (Silva et al. 2014b). Sinais clínicos graves, como edema, dispnéia, diarreia, vômito, manifestações hemorrágicas e falência renal estão associados com o óbito, assim como achados laboratoriais de anemia grave, neutropenia e trombocitopenia (Sampaio et al. 2010, Varma & Naseem 2010).

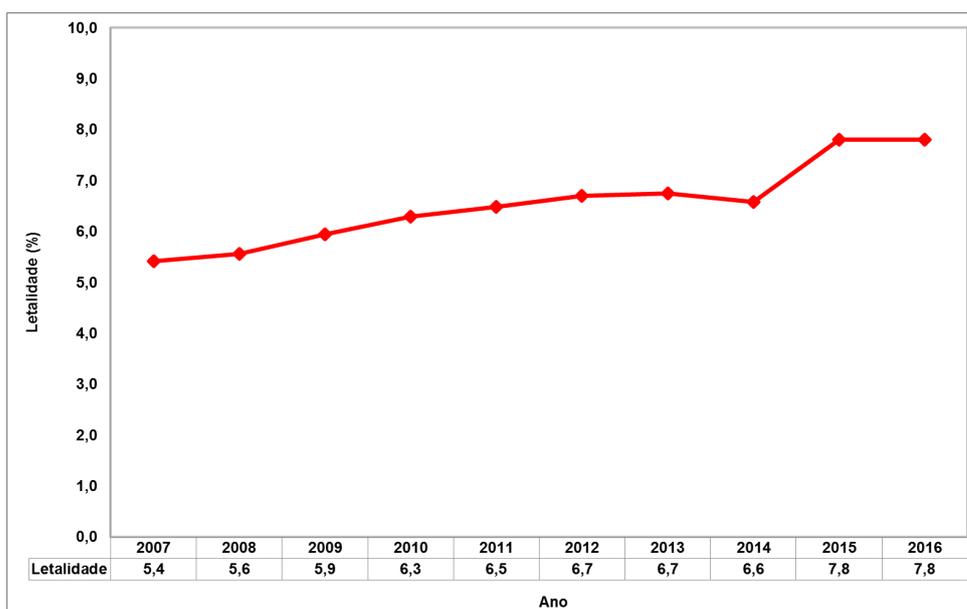


Figura 4. Taxa de letalidade por LV, Brasil, 2007-2016.

Fonte: SVS/MS

A idade e a nutrição também são fatores preponderantes para a letalidade, uma vez que já foi comprovada a sua influência sobre a resposta imunológica do hospedeiro. Em faixas etárias extremas, menores de 1 ano e maiores de 50 anos, são registrados maior número de óbitos. Donato (2014) demonstrou que a faixa etária de 1 a 4 anos teve o maior percentual de óbitos, atingindo 48% de letalidade, no período de 2007 a 2012.

A coinfeção LV/HIV também está relacionada ao aumento da letalidade no país. Nos últimos anos observa-se um aumento no número de coinfectados LV/HIV, sendo a faixa etária de 20 a 49 anos e o sexo masculino os mais acometidos (Figura 5). Em 2016 foram confirmados 317 casos de coinfeção, representando 9,9% do total de casos. A taxa de recidiva neste grupo é cerca de 30%, muito maior do que a taxa observada de 2%, no grupo sem coinfeção. Ademais, a letalidade neste grupo é maior, sendo registrado, em 2016, 11,4% (Donato 2014, Leite de Sousa-Gomes et al. 2017) (Figura 5).

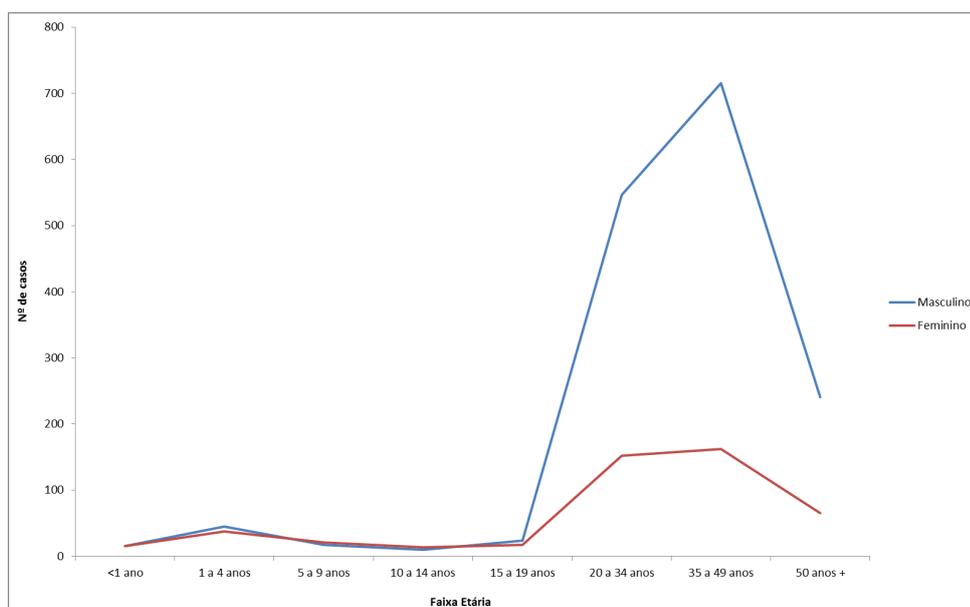


Figura 5. Casos de coinfeção LV/HIV segundo sexo e faixa etária, Brasil, 2007 a 2016.

Fonte: SVS/MS

Ressalta-se ainda que a taxa de letalidade poderia ser melhor mensurada caso houvesse uma comunicação entre os sistemas utilizados na vigilância em saúde, Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e Sistema de Informação de Mortalidade (SIM). No período de 2007 a 2012 foram notificados 1.368 óbitos por LV no SINAN. Entretanto, Donato (2014), no mesmo período, identificou 223 óbitos por LV (16%) no SIM que não constavam no SINAN, o que aponta para limitação do dado. Até que seja rotina do Programa de Vigilância e Controle da LV o relacionamento das bases dos sistemas utilizados para avaliação da morbidade e mortalidade, pode-se concluir que a magnitude e gravidade da doença pode estar sendo subestimada pelo SINAN.

1.2 Leishmaniose visceral canina (LVC)

A LVC é uma doença sistêmica grave e de evolução lenta. Apresenta sinais clínicos muito variáveis, comprometendo a estrutura corporal do animal, como atrofia muscular, caquexia, linfadenopatia e alterações dermatológicas. Estas últimas são as mais comumente observada na prática

da clínica veterinária e incluem as dermatites exfoliativa, nodular e ulcerativa (Deane & Deane 1962, Giunchetti et al. 2006).

Clinicamente, os animais infectados são divididos em três grupos: animais assintomáticos, que não apresentam nenhum sinal clínico sugestivo de infecção por LV; animais oligossintomáticos, são aqueles com adenite, perda de peso leve e pêlo opaco; animais sintomáticos, são aqueles que apresentam alguns sinais mais comuns da doença como dermatite furfurante, ceratoconjuntivite, córnea opaca, úlceras localizadas, paresia de membros, caquexia e hepatoesplenomegalia (Giunchetti et al. 2006).

A manifestação clínica da LVC depende de diversos fatores, alguns intrínsecos ao animal, como o tipo de resposta imune desenvolvida e o seu padrão nutricional; e outros extrínsecos, como as condições de higiene das instalações, manejo sanitário do animal e presença de ecto ou endoparasitos (Faria & Andrade 2012).

Animais sintomáticos possuem uma resposta imune predominantemente Th₂, caracterizando inespecificidade, e suas células mononucleares tem redução de produção de IFN δ , citocina que estimula os macrófagos e a diferenciação de linfócitos TCD4⁺ em Th₁. Ademais, alterações histopatológicas de pele dos cães sintomáticos tem extensão e severidade variáveis, acompanhadas da infiltração de macrófagos (parasitados ou não), linfócitos e neutrófilos isolados (Pinelli et al. 1994, Bourdoiseau et al. 1997, Palatnik-de-Sousa 2012). Nestes animais também são relatadas linfadenopatia, caracterizada pela depleção da região medular dos linfonodos, zona de células T, e proliferação da região cortical, zona de células B. A proliferação de linfócitos B provoca hipergamaglobulinemia, situação potencialmente nociva ao organismo, uma vez que o aumento excessivo de gamaglobulinas provoca a formação de imunocomplexos, causando vasculite, poliartrites e glomerulonefrite. Já animais assintomáticos possuem resposta específica, predominantemente Th₁ e alta produção de IFN δ (Gontijo & Melo 2004, Castro et al. 2012).

As condições ambientais, incluindo o local de permanência dos cães (tamanho e cobertura vegetal), o regime de criação (domiciliado ou semi-domiciliado) bem como a possibilidade de contato com outros animais, são importantes fatores para a determinação do risco de transmissão da LVC. Fernandes et al. (2016) concluiu que cães infectados têm 2 vezes a chance de viverem em condição de semidomiciliação quando comparados aos não infectados (OR = 2,04 IC95% 1,10-3,77) e 4 vezes a chance de serem de movimentação irrestrita, ou seja, não domiciliados (OR = 4,15 IC95% 2,04-8,42). Resultados semelhantes foram descritos por Goyena et al. (2016). A prevalência de LV era maior em cães que dormiam no peridomicílio quando comparada aqueles que dormiam no intradomicílio. Figueiredo et al. (2017) utilizaram imagens de sensoriamento remoto para correlacionar o uso e cobertura do solo em área urbana com a ocorrência de LVC. Foi observado que habitações localizadas em áreas com maior cobertura vegetal mais frequentemente albergam cães soropositivos, destacando que a presença da vegetação, em sua forma mais primária possível, favorece a interação entre os ciclos silvestre e peridoméstico, propiciando a manutenção da doença na área.

Uma vez infectados, os cães (sintomáticos ou não) apresentam intenso parasitismo cutâneo, possibilitando transmissão de *L. infantum* aos flebotomíneos no momento do seu repasto sanguíneo, o que os caracteriza como fonte de infecção (Lainson & Rangel, 2005). Dentre os outros animais domésticos, os abrigos de aves, principalmente galinhas, tem sido associados à presença maciça de *Lu. longipalpis*. Entretanto, essas não participam da manutenção do ciclo da LV, uma vez que são refratárias à infecção (Alexander et al., 2002; Oliveira-Pereira et al., 2008; Brazil et al 1991). Estudos recentes apontam a possibilidade de utilização de aves como sentinelas para detectar o aparecimento de *Lu. longipalpis*, uma vez que produzem anticorpos contra a saliva deste vetor (Brazil et al., 1991, Alexander et al., 2002, Oliveira-Pereira et al., 2008, Soares et al. 2013).

Assim como os cães, alguns animais silvestres são considerados reservatórios do parasito. São exemplos a raposa, *Cerdocyon thous*, e o

gambá, *Didelphis albiventris* (Ashford 2000). Inúmeros estudos avaliaram a prevalência da infecção de *L. infantum* em animais silvestres, entretanto, poucos são aqueles que mensuraram a taxa infectividade de flebotomíneos alimentados em animais silvestres (Travi et al. 1994, Quinnell et al. 1997, Lainson & Rangel 2005, Silva Tenório et al. 2011, Figueiredo et al. 2017). Courtenay et al. (2002) questionaram a participação ativa de raposas na manutenção da doença. Apesar das limitações na metodologia utilizada, nenhum dos 1.469 exemplares de *Lu. longipalpis* alimentados em 28 raposas sabidamente infectadas estava infectado após dissecação. Neste estudo, a prevalência de LV em raposas foi semelhante a prevalência em cães simpátricos.

Quando comparados aos demais reservatórios da doença, o cão não só tem uma maior taxa de infectividade para o vetor, como também é o que tem maior proximidade com a população humana, fortalecendo a sua importância no ciclo de transmissão da doença para a população humana (Lainson & Rangel 2005). Ressalta-se ainda que em áreas endêmicas para LV, a prevalência da doença nos cães não só supera como a elevação da sua incidência usualmente precede a ocorrência de casos humanos (Oliveira et al. 2001, Belo et al., 2013).

Considerando o seu papel como reservatórios, a identificação dos cães infectados é imprescindível para o controle da doença na população humana. Dentre as medidas de manejo dos reservatórios preconizadas pelo Ministério da Saúde, a eutanásia dos cães soro-reagentes é a medida mais amplamente utilizada, e questionada, nos municípios brasileiros. Dessa forma, estudos objetivando a avaliação de princípios ativos voltados para o tratamento da LVC foram realizados (Mateo et al. 2009, Woerly et al. 2009). Recentemente, um medicamento a base de miltefosina foi registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para tratamento da LVC, medida considerada para o tratamento individual de cães e não para o controle da LVC. Cães sintomáticos são elegíveis para o tratamento, entretanto, esta não é uma opção para cães assintomáticos, que devem ser direcionados a eutanásia. Do ponto de vista epidemiológico, estes animais

configuram um desafio para a execução da eutanásia, uma vez que a ausência de sinais clínicos dificulta a aceitação da população à medida proposta.

1.3 Medidas relacionadas à vigilância e controle de reservatórios

As medidas voltadas ao manejo de reservatórios são pautadas na identificação de cães infectados a partir de provas sorológicas aplicadas sequencialmente (Brasil 2014, Arruda et al. 2016). Embora existam diversos testes sorológicos disponíveis, estes variam nos valores de acurácia (sensibilidade e especificidade) em função da condição clínica, da densidade parasitária e do material biológico capturado (Santos et al. 2007, Moraes et al. 2013). Testes pouco sensíveis permitiriam a permanência de cães infectados na área, servindo como fonte de infecção aos vetores e aumentando o risco de transmissão da doença. Por outro lado, testes pouco específicos poderiam apontar erroneamente cães sem a doença como positivos induzindo à eliminação de cães saudáveis (Guimarães 1985).

Neste sentido, a avaliação da acurácia dos testes disponíveis nos mais diversos cenários, e de maneira periódica, é fundamental para a escolha do melhor protocolo diagnóstico a ser incorporado no Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PNVC-LV).

Até 2011, o PNVC-LV indicava a realização do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) como teste de triagem e a imunofluorescência indireta (IFI) como confirmatório.

O ELISA era considerado teste de triagem, uma vez que possui sensibilidade elevada, variando de 71 a 100%, além de ser rápido e ter possibilidade de ser realizado de maneira automatizada, aumentando assim o número de amostras processadas por vez (Bevilacqua & Alves 2004). A performance deste teste é limitada pelo tipo de antígeno utilizado. A utilização de antígeno bruto ou total limita a especificidade de ELISA e pode produzir

reação cruzada com outros agentes biológicos, dentre eles *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Trypanosoma cruzi* (Zanette et al. 2014, Peixoto et al. 2015).

O uso de antígenos recombinantes, por sua vez, aumenta a acurácia do teste se comparado ao uso de antígenos brutos. Porrozzi et al. (2007) compararam a utilização de antígenos brutos com diversos antígenos recombinantes: rK26, rK39 e rA2. Neste estudo, em testes de ELISA realizados em cães sintomáticos, antígenos brutos forneceram sensibilidade de 88% e especificidade de 87%, enquanto o antígeno recombinante rK26 sensibilidade de 100% e especificidade de 90-98%. Similarmente, o antígeno recombinante rK39 demonstrou 100% de sensibilidade e 85% de especificidade. Posteriormente, Maia & Campino (2008) demonstraram desempenho do rK39 ainda superior, apresentando a sensibilidade variando de 95 a 98% e a especificidade de 100%.

O IFI já foi amplamente utilizado para confirmação de casos de LVC, demonstrando-se bastante importante em levantamentos epidemiológicos (Bevilacqua & Alves 2004). Animais com titulação igual ou maior a 1:40 são considerados positivos para LVC. Microscopicamente, as amostras positivas apresentarão parasitos com fluorescência verde homogênea enquanto as negativas apresentarão uma coloração vermelha mate (Faria & Andrade 2012).

Mesmo com o seu uso difundido, possui diversas limitações em sua execução. Sua aplicação requer um alto nível de habilidade e experiência técnica, além de laboratório equipado e com infraestrutura adequada. Outra limitação é a necessidade de diluições em série do soro, tornando o teste laborioso e não prático para o rastreamento de grande número de amostras. No tocante a acurácia, a sensibilidade deste teste varia de 68% a 100%, com 74% a 100% de especificidade (Faria & Andrade 2012). Em um estudo realizado por Maia et al. (2009), testando cães assintomáticos e sintomáticos de uma área endêmica, a sensibilidade e especificidade foram de 87,5% e 94,7%, respectivamente. Semelhante ao ELISA, relatos de reação cruzada com *T. cruzi* foram observados, justificados pela proximidade filogenética entre os parasitos (Bevilacqua & Alves 2004, Gontijo; Melo 2004).

Ao longo dos anos, muitos foram os problemas observados na utilização do protocolo ELISA-IFI para confirmação dos casos de LVC. Estudos apontaram para a sensibilidade e especificidade insatisfatórias, principalmente em cães assintomáticos, além da demora entre a coleta e o resultado do exame, resultantes do tempo de execução dos testes. Este último ainda é agravado pela falta de infraestrutura de alguns municípios para a realização dos testes, o que ocasiona a centralização da execução nas regionais de saúde, dificultando ainda mais o retorno dos resultados (Morais et al. 2015, Romero 2016, Zuben & Donalísio 2016).

Considerando o supracitado, o Ministério da Saúde financiou a realização de um estudo em painel de soros para fazer a análise combinatória de todos os testes disponíveis no mercado para o diagnóstico de LVC (Brasil, 2011). O painel foi desenhado a partir de um estudo multicêntrico, randomizado, cego, realizado em municípios que tivessem a prevalência de LVC estimada em/ou maior que 10%. Dessa forma, o estudo foi desenvolvido nos municípios de Bauru/SP, Brasília/DF, Palmas/TO e Fortaleza/CE, nos quais foram coletadas cerca de 1.600 amostras biológicas. Estas foram encaminhadas para o Laboratório de Referência Nacional, Fundação Ezequiel Dias (FUNED), para processamento e envio de alíquotas aos laboratórios Adolfo Lutz (São Paulo) e Centro de Controle de Zoonose (Campo Grande), para verificação da reprodutibilidade. Dentre os parâmetros de acurácia avaliados, considerando os possíveis cenários, a realização dos testes sequenciais TR-DPP-LVC como triagem e ELISA como confirmatório, teve melhor acurácia, com valores de sensibilidade e especificidade de 87,88 (IC 95% =79.78 a 93.58) e 88,53 (IC95% = 86,68 a 90,21), respectivamente (Brasil, 2011). Além dos valores de acurácia é importante considerar que a realização do TR-DPP-LVC em campo tem diversas vantagens, como simplicidade e praticidade na realização, rapidez no resultado e a possibilidade de realização a partir de uma pequena amostra de sangue total, soro ou plasma, além de não exigir equipamentos laboratoriais específicos, armazenamento sob refrigeração e especialização tecnológica (da Silva 2015).

Estudos posteriores indicaram que o TR-DPP tem sensibilidade e especificidade elevadas, 98% e 96% em cães sintomáticos, respectivamente, entretanto esta diminui em animais assintomáticos (Grimaldi et al. 2012). Santos et al. (2007) demonstraram que o teste rápido realizado com soro detectou anticorpos para *Leishmania* em 31,3% do total das 1.199 amostras processadas, enquanto o ELISA e IFI detectou somente 27,2% e 25,1% respectivamente. Em meta-análise realizada por Peixoto et al (2014), foi demonstrado que o ELISA e TR-DPP-LVC tem acurácia moderada para o diagnóstico de LVC, entretanto, ressaltou-se na revisão a necessidade urgente de melhora no desenho, implementação e análise dos estudos existentes.

Considerando os resultados do painel, desde 2012 o PNVC-LV adota o TR-DPP-LVC para triagem e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) como confirmatório. Estudo posterior reforçou a superioridade apresentada pelo protocolo atual quando comparado ao protocolo anterior. Coura-Vital et al. (2014) avaliaram a incidência e prevalência da LVC antes e depois da mudança de protocolo. Foi realizado um estudo transversal, com 1.226 cães, que estimou a prevalência canina em 6,2% utilizando o protocolo adotado até 2012 (ELISA e IFI), e em 8,1% utilizando o protocolo atualmente recomendado (TR-DPP-LVC e ELISA). Da mesma forma, para a avaliação da incidência, foi realizada uma coorte de 26 meses com 447 animais em situação de suscetibilidade. Foi estimada a incidência em 2,8% e 5,4% utilizando o protocolo anterior e atual respectivamente.

Uma vez identificados, é indicada a eutanásia de cães soro-reagentes. Esta medida justifica-se, conforme descrito anteriormente, devido ao fato de cães infectados serem comprovadamente fontes de infecção aos insetos vetores, bem como por existir forte associação entre a presença de cães positivos e o risco de infecção humana (Belo et al. 2013). Entretanto, a discussão acerca da efetividade da eutanásia está em debate permanente. Alguns autores enfatizam que esta medida tem baixa efetividade quando comparada hipoteticamente a medidas dirigidas ao controle vetorial (Dye 1996, ELmojtaba et al. 2010), enquanto outros apontam que esta estratégia

pode reduzir o pool de fontes de infecção para flebotomíneos (Costa et al. 2007).

A aceitabilidade da eutanásia pela população é baixa, principalmente quando se trata de animais assintomáticos, o que dificulta a continuidade da ação (Costa et al. 2013). Em adição, nas situações em que a retirada de cães soro-reagentes é realizada, a taxa de reposição é elevada. Em estudos realizados em Araçatuba (SP), a taxa de reposição foi de 44,5%, com a justificativa dos proprietários de necessidade de companhia e de guarda das residências (Andrade et al. 2007).

Modelos matemáticos foram desenvolvidos para descrever a dinâmica de transmissão da LVC e seu controle por meio da eutanásia. Foi possível identificar a possível eficácia da eutanásia de cães soro-reagentes, assintomáticos e/ou sintomáticos, em áreas com transmissão baixa e/ou moderada. Esse modelo difere dos anteriores por ter considerado cães assintomáticos como infectantes aos flebotomíneos, o que normalmente não ocorre nos demais modelos. A capacidade infectiva dos animais assintomáticos, bem como a sua proporção tiveram grande impacto nas estratégias de controle (Costa et al., 2013).

Além da pouca aceitabilidade das atividades de controle de reservatórios propostas pelo PNVC-LV, autores ressaltam a dificuldade de execução destas atividades. Moraes et al. (2015) demonstraram redução na prevalência de LV canina em Belo Horizonte, no período de 2007 a 2011, evidenciando que as atividades propostas pelo Ministério da Saúde são efetivas, porém de execução complexa. Os autores ainda ressaltam a necessidade de revisão destas ações devido à dificuldade da sua manutenção. No período trabalhado foi observada redução no tempo entre a coleta de sangue e eutanásia dos cães positivos, bem como a permanência do alto percentual na realização das eutanásias de cães soro-reagentes. Zuben & Donalísio (2016) aplicaram um questionário aos gestores municipais de seis capitais brasileiras (Fortaleza, Campo Grande, Campinas, Bauru, Goiânia e Belo Horizonte) com o objetivo de obter a opinião destes quanto ao Programa. Como resultado foram relatadas dificuldades de execução

centradas na recusa da população às atividades de controle de vetores e reservatórios, principalmente com relação à eutanásia; alto custo para a manutenção das atividades associada ao pouco recurso repassado pelo governo federal; e o pouco envolvimento de outros setores das prefeituras.

Neste cenário, a efetividade de medidas de proteção individual para reservatórios domésticos deve ser estudada. Dessa forma, pesquisas sobre o uso de coleiras impregnadas com inseticidas, a avaliação de vacinas contra LVC e de outras medidas individuais, como aplicação de *spot-on*, devem ser estimuladas.

No tocante as vacinas, pesquisas pré-clínicas utilizando modelos de roedores avaliaram a eficácia de várias categorias de antígenos de *Leishmania*, incluindo parasitos mortos, frações purificadas por células, componentes ou subunidades de proteínas parasitárias, dentre outros. As combinações de antígenos e adjuvantes para cada tipo de antígeno também já foram testados em modelo animal utilizando cães, porém resultaram em proteção limitada a estes. Dentre as combinações existentes, o antígeno A2 recombinante associado a saponina, componentes da vacina LeishTec®, conferiu cerca de 40% de proteção contra a infecção por *Leishmania* (Palatnik-de-Sousa 2012, Gradoni 2015, Jain & Jain 2015). Esta vacina então recebeu registro final no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como medida protetiva individual contra LVC. Apesar de registrada, não existem evidências para comprovar a efetividade do seu uso como ferramenta de saúde pública. Ademais, em estudo realizado por Fernandes et al. (2014), 7,9% dos animais vacinados com LeishTec® apresentaram parasitismo e 5,1% foram capazes de infectar o vetor. Além disso, cerca de 13,3% dos animais apresentaram efeitos adversos sistêmicos, incluindo apatia, anorexia, dor, claudicação e edema.

A utilização de *spots-on* é amplamente recomendada para o controle de ectoparasitas, principalmente pulgas e carrapatos. Ademais, *spots-on* compostos por solução de permetrina a 65% já demonstraram eficácia considerável contra flebotomíneos em estudos de laboratório e de campo (Molina et al. 2001, Reithinger et al. 2001, Ferroglio et al. 2008). Ferroglio et

al. (2008) compararam o uso periódico de *spot-on* a base de permetrina a 65% com coleiras impregnadas com deltametrina a 4%. Não houve diferença entre os grupos, ambos apresentaram incidência de 2,5%, enquanto o grupo controle, não tratado com nenhuma dessas duas ferramentas, apresentou incidência de 15%, com diferença estatisticamente significativa entre este último e os grupos tratados ($\chi^2 = 12.4$; $P = 0.0004$). Vale ressaltar que, durante os seis meses de estudo, o uso do *spot-on* era mensal enquanto a troca da coleira somente ocorreu em caso de perda da mesma.

Coleiras impregnadas com deltametrina a 4% também tem demonstrado eficácia satisfatória em laboratório e em campo (David et al. 2001, Mazloui Gavvani et al. 2002, Reithinger et al. 2004, Brazuna 2012, Costa et al. 2013). Em estudo realizado no município de Andradina, região administrativa de Araçatuba no Planalto Ocidental Paulista, foi demonstrado que a utilização da coleira impregnada com deltametrina a 4% reduziu a prevalência canina e a incidência de casos humanos no último ano de estudo, quando utilizada de forma concomitante às atividades preconizadas pelo Programa Nacional de Controle das Leishmanioses (Camargo-Neves et al., 2004). Brazuna (2012) relatou redução da prevalência da LVC em 50% quando avaliou o uso da coleira em 100% da população canina na cidade de Campo Grande, MS. Resultados similares foram observados por Aoun et al (2008), na Tunísia, onde relataram soroconversão somente no grupo de cães não encoleirados (15,8%).

Neste mesmo contexto, uma coorte de 120 cães clinicamente e sorologicamente saudáveis de ambos os sexos, com faixa etária de 3 a 10 anos, foi realizada em um canil na região de Campânia, na Itália. Destes, 60 participaram de dois ciclos de encoleiramento, em maio de 2003 e de 2004. Foi observada proteção de 72,3% no primeiro ano e 45,1% no segundo ano. A taxa de proteção cumulativa observada no final do estudo foi de 50,8%, considerada positiva, uma vez que estes cães, além de serem somente uma amostra do total de cães presentes no canil, que mantinha em torno de 500 cães, conviviam com diversos cães infectados por *Leishmania* (Foglia Manzillo et al. 2006).

Estudo desenvolvido por Sevá et al. (2016), a partir de modelagem matemática, demonstraram que o uso de coleiras impregnadas com inseticida, quando utilizado com taxa de cobertura de 90%, conseguiu diminuir a prevalência de coes soropositivos e a incidência de casos humanos a zero. Resultados similares foram evidenciados por Reithinger et al. (2004), que ao utilizar como parâmetros no modelo: a proporcao de repastos sanguíneos realizados em coes (0,1 a 0,33), o intervalo entre os repastos (3 a 4 dias), o percentual de flebotomíneos que adquiriram o parasito realizando repasto sanguíneo em coes infectados (5 a 25%), o percentual de coes infectados por vetores (5-50%) e por fim, a taxa de mortalidade dos vetores (0,2 a 0,6), demonstraram que o uso da coleira impregnada com deltametrina conferiu uma protecao de 60%. Maior do que a conferida pela eutanásia, mensurada em 50%.

Estudos considerando o impacto do uso de coleiras impregnadas na incidência de casos humanos também já foram desenvolvidos. Mazloui Gavvani et al. (2002) no Ira, observaram reduçao da soroconversão em coes e humanos após um ano de estudo. Neste estudo, 18 aldeias foram pareadas por “prevalência pré-intervencao da infeccao *L. infantum*” em crianças e foram aleatoriamente divididas em grupos: intervencao, nos quais seria utilizado coleiras impregnadas com inseticida; e controle, nos quais não seriam utilizadas coleiras impregnadas com inseticida. Na área de intervencao, a soroconversão em crianças foi de 1,49% enquanto que na área controle foi de 2,41% (OR 0,57 - IC 95% = 0,36-0,9).

Até 2012, somente as coleiras impregnadas com deltametrina a 4% (Scalibor®) tinham registro no Brasil. Recentemente, outras duas coleiras, com princípios ativos distintos da Scalibor®, foram registradas. São elas a Seresto®, a base de imidacloprida (neonicotinóide) e flumetrina (piretróide); e a Leevre®, composta por deltametrina e propoxur, piretróide e carbamato, respectivamente.

A eficácia da coleira Seresto® já foi comprovada no controle de pulgas e carrapatos tanto em coes como gatos (Dantas-torres et al. 2013, Brianti et al. 2014). No tocante ao controle da populacao de flebotomíneos, estudo

demonstrou que o uso da coleira apresentou eficácia de 93,4%. Estudo multicêntrico, controlado, foi realizado na região de Sicília, Itália. Um total de 219 cães sorologicamente negativos para LV foram divididos em dois grupos: G1 (n=102), composto de cães com uso da coleira impregnada com inseticida; e G2 (n=117), composto por cães não encoleirados. Os animais foram acompanhados durante 10 meses, com realização periódica de testes diagnósticos para LVC nos dias 90, 180, 210 e 300 após o início do estudo. Infecção por *L. infantum* foi observada em 40,2% dos animais do G2. Oito (19,6%) dos cães soropositivos em G2 mostraram um aumento nos títulos de anticorpos variando entre 1:160 e 1:1.280. A taxa média de densidade de incidência no seguimento final foi de 4,0% para G1 e 60,7% para G2, comprovando o potencial protetivo da coleira (Brianti et al. 2014).

Com o surgimento de coleiras com diversas composições químicas, como Seresto® e Leevre®, estudos comparativos estão sendo desenvolvidos. Brianti et al. (2016) demonstraram a superioridade da coleira Seresto®, contra a infestação por pulgas e flebotomíneos, quando comparada a Scalibor®. Para avaliação da infestação por pulgas, a Seresto® teve eficácia de 100% nos dois períodos de acompanhamento, enquanto que a eficácia da Scalibor variou de 23,3 a 33,3% nos dias 120 e 210 respectivamente. No tocante a infecção por *L. infantum*, a incidência foi de 5,5% e 20% em cães que utilizaram Seresto® e Scalibor® respectivamente, com taxa de prevenção de 88,3% para Seresto® e 61,8% para Scalibor®.

Objetivando a comprovação, em larga escala, da efetividade das coleiras impregnadas com inseticida (Scalibor®), um projeto multicêntrico foi financiado pelo Ministério da Saúde em 2012. O estudo foi realizado em 17 municípios brasileiros, com uma estimativa de 85.000 cães encoleirados em um período de 24 meses. Os municípios foram divididos em áreas semelhantes (com relação as características ambientais e população canina), em que eram desenvolvidas também de maneira similar as atividades propostas pelo PNVC-LV. Uma área foi denominada “intervenção”, em que todos os cães soronegativos foram encoleirados; e a outra chamada de “controle” em que os cães não receberam coleiras. Semestralmente os

animais eram testados para LVC, seguindo o protocolo atualmente preconizado pelo MS, TR-DPP-LV seguido do ELISA. Seguindo as orientações do fabricante, as coleiras foram trocadas a cada 6 meses. Resultados preliminares demonstraram redução da prevalência da LVC, considerando todos os municípios, em 40% (Werneck, 2016 - Comunicação pessoal). No tocante a incidência da doença em humanos, esta teve uma redução em 11% durante o período de estudo. Neste sentido, uma avaliação de custo-efetividade está sendo conduzida para a possível incorporação desta ferramenta no Programa de Controle das Leishmanioses.

1.4. Flebotomíneos

Os flebotomíneos são dípteros capazes de transmitir diversos patógenos, como arbovírus, bactérias e protozoários. Neste sentido, o estudo sobre os fatores biológicos que justificam a sua ocorrência, distribuição e competência para a transmissão de patógenos são fundamentais (Shaw 2003).

1.4.1 Biologia de flebotomíneos

São insetos pequenos, medindo em torno de 2 a 3 mm, e conhecidos popularmente, por “mosquito palha”, “tatuquiras”, “birigui”, “arrepiado” a depender da área geográfica na qual estão distribuídos. Pertencem a subordem Nematocera por possuírem antenas longas e multissegmentadas, além do corpo recoberto de cerdas longas e numerosas; e à família Psychodidae por terem asas lanceoladas e densamente revestidas por cerdas longas, com nove ou mais veias (Brazil & Brazil, 2003).

Somente as fêmeas são hematófagas, devido à necessidade de desenvolvimento ovariano. É comprovado que durante a oviposição o número de ovos é diretamente proporcional à quantidade de sangue ingerido durante o repasto (Ready 1979). Observa-se que a alimentação em alguns grupos de

vertebrados tem valor nutritivo mais elevado que outras e dessa forma, também tem impacto direto no número de ovos postos por fêmea. Para *Lu. longipalpis*, foi observado que o repasto sanguíneo realizado em roedores (*Proechimys guyanensis*), gambás (*Dildepheis marsupialis*) e preguiças (*Bradypus tridactylus*) promove aumento no quantitativo de ovos postos por fêmea quando comparado ao repasto realizado em humanos (Ready 1979). Neste mesmo contexto, Chagas et al. (2007) comprovaram que fêmeas de *Lu. cruzi* alimentadas com sangue de hamster realizavam posturas com número elevado de ovos. Entretanto, neste mesmo estudo foi observada a preferência da alimentação em humanos quando comparada aos hamsters. O número médio de ovos por postura foi de 27,9, semelhante ao observado em outros estudos para *Lu. longipalpis*.

A escolha do local para realização da postura dos ovos é realizada aparentemente determinada por características microambientais. Superfícies sombreadas, sem muita alteração de temperatura e umidade, e ricas em matéria orgânica são os locais de predileção, principalmente quando a natureza desta matéria orgânica é vegetal (Brazil & Brasil, 2003). Essas características garantem a sobrevivência das larvas, que inicialmente se alimentam das cascas dos ovos eclodidos, mas que posteriormente necessitam de uma fonte de nutrição. A escolha do local para oviposição é orientada por semioquímicos, que atuam como feromônio de agregação (Dougherty & Hamilton 1997).

A produção dos feromônios de agregação se inicia cerca de 12 horas após o nascimento dos machos, atingindo o seu ápice em 3 dias (Yew & Chung 2015). Esses feromônios são fundamentais para o cortejo das fêmeas e para a cópula. Primariamente os machos são atraídos por odores exalados pelos hospedeiros e pela quantidade de hospedeiros disponíveis, alcançando estes primeiro do que as fêmeas. As fêmeas são atraídas tanto pelos hospedeiros como pela liberação de feromônios sexuais pelos machos (Jones & Quinnell 2002).

Tanto os machos quanto as fêmeas ingerem carboidratos, que são fontes de energia imprescindíveis para as atividades de vôo, acasalamento,

postura e longevidade (Brazil & Brazil, 2003). O hábito de voarem em saltos reforça a hipótese de que estes insetos não se afastam muito dos criadouros e a sua dispersão máxima geralmente não excede um quilômetro (Alexander 1987, Yuval et al. 1988, Doha et al. 1991, Kamhawi et al. 1991, Morrison et al. 1993).

Em condições laboratoriais observa-se mortalidade de mais de 90% em fêmeas após a realização do repasto sanguíneo e postura (Buescher et al., 1984, Elnaiem & Ward 1992, Killick-Kendrick et al. 1997). Em condições naturais, de campo, essa taxa diminui e é esse fenômeno que possibilita a transmissão do protozoário *L. infantum* a hospedeiros suscetíveis. Fêmeas grávidas de *Lu. longipalpis*, ou seja, fêmeas que realizaram digestão completa, foram encontradas no peridomicílio e em varandas no município de Panorama, São Paulo, apontando para risco de transmissão de LV (Galvis-Ovallos et al. 2017a).

Naturalmente, a maioria das espécies de flebotomíneos tem hábito crepuscular e noturno, e dessa forma, permanecem em locais protegidos durante o dia. Abrigam-se nas copas ou nas bases das árvores (ocos, troncos e raízes tubulares), no chão entre as folhas secas caídas, em frestas de rochas, dentro de cavernas, dentro de tocas de animais, entre outros locais (Teodoro et al. 1993, Casanova et al. 2013, Silva et al. 2014a, Campos et al. 2017). Em áreas antropizadas, estudos retratam o encontro de flebotomíneos próximo a vegetações, em abrigos de animais como, galinheiro, chiqueiro, estábulo, curral e sob material acumulado nos quintais das habitações. Em ambiente domiciliar, são encontrados nas paredes internas e externas dos domicílios (Almeida et al. 2010, Casanova et al. 2013, Silva et al. 2014a, Salomón et al. 2015, Berrozpe et al. 2017, Dos Santos Silva et al. 2017, Santini et al. 2017)

O ciclo biológico dos flebotomíneos ocorre no ambiente terrestre e compreende quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto (Fig. 6). O período determinado para a mudança entre estágios varia de acordo com a temperatura ambiente, sendo este período maior em temperaturas mais baixas e menor em temperaturas mais altas (WHO, 2010). O aumento da

umidade no ambiente das fêmeas alimentadas acelera o desenvolvimento dos ovos (Milleron et al. 2008).

Os ovos possuem forma variando de elipsoide à oval, com comprimento variando de 300 a 500 μm e largura de 70 a 150 μm (Fig. 6). Logo após a postura, apresentam cor clara, tornando-se castanho escuro com o decorrer do tempo. As fêmeas põem uma média de 40 ovos por postura, e esta ação é realizada em substrato úmido, sombreado e rico em matéria orgânica, para garantir a sobrevivência e alimentação das larvas. Geralmente estes ovos são postos de forma isolada ou em pequenos grupos, ficando aderidos aos substratos graças às substâncias produzidas pelas glândulas acessórias. Os ovos demoram cerca de 7 a 10 dias para eclodir e dar origem as larvas (Deane&Deane 1962, Young & Duncan 1994).

O estágio larvar é composto por quatro estádios, diferindo em tamanho e número de cerdas caudais (Fig. 6). Larvas de primeiro estágio possuem um par de cerdas caudais enquanto que os demais estádios possuem dois pares. As formas larvares são pequenas, brancas e de aspecto vermiforme. Alimentam-se de matéria orgânica, das cascas dos ovos eclodidos e dos corpos dos adultos mortos após a postura. O desenvolvimento larvar dura em torno três semanas, quando então as larvas de quarto estágio se transformam em pupas, estágio mais resistentes às variações de umidade do que as fases de desenvolvimento anteriores (Brazil & Brazil, 2003).

A pupa é esbranquiçada ou amarelada, escurecendo à medida que se aproxima a eclosão do adulto (Fig. 6). Após 10 dias, os adultos emergem, com predomínio dos machos inicialmente. Isto ocorre devido a necessidade dos machos de atingirem a maturidade sexual, uma vez que ao nascimento a sua genitália está invertida. Durante as primeiras 24 horas, após a eclosão do macho, a sua genitália sofre uma rotação de 180° até à posição definitiva, levando os gonóstilos e gonocoxitos a localização dorsal e as restantes estruturas a face ventral (Isabel & Branco 2011). A rotação de 180° dos

genitais masculinos e a emergência feminina tardia (2-3 dias após a emergência do sexo masculino) parecem estar ligadas Clements (1992).

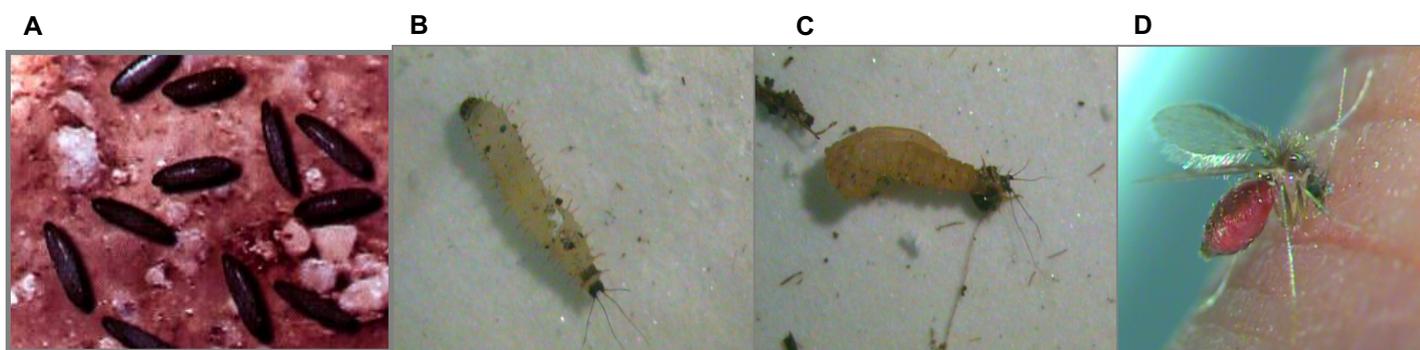


Figura 6. Ciclo evolutivo flebotomíneos. A. Ovo; B. Larva; C. Pupa; D. Adulto
Fonte: José Dilermando Andrade Filho.

O desenvolvimento de ovo a inseto adulto decorre num período de aproximadamente 30 a 40 dias dependendo da temperatura (Brazil & Brazil, 2003; WHO, 2010). As formas adultas são caracterizadas por dípteros pequenos com dimorfismo sexual aparente. As fêmeas normalmente são mais robustas que os machos. Diferenças são observadas com relação ao aparelho bucal. Machos possuem o aparelho bucal mais curto e atrofiado, enquanto nas fêmeas, este é mais longo e adaptado para a realização da alimentação sanguínea. A cabeça das fêmeas possui uma estrutura interna, na região mais ventral, chamada de cibário, que auxilia na sucção sanguínea e compõe os caracteres utilizados para a identificação taxonómica (Fig 7). Outra característica utilizada para a sexagem é a genitália dos espécimes. O macho possui um conjunto de apêndices bem desenvolvidos e ornamentados, enquanto que as fêmeas possuem segmentos menores e discretos com estruturas telescópicas, as quais lhe confere um aspecto mais arredondado. Além disso, as fêmeas possuem o corpo mais robusto (Young & Duncan 1994, Galati 1995, Shimabukuro et al. 2011).

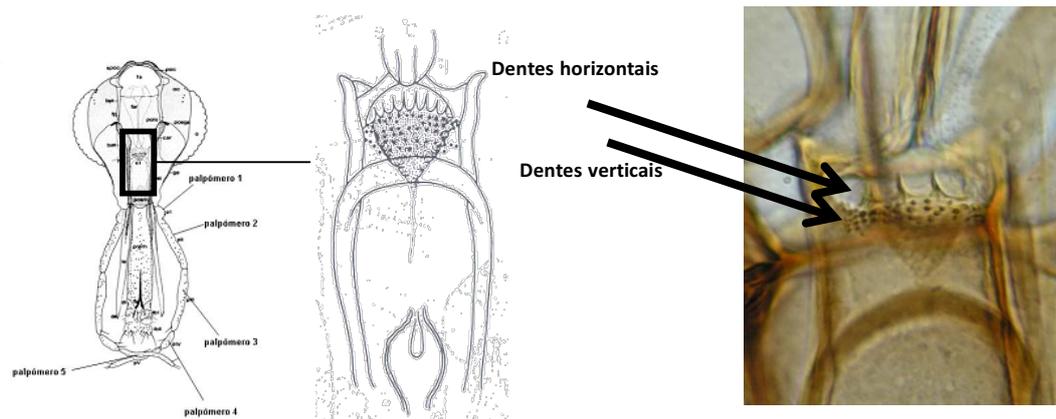


Figura 7. Estrutura utilizada para identificação taxonômica de flebotomíneos - Cibário.

Foto: Andrey José Andrade.

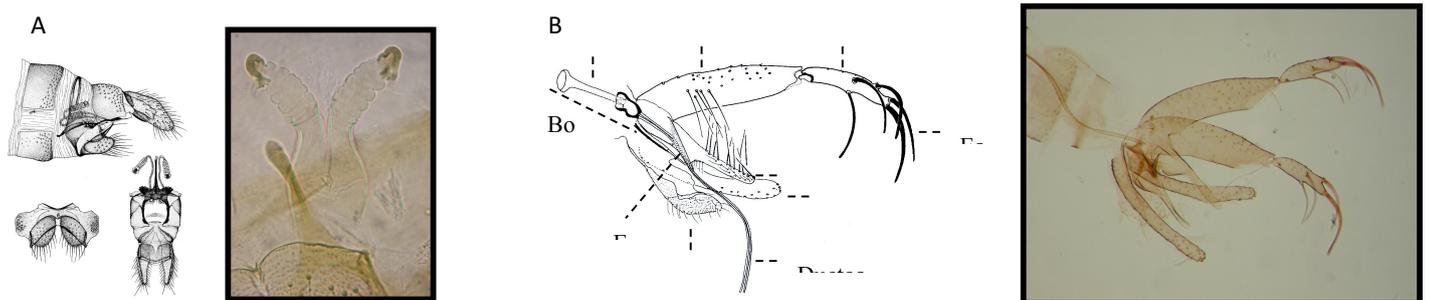


Figura 8. Estrutura utilizada para identificação taxonômica de flebotomíneos – Genitália. A. Genitália fêmea; B. Genitália macho. Foto: Andrey José Andrade.

1.4.2 Identificação taxonômica de flebotomíneos

A taxonomia de flebotomíneos, definida como identificação das espécies por meio de caracteres morfológicos e morfométricos, é o primeiro passo para a definição de quais espécies vetoras estão distribuídas em uma determinada área. A partir desta definição avalia-se o risco de transmissão da LV. Neste sentido, a taxonomia é a base para o desencadeamento de qualquer atividade direcionada a população de flebotomíneos, e, portanto, imprescindível para o controle da LV.

Theodor (1948) foi o primeiro autor a sugerir a separação de *Phlebotomus*, único gênero descrito até então, em quatro outros: dois para o hemisfério leste (*Phlebotomus* e *Sergentomyia*); e outros dois para as Américas (*Brumptomyia* e *Lutzomyia*). Posteriormente, dois outros gêneros foram descritos para a América: *Warileya* e *Hertigia*. Na medida em que ampliava-se o conhecimento dos flebotomíneos da América, vários subgêneros foram sendo propostos. Forattini (1973) apresentou uma classificação com elevação de alguns subgêneros a gênero nas chaves de identificação dos flebotomíneos da América. Martins et al (1978) publicaram no livro “American Sand Flies” uma lista de espécies por estado e municípios brasileiros e Young & Duncan (1994) também apresentaram chave de identificação para *Lutzomyia* e distribuição geográfica das espécies por estado. No ano seguinte, Galati publicou uma nova classificação baseada em análise filogenética, que foi republicada em 2003, no livro Flebotomíneos do Brasil. A proposta refinou a taxonomia de flebotomíneos na qual algumas características morfológicas permitiram dividir os flebotomíneos em tribos, subtribos e vários gêneros. Esse refinamento permite aprofundar o conhecimento de estruturas dos flebotomíneos que são importantes para diferenciação de espécies. Neste mesmo livro, Aguiar & Medeiros (2003) apresentam a distribuição das espécies brasileiras por estado.

No mundo já foram descritas 1004 espécies de flebotomíneos e segundo Young & Duncan (1994), 274 foram registradas no Brasil, 254 do gênero *Lutzomyia* e 20 do gênero *Brumptomyia*. Esta chave é amplamente utilizada na rotina dos laboratórios estaduais de entomologia, desde 2003, devido a sua praticidade quando comparada a outras chaves taxonômicas, justificada pela presença de ilustrações para a maioria das espécies de flebotomíneos. Nesta chave são priorizadas estruturas essenciais como a relação entre o tamanho dos segmentos das antenas, morfologia dos ascóideis, dos palpos, do lábio, extensão da sutura interocular, cibário das fêmeas, presença ou não de espinhos femurais, estrutura que compõe a genitália masculina e feminina (Fig. 9).

Entretanto, esta chave não é atualizada desde o ano de sua publicação, e nestes últimos 24 anos, em torno de 63 espécies foram registradas no país, contemplando, tanto novas espécies, quanto àquelas que outrora eram identificadas de maneira errônea, por apresentar características muito similares às de outras espécies. É o exemplo da espécie *Nyssomyia neivai* que atualmente faz parte do complexo intermedia e anteriormente era identificada erroneamente como *Nyssomyia intermedia* (Dilermando et al. 2006).

Uma das maiores vantagens da utilização da classificação proposta por Galati (2003) é a atualização anual realizada pelo Laboratório de Entomologia em Saúde Pública/Phlebotominae, Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e disponibilizada no site: <www.fsp.usp.br/~egalati>. Essa atualização permite a inclusão de novas espécies ou novos registros no país, bem como a revisão de caracteres para aprimoramento da identificação.

Em adição a isso, a classificação proposta por Galati (2003; 2017) inclui o gênero *Brumptomyia* com uma chave de identificação de fêmeas anteriormente consideradas indistinguíveis. A chave proposta por Galati (2003; 2017), embora apresente desenhos das estruturas morfológicas padrões dos grupos de flebotomíneos, não disponibiliza os desenhos para todas as espécies, o que dificulta a identificação. Entretanto, essa desvantagem pode ser compensada pela utilização das pranchas existentes na chave dicotômica proposta por Young & Duncan (1994). Tendo em vista todas as vantagens, para a identificação de flebotomíneos, o Ministério da Saúde preconiza a utilização de ambas as chaves taxonômicas, ficando a critério da equipe de entomologia estadual a escolha de qual chave é mais adequada a sua realidade local.

Machos e fêmeas de *Lu. longipalpis* apresentam tórax com cerdas metepisternais; mesonoto e escutelo castanhos. As fêmeas possuem espermateca segmentada e cibário com três ou mais pares de dentes posteriores e os anteriores dispostos em uma fileira transversal. Os machos possuem gonóstilos com espinho externo inferior em nível mais basal do que

o interno e a presença de duas cerdas esclerotizadas e curvadas no parâmero (Young & Duncan, 1994; Shimabukuro et al., 2011). Essas características são as mais utilizadas para identificação na rotina laboratorial.

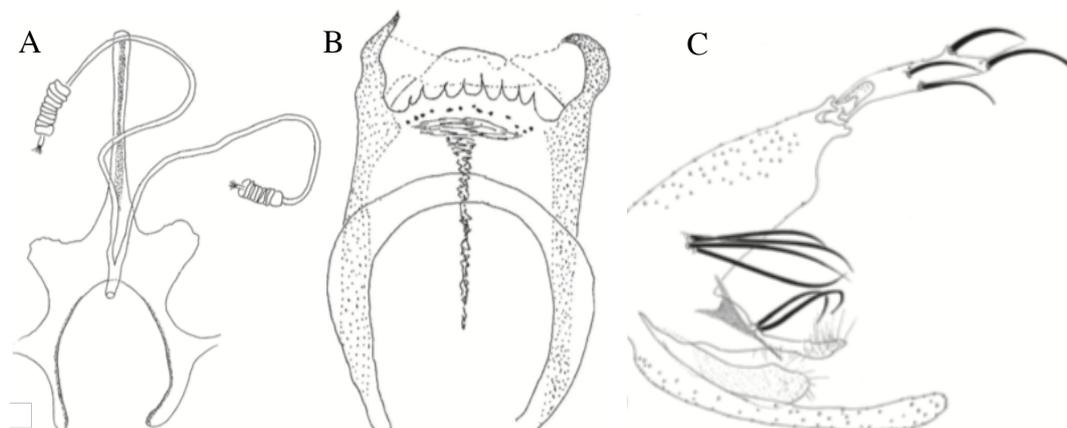


Figura 9. Caracteres utilizados para identificação taxonômica. A: Genitália da fêmea de *Lu. longipalpis*. B: cibário de *Lu. longipalpis*. C: Genitália masculina de *Lu. longipalpis*. Fonte: (Shimabukuro et al. 2011)

1.4.3. Capacidade e competência vetorial

Existem diversos aspectos que conferem capacidade e competência vetorial dos flebotomíneos à LV. Dentre os critérios essenciais descritos e aceitos pela Organização Mundial de Saúde, aspectos definidos pela biologia e ecologia dos flebotomíneos, como a sua distribuição e presença em alta densidade nos locais onde há transmissão de LV, predileção alimentar por reservatórios naturais de *L. infantum*, grau de antropofilia da espécie e encontro de exemplares da espécie infectados naturalmente podem ser indicativos de que esta espécie esteja participando da transmissão da doença. Além da infecção natural, sugere-se como fator complementar que seja realizada a infecção experimental, utilizando um modelo animal, para avaliar a susceptibilidade do inseto ao protozoário, o que possibilita o desenvolvimento do parasito e dessa forma, a transmissão da doença (Killick-Kendrick 1990, Ready 2013).

Essa suscetibilidade pode ser avaliada considerando cinco pontos principais: a capacidade dos parasitos de resistirem à atividade das enzimas digestivas; de escaparem da matriz peritrófica que reveste o bolo alimentar; de se aderirem ao epitélio intestinal no momento da excreção do resto alimentar; de completarem o ciclo de vida dentro do inseto vetor, culminando no desenvolvimento e diferenciação de formas infectantes e inocularem os parasitos infectantes no hospedeiro vertebrado (Pimenta et al., 1994, Lehane 1997, Pimenta et al. 1997, Pimenta et al., 2003).

Considerando esses pontos, atualmente a espécie *Lu. longipalpis* é a principal transmissora de LV. O alto grau de antropofilia e a preferência alimentar eclética dessa espécie associado com a sua presença e prevalência em áreas com casos autóctones de LV, seguida da infecção natural e complementada por infecção e transmissão experimental da *L. infantum* para hamsters através da picada em cinco ocasiões, comprova essa afirmação (Deane&Deane, 1962; Lainson et al., 1977; Lainson&Rangel 2005; Missawa&Dias, 2007)

Durante 50 anos sustentou-se a suposição de que *Lu. longipalpis* era a única espécie transmissora de LV nas Américas. Até que casos autóctones começaram a ser confirmados em áreas sem ocorrência desta espécie. Essa situação teve início na Venezuela, no estado de Sucre, com a predominância de *Lu. evansi* em áreas com casos autóctones de LV. Posteriormente, foi comprovada a infecção natural desta espécie por *L. infantum* (Travi et al. 1990, Montoya-Lerma et al. 2003, Mejía et al. 2018). No Brasil, esta situação é descrita desde 2003 e, atualmente, oito municípios com transmissão ainda não relataram a presença de *Lu. longipalpis*. A tabela 1 traz informações sobre as principais espécies encontradas e os achados de infecção natural.

Município/UF	Transmissão LV	Principais espécies de flebotomíneos encontradas	Presença de infecção natural	Referência bibliográfica
--------------	-------------------	---	---------------------------------	-----------------------------

Guarujá/SP	Canina e humana	<i>Nyssomyia intermedia</i>	Não	Comunicação pessoal (Cláudio Casanova)
		<i>Psathyromyia pascalei</i>	Não	
		<i>Migonemyia migonei</i>	Não	
Embu das Artes/SP	Canina	<i>Pintomyia fischeri</i>	Sim	Galvis-Ovallos et al., 2017
Cotia/SP	Canina	<i>Pintomyia fischeri</i>	Sim	
São Vicente Férrer/PE	Canina e humana	<i>Psychodopygus complexus</i>	Não	Pereira et al., 2010
		<i>Migonemyia migonei</i>	Sim	Carvalho et al., 2010 Guimarães et al., 2012, 2016
Florianópolis/SC	Canina e humana	<i>Pintomyia fischeri</i>	Não	Dias et al., 2013
		<i>Migonemyia migonei</i>	Não	
		<i>Nyssomyia neivai</i>	Sim	
Cacoal/RO	Canina	<i>Nyssomyia antunesi</i>	Não	Relatório Fiocruz/RJ
		<i>Nyssomyia whitmani</i>	Não	
		<i>Psychodopygus davisii</i>	Não	
		<i>Migonemyia migonei</i>	Não	
Porto Alegre	Canina e humana	<i>Pintomyia fischeri</i>	Sim	Relatório Fiocruz/RJ
		<i>Migonemyia migonei</i>	Sim	
		<i>Nyssomyia neivai</i>	Não	
		<i>Psathyromyia lanei</i>	Não	
Macapá/AP	Canina	<i>Lutzomyia gaminarai</i>	Sim	Relatório de campo estadual
		<i>Nyssomyia umbratilis,</i>	Não	

<i>Bicromomyia flaviscullata</i>	Não
<i>Trichophoromyia ubiquitalis</i>	Não
<i>Psychodopygus davisii</i>	Não
<i>Psychodopygus amazonenses</i>	Não
<i>Evandromyia infraespinosa</i>	Não

Tabela 1. Informações sobre tipo de transmissão de LV em municípios sem *Lu. longipalpis*, principais espécies flebotomínicas encontradas e infecção natural, Brasil, 2017.

Considerando os critérios de capacidade e competência vetorial, dentre todas as espécies encontradas naturalmente infectadas, *Lutzomyia cruzi* e *Migonemyia migonei* são consideradas vetores secundárias, atuando principalmente em áreas com ausência de *Lu. longipalpis* (Ready 2013, Guimarães et al. 2016, Falcão de Oliveira et al. 2017).

Fêmeas de *Lu. cruzi* são indistinguíveis de fêmeas de *Lu. longipalpis*, sendo necessário o encontro de exemplares machos para a correta identificação da espécie. A distribuição desta espécie no país está restrita aos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás (Galati et al. 1997, Ribeiro et al. 2007). A suspeita de participação na transmissão de LV se deu devido a sua distribuição, naturalmente infectada por formas flageladas de *L. infantum*, em dois municípios endêmicos para a doença: Ladário e Corumbá, ambos pertencentes ao estado do Mato Grosso do Sul (Santos et al. 1998). É sabido que o encontro de infecção natural, por técnicas moleculares, não é suficiente para a confirmação de competência vetorial, uma vez que, durante o processo de digestão, os parasitos podem ser eliminados. Dessa forma, apesar de ser uma atividade mais complexa e laboriosa, a realização da infecção experimental fortalece a hipótese pré-estabelecida de competência vetorial. Recentemente, foi comprovada a capacidade de transmissão experimental de *L. infantum* por *Lu. cruzi*, com 10,55% de taxa de infecção. A

proporção média de fêmeas alimentadas foi de 0,40 e o período de incubação extrínseco foi de 3 dias (Falcão de Oliveira et al. 2017).

Estudos similares foram conduzidos para a confirmação da participação de *Migonemyia migonei* como vetor secundário de *L. infantum*. Desde 2009, foi confirmada a infecção natural de exemplares desta espécie provenientes do município de São Vicente Férrer, Pernambuco. Neste município, em capturas sistemáticas realizadas no ano de 2009, a população de flebotomíneos era composta principalmente por *Mi. migonei*, representando 93% dos exemplares capturados (de Carvalho et al. 2010). Recentemente foi demonstrada a infecção experimental de *Mi. migonei* com *L. infantum*, entretanto enfatiza-se que no tocante a taxa de infecção, a sobrevivência em dias após o repasto sanguíneo e a quantidade de formas flageladas no tubo digestivo anterior, esta espécie apresenta competência vetorial inferior a *Lu. longipalpis* (Guimarães et al. 2016, Galvis-Ovallos et al. 2017b).

1.4.4 *Lutzomyia longipalpis*

Nas Américas, *Lu. longipalpis* está distribuído na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Uruguai e Venezuela (Shimabukuro et al. 2017). No Brasil, até o presente momento, a distribuição do flebotomíneo *Lu. longipalpis* inclui os estados de Alagoas, Acre, Amapá, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Roraima, Sergipe, São Paulo, Tocantins e Rio Grande do Sul (Lainson & Rangel 2005, Almeida et al. 2010, Santos et al. 2012, Galardo et al. 2013, Silva et al. 2014a, Borges et al. 2017, Dos Santos Silva et al. 2017).

Modelos preditivos utilizando o clima como a principal variável e a precipitação anual, temperatura do dia e precipitação do trimestre mais quente como preditores demonstraram que as áreas que se estendem da Região

Nordeste para parte da Região Sudeste do Brasil são mais prováveis de ter a ocorrência de *Lu. longipalpis* (Andrade-Filho et al. 2017). Peterson et al. (2017) utilizaram modelos de nicho ecológicos calibrados com base em ocorrências de *Lu. longipalpis* considerando toda a sua área geográfica conhecida e descreveu uma maior tendência no estabelecimento desta espécie em toda a parte oriental da região amazônica, principalmente nos estados do Amazonas, Pará, Amapá e Roraima. Neste modelo, o município de Macapá/AP, está incluído como área de predição positiva para *Lu. longipalpis* e apesar de ainda não ter sido registrada, casos de LVC foram notificados em 2017 nesse município. Na região Norte, somente 141 municípios tem registro desta espécie na atualidade (Galardo et al. 2013, Borges et al. 2017).

Primordialmente, *Lu. longipalpis* era considerada uma espécie silvestre, capturada em regiões de florestas e matas, longe de habitações humanas (Lainson et al., 1986, Lainson et al. 1990; Chagas et al., 1938, Salomón et al., 2009). Com o processo de urbanização das cidades, a partir da abertura de estradas, construção de ferrovias, usinas hidrelétricas e assentamentos populacionais, observa-se a dispersão da distribuição do vetor para novas áreas, sugerindo sua fácil adaptação ao ambiente urbano (Rangel & Vilela 2008, Almeida et al. 2010, Galardo et al. 2013, Silva et al. 2014a, Salomón et al. 2015, Berrozpe et al. 2017, Peterson et al. 2017). Apesar desta espécie ainda ser encontrada em áreas silvestres, em áreas urbanizadas é encontrada com maior frequência (Carvalho et al. 2013, Saraiva et al. 2015, Campos et al. 2017).

O estudo de características ambientais favoráveis ao aparecimento de *Lu. longipalpis* em uma área urbanizada compreende tanto fatores inerentes ao macroambiente, como o grau de urbanização da área, o tipo de solo, vegetação (alta ou baixa) e pluviosidade, como fatores relacionados ao microambiente, englobando a temperatura e umidade, bem como a presença de animais domésticos, principalmente suínos, aves e cães. Berrozpe et al. (2017), utilizando o índice de vegetação da diferença normalizada (NDVI) e a temperatura de superfície terrestre (LST), relatou que áreas com baixo NDVI

estavam relacionadas com a densidade de *Lu. longipalpis* na cidade de Corrientes, na Argentina. Neste estudo, dentre os fatores que possivelmente explicariam a agregação de vetores, somente o NDVI e a presença de animais domésticos foram estatisticamente significativos. Observou-se que áreas com baixo NDVI, apesar de fornecer poucos locais para abrigo dos vetores, normalmente têm presença de animais domésticos, o que proporciona matéria orgânica em abundância além de alimentação farta para as fêmeas. Esse dado corrobora com Bavía et al. (2005), que avaliou 33 municípios da Região do Distrito Sanitário de Barra, e encontrou correlação entre baixos valores de NDVI e presença de flebotomíneos, casos humanos e caninos de LV.

Fatores ambientais associados ao grau de urbanização das cidades, tais como saneamento básico, coleta de lixo, iluminação pública e pavimentação podem estar relacionados ao aparecimento de *Lu. longipalpis* (Fernández et al. 2010). Santini et al. (2017) demonstrou correlação entre áreas urbanizadas da cidade de Porto de Iguazu, Argentina, e a presença de *Lu. longipalpis*, confirmando a ocorrência desta espécie em todos os meses do ano, com pico observado no início do outono. Nesta mesma época observou-se maior dispersão deste vetor no município.

A temperatura, umidade e pluviosidade já foram apontados como possíveis fatores associados a ocorrência de *Lu. longipalpis* (Michalsky et al. 2009, Da Silva et al. 2013, de Almeida et al. 2013, de Andrade et al. 2014). Essas variáveis podem impactar negativamente a captura dos flebotomíneos, mas também o desenvolvimento de formas imaturas. A pluviosidade, quando ocorre em níveis elevados, interfere de maneira negativa, pois causam destruição dos criadouros (Missawa & Dias, 2007; Silva et al., 2007; Oliveira et al., 2008).

O processo de adaptação a novos ambientes sugere também mudanças alimentares. Estudos relacionados com a determinação de fonte alimentar de *Lu. longipalpis*, demonstraram o caráter eclético de alimentação desta espécie, uma vez que foi encontrada evidência de sangue proveniente de aves, roedores, caninos, equinos, bovinos e humanos (Missawa & Dias

2007, Isabel & Branco 2011, Afonso et al. 2012b, Cutolo et al. 2014, Paternina et al. 2016).

1.5. Medidas relacionadas à vigilância e controle de vetores

Conceitualmente, a vigilância entomológica é definida como uma observação contínua dos vetores que tem por objetivo a avaliação de características biológicas e ecológicas, seus níveis de interações com hospedeiros humanos, animais reservatórios e ambiente, para a detecção precoce de quaisquer mudanças no comportamento destes vetores que pudessem impactar o padrão de transmissão das doenças (Gomes, 2002).

A indicação das atividades entomológicas que compõem esta vigilância depende da classificação do município quanto ao seu nível de transmissão. Para municípios com registro de primeiro caso e em situações de surto é recomendada a realização da investigação entomológica, enquanto que para município de transmissão intensa e moderada é recomendado tanto o levantamento quanto o monitoramento entomológico (Brasil 2014).

A investigação entomológica é uma atividade qualitativa que consiste na captura de flebotomíneos durante até três noites consecutivas. Esta atividade tem como principal objetivo confirmar a área como de transmissão autóctone e dessa forma, devido ao horário de atividade do vetor, é sugerida a realização da atividade no ambiente de pernoite dos casos confirmados. Já o monitoramento entomológico tem caráter não somente qualitativo, mas também quantitativo, com objetivos principais de conhecimento da dispersão do vetor e determinação da curva de sazonalidade dos vetores na área, respectivamente. Indica-se que sejam utilizados um mínimo de 10 pontos de captura, com distância de 200 metros entre elas. Essa atividade deve ser executada durante três noites consecutivas por mês num período de 24 meses. Por ser uma atividade laboriosa, na impossibilidade de sua realização, é recomendado o levantamento entomológico. Esta última consiste na realização de capturas mensais, com quantitativo de pontos de captura e

duração definidos pela capacidade operacional da equipe executora. Todas as três atividades fazem uso das armadilhas luminosas do tipo CDC, que devem ser armadas ao anoitecer e próximo a ambientes que sejam ricos em matéria orgânica (Amóra et al. 2010, Queiroz et al. 2012, Vilela et al. 2013, Brasil 2014). Fatores ambientais, como temperatura e umidade, devem ser mensurados no momento da atividade, pois estes podem influenciar na frequência e densidade vetorial (Queiroz et al., 2012). A pluviosidade também é uma característica ambiental que interfere no aparecimento de flebotomíneos tanto de maneira positiva, quando esta ocorre em níveis moderados, como de maneira negativa, quando esta ocorre em níveis elevados, o que acabam destruindo dos criadouros (Missawa & Dias 2007, Silva et al. 2007, Oliveira et al. 2008).

Para a análise dos dados obtidos nas atividades de vigilância entomológica e também para avaliação da própria atividade em si são utilizados indicadores, entendidos como variáveis quantitativas e qualitativas, padronizadas e comparáveis em muitas situações. Os indicadores baseiam-se em quatro parâmetros: características que englobam os estágios de desenvolvimento do vetor, imaturos ou adultos; características de capacidade vetorial, abordando o nível de antropofilia, horário de atividade (diurna ou noturna) e local de atividade (intra e peridomicílio); competência vetorial, com informações intrínsecas aos vetores como a taxa de infecção natural; e fatores ambientais não biológicos, como temperatura e umidade, que poderiam influenciar na ocorrência e densidades dos vetores. No caso dos flebotomíneos, considerando a dificuldades existentes acerca da biologia das formas imaturas, os indicadores são voltados para a fase adulta. Dessa forma, são mensuradas a taxa de infestação de uma área a partir pelo cálculo da taxa de infestação domiciliar (TID) e a abundância relativa do vetor (AR) (Gomes 2002) (Figura 10).

Além do conhecimento gerado acerca da biologia e ecologia das espécies de flebotomíneos na área estudada, a vigilância entomológica é amplamente utilizada para direcionar as atividades de controle químico, principal medida de controle vetorial recomendada no âmbito da saúde

coletiva (Brasil 2014). Para o sucesso no controle da população de flebotomíneos, informações sobre o local provável de infecção (LPI) e período de maior densidade vetorial, determinado pela curva de sazonalidade do vetor, são fundamentais, e estas informações são obtidas a partir de avaliações dos dados coletados com a vigilância entomológica. Todavia, dificuldades no estabelecimento do fluxo de informações entomológicas, na utilização dos parâmetros epidemiológicos para determinação de áreas a serem pesquisadas, na demora da avaliação dos dados entomológicos para o direcionamento das ações previstas pelo PNVC-LV, acabam causando um não aproveitamento dos dados gerados pela atividade de vigilância entomológica e conseqüentemente uma descontinuidade das atividades preconizadas pelo PNVC-LV. Resumindo, existem fatores limitantes para a execução destas atividades de forma sistemática e periódica, o que resulta na dificuldade de geração de informações confiáveis sobre os vetores (indicadores de infestação domiciliar e abundância relativa), e assim dificuldades no direcionamento da borrifação domiciliar (Sena, 2011).

A borrifação domiciliar consiste na utilização de alfacipermetrina 20% SC, sendo responsabilidade do governo federal a aquisição e distribuição deste insumo aos estados. Este inseticida faz parte da classe dos piretróides e tem ação residual, sendo sua aplicação realizada em todas as paredes internas e externas do domicílio. O efeito residual dos piretróides pode ser variável, em torno de 3 meses, entretanto estudos apontam que há relação entre a residualidade e o tipo de parede borrifada (Passerat De Silans et al., 1998; Camargo-Neves et al., 2007). Em adição, tem-se observado mudanças no perfil de suscetibilidade de populações de *Lu. longipalpis* a alfacipermetrina em estados brasileiros, o que evidencia a necessidade de monitoramento das populações de *Lu. longipalpis* quanto a este evento (Rocha, 2016).

Além dos pontos supracitados, o controle químico em si é complexo, com relatos de dificuldade na sua operacionalização pelas equipes municipais e estaduais. Morais et al. (2015) observaram grande dificuldade na execução das atividades de controle vetorial em Belo Horizonte, o que culminou na não expansão das atividades de borrifação nas áreas indicadas pelo estudo.

Relatou ainda o grande percentual de recusa da atividade pelos moradores, devido à necessidade de preparação do domicílio (antes e depois da atividade) e da necessidade de permanência fora dos domicílios durante no mínimo duas horas após a realização da borrifação. Camargo-Neves (2004) relata dificuldades similares no estado de São Paulo, principalmente em áreas urbanas, com alta densidade demográfica, o que faz com que a manutenção das atividades ao longo do tempo se torne inviável.

Considerando as dificuldades operacionais, a qualidade dos inseticidas utilizados e a mudança no perfil de suscetibilidade dos flebotomíneos, evidencia-se a necessidade de buscas por ferramentas alternativas no âmbito do controle vetorial. Nesse sentido, o efeito repelente e inseticida de algumas plantas, em forma de extratos e óleos, tem sido amplamente pesquisado e em algumas áreas, como a agricultura, tem sido amplamente utilizados com a finalidade de proteger a colheita e armazenamento dos grãos (Boeke et al. 2004, Garcia and Azambuja 2004, Wandscheer et al. 2004, Senthil Nathan et al. 2006).

Estudos têm demonstrado que plantas da família Meliaceae, principalmente a *Azadiracta indica* e *Melia azedarach*, conhecidas popularmente como “Nim” e “Amargoseira” respectivamente, tem demonstrado em laboratório ação inseticida para *Lu. longipalpis* em todos os seus estágios de desenvolvimento. Ensaio laboratoriais de alimentação de larvas de *Lu. longipalpis* utilizando folhas e frutos de *A. indica* e *M. azedarach* de forma restrita demonstraram que ambas as espécies de plantas foram capazes de bloquear a muda entre os estádios larvares, com a diferença que as folhas de *M. azedarach* provocaram uma inibição maior da muda quando comparada aos frutos desta espécie e folhas e frutos da *A. indica* (Andrade-Coelho et al, 2009).

Maciel et al. (2010) demonstraram que o contato com o óleo das sementes de *A. indica* a uma concentração de 100 mg.mL⁻¹ impediu a eclosão de ovos e a mudança de estádios larvares, conferindo uma eficácia de 65 e 67%, respectivamente por 10 dias, quando submetidos a uma concentração de 100 mg.mL⁻¹. Ademais, foi realizada avaliação da mortalidade de formas

adultas de *Lu. longipalpis*. Na mesma concentração, a mortalidade permaneceu acima de 95% após 72 horas da borrifação (Maciel et al, 2010).

Plantas do gênero *Eucalipto* também já foram evidenciadas na literatura com atividade inseticida, e as espécies *E. staigeriana*, *E. citriodora* e *E. globulus* demonstraram eficácia elevada no impedimento da eclosão dos ovos e mudança de estádios das larvas, assim como evidenciado nos estudos com *A. indica* e *M. azedarach*. Entretanto, a concentração de óleo necessária para este bloqueio diferiu tanto com relação as espécies de eucalipto utilizado como em relação ao estágio de desenvolvimento do vetor (ovo, larva ou adulto) (Maciel et al. 2010a).

Diante destes resultados, conclui-se que óleo e extratos de diversas plantas possuem atividade inseticida sobre as três fases do ciclo de vida de *Lu. longipalpis* em laboratório. Esses resultados podem indicar que compostos originários de plantas podem ser uma alternativa aos inseticidas químicos no controle do vetor da LV. Entretanto, outros estudos devem ser realizados para comprovar a atividade das substâncias isoladas sobre o inseto, bem como para avaliar a residualidade destes compostos em campo.

Outro campo de estudo que vem crescendo é referente ao uso de mosquiteiros impregnados com inseticida para controle da população de vetores de diversas doenças, como malária, LV, LT e doença de Chagas (Wilson et al., 2014). Esta já é uma estratégia utilizada para controle da malária em áreas endêmicas preconizada pela Organização Mundial de Saúde, entretanto com efetividade ainda não comprovada no Brasil (Vieira et al., 2014).

Quando se trata de controle das populações de flebotomíneos, os estudos com mosquiteiros impregnados com inseticida publicados são voltados principalmente para os vetores transmissores da leishmaniose tegumentar (LT). Em revisão sistemática e metanálise realizada por Wilson et al (2014), de 21 artigos incluídos na revisão somente quatro, que tratavam sobre LT, participaram da metanálise e em conjunto evidenciaram uma eficácia de 77% na utilização dos mosquiteiros impregnados com inseticida (IC95%: 39-91%).

Estudo desenvolvidos em seis vilas na região noroeste da região de Cukurova, na Turquia, demonstraram eficácia de 92,2% dos mosquiteiros impregnados com inseticida (permetrina 2% e butóxido de piperonilo 1%), e redução da incidência de casos de LT nas áreas de utilização desta intervenção, de 4,78% para 0,37% (Gunay et al., 2014). Estes estudos evidenciam a possibilidade promissora da utilização de mosquiteiros impregnados em áreas endêmicas para LT, entretanto necessitando a avaliação da efetividade para vetores de LV no Brasil.

O avanço no conhecimento sobre a comunicação química de *Lu. longipalpis* também é uma alternativa para o fortalecimento do controle da LV. O uso de (S) -9-metilgermacreno-B sintético (+/-) - 9-metilgermacreno, feromônios sexuais, mostrou-se útil na interrupção do acasalamento porque as fêmeas são altamente atraídas por estes compostos. Nesse sentido, a atratividade ocasionada por estes feromônios sintéticos associada a abrigos de animais poderiam ser utilizadas para otimizar as atividades de controle químico de flebotomíneos (Hamilton 2008, Souza et al. 2017).

Neste contexto, conforme evidenciado no item anterior, as coleiras impregnadas vêm sendo amplamente avaliadas, tanto com relação a sua eficácia como efetividade. O efeito de repelência (ou inibição da alimentação) foi demonstrado em estudo realizado em Fortaleza, Ceará, onde a inibição da alimentação foi comprovada em 99,3% dos espécimes de *Lu. longipalpis* após 4 semanas de encoleiramento dos cães, 100% após 8-12 semanas e 96% após 16-20 semanas. A mortalidade foi de 96% nas primeiras quatro semanas de utilização da coleira (David et al. 2001).

Os trabalhos supracitados sugerem a eficácia da coleira impregnada com deltametrina a 4% na diminuição da incidência de casos humanos. Entretanto, poucos estudos científicos abordam aspectos entomológicos, envolvendo a possibilidade de mudança comportamental do principal vetor, *Lu. longipalpis* (predileção alimentar, ocorrência, abundância, tipos de habitat, dispersão e taxa de infecção natural dentre outros), frente a esta nova ferramenta (Reithinger et al. 2004).

2. Justificativa

As dificuldades na operacionalização das atividades de vigilância e controle da LV são inúmeras. A falta de efetividade é ocasionada em parte pela falta de recursos humanos qualificados e recursos financeiros escassos. Em adição a isso, a demora exacerbada entre a coleta das amostras caninas, os resultados dos testes diagnósticos utilizados na rotina, a retirada dos animais soropositivos e a reposição dos cães em área endêmica, bem como a recusa dos proprietários às medidas de vigilância do reservatório canino, são frequentes. A complexidade das atividades de controle químico, no que diz respeito à dificuldade operacional, alto custo de insumos, toxicidade e efeito residual limitado dos inseticidas, sugere a inviabilidade da execução desta atividade em zonas urbanas.

Dessa forma, a busca de alternativas para o aprimoramento do que atualmente é preconizado pelo Ministério da Saúde é uma necessidade urgente. A efetividade na utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% já foi descrita por diversos autores (David et al., 2001; Gavgani et al., 2002, Camargo-Neves et al, 2004; Reithinger et al, 2004). Entretanto, é necessária a avaliação do comportamento de *Lu. longipalpis*, o principal vetor de LV, frente à utilização das coleiras impregnadas com deltametrina a 4% como ferramenta de controle, pois a prova do princípio do efeito inseticida ou repelente de intervenções baseadas em inseticidas não significa necessariamente que a população que deve ser protegida de fato esteja usufruindo do efeito pretendido. Estudo recente realizado em Índia e Nepal mostrou resultados limitados de redução de exposição a picadas de *Phlebotomus argentipes* na população humana em um cenário submetido a mosquiteiros impregnados (Gidwani et al., 2011).

Fortaleza e Montes Claros são municípios prioritários junto ao Ministério da Saúde para o controle da LV, sendo classificados como de transmissão intensa. Ambos os municípios fazem parte do estudo intitulado “Avaliação da efetividade de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em

áreas endêmicas para leishmaniose visceral”, no qual foram definidas áreas em que seria realizado encoleiramento dos cães (intervenção) e áreas que não fariam o uso desta intervenção (controle). Ademais, os municípios dispõem de equipes para a realização das atividades entomológicas nas áreas de intervenção e área controle. Estes critérios foram utilizados para participação desses dois municípios no presente trabalho que pretende agregar conhecimento acerca das possíveis mudanças ocasionadas pela presença das coleiras impregnadas com deltametrina a 4% nas populações de *Lu. longipalpis* utilizadas de forma massiva para o controle de leishmaniose visceral.

3. Objetivos

Objetivo Geral

Estudar aspectos comportamentais de *Lutzomyia longipalpis* comparando áreas submetidas à intervenção com coleira impregnada com deltametrina a 4% como medida de controle da leishmaniose visceral com áreas sem esta intervenção.

Objetivos Específicos

1. Comparar a frequência de *Lu. longipalpis* no intra e peridomicílio entre áreas com a utilização da coleira impregnada com deltametrina a 4% e áreas sem esta intervenção;
2. Comparar a abundância relativa de *Lu. longipalpis* por residência entre áreas com a utilização da coleira impregnada com deltametrina a 4% e áreas sem esta intervenção;
3. Comparar a taxa de infestação domiciliar de *Lu. longipalpis* por residência entre áreas com a utilização da coleira impregnada com deltametrina a 4% e áreas sem esta intervenção;

4. Comparar a distribuição de *Lu. longipalpis* por sítios de captura entre áreas com a utilização da coleira impregnada com deltametrina a 4% e áreas sem esta intervenção;
5. Avaliar a influência da pluviosidade sobre a presença de *Lu. longipalpis*.

4. Material e Métodos

4.1 Área de estudo

O estudo foi realizado nos municípios de Montes Claros/MG e Fortaleza/CE. Montes Claros localiza-se na região Sudeste do Brasil, com uma área de 3.582,034 km² e população 385.898 habitantes (Figura 10). Sua vegetação é composta de uma mistura entre cerrado e caatinga. O clima é denominado tropical com diminuição de chuvas no inverno e temperatura média anual de 22,65 °C, tendo invernos secos e amenos (raramente frios em excesso) e verões chuvosos com temperaturas altas. Fortaleza localiza-se na região Nordeste do Brasil, a uma altitude média de 21 metros (Figura 11). É centro de um município de 313,8 km² de área e 2.551.806 habitantes, sendo a capital de maior densidade demográfica do país, com 7.815,7 hab/km. A sua vegetação é tipicamente litorânea, com áreas de mangue e restinga. Possui clima tropical semiúmido com temperatura média anual de 26 °C, sendo dezembro e janeiro os meses mais quentes e julho o mais frio, porém com diferenças mínimas de temperatura.

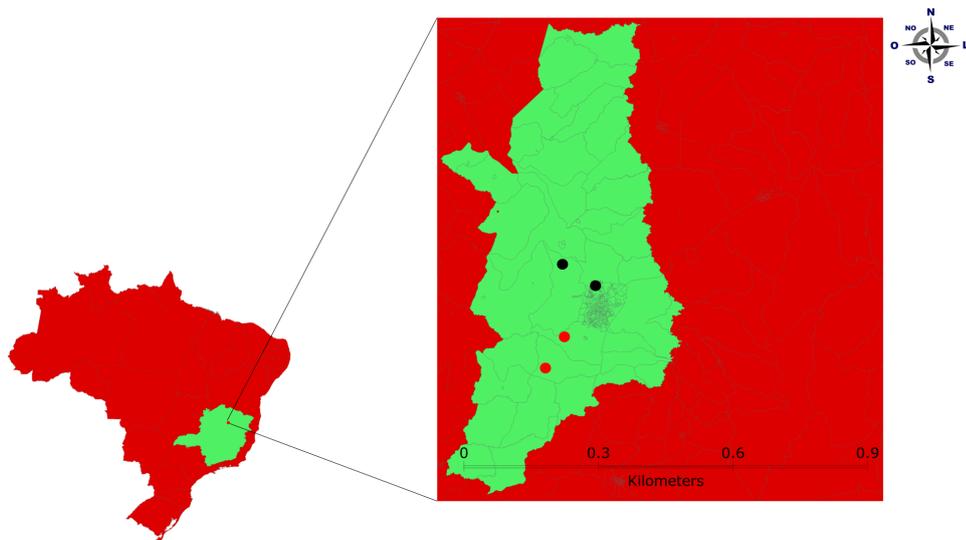


Figura 10. Montes Claros, MG. Pontos pretos indicam área controle e pontos vermelhos área de intervenção

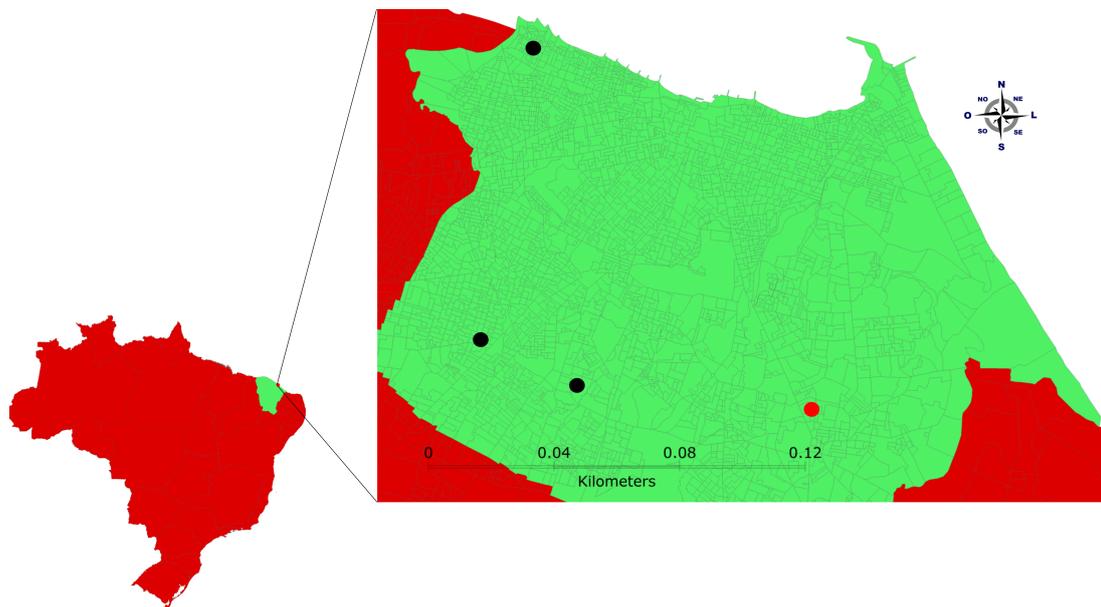


Figura 11. Fortaleza, CE. Pontos pretos indicam área controle e pontos vermelhos área de intervenção

4.2 Intervenção

A coleira impregnada com deltametrina 4% tem apresentações de 19 e 25 g. A coleira de 19g contém 0,760g de ingrediente ativo (IA), deltametrina,

e está indicada para animais de pequeno e médio porte; enquanto que a coleira com 25g contém 1g de IA, e está indicada para animais de grande porte (Figura 12).

Ao ser colocada no cão, a coleira necessita de 2 a 3 semanas para atingimento da eficácia total, uma vez que este é o tempo necessário para que a deltametrina se espalhe pelo corpo do animal. A deltametrina é um inseticida da classe dos piretróides, cujo mecanismo de ação é a inibição dos canais de sódio, causando a despolarização contínua da membrana e morte por excitação.



Figura 12 – Coleira Scalibor.

Fonte: MSD Saúde Animal

A eficácia da coleira utilizada no presente estudo foi previamente avaliada (David et al., 2001), entretanto estudos de efetividade vêm sendo realizados para comprovação da sua utilização como ferramenta de controle no Programa de Vigilância e Controle da LV. Dessa forma, o estudo denominado “Avaliação da efetividade de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em áreas endêmicas para leishmaniose visceral” foi financiado pelo Ministério da Saúde e iniciado em 2013. O estudo foi realizado em municípios endêmicos para LV, de acordo com critérios pré-definidos pelo pesquisador, que consideraram a classificação do município quanto a transmissão da LV, sendo priorizados os municípios com transmissão moderada ou intensa; e o aceite da equipe municipal e estadual para a execução das atividades de maneira continuada. Uma vez identificados os

municípios, foram escolhidas áreas que seriam submetidas à intervenção (encoleiramento dos cães) e áreas sem o uso desta intervenção. Ao final do estudo, comparando as duas áreas, foi avaliada a prevalência canina e incidência da LV humana.

Dessa forma, o presente estudo envolveu 10 e 12 pontos (domicílios) dos municípios de Montes Claros e Fortaleza respectivamente, distribuídos em 4 bairros. Em Montes Claros, dos dez pontos, cinco faziam parte da área de intervenção, ou seja, utilizaram a coleira impregnada com deltametrina a 4% e cinco não faziam uso desta intervenção. Já no segundo município (Fortaleza), em nove pontos os cães utilizaram a coleira impregnada com deltametrina a 4% e em três não faziam uso desta intervenção. Todos os bairros escolhidos são classificados como de transmissão intensa conforme o número de casos de LV notificados nos 3 últimos anos. No total foram encoleirados 5.000 cães em cada município, e a troca das coleiras foi realizada a cada 6 meses. O tempo total do estudo foi de 30 meses.

4.3 Escolha dos locais de captura

A captura de flebotomíneos nos municípios de Montes Claros e Fortaleza foi realizada nos 10 e 12 pontos respectivamente, com uma distância mínima de 200 metros entre eles. Foram consideradas a presença de características sugestivas a presença do vetor, tais como: peridomicílio com presença de vegetação abundante (árvores frutíferas ou ornamentais), sombreamento e umidade, acúmulo de matéria orgânica em decomposição (lixo orgânico) e presença de animais domésticos. Em relação a este último aspecto, todos os pontos tinham no mínimo duas fontes alimentares aos flebotomíneos, os cães e pelo menos outra fonte alimentar.

4.4 Captura de flebotomíneos

A captura foi realizada com a utilização de armadilhas luminosas do tipo CDC (Sudia & Chamberlain 1989), armadas três noites consecutivas por mês, das 18h às 6h, durante 30 meses. Foram colocadas 2 armadilhas em

cada residência, uma no intradomicílio e outra no peridomicílio, preferencialmente, próximo aos abrigos dos animais (Brasil 2014).

4.5 Identificação de flebotomíneos

Os flebotomíneos capturados em Montes Claros foram encaminhados para o Laboratório de entomologia do Centro de Controle de Zoonoses do município, onde foi realizada a triagem, separação dos flebotomíneos dos demais insetos capturados pela armadilha, e identificação dos machos. As fêmeas foram encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da Universidade de Brasília, para montagem e identificação de acordo com a classificação proposta por (Galati 1995). Durante a preparação dos exemplares para montagem observou-se características referentes a coloração do tórax, que indicavam diferenças entre as espécies capturadas. Os exemplares classificados como *Lu. longipalpis* possuíam um padrão bem distinto do observado nas demais espécies, com a presença de coloração escura acima da segunda e terceira coxa, no catepisterno e catepímero, respectivamente (referido no item 4. Resultados - Capítulo 2).

Os flebotomíneos capturados em Fortaleza foram levados ao Laboratório de Entomologia Médica Dr Thomaz Correia Aragão da Secretaria de Saúde do estado do Ceará, onde machos e fêmeas foram identificados, utilizando a chave de Young & Duncan (1994).

4.6 Análise estatística

Foram utilizadas as seguintes fórmulas para o cálculo da taxa de infestação domiciliar (1) e distribuição destas espécies por sítio de captura (2), respectivamente.

$$1. \text{Taxa de infestação domiciliar} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de domicílios positivos/local pesquisado/técnica}}{\text{Número de local pesquisado}} \times 100$$

$$2. \text{ Abundância relativa} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de } Lu. \textit{longipalpis} \text{ capturados por metodologia nos domicílios (intra ou peridomicílio)}}{\text{Total de domicílios pesquisados por metodologia (no intra ou peridomicílio)}}$$

Figura 13. Fórmulas para cálculo das taxas de infestação domiciliar¹ e abundância relativa do vetor².

Foi realizada análise descritiva dos dados de infestação domiciliar e abundância relativa do vetor, considerando as diferentes áreas, intervenção e controle.

Por meio de gráficos, avaliou-se a existência de tendências ou fenômenos cíclicos na abundância de insetos capturados ao longo do período de estudo, segundo local de captura e área de intervenção. Utilizou-se o suavizador “lowess” para a análise dos dados neste contexto.

O modelo de regressão de Poisson foi utilizado para avaliar a associação entre a intervenção e local de captura de abundância de insetos capturados segundo cidade e período de agregação temporal (bimestre).

Para o processo de avaliação do padrão de coloração do tórax de *Lutzomyia longipalpis* como triagem inicial para identificação taxonômica foi realizada análise descritiva.

5. Resultados

5.1 Capítulo 1.

Artigo aceito em 5 de fevereiro de 2018 pela revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Título resumido: Colares e *Lutzomyia longipalpis*

***Avaliação de populações de Lutzomyia longipalpis
(Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) em áreas de transmissão intensa
submetidas à intervenção com coleiras impregnadas com deltametrina
a 4% para controle de leishmaniose visceral***

Rafaella Albuquerque e Silva^{*1,2}; Andrey José de Andrade³; Bruno Beust Quint¹; Gabriel Elias Salmen Raffoul¹; Guilherme Loureiro Werneck⁴; Elizabeth Ferreira Rangel⁵; Gustavo Adolfo Sierra Romero¹

1. Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília, DF; Brasil;
2. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, DF; Brasil;
3. Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR; Brasil;
4. Instituto de Medicina Social, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;
5. Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ; Brasil;

*Corresponding author: Rafaella Albuquerque e Silva. SRTV 702, Via W 5 Norte - Brasília, DF, 70723-040

RESUMO

Introdução: Existe pouca informação sobre o efeito do uso generalizado de coleiras impregnadas com deltametrina para o controle da leishmaniose visceral canina sobre a população de flebotomíneos.

Objetivos: avaliar o impacto do uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% (Scalibor®) comparando áreas submetidas à intervenção a áreas sem esta intervenção.

Métodos: Foram realizadas capturas de flebotomíneos durante 30 meses em quatro bairros com transmissão intensa de LV em Fortaleza e Montes Claros. Calculou-se as taxas de infestação domiciliar, abundância relativa e distribuição de *Lu. longipalpis* por ponto de captura (intra e peridomicílio) e área (intervenção e controle).

Resultados: Na área controle, em Fortaleza, a abundância relativa foi de 415 espécimes por ponto de captura, enquanto que na área intervenção foi 159,25. Em Montes Claros, a abundância relativa foi de 5.660 espécimes por ponto de captura na área controle, enquanto na área de intervenção foi 2.499,4. O encoleiramento canino esteve associado a uma redução na quantidade de insetos capturados de 15% ($p = 0,004$) e 60% ($p < 0,001$) nas cidades de Montes Claros e Fortaleza, respectivamente.

Conclusão: Foi observada uma baixa abundância relativa nas áreas de intervenção o que sugere efeito do uso das coleiras impregnadas com inseticida.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral; *Lutzomyia longipalpis*; colares impregnados; deltametrina; cães.

Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Ministério da Saúde.

ABSTRACT

Background: There is little information on the effect of the use of deltamethrin-impregnated dog collars for the control of canine visceral leishmaniasis over the phlebotomine population.

Objectives: to evaluate the impact of the use of 4% deltamethrin-impregnated collars (Scalibor®) in populations of *Lutzomyia longipalpis* by comparing areas submitted to the intervention to areas without this intervention.

Methods: Phlebotomine captures were carried out for 30 months in four neighborhoods with intense VL transmission in Fortaleza e Montes Claros. We calculated the rates of domicile infestation, relative abundance and *Lu. longipalpis* distribution per point, capture location (intra and peridomicile areas) and area (intervention and non-intervention).

Findings: In the control area from Fortaleza, the relative abundance was 415 specimens per capture point, whereas in the intervention area it was 159.25, while in Montes Claros, the relative abundance was 5,660 specimens per capture point in control areas, whereas in the intervention area it was 2,499.4. The use of dog collars was associated with a reduction of captured insects of 15% ($p = 0.004$) and 60% ($p < 0.001$) in Montes Claros and Fortaleza, respectively.

Main conclusions: We observed a lower vector abundance in the intervention areas, which suggests an effect of the insecticide-impregnated collars.

Key words: visceral leishmaniasis; *Lutzomyia longipalpis*; impregnated collars; deltamethrin; dogs

Sponsorships: Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (Capes); National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) and Ministry of Health.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças negligenciadas, para quais as agendas públicas de governo devem dar especial atenção à vigilância e controle. A leishmaniose visceral (LV) é endêmica em 70 países, está distribuída nos cinco continentes, principalmente no Sul da Ásia, Leste da África e Américas. Dentre os países da América do Sul, o Brasil é o que concentra o maior número de casos, com mais de 90% do registrados pelos sistemas de notificação vigentes (PAHO/WHO 2016). Nas Américas, a LV é uma zoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e constitui grave problema de saúde pública.

As políticas de vigilância e controle da LV planejadas pelo Programa Nacional de Leishmanioses do Ministério da Saúde do Brasil estão focadas em três eixos para os quais são desenvolvidas atividades específicas. Primeiro, o uso de inseticidas químicos e manejo ambiental são recomendados com o objetivo de diminuir a densidade populacional do vetor e reduzir o seu contato com o homem. Segundo, a realização do inquérito sorológico canino e manejo adequado dos casos positivos, visando a diminuição das fontes de infecção para os vetores. E finalmente, o diagnóstico oportuno e manejo adequado dos casos humanos para evitar as formas graves da doença e o óbito (Brasil 2014).

Entretanto, ao longo dos anos, tem-se observado dificuldades na operacionalização das atividades de vigilância e controle da LV. A falta de efetividade é ocasionada em parte pela carência de profissionais qualificados e recursos financeiros escassos. Em adição, a demora exacerbada entre a coleta, os resultados dos testes diagnósticos utilizados na rotina e a retirada dos animais soropositivos, bem como a recusa dos proprietários às medidas de vigilância do reservatório canino são frequentes. Modelos matemáticos, sugerem que a eutanásia de cães soro-reagentes, em áreas com transmissão baixa ou moderada pode ter um efeito de redução da prevalência da infecção canina no longo prazo (Costa et al., 2013). A capacidade infectiva dos animais assintomáticos, bem como a sua proporção com relação a população canina, podem ter grande impacto nas estratégias de controle. Entretanto, a

realização de eutanásia indiscriminada de cães assintomáticos pode comprometer a manutenção do programa devido à insatisfação da população.

Ademais, nas situações em que a retirada de cães soro-reagentes é realizada, a taxa de reposição é alta (Zuben & Donalísio 2016). Em estudos realizados em Araçatuba (SP), a taxa de reposição foi de 44,5%, com a justificativa dos proprietários de necessidade de companhia e de guarda das residências (Andrade et al., 2007).

No tocante ao componente vetorial, a capacidade do *Lu. longipalpis* adaptar-se ao ambiente urbano associada a complexidade da realização do controle químico, no que diz respeito à dificuldade operacional, alto custo de insumos, toxicidade e efeito residual limitado dos inseticidas, sugere a inviabilidade da execução desta atividade em zonas urbanas (Zuben & Donalísio). Ademais, a falta de conhecimento acerca da biologia de formas imaturas dos flebotomíneos, principalmente considerando os criadouros, é um fator chave para a falha no controle desses insetos. Dessa forma, a busca de alternativas para complementação do que atualmente é preconizado pelo Ministério da Saúde é altamente desejável.

A coleira impregnada com deltametrina 4% é considerada ferramenta individual no controle da leishmaniose visceral canina, uma vez que possui atividade inseticida e repelente, reduzindo a interação entre os cães e os flebotomíneos. A eficácia destas coleiras já foi descrita anteriormente e sua efetividade tem sido avaliada em alguns cenários (David et al. 2001, Maroli et al. 2001, Mazloumi Gavvani et al., 2002, Reithinger et al. 2014). Killick-Kendrick et al. (1997) avaliou o potencial repelente e inseticida das coleiras impregnadas com deltametrina em laboratório utilizando populações de *Phlebotomus perniciosus*. Os cães foram acompanhados por 8 meses e periodicamente expostos a 200 *P. perniciosus* por duas horas em pelo menos 7 momentos, distribuídos entre a segunda e a 34^a semana após o encoleiramento.

A avaliação da repelência e da mortalidade foi realizada utilizando o percentual de fêmeas ingurgitadas e mortas após a exposição, respectivamente. O uso do colar impediu a alimentação de cerca de 96% das

fêmeas durante 34 meses de estudo. A mortalidade dos espécimes expostos variou entre 21 e 60% durante o período. Um estudo semelhante foi realizado por David et al (2001), no entanto, usando o vetor principal da leishmaniose visceral nas Américas, *Lu. longipalpis*. A interrupção da alimentação foi demonstrada em 96% das amostras, enquanto a mortalidade variou de 90 a 35% no período.

Uma vez que a eficácia foi demonstrada no laboratório, realizaram-se estudos de efetividade com o objetivo de fortalecer a evidência científica para o uso de coleiras impregnadas com 4% de deltametrina como ferramenta de controle em programas governamentais. Estudos intervencionistas foram então desenvolvidos, demonstrando a redução da prevalência de VL em cães. Brazuna (2012) avaliou a redução da prevalência da doença em cães após o uso de coleiras Scalibor® em todos os cães do município de Campo Grande, MS. A redução da prevalência de doença em cães no final do estudo foi de 50%. Resultados similares foram relatados por Kazimoto, com uma redução de prevalência de 53%, no entanto, com um menor número de cães com coleiras.

O estudo realizado por Sevá et al. (2016), utilizando modelagem matemática, demonstraram que o uso de coleiras impregnadas com inseticida, quando realizadas com uma cobertura de 90%, pode diminuir a prevalência de cães soropositivos e a incidência de casos de VL humana a zero.

Todavia, é necessária a avaliação do comportamento de *Lu. longipalpis*, o principal vetor de LV no continente americano, frente à utilização das coleiras impregnadas com deltametrina a 4% como ferramenta de controle, pois a prova do princípio do efeito inseticida ou repelente de intervenções baseadas em inseticidas não significa necessariamente que a população que deve ser protegida de fato esteja usufruindo do efeito pretendido.

O objetivo desse estudo foi avaliar o comportamento de *Lu. longipalpis* frente a utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% como ferramenta de controle de leishmaniose visceral.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo - O estudo foi realizado nos municípios de Montes Claros/MG e Fortaleza/CE. A escolha dos municípios se deu devido a participação destes no projeto intitulado “Avaliação da efetividade de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em áreas endêmicas para leishmaniose visceral”, projeto financiado pelo Ministério da Saúde que tinha como objetivo avaliar o impacto na prevalência de casos caninos e incidência de casos humanos de LV em áreas com o uso de coleiras impregnadas com deltametrina.

O projeto, no entanto, não contemplou a avaliação do impacto do uso de coleiras na população de *Lu. longipalpis*, o que motivou a realização do presente estudo.

Desta forma, as áreas em que o componente vetorial foi estudado foram as mesmas anteriormente definidas pelo projeto acima mencionado, que definiu quais áreas utilizariam coleiras nos cães (áreas de intervenção) e quais não utilizariam (áreas de controle). Outros critérios de inclusão considerados foram: o nível de transmissão (apenas os municípios com transmissão VL intensa, que são aqueles com uma média superior a 4,4 casos nos últimos três anos); presença de equipe para realização das atividades de vigilância entomológica em ambas as áreas.

A coleira impregnada com deltametrina a 4% é comercialmente chamada “Scalibor” e possui duas apresentações: 19g, indicada para animais de pequeno e médio porte, com 0,760g de ingrediente ativo (IA); e 25g, indicado para animais de grande porte, com 1g de IA.

Montes Claros localiza-se na região Sudeste do Brasil, com uma área de 3.582,034 km² e população 385.898 habitantes (Figura 1). Sua vegetação é composta de uma mistura entre cerrado e caatinga. O clima é tropical com diminuição de chuvas no inverno e temperatura média anual de 22°C, tendo invernos secos e amenos (raramente frios em excesso) e verões chuvosos com temperaturas altas (Michalshy et al., 2009).

Fortaleza localiza-se na região Nordeste do Brasil, a uma altitude média de 21 metros, 313,8 km² de área e 2.551.806 habitantes, sendo a capital de maior densidade demográfica do país, com 7.815,7 hab/km (Figura 2). A sua vegetação é tipicamente litorânea, com áreas de mangue e restinga. Possui tropical semiúmido com temperatura média anual é de 26 °C, sendo dezembro e janeiro os meses mais quentes e julho o mais frio, porém com diferenças mínimas de temperatura (Silva et al., 2014).

Foram selecionados pontos de captura de flebotomíneos, ou domicílios, em quatro bairros de ambos os municípios (Figura 1 e 2), no entanto, 10 e 12 pontos de captura foram escolhidos em Montes Claros e Fortaleza, respectivamente. No primeiro município (Montes Claros), cinco pontos de captura tiveram os cães encoleirados com coleiras impregnadas com deltametrina a 4% como ferramenta de prevenção LV e cinco não. No último município (Fortaleza), nove pontos de captura tiveram os cães encoleirados e três não.

Nas áreas de intervenção, as coleiras foram colocadas em cães domiciliados ou semi-domiciliados. Cães de movimentação irrestrita não foram submetidos à intervenção.

No total foram encoleirados 5.000 cães por município, e a troca das coleiras foi realizada a cada 6 meses. O tempo total do estudo entomológico foi de 30 meses.

Escolha dos locais de capturas - Em cada bairro foram escolhidos pontos de capturas (domicílios), com uma distância mínima de 200-500 metros entre eles. Para a escolha do domicílio foram consideradas características receptivas à presença do vetor, como descrito a seguir: vegetação presente, presença de animais domésticos, acúmulo de matéria orgânica e tamanho do peridomicílio.

Capturas de flebotomíneos - As capturas foram realizadas com a utilização de armadilhas luminosas do tipo CDC, armadas três noites consecutivas por mês, das 18h às 6h, durante 30 meses (Brasil 2014). Foram

colocadas 2 armadilhas em cada residência, uma no intradomicílio e outra no peridomicílio, preferencialmente, próximo aos abrigos dos animais. Outro critério para a escolha dos locais de captura foi a presença de cães. As capturas de flebotomíneos começaram cinco meses após o primeiro encoleiramento de cães em Montes Claros e Fortaleza.

Identificação de flebotomíneos - Os flebotomíneos capturados em Montes Claros foram encaminhados ao Laboratório de Entomologia do Centro de Controle de Zoonoses do município, onde foi realizada a triagem e identificação dos machos. As fêmeas foram encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da Universidade de Brasília, para montagem e identificação, de acordo com a classificação proposta por Galati (2003).

Os flebotomíneos capturados em Fortaleza foram levados ao Laboratório de Entomologia Médica Dr Thomaz Correia Aragão da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, onde machos e fêmeas foram identificados, utilizando a chave de Young;Duncan (1994).

Ambas as chaves são preconizadas pelo Ministério da Saúde, ficando a critério das equipes de entomologia estadual a escolha de qual chave adotar na sua rotina de trabalho. Independentemente da chave taxonômica escolhida para identificação, em ambas as chaves não há distinção na identificação de *Lutzomyia longipalpis*.

Pluviosidade - Os dados de pluviosidade dos dois municípios, no período de estudo, foram obtidos no site do Instituto Nacional de Meteorologia – INMET (INMET 2017).

Análise dos dados - Foram utilizadas as seguintes fórmulas para o cálculo da taxa de infestação domiciliar e distribuição destas espécies por sítio de captura (Tabela 1) (Brasil 2014).

Foi realizada análise descritiva dos dados de infestação domiciliar e abundância relativa do vetor, considerando as diferentes áreas, intervenção e

controle. Utilizou-se a técnica de suavização “lowess” para descrever as variações nas capturas dos flebotomíneos ao longo do tempo, considerando a área de estudo (Fortaleza/CE e Montes Claros/MG), áreas de intervenção (com e sem coleira impregnada com deltametrina) e o sítio de captura (intra e peridomicílio). O suavizador “lowess” é um método de regressão não paramétrico que se encaixa em um modelo linear ponderado localmente dando a pontos mais próximos de cada valor x o maior peso na suavização e limitando o efeito de outliers.

Para avaliar as associações entre a intervenção, o local de captura e a abundância de flebotomíneos, de acordo com o município e o período de agregação temporal (bimestre), utilizamos um modelo de regressão de Poisson. Na regressão de Poisson, as associações são expressas por taxas de incidência (IRR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%). Foi utilizado o software STATA versão 12.0.

RESULTADOS

Foram capturados 4.373 (1.494 no intradomicílio e 2.879 no peridomicílio) e 40.797 (8.359 no intradomicílio e 32.438 no peridomicílio) exemplares de *Lu. longipalpis* em Fortaleza e Montes Claros, respectivamente.

Em Fortaleza, dos 4.373 capturados, 3.141 eram machos e 1.232 eram fêmeas. Em Montes Claros, dos 40.792 capturados, 36.716 eram machos e 4.076 eram fêmeas. No tocante ao material capturado em Montes Claros, devido a sua qualidade e ao protocolo realizado para identificação dos espécimes, foi registrada a perda de 310 exemplares, o que corresponde a 7,6% do material total capturado em Montes Claros. Em números absolutos, esta perda foi semelhante entre as áreas de intervenção e controle.

Considerando o período integral de estudo, a taxa de infestação em ambos municípios foi de 100%, confirmando a distribuição da espécie por todos os quatro bairros, porém, com abundâncias relativas diferentes.

Em Fortaleza, na área controle, considerando o período completo de estudo, a abundância relativa foi 415 exemplares, por ponto de captura,

enquanto que na área de intervenção foi 159,25 exemplares. Levando em consideração o local de captura, a abundância relativa no intradomicílio foi 135,88 e 67,75 enquanto que no peridomicílio foi 279,22 e 91,5 nas áreas controle e de intervenção, respectivamente. A densidade vetorial variou durante o período, sendo observado o aumento da quantidade de flebotomíneos capturados no período de chuva ou logo após este período (Figura 3). A relação macho:fêmea foi de 2,54:1; maior nas áreas de intervenção (3,1:1), quando comparada às áreas controle (2,4:1).

Em Montes Claros, na área controle, considerando o período completo de estudo, a abundância relativa foi de 5.660 exemplares por ponto de captura, enquanto que na área de intervenção foi de 2.499,4 exemplares. Levando em consideração o sítio de captura (intra ou peridomicílio), a abundância relativa no intradomicílio foi de 964,4 e 707,4 enquanto no peridomicílio foi 4.695,6 e 1.792 nas áreas controle e de intervenção, respectivamente. A densidade vetorial variou durante o período, sendo observado o aumento da quantidade de flebotomíneos capturados no período de chuva ou logo após este período (Figura 3). A relação macho:fêmea foi de 9,07:1; maior nas áreas de intervenção (12,03:1), quando comparada às áreas controle (8,15:1).

Considerando os 30 meses de estudo, Fortaleza teve um total de 2.897 mm, com picos variando de 400 a 500 mm concentrados em março a julho dos anos estudados. O nono bimestre teve um registro pluviométrico mais baixo representado por 7mm. Enquanto, Montes Claros teve 1.685 mm com uma distribuição homogênea ao longo do ano e um único pico registrado em novembro e dezembro de 2013. No terceiro, nono e décimo quinto bimestre não choveu (Figura 3).

O encoleiramento canino esteve associado a uma redução de 15% ($p = 0,004$) e 60% ($p < 0,001$) na quantidade de insetos capturados nas cidades de Montes Claros e Fortaleza, respectivamente (Tabela 2 e 3). Quando analisado por local de captura, pôde-se observar uma redução de 21% no número de *Lu. longipalpis* capturados no peridomicílio (IRR = 0,783; $p < 0,001$) em Montes Claros, e um redução de 56% (IRR = 0,44; $p < 0,001$) e 60% (IRR

= 0,40; $p < 0,001$) no intra e peridomicílio em Fortaleza, respectivamente (Figura 5) (Tabela II e III). Não se observou sazonalidade ou outro fenômeno cíclico em ambas as cidades (Figura 4).

DISCUSSÃO

A coleira impregnada com deltametrina 4% é considerada atualmente ferramenta no controle da LV. Alguns estudos recentes sugerem que a sua utilização em áreas com transmissão reduz a prevalência de casos caninos, sem entretanto fazer alusão ao impacto efetivo na população de flebotomíneos (Kazimoto 2016, Sevá et al., 2016).

O impacto na redução da prevalência da leishmaniose visceral canina baseia-se na impossibilidade de realização do repasto sanguíneo pelos vetores nos cães encoleirados. Essa impossibilidade é sustentada pela ação repelente e inseticida da deltametrina, piretróide utilizado nas coleiras (Halbig et al., 2000, David et al., 2001, Maroli et al., 2001). No entanto, é importante enfatizar que, estudos indicam uma diminuição da mortalidade de *Lu. longipalpis*, de 90% para 35%, considerando a quarta e a 37ª semana de uso da coleira, demonstrando a necessidade de trocas sistemáticas para sustentar a interrupção da alimentação vetorial em cães (David et al., 2001).

As coleiras Scalibor® das áreas de intervenção do estudo foram trocadas a cada 6 meses, de acordo com as especificações do fabricante. No entanto, entre o primeiro e o segundo encoleiramento, este intervalo foi prolongado para um ano, devido a problemas inerentes à entrega. Da mesma forma, embora não tenha sido medida, durante os 30 meses do estudo, houve perdas de coleiras Scalibor® por várias razões: efeitos adversos caracterizados por prurido, irritação e dermatite; brigas entre animais; retirada da coleira pelo animal, principalmente pelo grupo de cães semi-domiciliados, já que a maioria deles não tem costume de usar coleira, entre outras razões.

Reithinger et al. (2004), a partir de modelo matemático, demonstraram redução da seroconversão em 50% dos animais encoleirados, apesar de ter sido registrado 41% de perda das coleiras utilizadas no estudo. No presente estudo, mesmo com as perdas, observou-se redução de 40% na prevalência

canina e redução na população de *Lu. longipalpis* no intra e peridomicílio em Fortaleza e Montes Claros (observações não publicadas - Werneck 2016). O efeito sobre a prevalência canina e a redução da população de *Lu. longipalpis* pode ser atribuída ao efeito do rebanho proporcionado pelo uso de coleiras em mais de 50% dos cães.

O presente estudo demonstrou ampla distribuição da principal espécie transmissora de LV, *Lu. longipalpis*, nos dois municípios trabalhados, comprovando a adaptação desta espécie ao ambiente antropizado. A adaptação de *Lu. longipalpis* às áreas urbanizadas nestes dois municípios já havia sido comprovada anteriormente, justificando a manutenção de altos coeficientes de incidência de casos humanos e prevalência de casos caninos nesses municípios (Michalsky et al., 2009, Silva et al., 2014).

Quando avaliado o local de captura, foi observada maior abundância de *Lu. longipalpis* no peridomicílio em ambos os municípios. Isso pode ser explicado pela presença de características favoráveis ao aparecimento do vetor nestes locais, principalmente: o tamanho dos peridomicílios associado a presença de árvores frutíferas e presença de mais de um tipo de animal doméstico ou criação, o que faz com que os flebotomíneos não tenham que se deslocar para o intradomicílio em busca de fontes alimentares (Silva et al. 2014, Salomón et al. 2015).

O número de exemplares de *Lu. longipalpis* capturados em Montes Claros foi dez vezes maior do que em Fortaleza, sendo quatro vezes maior no peridomicílio quando comparado ao intradomicílio em Montes Claros, e duas vezes maior em Fortaleza. Essa diferença pode ser atribuída ao fato de Montes Claros ser uma cidade com muita área verde e em amplo processo de urbanização, com modificações ambientais frequentes. Já foi descrito que o processo de urbanização proporciona a destruição dos habitats naturais de vetores e reservatórios da LV, o que leva a aproximação de vetores ao ambiente antropizado, facilitando a interação destes com a população humana (Cardim et al., 2013). Ademais, o alto grau de antropofilia e a preferência alimentar eclética dessa espécie de flebotomíneo justifica a sua capacidade em se adaptar a diversos ambientes antropizado (Salomón et al.,

2015). No entanto, a adaptação de flebotomíneos ao ambiente antropizado ocorre de forma gradual, sendo encontrados inicialmente em áreas semelhantes ao seu habitat natural, muitas vezes representadas pelo peridomicílio, para posteriormente se adaptarem a áreas mais antropizadas, como no intradomicílio (Silva et al. 2014).

Ademais, pode-se enfatizar que apesar das características ambientais dos pontos de capturas serem similares dentro de cada município trabalhado, entre eles algumas diferenças foram observadas. Diferente do observado em Fortaleza, em Montes Claros todos os pontos de capturas tinham presença de aves, principalmente galináceos, o que favorece o aparecimento de flebotomíneos (Alexander et al. 2002, Oliveira et al. 2008, Afonso et al. 2012, Soares et al. 2013). Além disso, a presença de galinhas pode atuar como amplificador da população de flebotomíneos (Oliveira et al. 2012, Casanova et al. 2013). Estudo realizado na Argentina, na província de Posadas, correlacionou a presença de aves e ausência de energia elétrica com o aumento da densidade de *Lu. longipalpis* (Fernández et al. 2010).

Em adição, diferenças foram apontadas no tocante a pluviosidade. Sabe-se que a pluviosidade pode interferir no aparecimento de flebotomíneos tanto de maneira positiva, quando esta ocorre em níveis moderados, como de maneira negativa, quando esta ocorre em níveis elevados, o que acaba destruindo os criadouros. Em Fortaleza, pôde-se observar que o número de exemplares capturados foi maior no período e logo após os picos de chuva, corroborando com trabalhos anteriores (Michalsky et al., 2009).

Considerando os 30 meses de estudo, no município de Fortaleza foi registrado um total de 2.897 mm, com picos variando entre 400 e 500 mm e concentrados nos meses de março a julho dos anos estudados. Já em Montes Claros foi registrado 1.685 mm, com distribuição homogênea durante o ano, e somente um grande pico registrado no período de novembro e dezembro de 2013. (Missawa & Dias 2007, Silva et al. 2007, Oliveira et al. 2008). Entretanto em Montes Claros, não foi possível observar o aumento esperado após as chuvas, sendo capturados flebotomíneos em todos os meses em que foi realizada a captura. Essa constância numérica de exemplares obtidos nas

capturas, independente do mês, já foi descrita em trabalhos anteriores (Michalsky et al. 2009).

O uso das coleiras impregnadas com deltametrina a 4% foi responsável por 14% e 60% de redução do número de flebotomíneos capturados na área de intervenção, quando comparada a área controle, em Montes Claros e Fortaleza, respectivamente. Essa diminuição pode justificar a redução observada na prevalência de casos caninos na ordem de 40% nos municípios participantes do projeto intitulado “Avaliação da efetividade de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em áreas endêmicas para leishmaniose visceral” (comunicação pessoal – Werneck 2016). Apesar da determinação da taxa de infecção natural dos exemplares capturados não ser realizada de forma rotineira no âmbito do serviço de saúde, o número de insetos capturados associados às características intrínsecas da espécie, principalmente a alta antropofilia e proximidade com os reservatórios domésticos, pode indicar maior risco de transmissão da doença (Salomón et al., 2015).

No tocante a relação macho:fêmea, em ambos os municípios e em ambas as áreas (intervenção e controle) foram capturados maior número de machos do que de fêmeas. Esta predominância de machos já foi descrita anteriormente (Cabanillas & Castellón 1999, Silva et al., 2014). Alguns autores relatam que o uso de armadilhas luminosas pode causar desequilíbrio entre os sexos na captura, sendo os machos mais capturados do que as fêmeas. Isso poderia ser fortalecido pelo comportamento dos machos em formar agregados para monitoramento e cópula com as fêmeas (Aguiar, 1985).

Comparando as áreas de intervenção e controle, em ambos os municípios, a taxa de infestação foi de 100%, indicando que a presença da coleira, apesar de reduzir o número de exemplares capturados, não previne a infestação dos domicílios. Entretanto, considerando o potencial repelente e inseticida da coleira, os insetos que perdurarem no ambiente domiciliar não terão acesso para realização do repasto sanguíneo nos cães, que são a principal fonte de infecção em âmbito urbano, e assim não serão capazes de

se infectar e posteriormente transmitir a doença para a população (Lainson & Rangel 2005, Maroli et al., 2013).

Além disso, é importante avaliar a fonte alimentar dos *Lu. longipalpis* na impossibilidade de realização do repasto sanguíneo em cães. Em todos os pontos de estudo, tanto nas áreas de intervenção quanto nas áreas controle, havia pelo menos um cão e outra fonte de alimento animal, além do homem. Este critério ajudaria a avaliar o risco de transmissão da doença aos seres humanos. É enfatizado que, uma vez protegido o cão, existe a probabilidade de interação entre *Lu. longipalpis* e humanos, o que inicialmente justificaria um aumento no número de casos humanos. No entanto, esse aumento não seria sustentado no longo prazo, devido à falta de fontes de infecção para o vetor. Estudos mostram que *Lu. longipalpis* é uma espécie de alimentação eclética, no entanto, tem preferência por aves, seguidas de porcos, cães e humanos (Afonso et al., 2012).

Considerando o local de captura, nas áreas de intervenção de Montes Claros, o número de *Lu. longipalpis* capturados no peridomicílio reduziu em torno de 21% ao longo do tempo ($p < 0.001$), não havendo redução no intradomicílio. Em Fortaleza essa redução ocorreu de forma significativa tanto no intra como no peridomicílio, na ordem de 56% e 60% respectivamente ($p < 0.001$). Essa redução no peridomicílio já era esperada, tendo em vista que os flebotomíneos teriam mais dificuldade em realizar o repasto sanguíneo nos cães encoleirados, recorrendo aos demais animais domésticos ou de criação e população humana para alimentação.

Embora exista uma complexidade na avaliação de fatores relacionados à sustentabilidade da transmissão da leishmaniose visceral, principalmente em relação à presença de *Lu. longipalpis* nas áreas com casos, é indiscutível que a redução na população desse vetor diminui a probabilidade de transmissão da doença. Os resultados deste trabalho indicam que o uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% poderia surgir como uma proposta alternativa, a ser integrada ao rol de atividades atualmente preconizadas pelo Ministério da Saúde para o controle de LV, uma vez que a execução das atuais estratégias de controle em áreas urbanas é complexa e

impopular, principalmente aquelas voltadas para a eutanásia de reservatórios domésticos. A avaliação da taxa de infecção por *L. infantum* e da fonte alimentar dos exemplares fêmeas de *Lu. longipalpis* capturados poderá complementar a informação sobre o efeito potencial da intervenção na transmissão da doença.

AGRADECIMENTOS: O trabalho teve o imenso apoio das equipes de entomologia do Centro de Controle de Zoonoses de Montes Claros e da Secretaria de Saúde do estado do Ceará.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES: A autora Rafaella Albuquerque e Silva participou da elaboração do projeto, execução em sua totalidade e redação do manuscrito; Andrey José de Andrade, Bruno Beust Quint e Gabriel Elias Salmen Raffoul foram responsáveis pela identificação de flebotomíneos e pela preparação do manuscrito; Guilherme Loureiro Werneck, Elizabeth Ferreira Rangel e Gustavo Adolfo Sierra Romero foram responsáveis pela elaboração do projeto, análise de dados, preparação e revisão do manuscrito.

REFERENCES

- Afonso MMDS, Duarte R, Miranda JC, Caranha L, Rangel EF. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) population from endemic areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. J Trop Med 2012; 2012: 1-5.
- Aguiar GM, Vilela, ML, Schuback PD; Soucasaux T, Azevedo AC. Aspectos da ecologia dos flebotomos do Parque Nacional da Serra dos Orgãos, Rio de Janeiro: Frequência mensal em armadilhas luminosas (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem do Inst Oswaldo Cruz. 1985; 80(4): 465-482.
- Alexander B, Lopes de Carvalho R, McCallum H, Pereira MH. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. Emerg Infect Dis 2002; 8 (12): 1489-1485.

- Andrade AM, Queiroz LH, Nunes GR, Perri SHV, Nunes CM. Reposição de cães em área endêmica para leishmaniose visceral. *Ver Soc Bras Med Trop.* 2007; 40 (5): 594-595.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014. 120p.: il. Color – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- Brazuna JCM. Estudos sobre leishmaniose visceral humana e canina no município de Campo Grande, MS, Brasil. 2012. 118 f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012.
- Cabanillas MRS, Castellón EG. Distribution of Sandflies (Diptera: Psychodidae) on Tree-trunks in a Non-flooded Area of the Ducke Forest Reserve, Manaus, AM, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94 (3): 289-296.
- Cardim MFM, Rodas LAC, Dibo MR, Guirado MM, Oliveira AM, Chiaravalloti-Neto F. Introduction and expansion of human American visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil, 1999-2011. *Rev Saúde Pública.* 2013; 47(4):691-700.
- Costa DNCC, Codeço CR, Silva MA, Werneck GL. Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. *Plos Negl Trop Dis.* 2013; 7(8): e2355.
- David JR, Stamm LM, Bezerra HS, Souza RN, Killick-Kendrick R, Lima JWO. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potente anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96 (6): 839-847.
- Fernández MS, Salomón OD, Cavia R, Perez AA, Acardi AS, Guccione JD. *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with environmental variables in na urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. *Acta Trop.* 2010; 114 (2): 81-87.
- Galati, EAB. Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae. In:

- Rangel EF & Lainson R (Orgs). Flebotomíneos do Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. 23-51p.
- Gidwani K, Picado A, Rijal S, Singh SP, Ruy L, Volfova V et al. Serological markers of sand fly exposure to evaluate insecticidal nets against visceral leishmaniasis in India and Nepal: A cluster-randomized trial. *Plos Negle Trop Dis.* 2011; 5 (9): e1296.
- Halbig P, Hodjati MH, Mazloumi-Gavgani AS, Mohite H, Davies CR. Further evidence that deltamethrin-impregnated collars protect domestic dogs from sandfly bites. *Med Vet Entomol.* 2000; 14 (2): 223-226.
- INMET 2017. Dados da Rede do INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf. Data de acesso: 26 de abril de 2016.
- Kazimoto TA. Uso de coleiras impregnadas com deltametrina 4% em cães no controle da leishmaniose visceral. 2016. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2016.
- Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology, Oxford*, v. 11, n. 2, p. 105-111, abr. 1997.
- Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100 (8): 811-827.
- Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Grandoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol.* 2013; 27 (2): 123-147.
- Maroli M, Mizzoni V, Siragusa C, D’Orazi A, Grandoni L. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in Southern Italy. *Med Vet Entomol.* 2001. 15 (4): 358-363.
- Mazloumi Gavgani AS, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis

- in Iranian children: A matched-cluster randomised trial. *Lancet*. 2002; 360 (9330): 374-379.
- Michalsky, ÉM, Fortes-Dias CL, França-Silva LC, Rocha MF, Barata RA, Dias ES. Association of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) population density with climate variables in Montes Claros, na área of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104 (8): 1191-1193.
- Paho, WHO. Organización Panamericana de la Salud: Leishmaniasis: Informe Epidemiológico en las Américas: Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2017; n 5. http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34111/informe_leishmaniasis_5_spa.pdf?sequence=5&isAllowed=y. Acessado em 20 de junho de 2017.
- Reithinger R, Coleman PG, Alexander B, Vieira EP, Assis G, Davies CR. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *Int J Parasitol*. 2004; 34 (1): 55-62.
- Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MMDS, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; 110 (7): 831-846.
- Sevá AP, Ovallos FG, Amaku M, Carrillo E, Moreno J, Galati EAB et al. Correction: Canine-based strategies for prevention and control of visceral leishmaniasis in Brazil. *Plos One*. 2016; 11 (9): e0161853.
- Silva RA, Santos FKM, Sousa LC, Rangel EF, Bevilaqua CML. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei* in na endemic área for visceral leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Veterinária*. 2014; 23 (3): 320-327.
- Soares BR, Souza APA, Prates DB, Oliveira CI de, Barral-Netto M, Miranda JC et al. Seroconversion of sentinela chickens as a biomarker for monitoring exposure to visceral leishmaniasis. *Sci Rep*. 2013; 3: 2352.
- 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). Florida, Memoirs of the American Entomological Institute 54, Associated Publishers, 881.

Zuben APB von, Donalísio MR. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da leishmaniose visceral em grandes municípios brasileiros. Cad Saúde Publica 32 (6): 1-11.

Figura 1. Montes Claros, MG. Pontos pretos indicam área controle e pontos vermelhos área de intervenção.

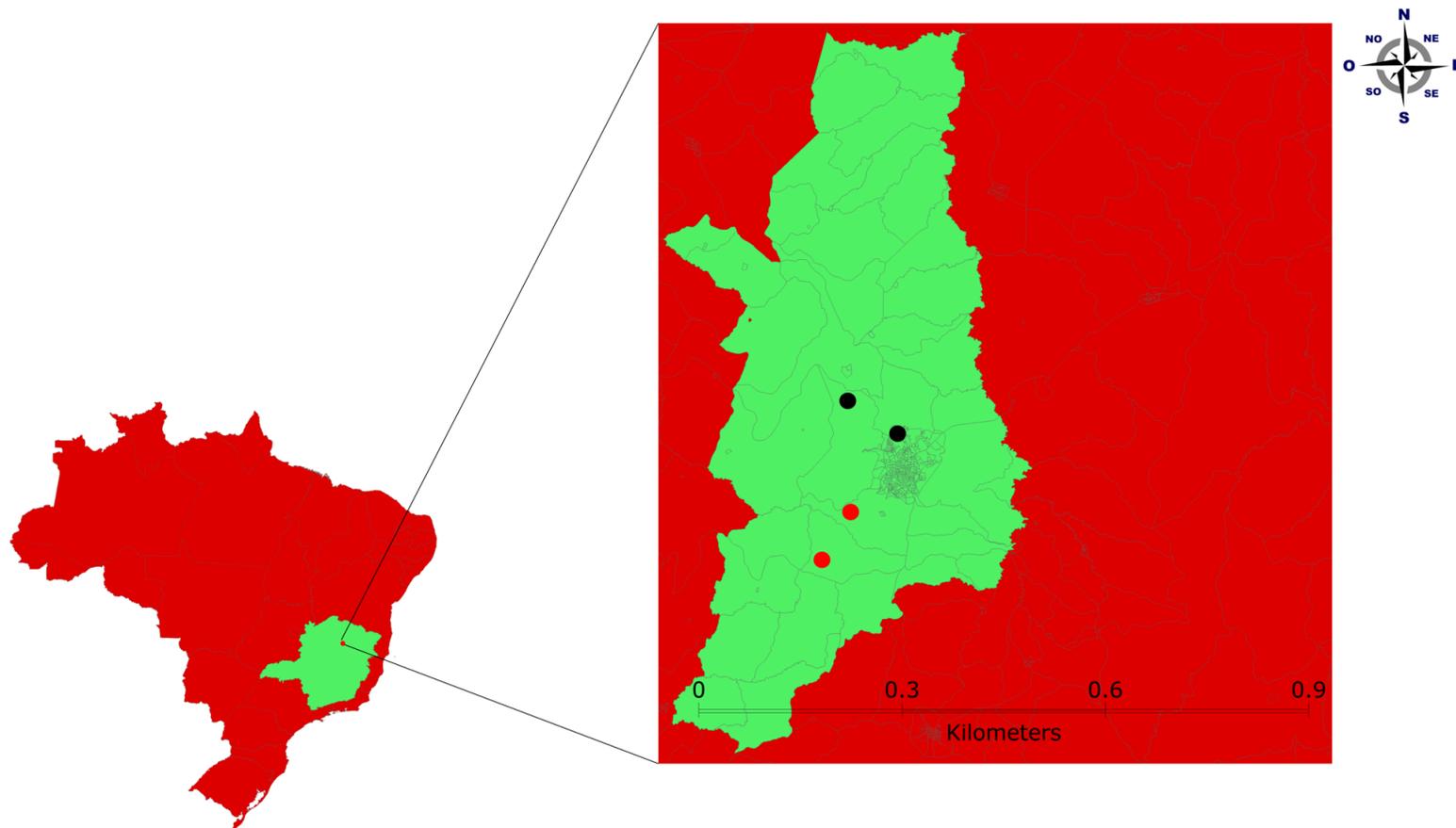


Figura 2. Fortaleza, CE. Pontos pretos indicam área controle e pontos vermelhos área de intervenção.

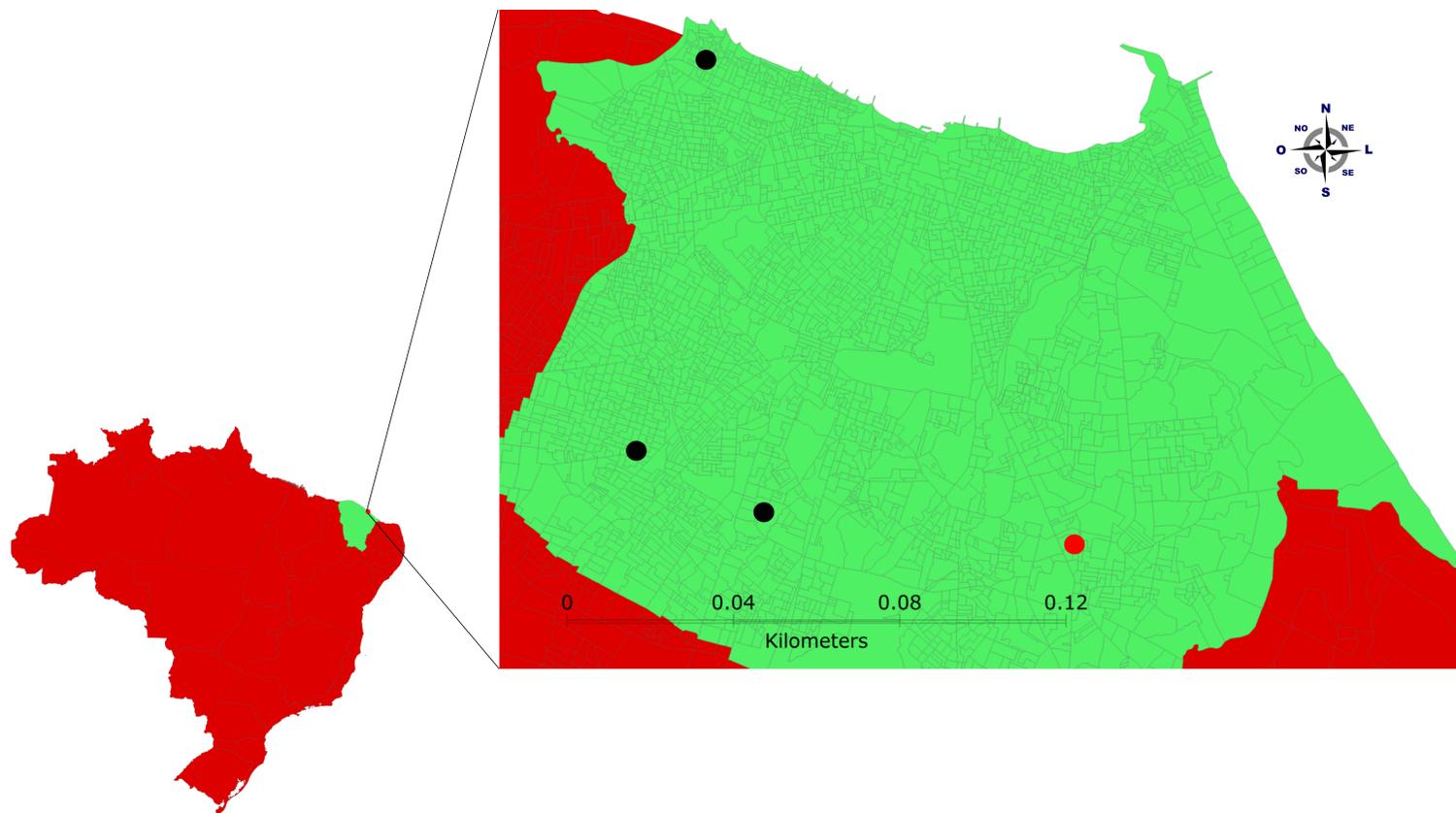
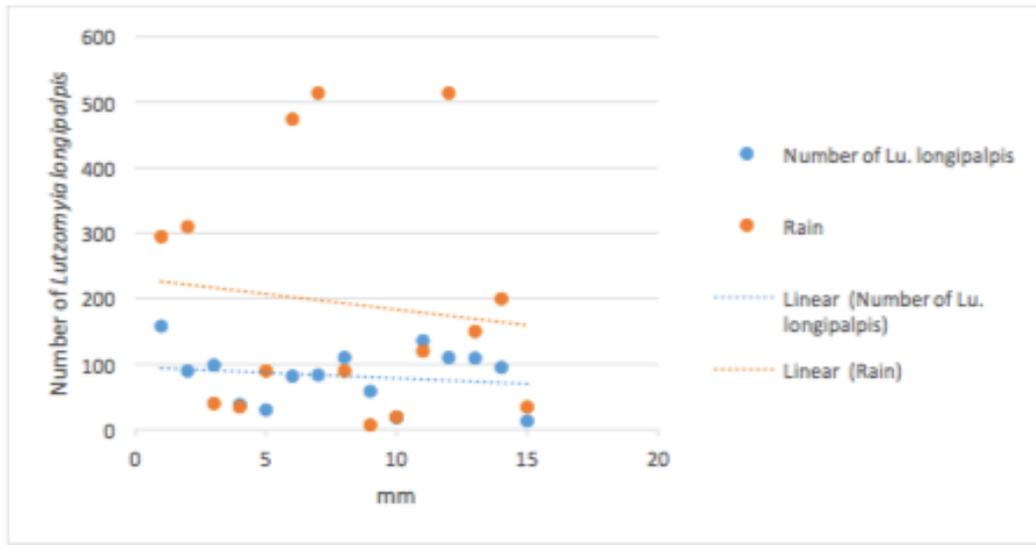


Figure 3. Número de *Lutzomyia longipalpis* capturados por bimestre e observação de pluviosidade durante o período de estudo. A. Fortaleza/CE. B. Montes Claros/MG, Brasil, 2013 a 2015.

A.



B.

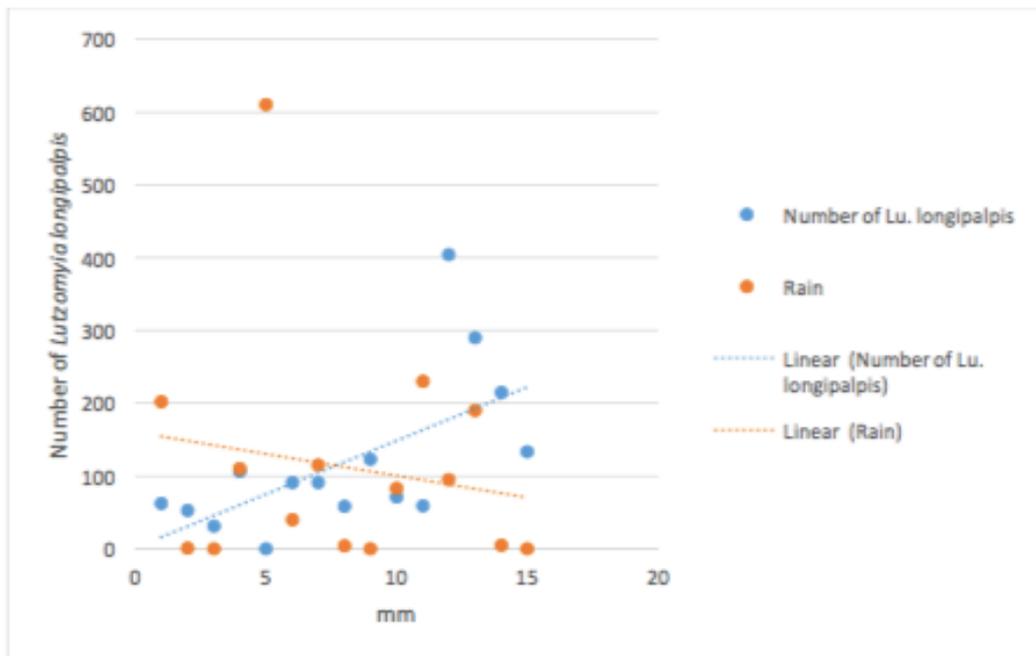
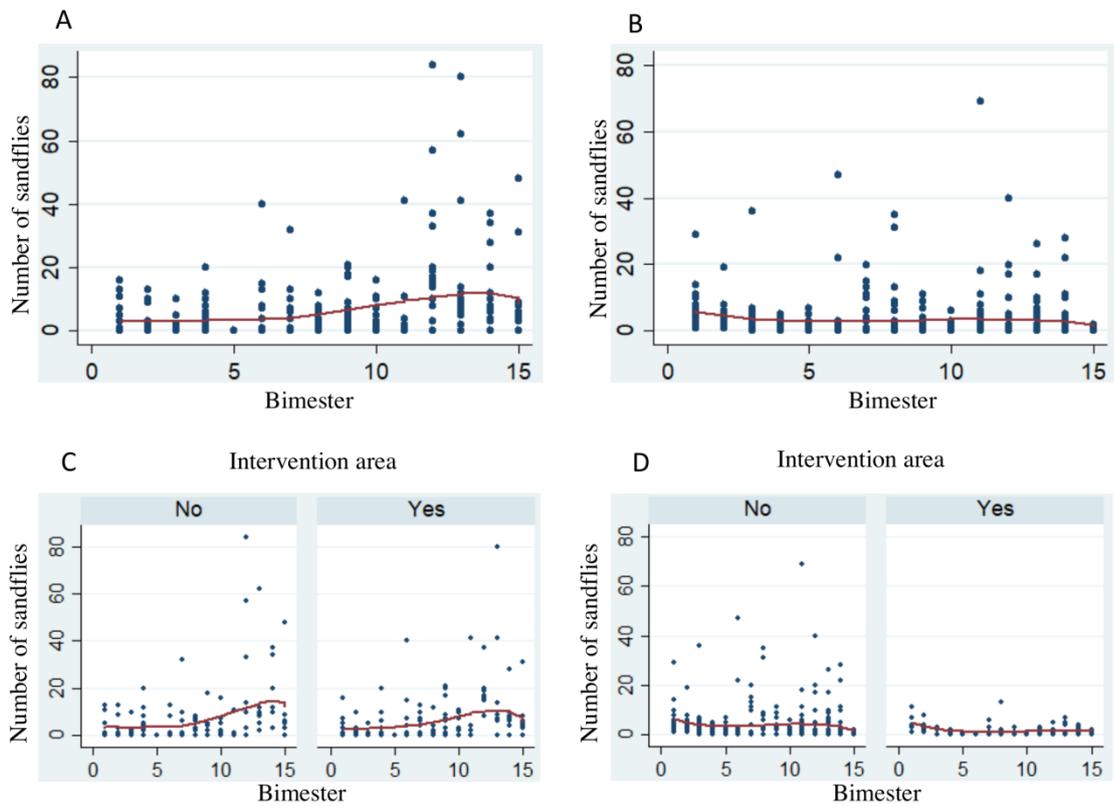


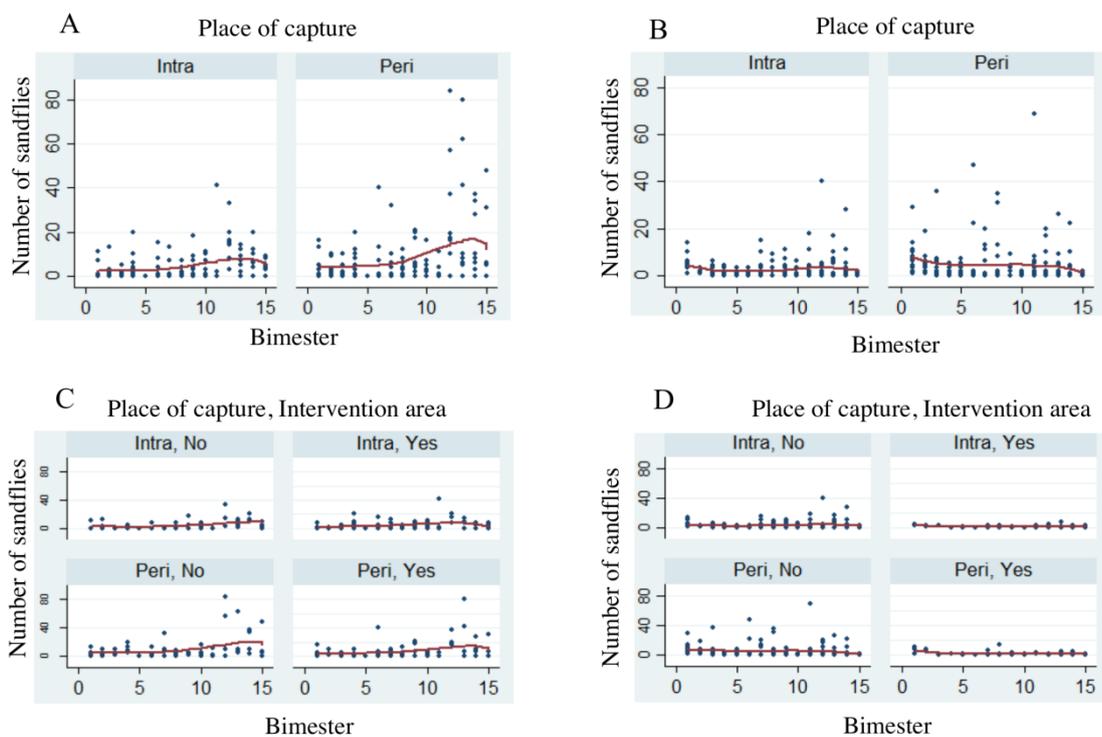
Figura 4. Número total de *Lutzomyia longipalpis* capturadas por bimestre e área de intervenção (com e sem o uso de coleiras) de Montes Claros (MG) e Fortaleza (CE), Brasil, 2013 a 2015.



A.

Número de flebotomíneos capturados por bimestre, Montes Claros/MG. B. Número de flebotomíneos capturados por bimestre, Fortaleza/CE. C. Número de flebotomíneos capturados por bimestre em área de intervenção e controle, Montes Claros/MG. D. Número de flebotomíneos capturados por bimestre em área de intervenção e controle, Fortaleza, CE.

Figura 5. Número de flebotomíneos capturados por bimestre, sítio de captura (intra e peridomicílio), área de intervenção (áreas com e sem a coleira) em Montes Claros e Fortaleza.



A. Número de flebotomíneos capturados por bimestre e sítio de captura, Montes Claros/MG. B. Número de flebotomíneos capturados por bimestre e sítio de captura, Fortaleza/CE. C. Número de flebotomíneos capturados por bimestre e sítio de captura, área intervenção e controle, Montes Claros/MG. D. Número de flebotomíneos capturados por bimestre e sítio de captura, área intervenção e controle, Fortaleza, CE.

Tabela I. Fórmulas utilizadas para calcular a taxa de infestação domiciliar e a abundância relativa do vetor

<p>Taxa de infestação domiciliar</p>	<p>Número de domicílios positivos/sítio de captura/técnica utilizada</p> <hr/> <p style="text-align: right;">x100</p> <hr/> <p>Número de domicílios pesquisados</p>
<p>Abundância relativa</p>	<p>Número de <i>Lu. longipalpis</i> capturados por metodologia nos domicílios (intra ou peridomicílio)</p> <hr/> <p>Número de domicílios pesquisados</p>

Tabela II. Modelo de regressão de Poisson. Avaliação entre a intervenção, sítio de captura e abundância de insetos, de acordo com o período de agregação temporal (bimestre), Montes Claros, MG, 2013 a 2015.

Total_insetos	IRR	P> z	[Intervalo de confiança 95%]	
Tempo	1.14	0.000	1.12	1.15
1.coleira	.87	0.004	.79	.95
2.local	1.92	0.000	1.74	2.12
_cons	1.45	0.000	1.24	1.69

Tabela III. Modelo de regressão de Poisson. Avaliação entre a intervenção, sítio de captura e abundância de insetos, de acordo com o período de agregação temporal (bimestre), Montes Claros, MG, Fortaleza, CE, 2013 a 2015.

Total_insetos	IRR	P> z	[95% Conf. Interval]	
Tempo	.97	0.002	.96	.99
1.coleira	.41	0.000	.35	.49
2.local	1.79	0.000	1.59	2.01
_cons	3.37	0.000	2.94	3.87

5. Resultados

5.2 Capítulo 2

Artigo a ser submetido

*Estamos desperdiçando um caracter de taxonomia útil? O caso da pigmentação do tórax para identificar *Lutzomyia longipalpis**

Rafaella Albuquerque e Silva^{*1,2}; Andrey José de Andrade³; Bruno Beust Quint¹; Gabriel Elias Salmen Raffoul¹; Elizabeth Ferreira Rangel⁵; Gustavo Adolfo Sierra Romero¹

1. Center for Tropical Medicine, University of Brasilia, Brasília, DF, Brazil;
2. Secretariat of Health Surveillance, Ministry of Health;
3. Federal University of Paraná;
4. Institute of Social Medicine, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
5. Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation;

Resumo: A identificação taxonômica de flebotomíneos é uma tarefa complexa e se baseia essencialmente em critérios morfológicos. A simplificação desse processo de identificação é desejável para tornar as atividades de vigilância entomológica mais ágeis e efetivas em relação a flebotomíneos de importância para a saúde pública humana e animal. O objetivo do presente relato é descrever a potencial utilidade do uso da coloração dos pleuritos para discriminar *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) de outras espécies de flebotomíneo. Foram identificados 355 espécimes de flebotomíneos utilizando-se a classificação taxonômica convencional e de forma independente e mascarada foi registrada a coloração dos escleritos torácicos. Foram incluídos no estudo 13 espécimes de *Evandromyia cortelezzi*/*Evandromyia sallesi* e 342 espécimes de *Lu. longipalpis*. Foi observada a presença de coloração mais escura em 337 (98,5%) espécimes de *Lu. longipalpis* no paratergito e anepímero, catepísterno e catepímero e tal característica não foi encontrada nos espécimes pertencentes aos demais exemplares estudados. Os nossos resultados sugerem que a coloração escura nesses escleritos pode auxiliar na detecção de *Lu. longipalpis* para

uma triagem inicial de espécimes capturados em áreas submetidas à vigilância entomológica para o monitoramento do risco de leishmaniose visceral.

Palavras chave: *Lutzomyia longipalpis*, taxonomia, catepisterno; catepímero, vigilância entomológica, flebotomíneos.

A taxonomia de flebotomíneos é atividade essencial do componente da vigilância entomológica que tem como objetivo final a identificação oportuna de qualquer mudança no perfil de transmissão das leishmanioses para reduzir a incidência de casos humanos (Gomes, 2002). A identificação das espécies de flebotomíneos encontradas em uma determinada área é relevante para a caracterização do risco de adquirir leishmanioses visceral e tegumentar. *Lutzomyia longipalpis* sensu lato (s.l.) (Lutz & Neiva 1912) é a principal espécie transmissora de *Leishmania infantum* (Nicolle 1908), agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) no Brasil. Todavia, estudos apontam outras duas espécies, *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira 1942) e *Migonomyia migonei* (França 1920), como vetores secundários da LV (Guimarães et al., 2016; Falcão de Oliveira et al., 2017).

Durante algumas décadas, pesquisas sobre a taxonomia Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) focaram principalmente em alguns espécimes usando morfologia e morfometria em uma relação com dados biológicos. Historicamente, esses estudos podem ser divididos em dois estágios diferentes de acordo com o caractere para distinguir e classificar as espécies. No primeiro, apenas os detalhes da morfologia externa foram considerados particularmente com análises morfométricas (Perfili'ev, 1968). Adler & Theodor (1926) introduzem estudos de estruturas internas (por exemplo, cibário, faringe e espermatecas nas fêmeas) iniciando o segundo estágio para a taxonomia de Phlebotominae. No entanto, os avanços na classificação deste grupo de insetos foram conduzidos quando foi provado seu papel na transmissão de agentes patogênicos (Lane, 1986). A subfamília Phlebotominae apresenta-se taxonomicamente bem estudada nas Américas. Akhoundi et al. (2016) apresentam histórico taxonômico da subfamília desde o século XVII até agora.

Atualmente, o Ministério da Saúde recomenda aos profissionais das Secretarias de Saúde dos Estados que executam as tarefas de vigilância

entomológica a utilização de duas chaves de identificação para flebotomíneos: a proposta por Young & Duncan (1994) e por Galati (2003) (Ministério da Saúde, 2015).

Machos e fêmeas de *Lu. longipalpis* apresentam tórax com cerdas metepisternais; mesonoto e escutelo castanhos. As fêmeas possuem espermateca segmentada e cibário com três ou mais pares de dentes posteriores e os anteriores dispostos em uma fileira transversal. Os machos possuem gonóstilos com espinho externo inferior em nível mais basal do que o interno e a presença de duas cerdas esclerotizadas e curvadas no parâmetro (Young & Duncan, 1994; Shimabukuro et al., 2011). Essas características são as mais utilizadas para identificação na rotina laboratorial.

Considerando que a identificação de flebotomíneos é uma atividade complexa, minuciosa e demorada, os estados centralizam estas atividades nas Coordenadorias Regionais de Saúde, sendo escassos os municípios que possuem equipe e infraestrutura para realizá-la (Brasil, 2014). A centralização da atividade sobrecarrega as equipes estaduais e justifica a busca por características de mais fácil visualização. Ademais, existe uma dificuldade na distinção de espécies que fazem parte de um mesmo complexo, a exemplificar *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia gaminarai* (Giordani et al., 2017), justificando a necessidade de busca por caracteres que sejam mais específicos para esta distinção.

Durante estudo realizado no município de Montes Claros/MG, que consistiu em capturas sistemáticas de flebotomíneos durante 30 meses (Silva et al. *in press*), observou-se que as fêmeas identificadas como *Lu. longipalpis* apresentavam coloração escura acima da segunda e terceira coxa, no catepisterno e catepímero, respectivamente. Essa observação também tinha sido apontada previamente (Eunice Galati - comunicação pessoal). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a presença da coloração supracitada poderia ser utilizada como triagem inicial para identificação de machos e fêmeas de *Lu. longipalpis*, separando-os de espécimes pertencentes a outras espécies.

Uma amostra de 383 flebotomíneos, provenientes de Fortaleza/CE (187 exemplares) e Montes Claros/MG (196 exemplares), foi enviada ao Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da Faculdade de Medicina da

Universidade de Brasília. A amostra de Fortaleza era composta de 95 fêmeas e 92 machos, enquanto que a de Montes Claros de 100 fêmeas e 96 machos.

Machos e fêmeas foram montados entre lâmina e lamínula utilizando somente a cabeça e a parte posterior do abdômen (genitália) para posterior identificação (Galati 2003). O tórax dos 383 espécimes foi separado individualmente e colocado em tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL. Lâminas e tubos receberam códigos para mascarar a avaliação realizada de forma independente por taxonomista com expertise em flebotômíneos no Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná.

Da amostra enviada, 28 (7%) exemplares, 15 de Fortaleza e 13 de Montes Claros, foram descartados por apresentar estado inadequado de conservação que impossibilitou a identificação. A identificação taxonômica convencional dos 355 exemplares aptos para a avaliação demonstrou que 342 (96,3%) eram *Lu. longipalpis*, dado consistente com a predominância desta espécie nas áreas urbanas onde a amostra estudada foi capturada e de acordo com o esperado principalmente em áreas classificadas como de transmissão intensa de LV (Silva et al., 2014; Salomón et al. 2015). Os 13 exemplares restantes eram fêmeas e foram identificados como *Evandromyia cortelezzii* (Brèthes 1923) ou *Ev. sallesi* (Galvão & Coutinho 1939), uma vez que as fêmeas destas duas espécies são morfologicamente indistinguíveis (Galati 2003).

Sábio et al. (2016) levando em conta o proposto por Caillard et al. (1986) e Andersen (2010) definiram a pigmentação dos escleritos torácicos como intensa (castanha), baixa intensidade (palha) e ausência (pálido). Tendo como referência essas observações, constatou-se no presente estudo que os 13 exemplares identificados, a partir de montagem da cabeça e do abdome, como *Ev. cortelezzii* ou *Ev. sallesi*, apresentaram na avaliação do tórax uma coloração palha nas regiões do catepisterno e catepímero e com um padrão de distribuição da coloração pelos dois pleuritos, na cor palha. Dos 342 exemplares identificados como *Lu. longipalpis* a partir da montagem da cabeça e do abdome, 337 (98,5%) apresentavam pigmentação castanha, contornando o catepisterno e o catepímero enquanto unicamente cinco exemplares (1,5%) apresentaram coloração pálida. Além disso, acima do catepisterno existe uma esclerotização no anepímero que foi mais evidente (castanha) nos

exemplares de *Lu. longipalpis* do que nos pertencentes ao complexo *cortelezzii* (palha). Ainda pôde ser notado que exemplares de *Lu. longipalpis* apresentaram o paratergito na mesma tonalidade do mesonoto (castanho) e nos exemplares do complexo *cortelezzii* ele é pálido, diferentemente do mesonoto (Fig 2). Cabe destacar que não houve necessidade de montagem dos espécimes entre lâminas e lamínulas para a visualização adequada do tórax.

Nos serviços de vigilância entomológica as características do tórax são pouco utilizadas para a identificação de flebotomíneos. Entretanto, a coloração do corpo como um todo pode funcionar como indicativo de que uma determinada espécie, ou alguns grupos de espécies ocorrem em uma área. Assim, por exemplo, corpo totalmente pálido pode ser indicativo da presença entre outras de *Psychodopygus carrerai*, *Nyssomyia frahai*, *Evandromyia infraspinosa*, *Sciopemyia sordellii*; corpo totalmente escuro remete a *Pintomyia pessoai*, *Pintomyia monticola*, *Lutzomyia amarali* entre outras. No entanto, o mais comum é encontrar uma mescla de tons entre a coloração palha e castanha no noto e escleritos das pleuras torácicas.

Na subtribo Psychodopygina a coloração dos escleritos torácicos apresenta grande importância taxonômica. Carvalho et al. (2006) para o gênero *Psychodopygus* demonstraram que a distribuição dessa pigmentação poderia funcionar como um caráter secundário para separação das espécies, principalmente para fêmeas. Para o gênero *Psathyromyia* a coloração do tórax é fundamental na separação das fêmeas do subgênero *Psathyromyia* da série *shannoni* (Sábio et al. 2014, 2016a,b) nas quais as espermatecas são morfologicamente semelhantes. *Bichromomyia* é outro exemplo que pode ser facilmente identificado pela coloração torácica, que segundo Sherlock & Carneiro (1962) apresenta nítido contraste do mesonoto (escuro) com a pleura (clara) e Galati (2003) acrescenta que o gênero apresenta mesonoto bicolor onde parte posterior do escudo e escutelo são claros, em contraste com o restante que é castanho.

Na subtribo Lutzomyiina não foram ainda descritos padrões de coloração no tórax. Como observado no presente estudo *Lu. longipalpis* apresenta as bordas do catepisterno e catepímero, o anepímero e o paratergito castanhos. Essas características são de fácil observação e sem necessidade de montagem para a sua visualização. Pela ocorrência desse padrão de coloração em 98,5% dos exemplares

de *Lu. longipalpis* avaliados no presente estudo, o uso da coloração do tórax poderia ser útil na triagem inicial dos flebotomíneos capturados pela vigilância entomológica objetivando primariamente a identificação de *Lu. longipalpis*. Ademais, a avaliação intraespécie do padrão de coloração do tórax considerando o período de vida (em dias) do exemplar adulto, é fundamental para o fortalecimento do uso deste caracter na triagem inicial dos flebotomíneos.

As observações aqui relatadas referem-se à distinção de dois complexos de espécies *Lu. longipalpis* s. lat e *Ev. cortelezzii*/*Ev. sallesi*. No entanto, é imprescindível o conhecimento do padrão de coloração torácica das espécies que ocorrem em simpatria com *Lu. longipalpis* ou outras deste complexo (*Lu. cruzi* e *Lu. gaminarai*), sobretudo em áreas urbanas, para fins de validação do padrão de coloração como caracter discriminante na identificação específica (Giordani et al 2017). Na presença de padrão de coloração semelhante é recomendável o uso, por exemplo, da relação entre comprimento da cabeça e de algumas de suas estruturas, tais como, clipeo, olhos, as quais mesmo sem auxílio de uma ferramenta para se medir é facilmente detectável.

AGRADECIMENTOS: agradecemos imensamente a Dra Eunice Galati pela revisão do texto e sugestões.

REFERÊNCIAS

- Adler, S., & Theodor, O. (1926). On the minutus Group of the Genus Phlebotomus in Palestine. Bulletin of Entomological Research, 16(4), 399-405. doi:10.1017/S000748530002873X
- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. PLoS Negl Trop Dis 10(3): e0004349. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Andersen, SO (2010). Insect cuticular sclerotization: a review. Insect Biochem. Mol. Biol. 40: 166-179. doi: 10.1016/j.ibmb.2009.10.007.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014. 120p.: il. Color – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Carvalho G M L, Falcão A L, Andrade Filho J D (2006) Taxonomic revision of phlebotomine sand fly species in the series *davisi* and *panamensis* of the subgenus *Psychodopygus* Mangabeira, 1941 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 101: 129-136.

Falcão de Oliveira E, Oshiro ET, Fernandes WS, Murat PG, Medeiros MJ de, Souza AI, Oliveira AG de, Galati EAB (2017). Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interaction. Plos Negl. Trop. Dis. 11(2):e0005401. doi: 10.1371/journal.pntd.0005401.

Gomes ADC (2002). Vigilância Entomológica. Iesus 11:79-90.

Galati E. A. B. Classificação de Phlebotominae. 2003. Rangel, E. F.; Lainson, R. Inn: Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 2003. p. 23-175.

Giordani BF, Andrade AJ, Galati EAB, Gurgel-Gonçalves R (2017). The role of wing geometric morphometrics in the identification of sandflies within the subgenus *Lutzomyia*. Med. Vet. Entomol. 31(4): 373-380. Doi: 10.1111/mve.12245.

Guimarães VCFV, Pruzinova K, Sadlova J, Volfova V, Myskova J, Filhos SPB, Volf P (2016). *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. Parasites & Vectors, 9, 159. <http://doi.org/10.1186/s13071-016-1444-2>

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

Ministério da Saúde, Brasil (2015). Nota Técnica – Inclusão de nova chave de identificação de flebotomíneos na rotina dos Laboratórios Estaduais de Entomologia. -

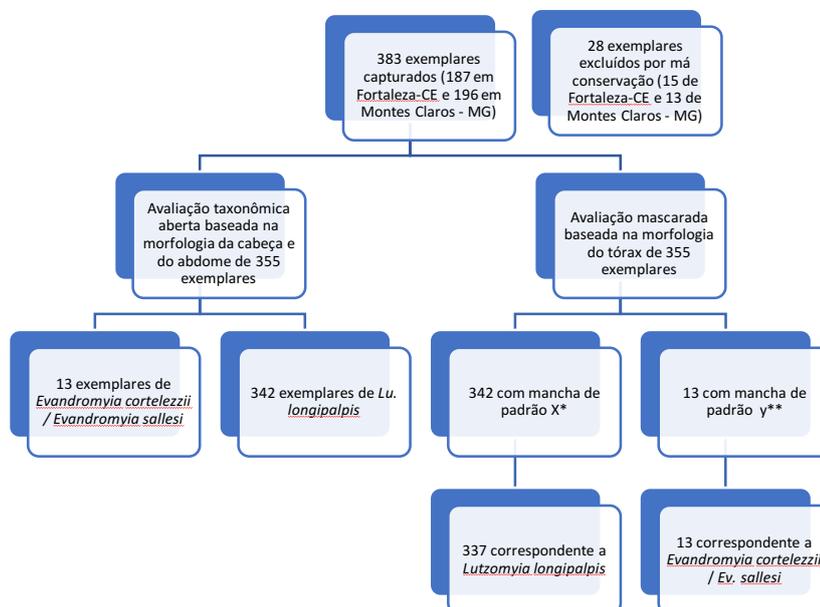
<http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/25/Nota-Tecnica---Inclusao-da-chave-de-identificacao-de-flebotomineos.2015.pdf>

Perfil'ev, P.P.: Fauna of U.S.S.R. Diptera. *Phlebotomidae* (sandflies). Acad. Sci.

U.S.S.R. Zool. Inst. New Ser. No. 93, Vol. 3 No. 2, Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, 1968

- Rodrigues ACM, Silva RA, Melo LM, Luciano MCS, Bevilaqua CML (2014). Epidemiological survey of *Lutzomyia longipalpis* infected by *Leishmania infantum* in na endemic área of Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Veterinária 23:55-62.
- Sábio, P.B., A. J. Andrade, and E.A.B. Galati. 2014. Assessment of the taxonomic status of some species included in the Shannoni Complex, with the description of a new species of *Psathyromyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). J. Med. Entomol. 51: 331–341.
- Sábio, P.B., A. J. Andrade, and E.A.B. Galati (2016a). Description of *Psathyromyia* (*Psathyromyia*) *baratai* sp. n. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Cantareira State Park, São Paulo, Brazil. J. Med. Entomol. 53: 83–90.
- Sábio PB, Brilhante AF, Quintana MG, Andrade, AJ, E. Galati, EAB (2016b). On the synonyms of *Psathyromyia* (*Psathyromyia*) *shannoni* (Dyar, 1929) and *Pa. bigeniculata* (Floch & Abonnenc, 1941) and the resuscitation of *Pa. pifanoi* (Ortiz, 1972) with the description of its female (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Journal of Medical Entomology* 53:5, 1140-1147.
- Salomón, OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MMDS, Rangel EF (2015). *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 110: 831-846.
- Santini MS, Utgés ME, Berrozpe P, Acosta MM, Casas N, Heuer P, Salomón, OD. *Lutzomyia longipalpis* presence and abundance distribution at diferente microspatiol scale in na urban scenario. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(8), e0003951. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003951>.
- Shimabukuro PHF, Tolezano JE, Galati EAB (2011) Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil. Pap. Avulsos Zool. 51: 399-441.
- Young DG, Duncan MA (1994). Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, The West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memories of the American Entomologic Institute* (Vol. 54). <https://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>

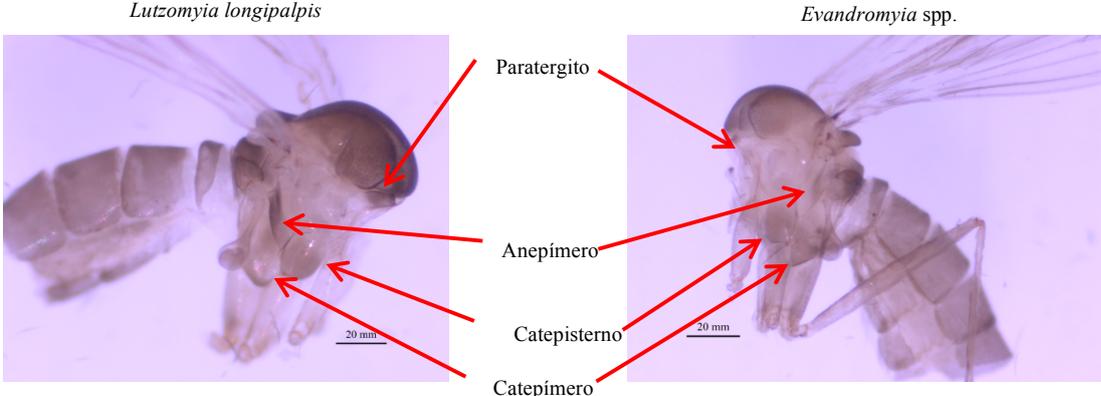
Figura 1. Fluxograma de identificação taxonômica no estudo.



*Padrão X: presença de pigmentação castanha, contornando o catepisterno e o catepímero; acima do catepisterno existe uma esclerotização no anepímero mais evidente (castanha); paratergito na mesma tonalidade do mesonoto (castanho).

**Padrão Y: coloração palha nas regiões do catepisterno e catepímero e com um padrão de distribuição da coloração pelos dois pleuritos na cor palha; esclerotização no anepímero menos evidente; paratergito pálido.

Figura 2. Diferença no padrão de coloração do tórax de *Lutzomyia longipalpis* e *Evandromyia cortelezii*/*Ev. sallesi*



6. Considerações finais

O monitoramento do impacto das estratégias voltadas ao controle da LV deve ser atividade rotineira do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral. As medidas de controle preconizadas que ao longo do tempo não tenham tido efetivamente o impacto esperado na redução de casos humanos da doença devem necessariamente ser revistas. Neste escopo, a impopularidade e complexidade de execução das atividades voltadas para o manejo de reservatórios impulsionam o Ministério da Saúde a priorizar o estudo de medidas alternativas no âmbito da pesquisa científica.

A detecção e tratamento oportuno dos casos humanos de LV certamente possui valor incontestável dentre as abordagens para reduzir o impacto da doença, tendo em vista que além da redução do sofrimento da população pelo agravo, a maior parte do custo atrelado ao cuidado oferecido à população humana com suspeita de LV decorre da perda de produtividade associada à letalidade causada pela doença no Brasil (de Carvalho et al., 2017).

A eliminação de cães infectados por meio da eutanásia tem se revelado uma medida de baixíssima receptividade pela população e de operacionalização extremamente complexa, colocando em risco a sua sustentabilidade a longo prazo (Romero 2016).

A aplicação de inseticidas que inicialmente foi saudada, após o desenvolvimento de alguns modelos matemáticos como a solução do problema, também se tem revelado como de natureza complexa quando dirigida ao ambiente domiciliar ou peridomiciliar onde apresenta baixo poder residual (Dye 1999; Morais et al. 2015). A residualidade da alfacipermetrina, inseticida atualmente utilizado para controle de flebotomíneos, gira em torno de 4 meses, entretanto esta pode ser alterada devido a fatores ambientais, como insolação e pluviosidade, além do tipo de parede na qual o inseticida será aplicado (Passerat De Silans et al. 1998).

A avaliação da efetividade de coleiras Scalibor® promovida pelo Ministério da Saúde demarca um momento histórico no PNVC-LV, pois, se incorporada ao sistema, esta medida será a primeira voltada tanto para a prevenção da doença em cães, quanto para a prevenção da infecção humana. O perfil da intervenção é extremamente favorável para que, se efetiva, se torne a mais popular dentre todas as intervenções

de controle atualmente preconizadas. Entretanto, mesmo com a redução de casos caninos e humanos demonstrada nas áreas em que se utilizaram coleiras Scalibor®, a avaliação da população de *Lutzomyia longipalpis*, considerando principalmente a ocorrência, abundância e frequência desta espécie no ambiente domiciliar, é necessária para o entendimento de possíveis alterações comportamentais que explicariam a redução nos indicadores de infecção canina e doença humana, tendo em vista que o comportamento desses indicadores em ambiente urbano estariam refletindo as alterações no comportamento de *Lu. longipalpis* ao longo dos anos, demonstrando alto potencial de adaptabilidade desta espécie aos mais diversos ambientes.

Aceita-se, com uma maior clareza hoje, que as condições micro e macroambientais determinam principalmente a distribuição desta espécie nos locais de captura antropizados, representados pelas unidades domiciliares (intra e peridomicílio). No presente estudo, observou-se que, acompanhando a tendência para a redução de casos humanos e caninos, a população de vetores mostrou redução de maneira global atingindo magnitude estatisticamente significativa no peridomicílio de ambos os municípios estudados. Interessante apontar que em Fortaleza houve redução no número de exemplares capturados no intradomicílio enquanto que em Montes Claros, neste local, a população permaneceu inalterada. Inicialmente, esperaríamos que, quando protegido o cão, os flebotomíneos migrariam preferencialmente para o intradomicílio devido à necessidade de alimentação sanguínea, o que aumentaria o quantitativo de exemplares capturados nesse local. Entretanto, os nossos resultados trazem um cenário oposto. A possível explicação para este achado poderia estar centrada no potencial inseticida da coleira, que poderia ter se sobreposto ao seu potencial repelente. Da mesma forma, a seletividade da metodologia única de captura utilizada no estudo (armadilhas luminosas do tipo CDC) poderia ter influenciado esta avaliação. Já foi demonstrado o desequilíbrio de captura entre os sexos de flebotomíneos, bem como limitação na captura de fêmeas alimentadas relacionados ao uso desta armadilha (Aguiar 1985). A preferência alimentar por outras fontes disponíveis no domicílio, excetuando-se a humana, também poderia explicar esse achado. Portanto, a determinação da fonte alimentar dos flebotomíneos seria o campo prioritário para testar a hipótese de mudança do

hábito alimentar das populações expostas às coleiras impregnadas que sobrevivem ao efeito inseticida do dispositivo. No presente estudo, a extração de DNA de todos os flebotomíneos capturados permitirá em pesquisa futura testar essa hipótese.

O interesse pela identificação das fontes alimentares de *Lu. longipalpis* ao longo do tempo aumentou devido ao fortalecimento da sua participação na transmissão de LV (Deane & Deane 1962, Lainson & Rangel 2005, Brasil 2014). Quando é determinado o padrão de alimentação de uma espécie, entende-se melhor a sua biologia e os processos de interação interespecíficas. Assim, é fundamental a avaliação rotineira da interação dos vetores com os reservatórios naturais da doença, bem como com hospedeiros suscetíveis, para avaliação das possíveis alterações no perfil de transmissão da doença, principalmente em um cenário de utilização de uma intervenção que tem impacto direto na população de vetores. Considerando a importância da determinação da fonte alimentar, numa perspectiva futura, complementaremos os presentes achados com este dado.

Diversas metodologias, no âmbito imunológico e molecular, foram utilizadas e aperfeiçoadas para determinação de fontes alimentares de *Lu. longipalpis*. Algumas técnicas mais utilizadas compreendem métodos imunológicos, como teste de precipitação e o Elisa; e métodos moleculares, como PCR convencional e as suas mais diversas variações. Dentre os métodos imunológicos disponíveis, a técnica de precipitina foi primariamente empregada no âmbito da pesquisa e trouxe inúmeras contribuições aos estudos de determinação das fontes alimentares em flebotomíneos (Tesh et al. 1971, Da Rocha Nery et al. 2004, de C Dias-Sversutti et al. 2007). Embora a técnica de precipitina seja simples, rápida e apresente uma boa especificidade, investimentos foram feitos em novas tecnologias que apresentavam maior sensibilidade. Neste contexto, o Elisa passou a ser amplamente utilizado na definição do perfil alimentar dos flebotomíneos (Ngumbi et al. 1992, Quinnel et al. 1992, Comer et al. 1994, Yaghoobi-Ershadi et al. 1995, Oliveira-Pereira et al. 2008). Entretanto, ao longo dos anos, diversas dificuldades foram levantadas no uso desta técnica. A necessidade de produção de antissoros de alta qualidade para as diversas espécies de vertebrados encontrados nas áreas de captura de flebotomíneos e a dificuldade de produção de anticorpos específicos objetivando reduzir as reações cruzadas estão entre as principais dificuldades relatadas (Rurangirwa et al. 1986, Kent & Norris 2005).

Assim, métodos moleculares baseados na amplificação de DNA a partir da reação em cadeia da polimerase (PCR) surgiram como uma alternativa mais sensível e específica para o diagnóstico da fonte alimentar. Para tanto, são utilizadas regiões conservadas do genoma mitocondrial, como o citocromo B, citocromo c oxidase, genes de rRNA (12S, 16S e 18S). As técnicas utilizadas incluem reação em cadeia da polimerase convencional (PCR), PCR seguido de sequenciamento, polimorfismo do comprimento do fragmento de limitação (RFLP-PCR), PCR seguida de hibridação inversa de linha (RLB), PCR em tempo real dentre outras (Kent 2009, Bezerra-Vasconcelos et al. 2011, Afonso et al. 2012a, b).

A RT-PCR quando comparada as demais tem a vantagem de ser mais rápida e apresentar dados quantitativos monitorados em tempo real. Esta técnica tem sido amplamente empregada utilizando amostras de cães e seres humanos em estudos que examinam a carga de parasitos, interações hospedeiro-parasito, determinação de fonte alimentar e o monitoramento de terapia medicamentosa (Mary et al. 2004, Mortarino et al. 2004, Francino et al. 2006, de Carvalho et al. 2010, Peña et al. 2012, Pita-Pereira et al. 2012, Rosa et al. 2012, Ceccarelli et al. 2014, Hernández et al. 2014). Dentre as metodologias utilizadas na RT-PCR, a fusão de alta resolução (HRM) tornou-se um método de genotipagem sensível, com desempenho muito maior do que a análise clássica da curva de fusão do DNA (Wilhelm et al. 2003)

Uma vez incorporada a intervenção com coleiras impregnadas, no PNVC-LV, é fundamental o monitoramento continuado das populações de flebotomíneos, a partir de capturas sistematizadas nos locais de uso das coleiras. Como o impacto da intervenção é direcionado contra a população de flebotomíneos, deve-se entender melhor qual é a magnitude desse impacto para a definição dos melhores indicadores entomológicos que sejam correlatos ao efeito esperado de longo prazo. Embora, não existam relatos de resistência aos inseticidas em populações de *Lu. longipalpis*, estudo recente vem demonstrando alteração de suscetibilidade (Rocha 2016).

Outro ponto interessante abordado neste estudo foi a descrição de um padrão de coloração do tórax de 98,5% dos exemplares de *Lu. longipalpis* capturados. Considerando a complexidade na utilização de chaves taxonômicas pelos profissionais das equipes estaduais, principalmente devido à demora no processo de preparação e montagem das lâminas, a utilização do padrão de coloração do tórax

poderia otimizar o trabalho inicial de triagem. Essa otimização é fundamental, uma vez que as capturas podem resultar em um grande número de flebotomíneos a serem identificados. O achado de *Lu. longipalpis* em uma área tem o objetivo de relatar a primeira ocorrência bem como confirmar a autoctonia do caso humano ou canino. Nesse sentido, a visualização deste padrão de coloração poderia priorizar a montagem de exemplares que o possuíssem e assim, acelerar a identificação de *Lu. longipalpis* na área sob avaliação.

Do ponto de vista prático, os achados do presente estudo vêm complementar o conjunto de evidências sobre a efetividade de coleiras impregnadas com deltametrina para prevenir a transmissão de LV entre cães e possivelmente entre cães e humanos. Paralelamente os resultados sugerem que existem caminhos para facilitar o monitoramento entomológico quanto à detecção da presença de *Lu. longipalpis* por meio das características de pigmentação do tórax. Estas contribuições certamente serão úteis na formulação da política de controle da LV no Brasil e estabelecem um ponto de partida sólido para orientar futuras avaliações de novas intervenções contra a LV que sejam dirigidas ao controle vetorial.

7. Conclusões

A coleira impregnada com deltametrina a 4% demonstrou-se efetiva para o controle da população de *Lutzomyia longipalpis*, reduzindo-a significativamente numa magnitude entre 15 e 60%. Esta redução foi mais evidenciada no peridomicílio quando comparado ao intradomicílio. A taxa de infestação domiciliar e abundância relativa de *Lu. longipalpis* também foram menores nas áreas sob intervenção com coleiras impregnadas quando comparadas as áreas controle. Entretanto, recomenda-se a determinação das fontes alimentares dos exemplares capturados para o maior entendimento da dinâmica comportamental destes vetores nas áreas de uso da coleira impregnada com delatmetrina a 4%.

A pigmentação do tórax de *Lu. longipalpis* como característica de triagem para identificação inicial de flebotomíneos capturados em campo surge como uma possibilidade ao ser observada na maioria dos exemplares dessa espécie

distinguindo-os de exemplares do complexo *Ev. cortelezzii*/*Ev. sallesi*, entretanto, entende-se que para o fortalecimento da utilização deste caracter será necessário ampliar o estudo, com a avaliação das espécies *Lu. cruzi* e *Lu. gaminarai*, pertencentes ao mesmo complexo que o *Lu. longipalpis*.

8. Referências

- Afonso MMDS, Duarte R, Miranda JC, Caranha L, Rangel EF. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. *J. Trop. Med* 2012; 2012: 858657. doi: 10.1155/2012/858657.
- Aguiar GM, Vilela, ML, Schubach, PA, Soucasaux, T, Azevedo, ACR. Aspectos da ecologia dos flebotomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. IV. Frequencia mensal em armadilha luminosa (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1985; 80(4): 465–482.
- Aguiar, G. M.; Medeiros, W. M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil, 2003. Rangel, E. F.; Lainson, R. Inn: Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 2003. p. 207-255
- Alexander JB. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. *J. Med. Entomol.* 1987; 24: 552–558.
- Alexander B, Lopes de Carvalho R, McCallum H, Pereira MH. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8:1480–1485.
- Almeida PS de, Sciamarelli A, Mira Batista P, Dimas Ferreira A, Nascimento J, Raizer J, Andrade Filho JD, Gurgel-Gonçalves R. Predicting the geographic distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2013; 108: 992–996.
- Almeida PS De, Minzão ER, Minzão LD, Rosa S. Aspectos ecológicos de

- flebotomíneos (Diptera : Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul Ecological aspects of Phlebotomines (Diptera : Psychodidae) in the urban area of Ponta Porã municipa. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2010; 43(6): 723-727, 2010.
- Andrade-Coelho, C.; Souza, N.A.; Gouveia, C.; Silva, V.C.; Gonzalez, M.S.; Rangel, E.F. Effect of Fruit and Leaves of Meliaceae Plants (*Azadirachta indica* and *Melia azedarach*) on the Development of *Lutzomyia longipalpis* Larvae (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Under Experimental Conditions. *Journal of Medical Entomology* 2009; 46(5): 1125-1130, 2009.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Boer M Den, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Horst R Ter, López-Vélez R, Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008; 21: 334–359.
- Amóra SSA, Bevilaqua CML, Dias E de C, Feijó FMC, Oliveira PGM de, Peixoto GCX, Alves ND, Oliveira LMB de, Macedo ITF. Monitoring of *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 in an area of intense transmission of visceral leishmaniasis in Rio Grande do Norte, Northeast Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2010; 19: 39–43.
- Andrade-Filho JD, Scholte RGC, Amaral ALG, Shimabukuro PHF, Carvalho OS, Caldeira RL. Occurrence and probability maps of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *J. Med. Entomol.* 2017; 54: 1430–1434.
- Andrade ARO de, Silva BAK da, Cristaldo G, Andrade SMO de, Filho AC, Ribeiro A, Cunha Santos M da, Andreotti R. Spatial distribution and environmental factors associated to phlebotomine fauna in a border area of transmission of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Parasit. Vectors* 2014; 7: 260. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-260>
- Andrade AM, Queiroz LH, Nunes GR, Perri SHV, Nunes CM. Reposição de cães em área endêmica para leishmaniose visceral. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007; 40: 594–595.
- Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect. Dis.* 2008; 8: 191–199.

- Aoun K, Chouih E, Boufaden I, Mahmoud R, Bouratbine A, Bedoui K. Efficacy of Deltamethrine-impregnated collars Scalibor in the prevention of canine leishmaniasis in the area of Tunis. *Arch. Inst. Pasteur Tunis* 2008; 85: 63–68.
- Arruda MM de, Figueiredo FB, Marcelino AP, Barbosa JR, Werneck GL, Noronha EF, Sierra Romero GA. Sensitivity and specificity of parallel or serial serological testing for detection of canine Leishmania infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2016; 111: 168–173.
- Asfaram S, Fakhar M, Soosaraei M, Hosseini Teshnizi S, Mardani A, Banimostafavi ES, Ziaei Hezarjaribi H. Global status of visceral leishmanial infection among blood donors: A systematic review and meta-analysis. *Transfus Apher Sci.* 2017; 56(5): 748-754. doi: 10.1016/j.transci.2017.09.007.
- Ashford RW. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 2000; 30: 1269–1281.
- Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson WD. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 1986; 154: 1003–1011.
- Bandaranayake T, Shaw AC. Host Resistance and Immune Aging. *Clin. Geriatr. Med.* 2016; 32: 415–432.
- Bavia ME, Carneiro DD, Gurgel Hda C, Madureira Filho C, Barbosa MG. Remote Sensing and Geographic Information Systems and risk of American visceral leishmaniasis in Bahia, Brazil. *Parassitologia* 2005; 47: 165–169.
- Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simões TC, Nascimento BWL, Silva ES da, Struchiner CJ. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(4): e2182.
- Berrozpe P, Lamattina D, Santini MS, Araujo AV, Utgés ME, Salomón OD. Environmental suitability for *Lutzomyia longipalpis* in a subtropical city with a recently established visceral leishmaniasis transmission cycle, Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2017; 112: 674–680.
- Bevilacqua PD, Alves WA. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia

- de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad. Saude Publica* 2004; 20: 259–265.
- Bevilacqua PD, Paixao HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanization of visceral leishmaniose in Belo Horizonte, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. E Zootec.* 2001; 53: 1–8.
- Bezerra-Vaconcelos DR, Melo LM, Albuquerque ES, Luciano MCS, Bevilacqua CML. Real-time PCR to assess the Leishmania load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: Screening of target genes and assessment of quantitative methods. *Exp. Parasitol.* 2011; 129: 234-239.
- Bhattacharya P, Ali N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2013; 46: 128–134.
- Boeke SJ, Boersma MG, Alink GM, Loon JJA Van, Huis A Van, Dicke M, Rietjens IMCM. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. *J. Ethnopharmacol.* 2004; 94: 25–41.
- Borges DA, Molina SMG, Pinto MC, Galati EAB, Cesario M, Ortiz DGS. First record of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) on the trinational frontier (Brazil-Peru-Bolivia) of South-Western Amazonia. *J. Med. Entomol.* 2017; 54: 1425–1429.
- Bourdoiseau G, Bonnefont C, Magnol JP, Saint-André I, Chabanne L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1997; 56: 345–351.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014. 120p.: il. Color – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- Brasil. Ministério da Saúde. Validação dos kits de diagnóstico da leishmaniose visceral canina - Relatório Técnico, 2011.
- Brasil. Ministério da Saúde.

<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>.

Acessado em 22 de novembro de 2017.

Brazil RP, Almeida DC De, Brazil BG, Mamede SM. Chicken house as a resting site of sandflies in Rio de Janeiro, Brazil. *Parassitologia* 1991; 33 Suppl: 113–117.

Brazil, R. P.; Brazil, B. G. Biologia de flebotomíneos neotropicais. Rangel, E., Lainson, R. Inn: Flebotomíneos do Brasil, editora Fiocruz, pp. 257-274, 2003.

Brazuna JCM (2012). Estudos sobre leishmaniose visceral humana e canina no município de Campo Grande, MS, Brasil. Tese de Doutorado, 118 pp. Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Brianti E, Gaglio G, Napoli E, Falsone L, Prudente C, Solari Basano F, Latrofa MS, Tarallo VD, Dantas-Torres F, Capelli G, Stanneck D, Giannetto S, Otranto D. Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%)/flumethrin (4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniosis. *Parasites and Vectors* 2014; 7: 1–10.

Brianti E, Napoli E, Gaglio G, Falsone L, Giannetto S, Solari Basano F, Nazzari R, Latrofa MS, Annoscia G, Tarallo VD, Stanneck D, Dantas-Torres F, Otranto D. Field Evaluation of Two Different Treatment Approaches and Their Ability to Control Fleas and Prevent Canine Leishmaniosis in a Highly Endemic Area. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10: 1–13.

Buescher M, Rutledge L, Roberts J, Nelson J. Observation on multiple feeding by *Lutzomyia longipalpis* in the laboratory (Diptera: Psychodidae). *Mosq. News* 1984; 44: 26–77.

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

Campos AM, Santos CLC Dos, Stumpp R, Silva LHD Da, Maia RA, Paglia AP, Andrade Filho JD. Photoperiod Differences in Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Species Richness and Abundance in Caves in Minas Gerais State, Brazil. *J. Med. Entomol.* 2017; 54: 100–105.

- Carranza-Tamayo CO, Werneck GL, Romero GA. Are opossums a relevant factor associated with asymptomatic *Leishmania* infection in the outskirts of the largest Brazilian cities? *Braz J Infect Dis.* 2016 20(2): 119-26. doi: 10.1016/j.bjid.2015.11.013.
- Cardenas R, Sandoval CM, Rodríguez-Morales AJ, Franco-Paredes C. Impact of climate variability in the occurrence of leishmaniasis in Northeastern Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 75: 273–277.
- Cardim MFM, Rodas LAC, Dibo MR, Guirado MM, Oliveira AM, Chiaravalloti-Neto F. Introduction and expansion of human American visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil, 1999-2011. *Rev. Saude Publica* 2013; 47(4): 691-700.
- Carvalho MR de, Valença HF, Silva FJ da, Pita-Pereira D de, Araújo Pereira T de, Britto C, Brazil RP, Filho SPB. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Trop.* 2010; 116: 108–110.
- Carvalho GM de L, Brazil RP, Ramos MC das NF, Serra e Meira PCL, Zenóbio APL de A, Botelho HA, Sanguinette C de C, Saraiva L, Andrade Filho JD 2013. Ecological Aspects of Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae) from a Cave of the Speleological Province of Bambuí, Brazil. *PLoS One* 8(10): e77158. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077158>
- Casanova C, Andrighetti MTM, Sampaio SMP, Marcoris MLG, Colla-Jacques FE, Prado ÂP. Larval Breeding Sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Visceral Leishmaniasis Endemic Urban Areas in Southeastern Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(9): e2443.
- Castro IP de, Sousa MVC de, Magalhães GM, Mundim AV, Noleto PG, Paula MBC de, Pajuaba Neto A de A, Medeiros AA. Perfil hepático e protéico em cães com leishmaniose visceral. *Biosci. J.* 2012; 28: 799–804.
- Cavalcante ÍJM, Vale MR. Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Ceará in the period 2007 to 2011. *Rev. Bras. Epidemiol.* 2014; 17: 911–924.

- C Dias-Sversutti A de, L Scobro RB de, Reinhold-Castro KR, Neitzke HC, Teodoro U. Preliminary study on feeding preference of *Nyssomyia neivai* (Pinto) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) in a rural área of the State of Paraná, South Brazil. *Neotrop. Entomol.* 2007; 36: 953-959.
- Ceccarelli M, Galluzi L, Migliazzo A, Magnani M. Detection and characterization of Leishmania (Leishmania) and Leishmania (Viannia) by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. *Plos One.* 2014; 9(2): e88845.
- Chagas E, Cunha AM, Ferreira LC, Deane L, Deane G, Guimarães FN, Paumgarten MJ, Sá B. Leishmaniose visceral americana (Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão Encarregada do Estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,* 1938; 33: 89-229.
- Chagas AC, Medeiros JF, Cássia S, Justiniano B, Arley F, Pessoa C. Haematophagic behavior in laboratory of *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae) in relation to three mammalian blood sources in Manaus, Brazil em relação a três fontes sanguíneas de mamíferos em laboratório, Manaus, 2007; 37: 127–132.
- Clements A (1992). *The biology of mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction.* 532 pp.
- Comer JÁ, Irby WS, Kavanaugh DM. Hosts of *Lutzomyia-Shannoni* (Diptera, Psychodidae) in relation to vesicular stomatitis-virus on Ossabaw Island, Georgia, USA. *Med Vet. Entomol.* 1994; 8: 325-330.
- Costa JML, Viana GMC, Saldanha ACR, Nascimento MDSB, Alvim AC, Burattini MN, Silva AR da. Leishmaniose visceral no estado do Maranhão, Brasil: a evolução de uma epidemia. *Cad. Saude Publica* 1995; 11: 321–324.
- Costa CHN, Tapety CMM, Werneck GL. Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007; 40: 415–419.
- Costa DNCC, Codeço CT, Silva MA, Werneck GL. Culling Dogs in Scenarios of Imperfect Control: Realistic Impact on the Prevalence of Canine Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(8): e2355.

- Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Leal GGDA, Moreira NDD, Oliveira LAM, Machado EMDM, Morais MHF, Corrêa-Oliveira R, Carneiro M, Reis AB. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. *PLoS One* 2014; 9: 1–6.
- Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Dye C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: The crab-eating fox is not important for transmission. *Parasitology* 2002; 125: 407–414.
- Cutolo AA, Teodoro AKM, Ovallos FG, Allegretti SM, Galati EAB. Sandflies (Diptera: Psychodidae) associated with opossum nests at urban sites in southeastern Brazil: A risk factor for urban and periurban zoonotic *Leishmania* transmission? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2014; 109: 391–393.
- Dantas-torres F, Capelli G, Giannelli A, Antonio R, Ramos N, Lia RP, Cantacessi C, Caprariis D De, Tommasi AS De, Latrofa MS, Lacasella V, Tarallo VD, Paola G Di, Qurollo B, Breitschwerdt E, Stanneck D, Otranto D. Efficacy of an imidacloprid / flumethrin collar against fleas , ticks and tick-borne pathogens in dogs. *Parasit. Vectors* 2013; 6: 245.
- David JR, Stamm LM, Bezerra HS, Souza RN, Killick-Kendrick R, Lima JWO. Deltamethrin-impregnated Dog Collars Have a Potent Anti-feeding and Insecticidal Effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2001; 96: 839–847.
- Deane LM, Deane MP. Isolation of leishmaniasis in the viscera and the skin of a fox in the kala-azar endemic zone in Sobral, Ceará. *Hospital (Rio J)* 1954; 45(4): 419-421.
- Deane LM (1956). Leishmaniose visceral no Brasil. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária, 162pp.
- Deane LM, Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 1962; 4: 198–pp.
- De Carvalho IPSF, Peixoto HM, Romero GAS, de Oliveira MRF. Cost of visceral leishmaniasis care in Brazil. *Trop Med Int Health*. 2017; 22(12): 1579-1589.doi:

10.1111/tmi.12994.

- Dias ES, Michalsky ÉM, do Nascimento JC, Ferreira Ede C, Lopes JV, Fortes-Dias CL. Detection of *Leishmania infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis, in *Lutzomyia neivai*, a putative vector of cutaneous leishmaniasis. *J Vector Ecol.* 2013; 38(1): 193-6. doi: 10.1111/j.1948-7134.2013.12028.x.
- Dilermando J, Filho A, Galati EAB, Falcão AL. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva) and *Nyssomyia neivai* (Pinto). *Rev. Bras. Entomol.* 2006; 50: 385–393.
- Doha S, Shehata MG, Elsaid S, Elsayaf B. Dispersal of *Phlebotomus-papatasi* (*Scopoli*) and *Phlebotomus-Langerona Nitzulescu* in El-Hammam, Matrouh governorate, Egypt. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 1991; 66: 69–76.
- Donato L. (2014). Influência de fatores socioeconômicos, demográficos e de saúde sobre a letalidade da leishmaniose visceral no Brasil. *Pós Grad. em Med. Trop. Fac. Med. Univ. Bras.*: 60.
- Dos Santos Marques LH, DA Rocha IC, Reis IA, DA Cunha GM, Oliveira E, Pfeilsticker TR, DE Araújo VE, Morais MH, Rabello A, Carneiro M. *Leishmania infantum*: illness, transmission profile and risk factors for asymptomatic infection in an endemic metropolis in Brazil. *Parasitology.* 2017; 144(4): 546-556. doi: 10.1017/S0031182016002134.
- Dougherty M, Hamilton G. Dodecanoic acid is the oviposition pheromone of *Lutzomyia longipalpis*. *J. Chem. Ecol.* 1997; 23: 2657–2671.
- Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; 55: 125–130.
- ELmojtaba IM, Mugisha JYT, Hashim MHA. Mathematical analysis of the dynamics of visceral leishmaniasis in the Sudan. *Appl. Math. Comput.* 2010; 217: 2567–2578.
- Elnaiem D-EA, Ward RD. Oviposition attractants and stimulants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 1992; 29: 5–12.
- Falcão de Oliveira E, Oshiro ET, Fernandes WS, Murat PG, Medeiros MJ de, Souza AI, Oliveira AG de, Galati EAB. Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(2): e5401.

- Faria AR, Andrade HM de. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Rev. Pan-Amazônica Saúde* 2012; 3: 47–57.
- Fernandes CB, Junior JTM, Jesus C De, Silva Souza BMP Da, Lorangeira DF, Fraga DBM, Tavares Veras PS, Barrouin-Melo SM. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. *Vaccine* 2004; 32: 1287–1295.
- Fernández MS, Salomón OD, Cavia R, Perez AA, Acardi SA, Guccione JD. *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with environmental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. *Acta Trop.* 2010; 114: 81–87.
- Fernandes AR da F, Pimenta CLRM, Vidal IF, Oliveira GC, Sartori RS, Araújo RB, Melo MA, Langoni H, Azevedo SS. Risk factors associated with seropositivity for *Leishmania spp.* and *Trypanosoma cruzi* in dogs in the state of Paraíba, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 2016; 25: 90–98.
- Ferreira GR, Castelo Branco Ribeiro JC, Meneses Filho A, de Jesus Cardoso Farias Pereira T, Parente DM, Pereira HF, Carlos da Silva J, Zacarias DA, Vieira da Silva L, Medeiros Faustino SK, Almeida Neto WS, Costa DL, Lopes de Mendonça I, Nery Costa CH. Human Competence to Transmit *Leishmania infantum* to *Lutzomyia longipalpis* and the Influence of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2018; 98(1):126-133. doi: 10.4269/ajtmh.16-0883.
- Ferroglio E, Poggi M, Trisciuglio A. Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. *Zoonoses Public Health* 2008; 55: 145–148.
- Figueiredo ABF, Werneck GL, Cruz M do SP e, Silva JP da, Almeida AS de. Uso e cobertura do solo e prevalência de leishmaniose visceral canina em Teresina, Piauí, Brasil: uma abordagem utilizando sensoriamento remoto orbital. *Cad. Saude Publica* 2017; 33: 1–13.
- Foglia Manzillo V, Oliva G, Pagano A, Manna L, Maroli M, Gradoni L. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the

- protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Vet. Parasitol.* 2006; 142: 142–145.
- Forattini OP (1973). *Entomologia Médica. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose.* São Paulo: Edgard Blücher Ltda. 658 pp.
- Francino O, Altet L, Sánchez A, Roura X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 2006; 137: 214-221.
- Galardo AKR, Galardo CD, Santana AA, Mendes JCC, Souza FRA de, Duarte JP, Saraiva JF, Pinna LCL, Carvalho RW, Sales de Andrade Correa AP, Silva Ferreira Lima AC da. Primeira ocorrência de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Estado do Amapá, Brasil. *Biota Amaz.* 2013; 3(2): 179-183.
- Galati EAB, Nunes VLB, Rego Jr. F de A, Oshiro ET, Rodrigues Chang M. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Saude Publica* 1997; 31: 378–390.
- Galati, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. 2003. Rangel, E. F.; Lainson, R. Inn: Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 2003. p. 23-175
- Galvis-Ovallos F, Casanova C, Sevá A da P, Galati EAB. Ecological parameters of the (S)-9-methylgermacrene-B population of the *Lutzomyia longipalpis* complex in a visceral leishmaniasis area in São Paulo state, Brazil. *Parasites and Vectors* 2017a; 10: 1–9.
- Galvis-Ovallos F, Silva MD da, Bispo GB da S, Oliveira AG de, Neto JRG, Malafrente R dos S, Galati EAB. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. *Parasite* 2017b; 24(2). DOI: [10.1051/parasite/2017002](https://doi.org/10.1051/parasite/2017002)
- Garcia ES, Azambuja P. Lignoids in insects: Chemical probes for the study of ecdysis, excretion and *Trypanosoma cruzi* - Triatomine interactions. *Toxicon* 2004; 44: 431–440.
- Gidwani K, Picado A, Rijal S, Singh SP, Roy L, Volfova V, Andersen EW, Uranw S, Ostyn B, Sudarshan M, Chakravarty J, Volf P, Sundar S, Boelaert M, Rogers ME.

- Serological markers of sand fly exposure to evaluate insecticidal nets against visceral leishmaniasis in India and Nepal: A cluster-randomized trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011; 5(9): e1296.
- Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB. Relationship between Canine Visceral Leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* Burden in Dermal Inflammatory Foci. *J. Comp. Pathol.* 2006; 135: 100–107.
- Goenka A, Kollmann TR. Development of immunity in early life. *J. Infect.* 2015; 71: S112–S120.
- Gomes ADC. Vigilância Entomológica. *Iesus* 2002; 11: 79–90.
- Gontijo, CMF; Melo M. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.* 2004; 7: 338–349.
- González C, Wang O, Strutz SE, González-Salazar C, Sánchez-Cordero V, Sarkar S. Climate change and risk of leishmaniasis in North America: Predictions from ecological niche models of vector and reservoir species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4(1): e585.
- Goyena E, Pérez-Cutillas P, Chitimia L, Risueño J, García-Martínez JD, Bernal LJ, Berriatua E. A cross-sectional study of the impact of regular use of insecticides in dogs on Canine Leishmaniasis seroprevalence in southeast Spain. *Prev. Vet. Med.* 2016; 124: 78–84.
- Gradoni L. Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. *Vet. Parasitol.* 2015; 208: 94–100.
- Griensven J Van, Carrillo E, López-Vélez R, Lynen L, Moreno J. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 20: 286–299.
- Grimaldi G, Teva A, Ferreira AL, Santos CB dos, Pinto I de S, de-Azevedo CT, Falqueto A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP@CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2012; 106: 54–59.
- Guimarães CMS. Exames De Laboratório: Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1985; 18: 117–120.

- Guimarães VCFV, Costa PL, Silva FJ, Silva KT, Silva KG, Araújo AI, et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Férrer, a sympatric area to cutaneous and visceral leishmaniasis in Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012; 45: 66–70.
- Guimarães VCFV, Pruzinova K, Sadlova J, Volfova V, Myskova J, Filho SPB, Volf P. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. *Parasites and Vectors* 2016; 9(159). DOI 10.1186/s13071-016-1444-2
- Gunay F, Karakus M, Oguz G, Dogan M, Karakaya Y, Ergan G, Kaynas S, Kasap OE, Ozbel Y, Alten B. Evaluation of the efficacy of Olyset® Plus in a village-based cohort study in the Cukurova Plain, Turkey, in an area of hyperendemic cutaneous leishmaniasis. *J. Vector Ecol.* 2014; 39: 395–405.
- Hamilton JGC. Sandfly pheromones: Their biology and potential for use in control programs. *Parasite* 2008; 15: 252–256.
- Hernández C, Alvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez JD. Identification of six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasitol. Vector* 2014; 7: 501. doi: 10.1186/s13071-014-0501-y.
- Hommel M. Visceral leishmaniasis: Biology of the parasite. *J. Infect.* 1999; 39: 101–111.
- Hughes S, Kelly P. Interactions of malnutrition and immune impairment, with specific reference to immunity against parasites. *Parasite Immunol.* 2006; 28: 577–588.
- Isabel S, Branco M (2011). Universidade Nova de Lisboa Instituto de Higiene e Medicina Tropical Estudo dos flebótomos (Diptera, Phlebotominae), vectores de *Leishmania* sp. no Concelho de Torres Novas, Portugal Orientador – Professora Doutora Maria Odete Afonso Co-orientador – P.
- Jain K, Jain NK. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. *J. Immunol. Methods* 2015; 422: 1–12.
- Jones TM, Quinnell RJ. Testing predictions for the evolution of lekking in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Anim. Behav.* 2002; 63: 605–612.
- Kamhawi S, Abdel-Hafez SK, Molyneux DH. The behaviour and dispersal of sandflies

- in Ras el Naqb, south Jordan with particular emphasis on *Phlebotomus kazeruni*. *Parassitologia* 1991; 33 Suppl: 307–314.
- Kent RJ, Norris DE. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005; 73: 336-342.
- Kent RJ. Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. *Mol. Ecol. Resour.* 2009; 9: 4-18.
- Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.* 1997; 11: 105–111.
- Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.* 1990; 4: 1–24.
- Lainson R, Ward RD, Shaw JJ. Experimental transmission of leishmania chagasi, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature* 1977; 266: 628–630.
- Lainson R; Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR, Ryan L, Povoá MM, Ishikawa E AY. A Leishmania e as leishmanioses. Instituto Evandro Chagas: 50 anos de Contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical. Serviços de Saúde Pública, Belém, Pará, 1986; 1: 83-124.
- Lainson R, Dye C, Shaw JJ, Macdonald DW, Courtenay O, Souza AA, Silveira FT. Amazonian visceral leishmaniasis--distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1990; 85: 135–137.
- Lainson R, Rangel BF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2005; 100: 811–827.
- Lehane MJ. Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol.* 1997; 42: 525–550.
- Leite de Sousa-Gomes M, Romero GAS, Werneck GL. Visceral leishmaniasis and

- HIV/AIDS in Brazil: Are we aware enough? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11: 1–13.
- Lopes EGP, Magalhães DF, Silva JA, Haddad JPA, Moreira EC. Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte-MG, 1993 a 2007. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 2010; 62: 1062–1071.
- Maciel M V., Morais SM, Bevilaqua CML, Silva RA, Barros RS, Sousa RN, Sousa LC, Brito ES, Souza-Neto MA. Chemical composition of Eucalyptus spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. *Vet. Parasitol.* 2010a; 167: 1–7.
- Maciel M V., Morais SM, Bevilaqua CML, Silva RA, Barros RS, Sousa RN, Sousa LC, Machado LKA, Brito ES, Souza-Neto MA. Atividade inseticida in vitro do óleo de sementes de nim sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2010b; 19: 7–11.
- Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasitol.* 2008; 158: 274–287.
- Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet. J.* 2009; 179: 142–144.
- Mansueto P, Vitale G, Seidita A, Guarneri FP, Pepe I, Rinollo C, Rosa S Di, Rini G, Cillari E, Fede G Di. Advances in leishmaniasis immunopathogenesis. *Acta Medica Mediterr.* 2011; 27: 7–16.
- Mary C, Paraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42: 5249–5255.
- Martins AV, Williams P, Falcão AL. (1978). American sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. 195 pp.
- Mateo M, Maynard L, Vischer C, Bianciardi P, Miró G. Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. *Parasitol. Res.* 2009; 105: 155–162.
- Mazloumi Gavgani AS, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian

- children: A matched-cluster randomised trial. *Lancet* 2002; 360: 374–379.
- Mejía Á, Matamoros G, Fontecha G, Sosa-Ochoa W. Bionomic aspects of *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis*, proven vectors of *Leishmania infantum* in an endemic area of non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras. *Parasit. Vectors* 2018; 11(1): 15. doi: 10.1186/s13071-017-2605-7
- Mendes W da S, Silva AAM da, Trovao J de R, Silva AR da, Costa JML. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis, Maranhão, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2002; 35: 227–231.
- Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, França-Silva JC, Rocha MF, Barata RA, Dias ES. Association of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) population density with climate variables in Montes Claros, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2009; 104: 1191–1193.
- Milleron RS, Meneses CR, Elnaiem DA, Lanzaro GC. Effects of Varying Moisture on Egg Production and Longevity of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 2008; 45: 160–165.
- Missawa NA, Dias ES. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Várzea Grande: An area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2007; 102: 913–918.
- Molina R, Lohse JM, Nieto J. Evaluation of a topical solution containing 65% permethrin against the sandfly (*Phlebotomus perniciosus*) in dogs. *Vet. Ther.* 2001; 2: 261–267.
- Mortarino M, Franceschi A, Mancianti F, Bazzocchi C, Genchi C, Bandi C. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. *Parassitologia.* 2004; 46:163-167.
- Monteiro DC, Sousa AQ, Lima DM, Fontes RM, Praciano CC, Frutuoso MS, Matos LC, Teixeira MJ, Pearson RD, Pompeu MM. *Leishmania infantum* Infection in Blood Donors, Northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22(4): 739-40. doi: 10.3201/eid2204.150065.
- Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD, Barazarte R, Travi BL, Lane RP. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for

- transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Trop.* 2003; 85: 19–29.
- Morais MHF, Fiuza V de OP, Araújo VEM de, Menezes FC de, Carneiro M. Avaliação das atividades de controle da leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006-2011. *Epidemiol. e Serviços Saúde* 2015; 24: 485–496.
- Morais AN, Sousa MG, Meireles LR, Kesper N, Umezawa ES. Canine visceral leishmaniasis and Chagas disease among dogs in Araguaína, Tocantins. *Leishmaniose visceral canina e doença de Chagas em cães de Araguaína, Tocantins. Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal* 2013; 22: 225–229.
- Moroni G, Bossi L. Interesting Case Nephrology Dialysis Transplantation Don ' t forget visceral leishmaniasis in transplant patients. 1995; 10: 563–564.
- Morrison AC, Ferro C, Morales A, Tesh RB, Wilson ML. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J Med Entomol* 1993; 30: 427–435.
- Morton IE, Ward RD. Laboratory response of female *Lutzomyia longipalpis* sandflies to a host and male pheromone source over distance. *Med. Vet. Entomol.* 1989; 3: 219–223.
- Ngumbi PM, Lawyer PG, Johnson RN, Kiilu G, Asiago C. Identification of phlebotomine sandfly bloodmeals from Baringo district, Kenya, by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Med. Vet. Entomol.* 1992; 6:385-388.
- Oliveira CD, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cad. Saúde Pública* 2001; 17: 1231–1239.
- Oliveira AG, Galati EAB, Fernandes CE, Dorval MEC, Brazil RP. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in endemic area of visceral leishmaniasis, Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Trop.* 2008; 105: 55–61.
- Oliveira-Pereira YN, Moraes JLP, Lorosa ES, Rebêlo JMM. Preferência alimentar sanguínea de flebotomíneos da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Cad. Saude Publica* 2008; 24: 2183–2186.
- OPS/OMS OP de la S (2016). Leishmaniasis Informe Epidemiológico de las Américas.

Inf. Leishmaniasis 4: 3–7.

Palatnik-de-Sousa CB. Vaccines for canine leishmaniasis. *Front. Immunol.* 2012; 3: 1–15.

Passerat De Silans LNM, Dedet JP, Arias JR. Field Monitoring of Cypermethrin Residual Effect on the Mortality Rates of the Phlebotomine Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* in the State of Paraíba, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1998; 93: 339–344.

Paternina LE, Verbel-Vergara D, Romero-Ricardo L, Pérez-Doria A, Paternina-Gómez M, Martínez L, Bejarano EE. Evidence for anthropophily in five species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from northern Colombia, revealed by molecular identification of bloodmeals. *Acta Trop.* 2016, 156: 86-92.

Peña VH, Fernández GJ, Gómez-Palacio AM, Mejía-Jaramillo AM, Canillo O, Triana-Chávez O. High-resolution melting (HRM) of the cytochrome B gene: a powerful approach to identify blood-meal sources in Chagas disease vectors. *Plos Negl. Trop. Dis.* 2012; 6: e1530.

Peixoto HM, Oliveira MRF de, Romero GAS. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. *Trop. Med. Int. Heal.* 2015; 20: 334–352.

Pereira T, Britto C, et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (Franca, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Trop.* 2010;116: 108–10. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.03.009.

Peterson AT, Campbell LP, Moo-Llanes DA, Travi B, González C, Ferro MC, Ferreira GEM, Brandão-Filho SP, Cupolillo E, Ramsey J, Leffer AMC, Pech-May A, Shaw JJ. Influences of climate change on the potential distribution of *Lutzomyia longipalpis sensu lato* (Psychodidae: Phlebotominae). *Int. J. Parasitol.* 2017; 47: 667–674.

Pimenta PFP, Saraiva EM, Rowton E, Modi GB, Garaway, LA, Beverley SM, Turco, S, Sacks, DL. The vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface

- lipophosphoglycan. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994; 91: 9155-9159.
- Pimenta PFP, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* 1997; 115: 359–369.
- Pimenta PFP; Secundino NFC; Blancom EEN (2003). Interação *Leishmania* hospedeiro invertebrado. In: Flebotomíneos do Brasil, editora Fiocruz, 367pp.
- Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, Real G Del, Ruitenberg J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 1994; 62: 229–235.
- Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, ima RB, Pereira BA, Moreira OC, Brazil RP, Britto C. SYBR Green-based RealPCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agentes of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniases. *Parasit. Vector.* 2012; 5:15. doi: 10.1186/1756-3305-5-15.
- Porrozzi R, Santos Da Costa M V., Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, Santos CD Dos, Fernandes AP, Gazzinelli RT, Campos-Neto A, Grimaldi G. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007; 14: 544–548.
- Queiroz MFM, Varjão JR, Moraes SC de, Salcedo GE. Analysis of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Barra do Garças, State of Mato Grosso, Brazil, and the influence of environmental variables on the vector density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2012; 45: 313–317.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C. The epidemiology of canine leishmaniasis: Transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology* 1997; 115: 143–156.
- Quinnell RJ, Dye C, Shaw JJ. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. *Med. Vet. Entomol.* 1992; 6: 195-200.

- Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad. Saude Publica* 2008; 24: 2948–2952.
- Ready P (1979). Factors affecting egg production of laboratory-bred. *J. Med. Entomol.* 16: 413–423.
- Ready PD. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annu. Rev. Entomol.* 2013; 58: 227-50.
- Reithinger R, Coleman PG, Alexander B, Vieira EP, Assis G, Davies CR. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *Int. J. Parasitol.* 2004; 34: 55–62.
- Reithinger R, Teodoro U, Davies CR. Topical insecticide treatments to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis. *Emerg. Infect. Dis.* 2001; 7: 872–876.
- Ribeiro ALM, Missawa NA, Zeilhofer P. Distribution of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of medical importance in Mato Grosso State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 2007; 49: 317–321.
- Rirangirwa FR, Minja SH, Musoke AJ, Nantulya VM, Grootenhuis J, Moloo SK. Production and evaluation of specific antisera against sera of various vertebrate species for identification of bloodmeals of *Glossina morsitans centralis*. *Acta Trop.* 1986; 43: 379-389.
- Rocha DA (2016). Caracterização da suscetibilidade de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) ao inseticida alfacipermetrina. Dissertação de mestrado em Medicina Tropical - UNB. 126pp.
- Rocha Nery LC Da, Lorosa ES, Ramos Franco AM. Feeding preference of the sand flies *Lutzomyia umbratilis* and *L. spathotrichia* (Diptera:Psychodidae, Phlebotominae) in an urban forest patch in the City of Manaus, Amazonas, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2004; 99: 571-574.
- Romero GAS. O controle de leishmaniose visceral no Brasil: transformar é preciso. *Cad. Saúde Pública* 2016; 32: 1–3.

- Romero GAS, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 19;4(1): e584
- Rosa J, Pereira DP, Brazil RP, Filho JDA, Salomón O, Szelag E. Natural infection of cortezzi complex (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) with *Leishmania braziliensis* in Chaco, Argentina. *Acta Trop.* 2012; 123: 128-131.
- Saharia KK, Koup RA. NIH Public Access. *Cell* 2013; 155: 265–275.
- Salomón OD, Ramos LK, Quintana MG, Acardi AS, Santini MS, Schneider A. Distribution of vectors of visceral leishmaniasis in the Providence of Corrientes, 2008. *Medicina (B. Aires).* 2009; 69: 625-630.
- Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MMDS, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2015; 110: 831–846.
- Sampaio DQMJA, Cavalcanti NV, Alves JGB, Filho MJCF, Correia JB. Risk factors for death in children with visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4(11): e877.
- Santini MS, Fernández MS, Cavia R, Salomón OD. Co-occurrence and seasonal and environmental distributions of the sandflies *Lutzomyia longipalpis* and *Nyssomyia whitmani* in the city of Puerto Iguazú, northeastern Argentina. *Med. Vet. Entomol.* 2017; : 1–9. doi: 10.1111/mve.12283.
- Santos S, Arias J, Ribeiro A, Hoffmann M, Freitas R, Malacco M. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.* 1998; 12: 315–317.
- Santos AA, Junior MS, Kaneto CN, Camargo CVO, Bisugo MC, Araújo M de FL, Taniguchi HH, Acunha E, Santos AA, Junior MS, Kaneto CN, Camargo CVO, Polizel MA, Vigilato MAN, Negreiros CMS, Okagima M, Gonçalves NM, Lundstedt LP, Andrade AM, Lima VMF, Tolezano JE. Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização de teste rápido com antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas do estado de São Paulo. Assessment of canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of a rapid test using reco. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 2007; 66: 185–193.

- Santos DR dos, Ferreira AC, Bisetto Junior A. The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Paraná, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2012; 45: 643–645.
- Santos Silva J Dos, Caranha L, Moura Santos FK, Santos AP Dos, Rodrigues Da Silva LO, Ferreira Rangel E. Sand fly (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) abundance and diversity in areas affected by the São Francisco River transposition project in Ceará State, Brazil. *Parasites and Vectors* 2017; 10: 1–13.
- Saraiva L, Silva Reis A, Marteleto Nunes Rugani J, Sampaio Pereira AA, Rêgo FD, Vianna Mariano da Rocha Lima AC, Gontijo CMF, Andrade Filho JD. Survey of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in an Environmentally Protected Area in Brazil. *PLoS One* 2015; 10: e0134845.
- Sena JM De (2011). Vigilância entomológica do Programa de Leishmaniose Visceral: limites e possibilidade para o monitoramento das ações. Dissertação de Mestrado - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. 159pp.
- Senthil Nathan S, Choi MY, Paik CH, Seo HY, Kim JD, Kang SM. The toxic effects of neem extract and azadirachtin on the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (BPH) (Homoptera: Delphacidae). *Chemosphere* 2007; 67: 80–88.
- Sevá AP, Ovallos FG, Amaku M, Carrillo E, Moreno J, Galati EAB, Lopes EG, Soares RM, Ferreira F. Correction: Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLoS One* 2016; 11: e0162854.
- Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian J. Exp. Biol.* 2009; 47: 412–423.
- Shaw J. The leishmaniasis - Survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2007; 102: 541–546.
- Shaw, J, Rosa, AT, Souza, A, Cruz AC. Os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In: Rangel EF & Lainson R (Orgs). *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. 337-351.
- Shimabukuro PHF, Andrade AJ De, Galati EAB. Checklist of American sand flies (Diptera, psychodidae, phlebotominae): Genera, species, and their distribution.

Zookeys 2017: 67–106.

Shimabukuro PHF, Tolezano JE, Galati EAB et al. Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil. *Pap. Avulsos Zool.* 2011; 51: 399–441.

Silva EA, Andreotti R, Honer MR. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007; 40: 420–425.

Silva Tenório M da, Oliveira e Sousa L de, Paixão M dos S, Alves MF, Cássia Paulan S de, Lima FL, Jusi MMG, Tasca KI, Machado RZ, Starke-Buzetti WA. Visceral Leishmaniasis in a Captive Crab-Eating Fox *Cerdocyon thous*. *J. Zoo Wildl. Med.* 2011; 42: 608–616.

Silva AA Da, Pacheco-Silva A, Castro Cintra Sesso R De, Esmeraldo RM, Oliveira CMC De, Fernandes PFCBC, Oliveira RA, Silva LS V, Carvalho VP, Nery Costa CH. The risk factors for and effects of visceral leishmaniasis in graft and renal transplant recipients. *Transplantation* 2013; 95: 721–727.

Silva RA, Santos FKM, Sousa LC, Rangel EF, Bevilaqua CML. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei* in an endemic area for visceral leishmaniasis. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 2014a; 2961: 320–327.

Silva JM, Zacarias DA, Figueirêdo LC De, Soares MRA, Ishikawa EAY, Costa DL, Costa CHN. Bone marrow parasite burden among patients with new world kala-azar is associated with disease severity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014b; 90: 621–626.

Silva SR da (2015). Avaliação da infecciosidade em cães vacinados com Leish-Tec® (Hertape Saúde Animal S/A) para *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. 85pp.

Soares BR, Souza APA, Prates DB, Oliveira CI de, Barral-Netto M, Miranda JC, Barral A. Seroconversion of sentinel chickens as a biomarker for monitoring exposure to visceral leishmaniasis. *Sci. Rep.* 2013; 3: 2352.

Souza NA, Brazil RP, Araki AS. The current status of the *Lutzomyia longipalpis*

- (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species complex. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2017; 112: 161–174.
- Sudia W, Chamberlain R. This Week's Citation Classic.: 1989.
- Teodoro U, La V, Filho S, Lima EM De, Spinosa RP, Barbosa OC, Eugênia M, Costa M, Campana MV. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais , em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná , sul do Brasil * Observations on the behavior of phlebotomines in forest an. *Rev. Saude Publica* 1993; 27: 242–249.
- Tesh RB, Chaniotis BN, Aronson MD, Johnson KM. Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1971; 20: 150-156.
- Theodor O. Classification of the world species of the subfamily Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). *Bull Entomol Res* 1948; 39: 85-115.
- Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Goncalves A, Velez ID. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 50: 557–565.
- Travi BL, Velez 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.* 1990; 84: 676–677.
- Van Griensven, J. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clinical Microbiology and Infection.* 2014; 20, 286–299.
- Varma N, Naseem S. Hematologic changes in visceral Leishmaniasis/Kala Azar. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 2010; 26: 78–82.
- Vieira G de D, Basano S de A, Katsuragawa TH, Camargo LMA. Insecticide- treated bed nets in Rondônia, Brazil: Evaluation of their impact on malaria control. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 2014; 56: 493–497.
- Vilela ML, Pita-Pereira D de, Azevedo CG, Espíndola Godoy R, Britto C, Rangel EF.

- The phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of Guaraí, state of Tocantins, with an emphasis on the putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in rural settlement and periurban areas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2013; 108: 578–585.
- Wandscheer CB, Duque JE, Silva MAN Da, Fukuyama Y, Wohlke JL, Adelman J, Fontana JD. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon* 2004; 44: 829–835.
- WHO - World Health Organization. Controle das Leishmanioses. Relatório de uma reunião do Comitê de Peritos sobre o Controle das leishmanioses, Genebra, 22-26 de março 2010.
- Wilson AL, Dhiman RC, Kitron U, Scott TW, Berg H van den, Lindsay SW. Benefit of Insecticide-Treated Nets, Curtains and Screening on Vector Borne Diseases, Excluding Malaria: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(10): e3228.
- Wilhelm J, Pingoud A, Hahn M. Validation of an algorithm for automatic quantification of nucleic acid copy numbers by real-time polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 2003; 317: 218-225.
- Woerly V, Maynard L, Sanquer A, Eun HM. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. *Parasitol. Res.* 2009; 105: 463–469.
- Yaghoobi-Ershadi MR, Javadian E, Kannani A. Host preference pattern of phlebotomine sandflies of Borkhar rural district, Isfahan province, Iran. *Acta Trp.* 1995; 60: 155-158.
- Yew JY, Chung H. Insect pheromones: An overview of function, form, and discovery. *Prog. Lipid Res.* 2015; 59: 88–105.
- Young DG, Duncan MA (1994). *Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)*. Mem. Amer. Inst. Entomol. 54, Associate Publishers, Gainesville, 881 pp.

- Yuval B, Warburg A, Schlein Y. Leishmaniasis in the Jordan Valley. V. Dispersal characteristics of the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Med. Vet. Entomol.* 1988; 2: 391–395.
- Zacarias DA, Rolão N, Pinho FA de, Sene I, Silva JC, Pereira TC, Costa DL, Costa CHN. Causes and consequences of the *Leishmania infantum* burden in patients with kala-azar – a study of 625 patients. *Trop. Med. Int. Heal.* 2017; 22: 679–687.
- Zanette MF, Lima VMF de, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RF da C, Biondo AW, Marcondes M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2014; 47: 105–107.
- Zuben APB von, Donalísio MR. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. *Cad. Saude Publica* 2016; 32: 1–11.

Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations

Rafaela Albuquerque e Silva^{1,2/*}, Andrey José de Andrade³, Bruno Beust Quint¹, Gabriel Elias Salmen Raffoul¹, Guilherme Loureiro Werneck⁴, Elizabeth Ferreira Rangel⁵, Gustavo Adolfo Sierra Romero¹

¹Universidade de Brasília, Núcleo de Medicina Tropical, Brasília, DF, Brasil

²Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, DF, Brasil

³Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Básica, Curitiba, PR, Brasil

⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Medicina Social, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁵Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

BACKGROUND There is little information on the effect of using deltamethrin-impregnated dog collars for the control of canine visceral leishmaniasis.

OBJECTIVES The objective of this study was to evaluate the effectiveness of the use of 4% deltamethrin-impregnated collars (Sealibor®) in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* by comparing populations in intervention and non-intervention areas.

METHODS Phlebotomine flies were captured over 30 months in four neighbourhoods with intense visceral leishmaniasis transmission in Fortaleza and Montes Claros. We calculated the rates of domicile infestation, relative abundance of *Lu. longipalpis*, and *Lu. longipalpis* distribution in each site, capture location (intra- and peridomestic locations) and area (intervention and non-intervention areas).

FINDINGS In the control area in Fortaleza, the relative abundance of *Lu. longipalpis* was 415 specimens at each capture site, whereas in the intervention area it was 159.25; in Montes Claros, the relative abundance was 5,660 specimens per capture site in the control area, whereas in the intervention area it was 2,499.4. The use of dog collars was associated with a reduction in captured insects of 15% ($p = 0.004$) and 60% ($p < 0.001$) in Montes Claros and Fortaleza, respectively.

MAIN CONCLUSIONS We observed a lower vector abundance in the intervention areas, suggesting an effect of the insecticide-impregnated collars.

Key words: visceral leishmaniasis - *Lutzomyia longipalpis* - impregnated collars - deltamethrin - dogs

Leishmaniasis is a neglected disease that requires special government attention for surveillance and control. Visceral leishmaniasis (VL) is endemic in 70 countries on five continents and is mainly found in South Asia, East Africa, and the Americas. Among South America countries, Brazil accounts for the largest number of cases, registering over 90% of cases notified (OPAS/WHO 2017). In the Americas, VL is a zoonosis caused by the protozoa *Leishmania infantum*, and it is a serious public health issue.

VL surveillance and control policies in Brazil, outlined by the Leishmaniasis National Program of the Brazilian Ministry of Health, are focused on three axes for specific activities. First, the use of chemical insecticides and environmental management are recommended to lower the vector population density and reduce vector-human contact. Second, canine serological surveys and adequate management of positive cases are endorsed to decrease the sources of infection for the vector. Finally,

timely diagnosis and proper management of human cases are needed to prevent severe forms of the disease and death (MS/SVS/DVE 2014).

However, over the years, difficulties in the operationalisation of VL surveillance and control activities have been observed. The lack of effectiveness results partially from the shortage of qualified professionals and scarce financial resources. Moreover, delays in collections, performance of routine diagnostic tests, and removal of seropositive dogs, as well as refusal by dog owners to comply with surveillance measures, are frequent.

Mathematical models have suggested that euthanasia of *Leishmania* antibody-positive dogs in areas with low or moderate transmission of the pathogen might reduce the prevalence of canine infection in the long term (Costa et al. 2013). The infectiousness of asymptomatic animals, as well as their proportion among the whole dog population, can impact control strategies. Nevertheless, the indiscriminate euthanasia of asymptomatic dogs may compromise maintenance of the program because of population dissatisfaction.

Furthermore, in situations where seropositive dogs are removed, the rate of dog replacement is high (von Zuben and Donalísio 2016). In studies carried out in the city of Araçatuba (São Paulo state), the replacement rate was

doi:

Financial support: Capes, CNPq, Ministério da Saúde, FAP-DF.
* Corresponding author: rafaa28@gmail.com / rafaela.silva@saude.gov.br

Received 18 September 2017

Accepted 5 February 2018



44.5%, with owners justifying this by the need for a companion or guard dog for residencies (Andrade et al. 2007).

Regarding the vector, the ability of *Lutzomyia longipalpis* to adapt to urban environments increases the complexity of chemical control, resulting in operational difficulties, high costs, toxicity, and limited residual effects of the insecticide, and reducing the feasibility of executing this activity in these settings (von Zuben and Donalísio 2016). In addition, the lack of knowledge about the biology of immature forms of sandflies, mainly their breeding sites, is a key factor in the failure to control these insects.

Thus, alternatives to complement current Ministry of Health control strategies are highly desirable. Dog collars impregnated with 4% deltamethrin are considered as a potential tool for the control of canine VL. They contain a repellent and show insecticidal activities, reducing the interactions between dogs and phlebotomine flies. The efficacy of these collars has been described previously (David et al. 2001, Maroli et al. 2001, Gavvani et al. 2002, Reithinger et al. 2004). Killick-Kendrick et al. (1997) evaluated the insect repellency and insecticidal potential of collars impregnated with deltamethrin using *Phlebotomus perniciosus* in the laboratory. The dogs were followed up for 8 months and were periodically exposed to 200 *P. perniciosus* for two hours at least seven times between the 2nd and 34th week after the placement of the collars. An evaluation of repellency and mortality, based on the percentage of engorged and dead females after exposure, respectively, was conducted. The use of the collars prevented about 96% of *P. perniciosus* females from feeding during the 34 months of the study. Mortality of the exposed flies fluctuated between 21 and 60% during the period. A similar study was performed by David et al. (2001); however, they used the main vector associated with VL in the Americas, *Lu. longipalpis*. Feed interruption was demonstrated in 96% of flies used in the experiment, and fly mortality ranged from 90 to 35% over the period.

Once efficacy was demonstrated in the laboratory, effectiveness studies were performed to evaluate collars impregnated with 4% deltamethrin as a control tool for use in governmental programs. Based on the performance of collars in field trials, interventional studies were then conducted. These demonstrated a reduction in the prevalence of VL in treated dogs. Brazuna (2012) evaluated the reduction of disease prevalence in dogs after the use of Scalibor® collars in all dogs in the municipality of Campo Grande, MS. The reduction in disease prevalence in dogs was 50%. Comparable results were reported by Kazimoto, who showed a 53% prevalence reduction with the use of these collars in a smaller number of dogs. In addition, a mathematical modelling study performed by Sevá et al. (2016) indicated that the use of insecticide-impregnated collars, when 90% coverage is achieved, can decrease the prevalence of seropositive dogs and incidence of human VL cases to zero.

Nonetheless, it is necessary to evaluate the impact of using 4% deltamethrin-impregnated collars (Scalibor®) of populations of *Lu. longipalpis*, since proof of the insecticide or repellent effect of this intervention dogs does not necessarily equate with an effect at the population level (Gidwani et al. 2011). Therefore, the

objective of this study was to evaluate the impact of this intervention by comparing populations of *Lu. longipalpis* in treated and untreated areas.

MATERIALS AND METHODS

Study area - The study was carried out in Montes Claros, MG, and Fortaleza, CE. These municipalities were chosen because they were participating in the project entitled "Evaluation of the effectiveness of 4% deltamethrin-impregnated collars in endemic areas for visceral leishmaniasis", a project commissioned by the Ministry of Health whose objective was to evaluate the impact of these collars on VL prevalence in dogs and incidence in humans. The project, however, did not evaluate the impact of these collars on *Lu. longipalpis* populations.

The areas in which dog collars were used (intervention areas) and were not used (control areas) were defined in the previous study. Inclusion of intervention and control areas in this study was based on the number of VL cases (only municipalities with an average of more than 4.4 cases in the last three years were included) and availability of teams to carry out entomological surveillance activities.

Montes Claros, with an area of 3,582.034 km² and a population of 385,898 people, is located in the south-eastern region of Brazil (Fig. 1). Its vegetation comprises a mixture of *cerrado* and *caatinga*. It has a tropical climate with an average annual temperature of 22°C, dry and mild (rarely excessively cold) winters, and hot rainy summers (Michalshy et al. 2009). Fortaleza is located in the north-eastern region of Brazil and has an average altitude of 21 metres, an area of 313.8 km², and a population of 2,551,806 people. It is the state capital with the highest density (7,815.7 pop/km²) of people in the country (Fig. 2). It has typical coastal vegetation with areas of mangrove and *restinga*. Its climate is tropical and semi-humid, with an annual average temperature of 26°C. December and January are the hottest months of the year and July the coldest; however, the difference between these seasonal temperatures is minimal (Silva et al. 2014). Rainfall data from both municipalities during the study period were obtained through the National Institute of Meteorology website (INMET 2017).

In the intervention areas, the collars were placed on domestic or semi-domestic dogs. Stray dogs were not included in the intervention. In total, around 5,000 dogs per municipality wore the collars, which were replaced every six months. The 4% deltamethrin-impregnated collar used in this study, Scalibor®, is commercially available in two presentations: 19 g, indicated for small-to-medium-sized dogs and 25 g for large-sized dogs, with 0.760 g and 1 g, respectively, of the active ingredient. The total study period was 30 months.

Capture points - We selected phlebotomine fly capture points, or dwellings, in four neighbourhoods in each municipality (Figs 1 and 2), with 10 and 12 capture points chosen in Montes Claros and Fortaleza, respectively. In the first municipality (Montes Claros), five capture points were in the intervention area, and five were in the control area. In Fortaleza, nine capture points were in the intervention area, and three were in the control area. We chose

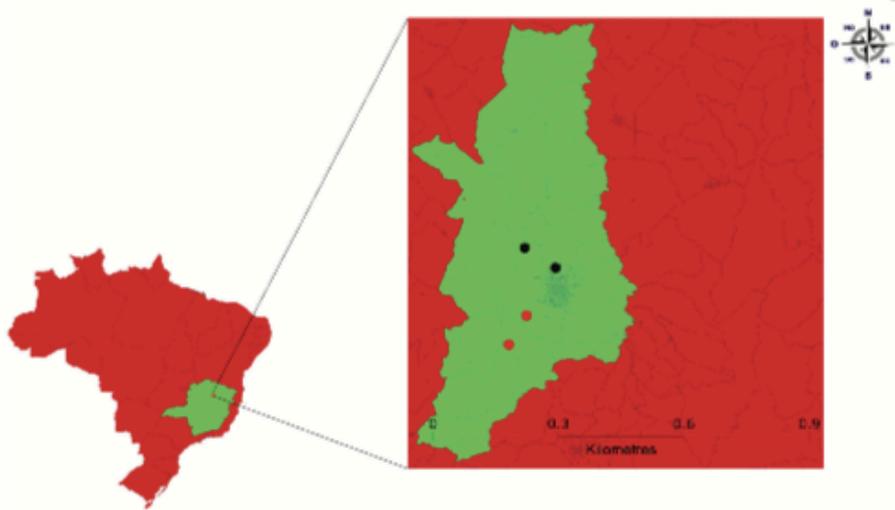


Fig. 1: Montes Claros municipality, Minas Gerais (MG), Brazil. Black dots indicate the control area and red dots indicate the intervention area.

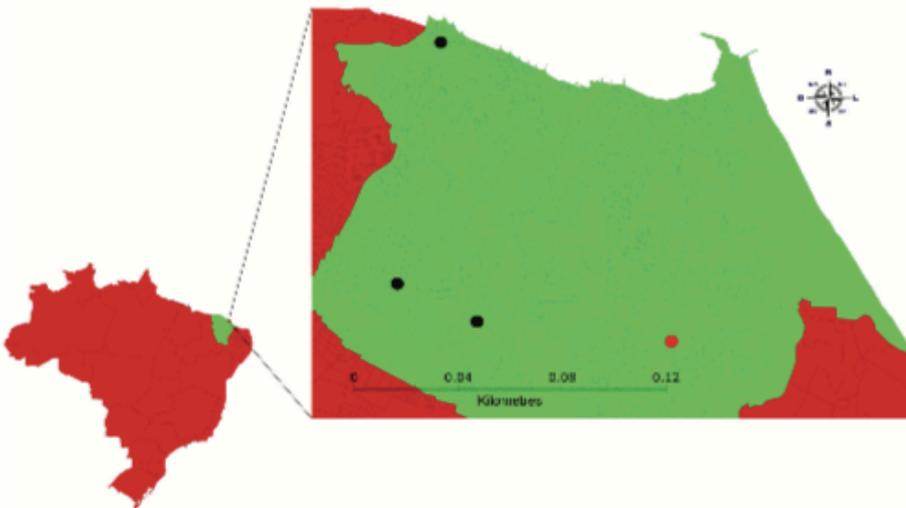


Fig. 2: Fortaleza municipality, Ceará (CE), Brazil. Black dots indicate the control area and red dots indicate the intervention area.

capture points (domiciles) with a minimum distance of 200-500 metres between them. The domiciles were chosen according to characteristics indicative of their receptiveness to the vector: type of vegetation present, presence

of domestic animals, accumulation of organic matter, and peridomestic area (200-300 square metres). Another criterion for the selection of points was the presence of dogs. A dog resided at each phlebotomine fly capture point.

Phlebotomine fly collection - We collected phlebotomine flies using CDC light traps, which were set three consecutive nights per month, from 6 pm to 6 am for 30 months (MS/SVS/DVE 2014). Two traps were placed in each residence, one inside of the house and one outside, preferably near places where dogs sheltered (MS/SVS/DVE 2014). Fly capture began five months after the first placement of collars in Montes Claros and Fortaleza.

Phlebotomine fly identification - Flies captured in Montes Claros were sent to the Entomology Laboratory of the Zoonosis Control Centre of the municipality, where male flies were screened and identified. The females were sent to the Medical Parasitology and Vector Biology Laboratory of the University of Brasilia for slide preparation and identification in accordance with the Galati (2003) classification. Flies captured in Fortaleza were taken to the Dr Thomaz Correia Aragão Medical Entomology Laboratory of the state of Ceará Health Department, where males and females were identified in accordance with the Young and Duncan (1994) classification. Both taxonomic keys are recommended by the Ministry of Health; therefore, the choice of which key to adopt in the daily routine was the decision of entomology teams in each state. There was no distinction in the characteristics used to identify *Lu. longipalpis* between the taxonomic keys.

Data analysis - Formulas shown in Table I were used to calculate the domicile infestation and distribution rates of *Lu. longipalpis* at each capture site (MS/SVS/DVE 2014). A descriptive analysis of domicile infestation and relative vector abundance in intervention and control areas was performed. We used a locally-weighted scatterplot smoothing technique ("lowess") to describe the variation in sandflies captured across time considering the study area (Fortaleza, CE, and Montes Claros, MG), intervention area [with deltamethrin-impregnated collars and without (control)], and capture site (inside and outside of houses). The "lowess" smoother is a non-parametric regression method that fits a locally weighted linear regression model giving points closer to each value the greater weight in smoothing and limiting the effect of outliers. To determine associations between intervention, capture site, and insect abundance according to study site and period of temporal aggregation (bimester), we used a Poisson regression model. In Poisson regression, associations are expressed as incidence rate ratios (IRR) with 95% confidence intervals (95% CI). For the data analyses, we used STATA version 12.0.

RESULTS

In total, 4,373 (1,494 intradomiciliary and 2,879 peridomiciliary) and 40,797 (8,359 intradomiciliary and 32,438 peridomiciliary) specimens of *Lu. longipalpis* were collected in Fortaleza and Montes Claros, respectively.

Out of the 4,373 phlebotomine flies captured in Fortaleza, 3,141 were males and 1,232 were females, and, out of the 40,792 captured in Montes Claros, 36,716 were males and 4,076 females. From Montes Claros, 310 specimens were lost because of poor quality or the protocol used for the identification, corresponding to 7.6% of all female specimens from this municipality. When compared in absolute numbers, this loss was similar in both the intervention and control areas.

In the full study period, the infestation rate was 100% in both municipalities, confirming the wide distribution of *Lu. longipalpis* in all four neighbourhoods. However, there were differences in relative abundance. In the control area in Fortaleza, the relative abundance of *Lu. longipalpis* across the study period was 415 specimens per capture point, whereas in the intervention area it was 159.25. The relative abundances inside of houses were 135.88 and 67.75 and outside of houses were 279.22 and 91.5 for the control and intervention areas, respectively. Vector densities varied throughout the study period, with an increase in *Lu. longipalpis* captured during the rainy season or soon after (Fig. 3). The overall male:female ratio was 2.54:1, with the ratio higher in the intervention areas (3.1:1) than in the control areas (2.4:1). Across the capture period in the control area in Montes Claros, the relative abundance of *Lu. longipalpis* was 5,660 specimens per capture point, whereas in the intervention area it was 2,499.4. The relative abundances of *Lu. longipalpis* inside of houses were 964.4 and 707.4 and outside of houses were 4,695.6 and 1,792 for the control and intervention areas, respectively. Vector densities varied throughout the study period, with an increase in *Lu. longipalpis* captured during the rainy season or soon after (Fig. 3). The overall male:female ratio was 9.07:1, with the ratio higher in the intervention areas (12.03:1) than in the control areas (8.15:1).

In the 30-month study period, Fortaleza had a total of 2,897 mm of rain, with rainfall in the peak periods ranging from 400 to 500 mm in March to July of the study years. In the 9th bimester, only 7 mm of rainfall was recorded. In contrast, Montes Claros had 1,685 mm of rainfall, with a homogeneous distribution throughout the year and a single

TABLE I
Formulas used to calculate the domicile and relative vector abundance rate

Domicile infestation rate	$\frac{\text{Number of positive domicile/researched site/technique}}{\text{Number of researched domicile}}$
Relative abundance	$\frac{\text{Number of Lutzomyia longipalpis collected per methodology in the domiciles (intra or peridomicile)}}{\text{Number of researched domicile}}$

registered peak in November and December 2013. On the 3rd, 9th, and 15th bimesters, it did not rain (Fig. 3).

The use of dog collars was associated with 15% ($p = 0.004$) and 60% ($p < 0.001$) reductions in the number of captured insects in Montes Claros and Fortaleza, respectively (Tables II-III). The analysis according to capture site showed a 21% decrease in peridomestic *Lu. longipalpis* (IRR = 0.783; $p < 0.001$) in Montes Claros and a 56% (IRR = 0.44; $p < 0.001$) and 60% (IRR = 0.40; $p < 0.001$) decrease in intra- and peridomestic *Lu. longipalpis* in Fortaleza, respectively (Fig. 5) (Tables II-III). No seasonality or other cyclical phenomena were observed in either city (Fig. 4).

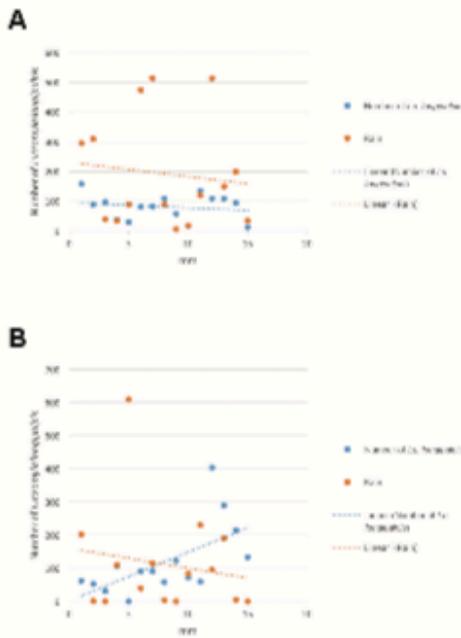


Fig. 3: number of *Lutzomyia longipalpis* specimens captured per bimester and observed rainfall during the study period. (A) Fortaleza, Ceará (CE), Brazil. (B) Montes Claros, Minas Gerais (MG), Brazil, from 2013 to 2015.

TABLE II

Poisson regression model. Evaluation of the association between the intervention, capture site and insect abundance, according to the period of temporal aggregation (bimester), Montes Claros, Minas Gerais (MG), Brazil

Total_insects	IRR	P > z	95% confidence interval	
Time	1.14	0.000	1.12	1.15
1.collar	.87	0.004	.79	.95
2.local	1.92	0.000	1.74	2.12
_cons	1.45	0.000	1.24	1.69

TABLE III

Poisson regression model. Evaluation of the association between the intervention, capture site and insect abundance, according to the period of temporal aggregation (bimester), Fortaleza, Ceará (CE), Brazil

Total_insects	IRR	P > z	95% confidence interval	
Time	.97	0.002	.96	.99
1.collar	.41	0.000	.35	.49
2.local	1.79	0.000	1.59	2.01
_cons	3.37	0.000	2.94	3.87

DISCUSSION

The 4% deltamethrin-impregnated collar is currently considered a tool for VL control. Some studies have indicated that its use in transmission areas reduces the prevalence of canine VL, but these studies have not shown its effects on the vector population (Kazimoto 2016, Sevá et al. 2016). This effect on the prevalence of canine VL is based on a reduction in blood feeding by the vector on dogs with collars, mediated by the repellent and insecticidal action of deltamethrin, a pyrethroid, impregnated in the collars (Halbig et al. 2000, David et al. 2001, Maroli et al. 2001). However, one study showed a decrease in *Lu. longipalpis* mortality, from 90% to 35% between the 4th and 37th week of collar use, demonstrating the need for systematic reapplications of the insecticide for continued interruption of vector feeding on dogs (David et al. 2001).

Scalibor® collars were first changed after six months in the intervention areas, based on the manufacturer's specification. However, between the 1st and 2nd exchanges, the interval was extended to one year because of problems with product delivery. Although not quantified, there were losses of the collars throughout the study for several reasons: removal by dog owners because of itching, irritation, and dermatitis in dogs that wore the collars; fights between animals; removal of collar by the animals, mainly by semi-domestic dogs, because most were not accustomed to wearing collars; and other reasons. Reithinger et al. (2004), using a mathematical model, demonstrated a reduction in antibody seroconversion by 50% in animals given collars, despite 41% collar losses predicted during the study. In the present study, even with losses, a 40% reduction in canine prevalence, as well as a reduction in *Lu. longipalpis* inside and outside of houses, was observed in Fortaleza and Montes Claros (unpublished observations, Werneck 2016). The effect on canine prevalence and reduction in *Lu. longipalpis* can be attributed to the herd effect of collar use by more than 50% of dogs.

This study showed a wide distribution of the main vector species for VL, *Lu. longipalpis*, in both municipalities, confirming the ability of this species to adapt to an anthropised environment. Adaptation of *Lu. longipalpis* to urbanised areas in these two municipalities was described previously, and this ability to exploit an urban ecology underlies the high correlation between human cases and canine seroprevalence (Michalsky et al. 2009, Silva et al. 2014).

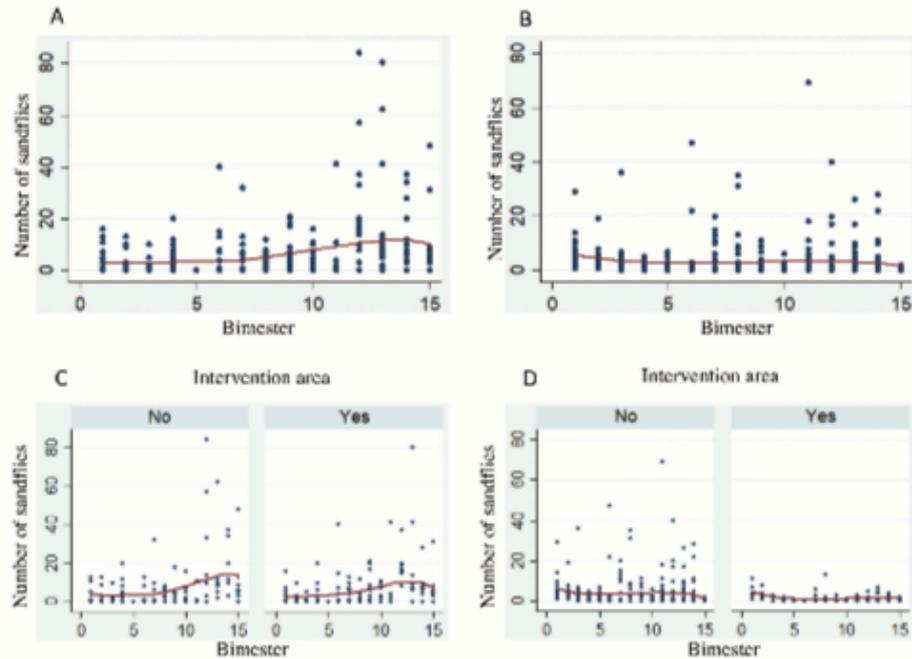


Fig. 4: total number of *Lutzomyia longipalpis* captured per bimester in the intervention area (with and without the use of dog collars) in Montes Claros, Minas Gerais (MG), and Fortaleza, Ceará (CE), Brazil, from 2013 to 2015. (A) Number of *Lu. longipalpis* captured per bimester, Montes Claros, MG. (B) Number of *Lu. longipalpis* captured per bimester, Fortaleza, CE. (C) Number of *Lu. longipalpis* captured per bimester in intervention and control areas, Montes Claros, MG. (D) Number of *Lu. longipalpis* captured per bimester in intervention and control areas, Fortaleza, CE.

At collection sites, we observed a higher abundance of *Lu. longipalpis* outside of houses than within them in both municipalities. This can be explained by characteristics favourable to the vector in these locations: peridomestic areas with fruit trees and more than one type of domestic animal or livestock, meaning that the phlebotomine flies did not have to enter houses to search for food (Silva et al. 2014, Salomón et al. 2015).

The number of *Lu. longipalpis* specimens captured in Montes Claros was ten-fold the number captured in Fortaleza. The number of *Lu. longipalpis* specimens captured outside of houses was four times more than that of specimens capture inside houses in Montes Claros; two times more specimens were captured outside than inside of houses in Fortaleza. These differences can be attributed to the fact that Montes Claros is a city with a large amount of green space and intense urbanisation with frequent environmental modifications. As previously described, urbanisation contributes to the destruction of natural habitats for the *L. infantum* vector and reservoirs, causing the vectors to enter anthropised environments and facilitating interactions between the vector and humans (Cardim et al. 2013). Furthermore, the high degree of anthropophilia and eclectic food preferences of phle-

botomine fly species may allow them to adapt to various anthropised environments (Salomón et al. 2015). Because the adaptation of sandflies to anthropic environments occurs gradually, sandflies are still found primarily in areas similar to their natural habitat (peridomestic spaces) and may later adapt to more anthropised areas such as the inside of houses (Silva et al. 2014).

Likewise, although the environmental characteristics of the capture points were similar in each municipality surveyed, there were some differences between them that could account for the difference in *Lu. longipalpis* densities between municipalities. Unlike what was observed in Fortaleza, in Montes Claros, poultry, especially chickens, which are associated with the presence phlebotomine flies, were found in all capture sites (Alexander et al. 2002, Afonso et al. 2012, Soares et al. 2013). Moreover, the presence of poultry may act as an amplifier for these flies (Soares et al. 2013). Studies carried out in the Posadas province of Argentina showed a correlation between the presence of birds and absence of electric power and an increase in the density of *Lu. longipalpis* (Fernández et al. 2010).

Additionally, there were differences in rainfall. Rainfall at moderate levels is associated with an increase

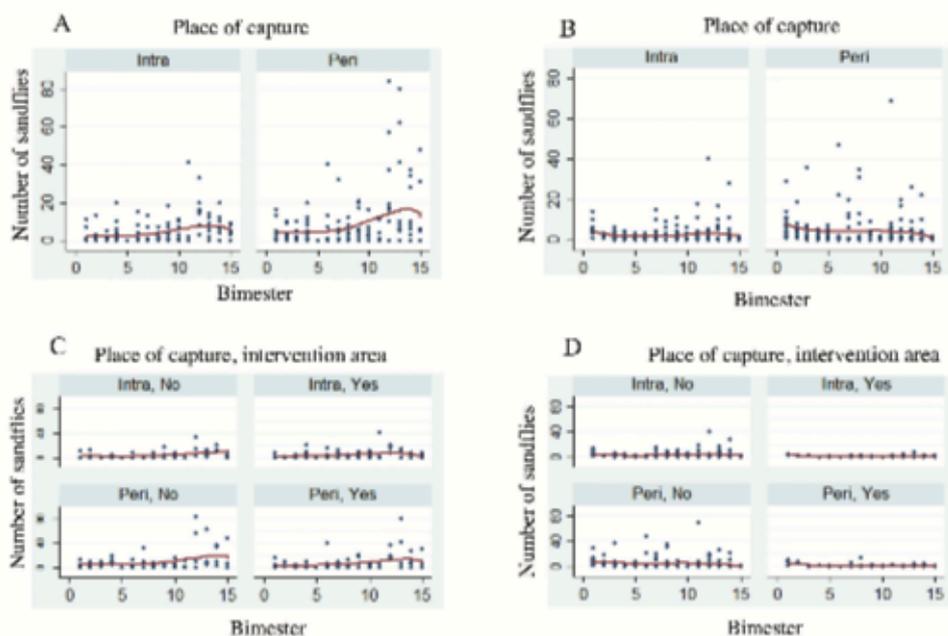


Fig. 5: number of *Lutzomyia longipalpis* captured per bimester at each collection site (intra- and peridomiciliary) and intervention or control area (areas with and without the use of dog collars) in Montes Claros, Minas Gerais (MG), and Fortaleza, Ceará (CE), Brazil. (A) Number of *Lu. longipalpis* captured per bimester and at each capture site in Montes Claros, MG. (B) Number of *Lu. longipalpis* captured per bimester and at each capture site in Fortaleza, CE. (C) Number of *Lu. longipalpis* captured per bimester and at each capture site and intervention or control area, Montes Claros, MG. (D) Number of *Lu. longipalpis* captured per bimester and at each capture site and intervention or control area, Fortaleza, CE.

in phlebotomine flies; rainfall at elevated levels, however, can destroy *Lutzomyia* breeding sites, decreasing the population. In Fortaleza, we observed that the number of captured specimens was larger in the period soon after the peak in rainfall, which agrees with previous reports (Michalsky et al. 2009). However, in Montes Claros, this was not the case, with an absence of peaks in rainfall and presence of phlebotomine flies throughout the study period. This consistency in the number of specimens captured, regardless of the month, has been described previously (Michalsky et al. 2009).

The use of 4% deltamethrin-impregnated collars resulted in 14% and 60% reductions in *Lu. longipalpis* captured in the intervention areas compared to the control areas in Montes Claros and Fortaleza, respectively. This reduction is in line with the 40% decrease in canine prevalence observed in municipalities that participated in the project entitled "Evaluation of the effectiveness of 4% deltamethrin-impregnated collars in endemic areas for visceral leishmaniasis" (unpublished observations, Werneck 2016). Even though the natural infection rate in captured specimens is not routinely determined by the health services, the number of captured insects, in associated with the high degree of anthrophilia of this species and their proximity to domestic reservoirs, may indicate a higher risk for transmission of *L. infantum* (Salomón et al. 2015).

Regarding the ratio of male to female *Lu. longipalpis*, in both municipalities and areas (intervention and control) the number of captured males was higher than that of females. This predominance of males has been described before (Cabanillas and Castellón 1999, Silva et al. 2014). Some authors have suggested that the use of light traps may cause an imbalance in the sexes captured, with males caught more frequently than females. This could be a result of the aggregation of male for copulation with females (de Aguiar et al. 1985).

In both the intervention and control areas in both municipalities, the *Lu. longipalpis* infestation rate was 100%, indicating that the presence of the dog collar, despite reducing the number of species captured, did not prevent houses from becoming infested. Nevertheless, because of the repellent and insecticidal effects of the collar, the vector may not access blood meals from dogs, which are the main source of *L. infantum* in urban areas, and therefore there are not as likely to become infected and transmit the pathogen (Lainson and Rangel 2005, Maroli et al. 2013).

In addition, it is important to evaluate the food sources selected by *Lu. longipalpis* when dogs are unavailable for feeding. At each capture point in both the intervention and control areas, there was at least one dog and another animal as a food source, in addition to humans. Understanding feeding preferences would help in assessing the risk

of transmission of *L. infantum* to humans. Protection of dogs by the collars may increase interactions between *Lu. longipalpis* and humans, which could increase the number of VL cases in humans. However, this increase would not be sustained in the long term because of the sources of infection for the vector would be reduced. Studies have shown that *Lu. longipalpis* feeds eclectically; however, it has a preference for birds, followed by pigs, dogs, and then humans (Afonso et al. 2012).

In the intervention area of Montes Claros, the number of *Lu. longipalpis* captured outside of houses was reduced by approximately 21% over the study period ($p < 0.001$), with no decrease inside of houses. In Fortaleza, the reduction was more pronounced both inside and outside of houses, with 56% and 60% reductions, respectively ($p < 0.001$). This reduction outside of houses was expected, because *Lu. longipalpis* would feed less on dogs with collars and resort to feeding on other domestic animals, livestock, or humans.

Although identifying factors associated with the maintenance of VL, mainly those related to the presence of *Lu. longipalpis* in the area, reducing the population of this vector indisputably decreases the probability of *L. infantum* transmission and thus cases of the disease. The results of this work indicate that use of 4% deltamethrin-impregnated collars should be integrated into the roster of activities currently recommended by the Ministry of Health for VL control, because current control strategies in urban areas, such as euthanising domestic reservoirs, are unpopular. An evaluation of *L. infantum* infection rates and food sources of captured females may complement this data, further validating the effects of this intervention on the prevalence of VL.

ACKNOWLEDGEMENTS

To entomology teams of the Health Departments of the municipality of Montes Claros and state of Ceará made this work possible.

AUTHORS' CONTRIBUTION

RAS participated in the all aspects of the preparation and execution of this study, as well as manuscript writing; AJA, BBQ and GESR were responsible for sandfly identification and manuscript preparation; GLW, EFR and GASR were responsible for designing the project, data analysis, and preparation and revision of the manuscript.

REFERENCES

- Afonso MMDS, Duarte R, Miranda JC, Caranha L, Rangel EF. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) population from endemic areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. *J Trop Med*. 2012; 2012: 1-5.
- Alexander B, de Carvalho RL, McCallum H, Pereira MH. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8(12): 1480-5.
- Andrade AM, Queiroz LH, Nunes GR, Perri SHV, Nunes CM. Reposição de cães em área endêmica para leishmaniose visceral. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; 40(5): 594-5.
- Brazuna JCM. Estudos sobre leishmaniose visceral humana e canina no município de Campo Grande, MS, Brasil [Tese]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2012. 118 fls.
- Cabanillas MRS, Castellón EG. Distribution of sandflies (Diptera: Psychodidae) on tree-trunks in a non-flooded area of the Ducke Forest Reserve, Manaus, AM, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94(3): 289-96.
- Cardim MFM, Rodas LAC, Dibo MR, Guirado MM, Oliveira AM, Chiaravalloti-Neto F. Introduction and expansion of human American visceral leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil, 1999-2011. *Rev Saude Publica*. 2013; 47(4): 691-700.
- Costa DNCC, Codeço CR, Silva MA, Werneck GL. Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(8): e2355.
- David JR, Stamm LM, Bezerra HS, Souza RN, Killick-Kendrick R, Lima JWO. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001; 96(6): 839-47.
- de Aguiar GM, Vilela ML, Schuback PD, Soucaux T, de Azevedo ACR. Aspectos da ecologia dos flebotomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. IV. Frequência mensal em armadilhas luminosas (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1985; 80(4): 465-82.
- Fernández MS, Salomón OD, Cavia R, Perez AA, Acardi AS, Gucione JD. *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with environmental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. *Acta Trop*. 2010; 114(2): 81-7.
- Galati EAB. Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF, Lainson R, orgs. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 23-51.
- Gavagni ASM, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *Lancet*. 2002; 360(9330): 374-9.
- Gidwani K, Picado A, Rijal S, Singh SP, Ruy L, Volfova V, et al. Serological markers of sand fly exposure to evaluate insecticidal nets against visceral leishmaniasis in India and Nepal: a cluster-randomized trial. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(9): e1296.
- Halbig P, Hodjati MH, Mazloumi-Gavagni AS, Mohite H, Davies CR. Further evidence that deltamethrin-impregnated collars protect domestic dogs from sandfly bites. *Med Vet Entomol*. 2000; 14(2): 223-6.
- INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. Dados da Rede do INMET. 2017. Available from: http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf.
- Kazimoto TA. Uso de coleiras impregnadas com deltametrina 4% em cães no controle da leishmaniose visceral [Dissertação]. Mossoró: Universidade Federal Rural do Semi-Árido; 2016. 66 fls.
- Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol*. 1997; 11(2): 105-11.
- Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100(8): 811-27.
- Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Grandoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*. 2013; 27(2): 123-47.
- Maroli M, Mizzoni V, Siragusa C, D'Orazi A, Grandoni L. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in Southern Italy. *Med Vet Entomol*. 2001; 15(4): 358-63.
- Michalsky EM, Fortes-Dias CL, França-Silva JC, Rocha MF, Barata RA, Dias ES. Association of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:

- Psychodidae) population density with climate variables in Montes Claros, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(8): 1191-3.
- MS/SVS/DVE - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: MS; 2014. 120 pp.
- OPAS/WHO - Organización Panamericana de la Salud/World Health Organization. Leishmaniasis. Informe epidemiológico en las Américas. No. 5. Washington: OPAS; 2017. Available from: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34111/informe_leishmaniasis_5_spa.pdf?sequence=5&isAllowed=y.
- Reithinger R, Coleman PG, Alexander B, Vieira EP, Assis G, Davies CR. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? Int J Parasitol. 2004; 34(1): 55-62.
- Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MMS, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015; 110(7): 831-46.
- Sevá AP, Ovallos FG, Amaku M, Carrillo E, Moreno J, Galati EAB, et al. Correction: Canine-based strategies for prevention and control of visceral leishmaniasis in Brazil. PLoS ONE. 2016; 11(9): e0161853.
- Silva RA, Santos FKM, Sousa LC, Rangel EF, Bevilacqua CML. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei* in an endemic area for visceral leishmaniasis. Rev Bras Parasitol Vet. 2014; 23(3): 320-7.
- Soares BR, Souza APA, Prates DB, de Oliveira CI, Barral-Netto M, Miranda JC, et al. Seroconversion of sentinel chickens as a biomarker for monitoring exposure to visceral leishmaniasis. Sci Rep. 2013; 3: 2352.
- von Zuben APB, Donalísio MR. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da leishmaniose visceral em grandes municípios brasileiros. Cad Saude Publica. 2016; 32(6): 1-11.
- 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). Gainesville: Associated Publishers; 1994. 881 pp.

PROOF PROOF PROOF

APÊNDICE 2.

CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL E ANÁLISE DESCRITIVA POR MUNICÍPIO.

A escolha dos pontos de captura baseou-se na presença de características ambientais favoráveis ao aparecimento de flebotomíneos, tais como: peridomicílios amplos, sombreados, com presença de árvores frutíferas, presença de animais domésticos, contemplando pelo menos cães, humanos e mais uma fonte alimentar.

Em Fortaleza/CE, todos os pontos tinham peridomicílio com área maior do que 100m², presença de árvores de grande porte que proporcionavam áreas amplas de sombreamento, como mangueiras (66%), cajueiros (66%) e coqueiros (50%). Ademais, no tocante às fontes alimentares disponíveis, excetuando-se os cães, a presença de aves foi a mais frequente nos pontos de captura (83%), seguida de bovinos (33,3%) e felinos (33,3%). Em relação às condições de infraestrutura de cada ponto de captura, avaliado a partir da coleta semanal de lixo e do saneamento básico, observou-se que em dois pontos, Messejana 3 (Mess3) e Bom Jardim 3 (BJ 3), não havia coleta de lixo (Tabela 1).

No período estudado, abril de 2013 a setembro de 2015, foram capturados um total de 4.373 exemplares de *Lutzomyia longipalpis* (1.494 no intradomicílio e 2.879 no peridomicílio). Dos 4.373 exemplares capturados, 3.141 eram machos e 1.232 eram fêmeas. Quando avaliado o quantitativo de exemplares de *Lu. longipalpis* capturados por ponto de coleta, foram observadas diferenças expressivas. Em Bom Jardim 1 (BJ1) e Barra do Ceará 3 (BC3), ambos pertencentes a área controle de estudo, apresentaram juntos mais de 50% do total de exemplares de *Lu. longipalpis* capturados no período, entretanto, com maiores variabilidade entre os bimestres (Tabela 2; Figura 1). Em ambos os pontos havia a presença de aves, majoritariamente galinhas, que, diferente dos demais pontos de captura deste município, eram criadas em regime de confinamento (galinheiros). Nesse sentido, a delimitação da mobilidade das aves associada a alta atratividade para os flebotomíneos por este grupo de animais, justifica a abundância da captura nesses locais. Ademais, havia uma grande diversidade de árvores frutíferas, principalmente no BJ1.

A taxa de infestação domiciliar considerando todo o período de estudo foi de 100%, confirmando a ampla distribuição de *Lu. longipalpis* no município. Entretanto,

ao avaliar este indicador por bimestre, observou-se tendência de redução ao longo do tempo (Figura 2). Em nenhuma das áreas avaliadas, sob intervenção ou controle, durante todo o período de estudo este indicador foi zero.

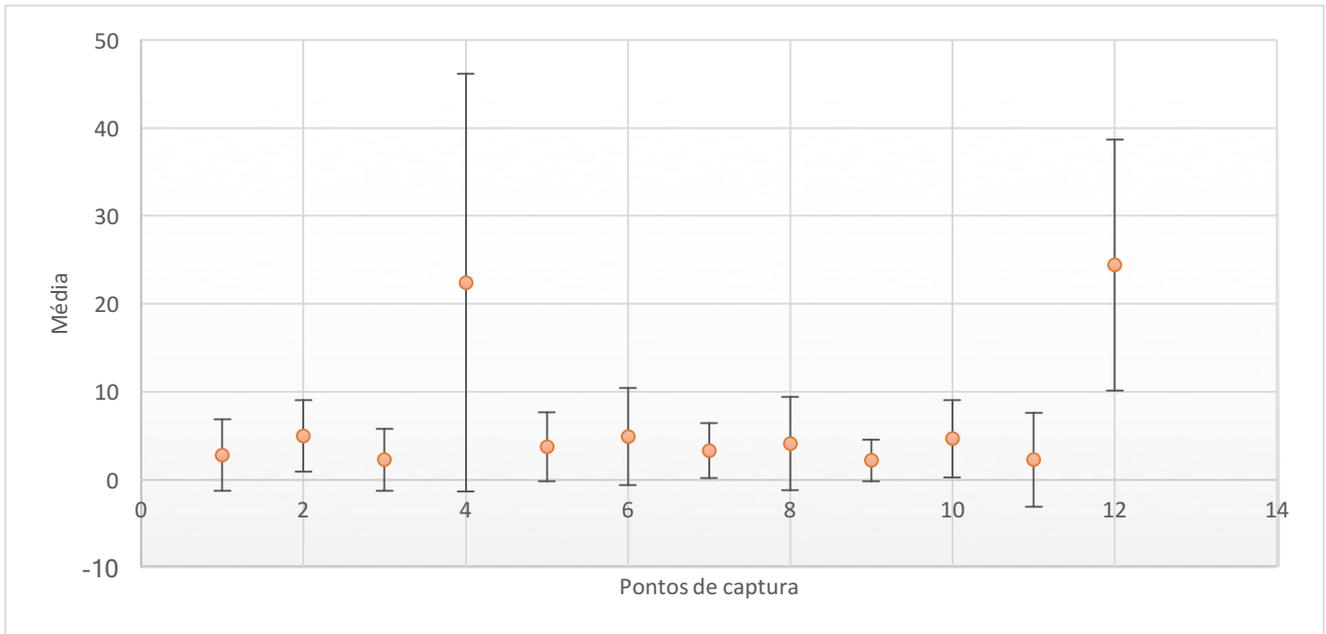


Figura 1. Média e desvio padrão do número de *Lutzomyia longipalpis* capturados, por ponto de coleta, Fortaleza/CE, 2013 a 2015.

1. Messejana 1; 2. Messejana 2; 3. Messejana 3; 4. Bom Jardim 1; 5. Bom Jardim 2; 6. Bom Jardim 3; 7. Mondubim 1; 8. Mondubim 2; 9. Mondubim 3; 10. Barra do Ceará 1; 11. Barra do Ceará 2; 12. Barra do Ceará 3.

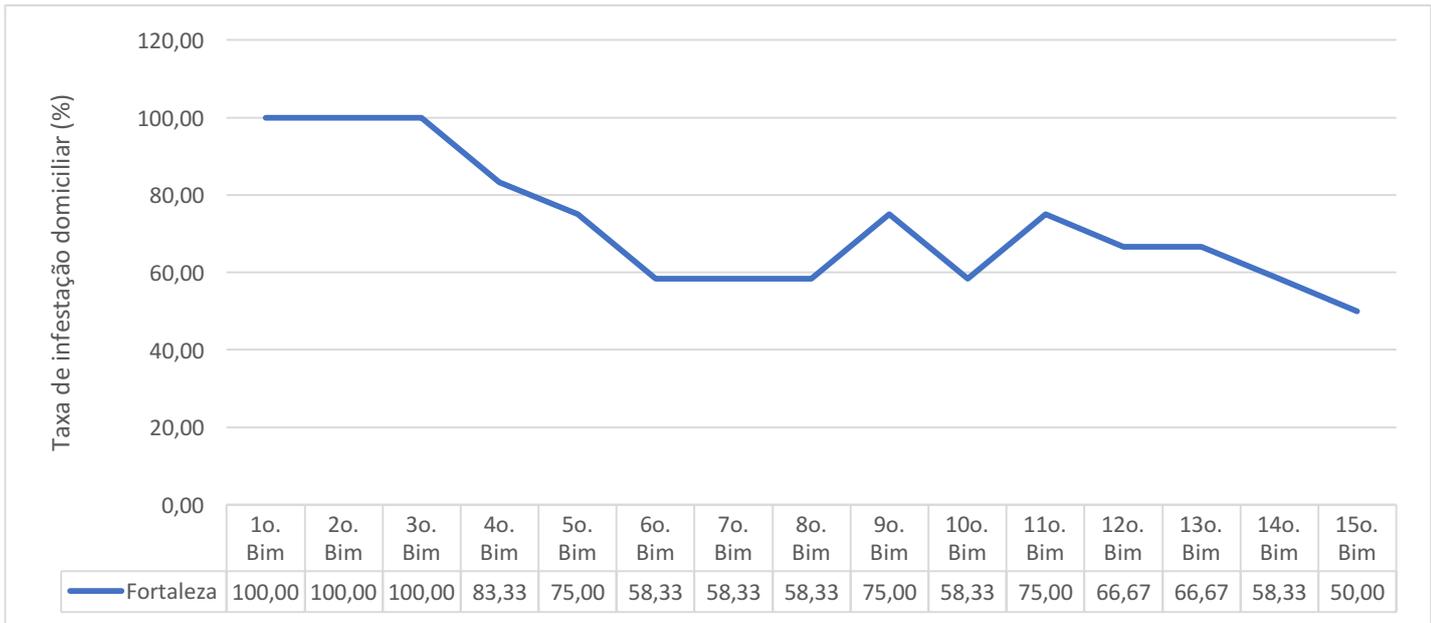


Figura 2. Taxa de infestação domiciliar, por bimestre, Fortaleza/CE, 2013 a 2015.

Ponto de Coleta		Mess 1	Mess 2	Mess 3	BJ1	BJ 2	BJ 3	Mod 1	Mod 2	Mod 3	BC 1	BC 2	BC 3
Recolhimento de Lixo		Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Saneamento básico		Sim											
Quantidade de moradores		1 a 2	>4	>4	>4	>4	2 a 4	>4	>4	>4	>4	1 a 2	>4
Presença de animais domésticos	Canino	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	Felino			x			x				x	x	
	Bovino	x				x	x			x			
	Suíno												
	Equino	x					x			x			
	Ave	x	x	x	x	x	x	x	x		x		x
Tamanho do peridomicílio		>100 m ²											
Cobertura vegetal	Banana		x					x	x			x	
	Manga	x	x	x	x	x	x	x	x				
	Laranja				x								
	Caju		x	x	x			x	x		x	x	x
	Coco		x	x	x	x					x		x
	Outros	Goiaba	Siriguela		Abacate			Cajá	Siriguela	Acerola		Graviola	Siriguela

Tabela 1. Características ambientais, por ponto de captura e área (intervenção e controle), Fortaleza/CE, 2013 a 2015.

Mess1 – Messejana 1; Mess 2 – Messejana 2; Mess 3 – Messejana 3; BJ 1 – Bom Jardim 1; BJ 2 – Bom Jardim 2; BJ 3 – Bom Jardim 3; Mod 1 – Mondubim 1; Mod 2 – Mondubim 2; Mod 3 – Mondubim 3; BC 1 – Barra do Ceará 1; BC 2 – Barra do Ceará 2; BC 3 – Barra do Ceará 3

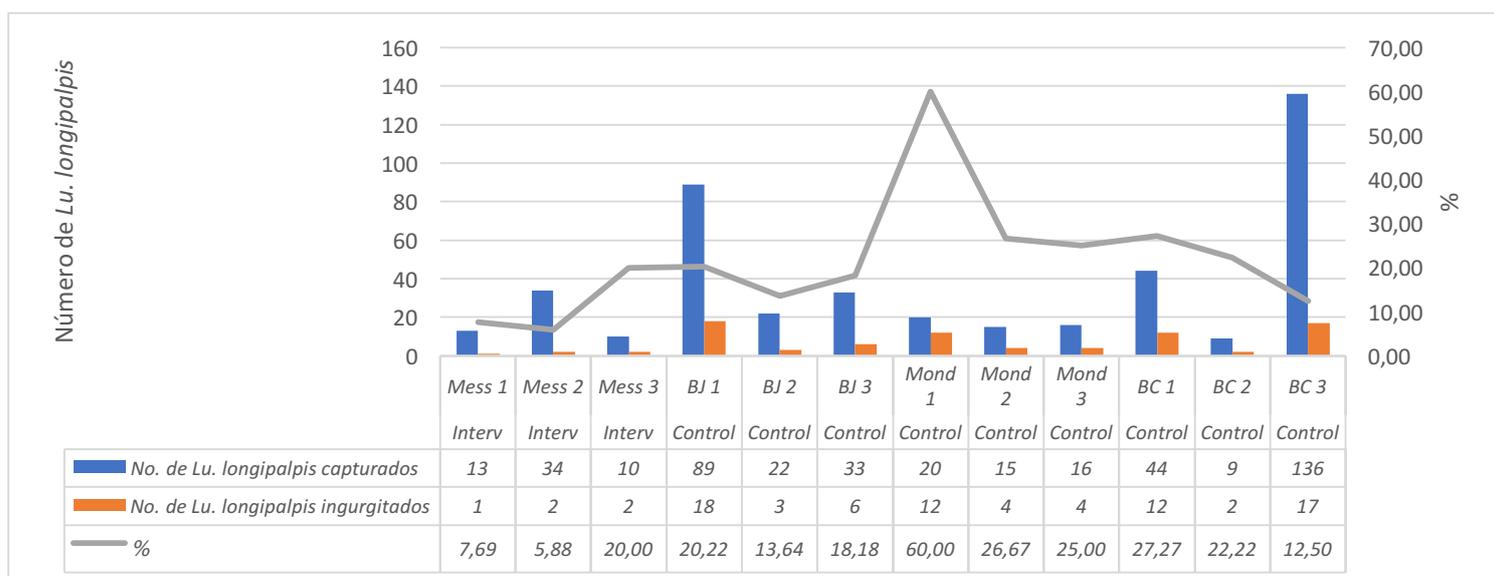
Área	Ponto de captura	Bimestre															Total	Média	Desvio padrão
		1o.	2o.	3o.	4o.	5o.	6o.	7o.	8o.	9o.	10o	11o	12o	13o	14o	15o			
Intervenção	Mess 1	15	7	3	1	1	0	6	1	0	0	1	0	5	0	2	42	2,80	4,09
Intervenção	Mess 2	4	6	5	2	1	0	4	15	4	1	4	7	12	7	3	75	5,00	4,07
Intervenção	Mess 3	11	9	5	1	0	0	0	0	0	0	3	1	0	3	1	34	2,27	3,49
Controle	BJ 1	14	8	7	3	3	48	15	38	13	1	80	57	14	33	2	336	22,40	23,73
Controle	BJ 2	9	5	4	6	4	0	1	0	2	2	1	11	11	0	0	56	3,73	3,94
Controle	BJ 3	18	4	1	3	0	1	0	8	4	2	10	4	15	4	0	74	4,93	5,52
Controle	Mond 1	3	4	8	0	2	1	0	0	6	2	6	0	8	8	2	50	3,33	3,11
Controle	Mond 2	6	9	4	7	3	4	20	0	4	0	5	0	0	0	0	62	4,13	5,29
Controle	Mond 3	8	6	1	4	2	2	0	2	4	0	0	1	1	2	0	33	2,20	2,37
Controle	BC 1	8	4	11	4	5	1	15	6	7	4	0	5	0	0	0	70	4,67	4,37
Controle	BC 2	19	7	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34	2,27	5,32
Controle	BC 3	43	21	42	7	9	25	23	40	15	7	26	24	43	38	3	366	24,40	14,23
	Total	158	90	99	38	30	82	84	110	59	19	136	110	109	95	13	1232		

Tabela 2. Número de exemplares de *Lutzomyia longipalpis* capturados em Fortaleza/CE por ponto de coleta, área e bimestre, 2013 a 2015.

Mess1 – Messejana 1; Mess 2 – Messejana 2; Mess 3 – Messejana 3; BJ 1 – Bom Jardim 1; BJ 2 – Bom Jardim 2; BJ 3 – Bom Jardim 3; Mod 1 – Mondubim 1; Mod 2 – Mondubim 2; Mod 3 – Mondubim 3; BC 1 – Barra do Ceará 1; BC 2 – Barra do Ceará 2; BC 3 – Barra do Ceará 3

Quanto ao percentual de fêmeas de *Lu. longipalpis* alimentadas com sangue, foi observado que 37% e 66% dos exemplares capturados no intra e peridomicílio, respectivamente, estavam ingurgitados. Quando esse parâmetro foi avaliado por área (controle e intervenção) e local de captura observou-se maior percentual de fêmeas alimentadas no intradomicílio das áreas controles quando comparadas às áreas de intervenção (Figura 3).

A



B

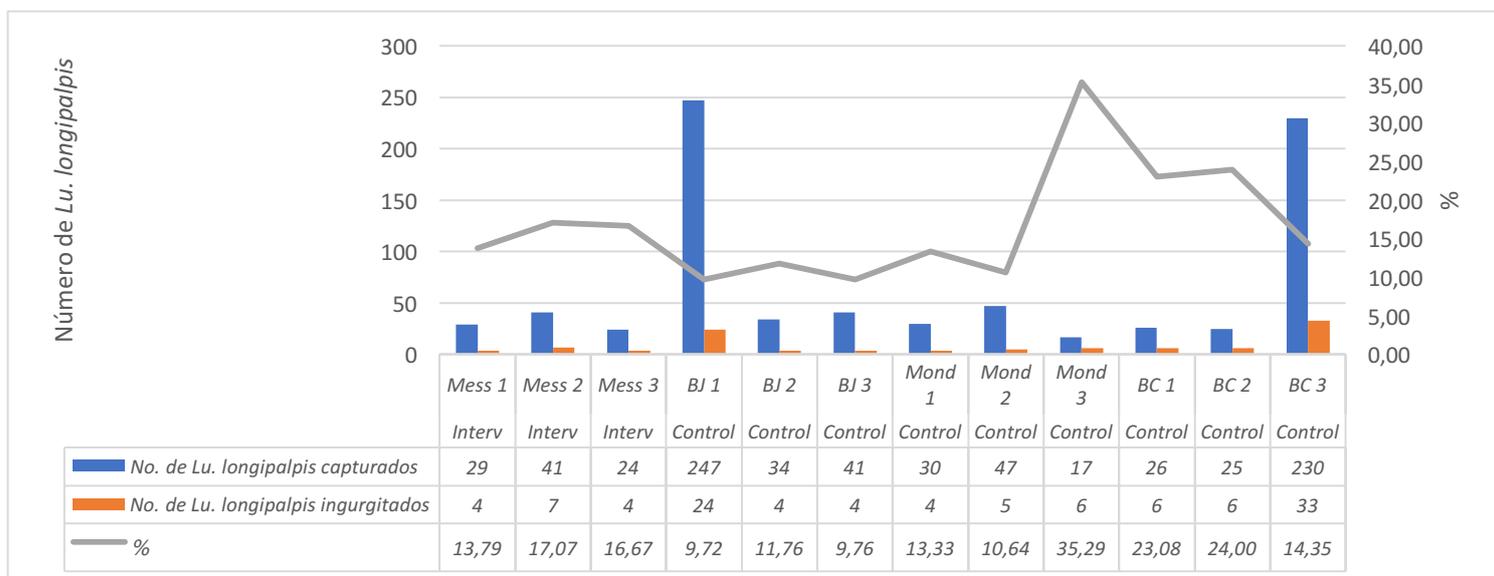


Figura 3. Percentual de *Lutzomyia longipalpis* ingurgitados por ponto de captura, Fortaleza/CE, 2013 a 2015.

A. Intradomicílio. B. Peridomicílio.

Em Montes Claros/MG, todos os pontos tinham peridomicílio com área maior do que 100m², presença de árvores de grande porte, principalmente mangueiras (70%) e goiabeiras (40%). Não foi observada muita variabilidade nas fontes alimentares disponíveis entre os pontos de captura. Todos apresentavam cães e aves (Tabela 3). Da mesma forma, em todos os pontos havia coleta de lixo e eram áreas saneadas.

Dos 40.792 exemplares de *Lu. longipalpis* capturados, 36.716 eram machos e 4.076 eram fêmeas. Na área controle, considerando o período completo de estudo, a abundância relativa foi de 5.660 exemplares por ponto de captura, enquanto que na área de intervenção foi de 2.499,4 exemplares. Quando avaliado este indicador por ponto de captura, diferenças consideráveis foram observadas (Tabela 4). Em Morrinhos 3, ponto pertencente a área controle de estudo, correspondeu a 52,8% do total de *Lu. longipalpis* capturados no período, entretanto, com maior variabilidade entre os bimestres (Tabela 4; Figura 4). Essa diferença de quantitativo capturado pode ser justificada pela presença, em grande quantidade, de aves. No peridomicílio deste ponto de captura havia uma criação de pombos, em regime de confinamento.

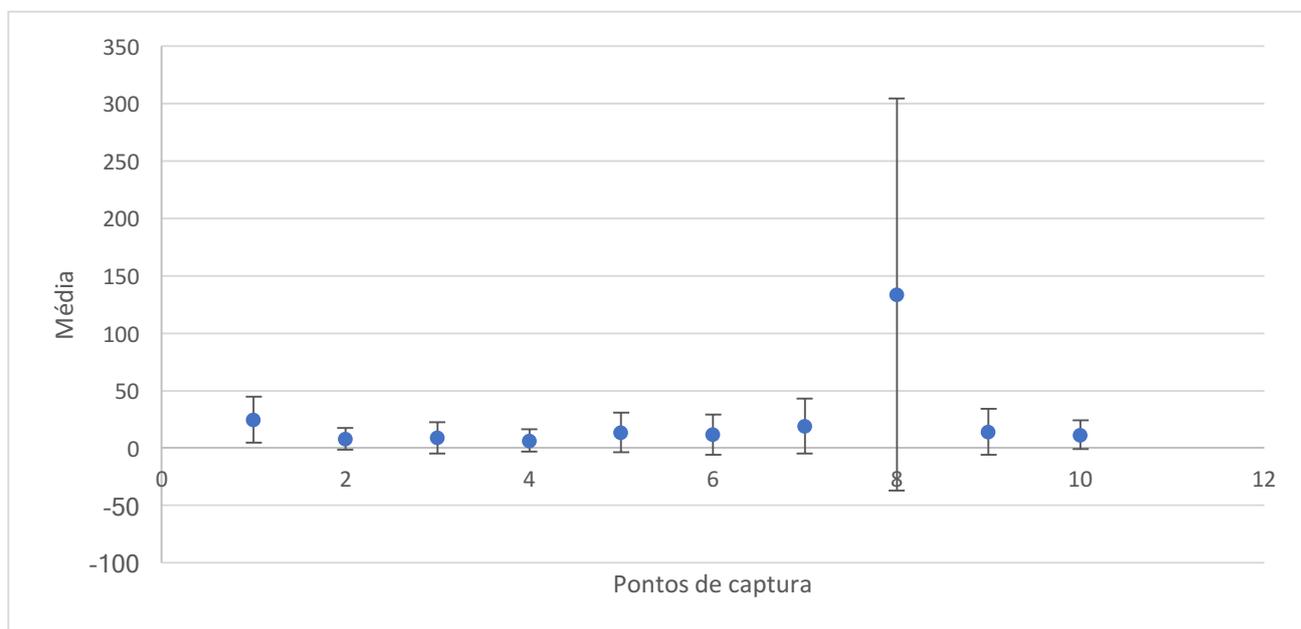


Figura 4. Média e desvio padrão do número de *Lutzomyia longipalpis* capturados, por ponto de coleta, Montes Claros/MG, 2013 a 2015

1. Vila Grace; 2. Maracanã 1; 3. Maracanã 2; 4. Maracanã 3; 5. Maracanã 4; 6. Morrinhos 1; 7. Morrinhos 2; 8. Morrinhos 3; 9. Morrinhos 4; 10. Dr. João Alves

A taxa de infestação domiciliar considerando todo o período de estudo foi de 100%, confirmando a ampla distribuição de *Lu. longipalpis* no município. Ao avaliar este indicador por bimestre, observou-se a permanência deste em níveis elevados durante todo o período de estudo (Figura 5). No 5º bimestre, correspondente aos meses de novembro e dezembro de 2013, as capturas foram negativas devido ao período de chuva no município.

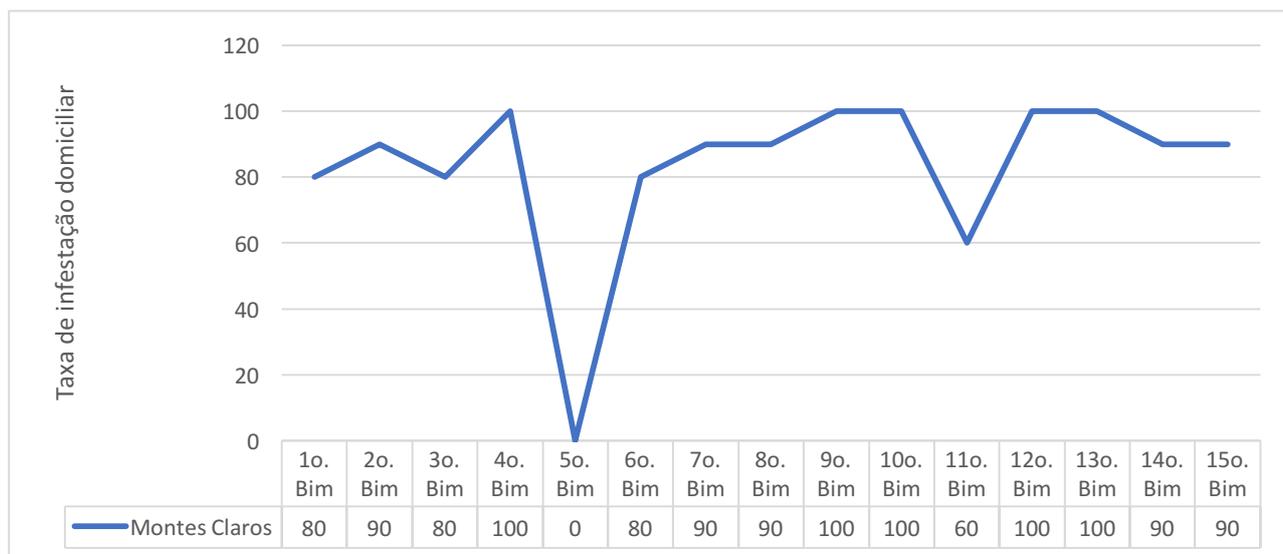
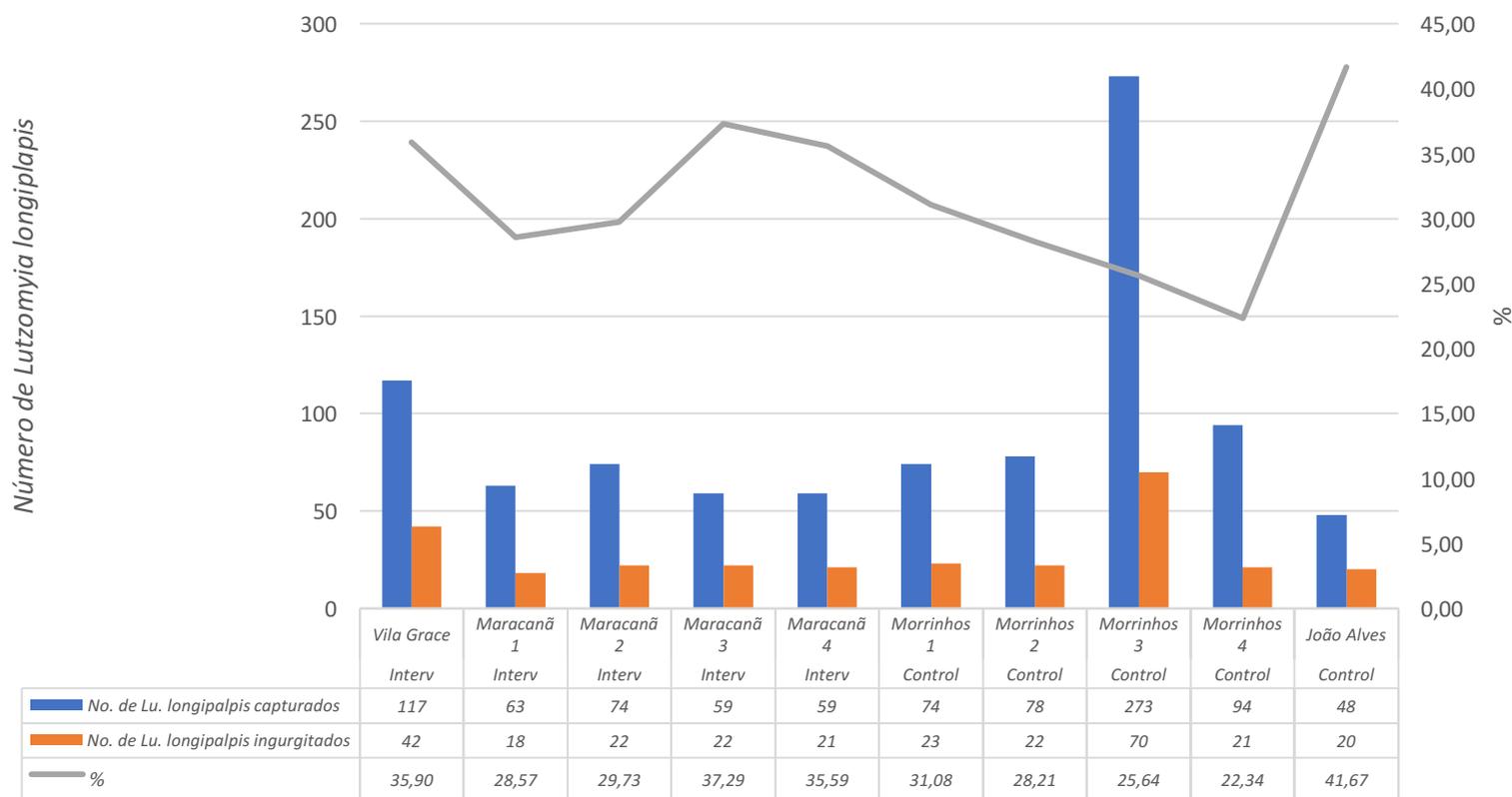


Figura 5. Taxa de infestação domiciliar, por bimestre, Montes Claros/MG, 2013 a 2015

No tocante ao percentual de fêmeas *Lu. longipalpis* alimentadas com sangue (ingurgitados), foi observado que 30% e 14% dos exemplares capturados no intra e peridomicílio, respectivamente, estavam ingurgitados. Quando avaliado por área (controle e intervenção) e local de captura observou-se maior percentual de fêmeas alimentadas no intradomicílio das áreas de intervenção, quando comparadas às áreas controles. Esse resultado era esperado, uma vez que protegendo os cães, os flebotomíneos poderiam se dispersar para o intradomicílio para, mais facilmente, realizar o repasto sanguíneo.

A



B

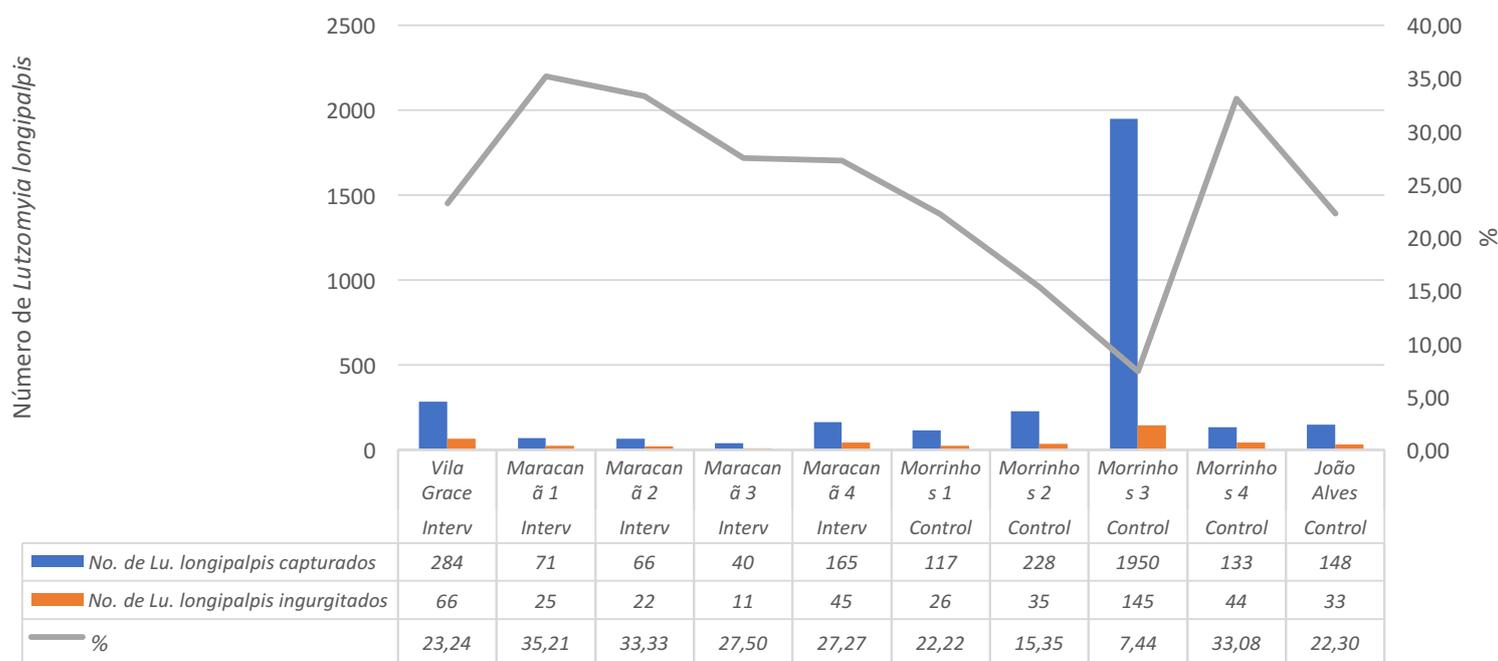


Figura 6. Percentual de *Lutzomyia longipalpis* ingurgitados por ponto de captura, Montes Claros/MG, 2013 a 2015. A. Intradomicílio. B. Peridomicílio.

Ponto de Coleta	Vila Grace	Maracanã 1	Maracanã 2	Maracanã 3	Maracanã 4	Morrinhos 1	Morrinhos 2	Morrinhos 3	Morrinhos 4	Dr. João Alves
Recolhimento de Lixo	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Saneamento básico	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Quantidade de moradores	>4	1 a 2	>4	>4	1 a 2	2 a 4	2 a 4	3 a 4	2 a 4	1 a 2
Presença de animais domésticos	Canino	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	Felino			x				x		
	Bovino									
	Suíno									
	Equino									
	Ave	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Tamanho do peridomicílio	>100 m2	>100 m2	>100 m2	>100 m2	>100 m2	>100 m2	>100 m2	>100 m2	>100 m2	>100 m2
Cobertura vegetal	Goiaba	x		x	x				x	x
	Manga			x	x	x	x	x	x	x
	Laranja		x						x	
	Caju			x						
	Limão		x						x	
	Outros	Pau Brasil, Abacate	Jaboticaba	Pinha		Acerola, Tamarindo	Mamão, Romã	Acerola	Siriguela, Cajá	

Tabela 3. Características ambientais, por ponto de captura e área (intervenção e controle), Montes Claros, 2013 a 2015.

Área	Ponto de captura	Bimestre															Total	Média	Desvio Padrão
		1o.	2o.	3o.	4o.	5o.	6o.	7o.	8o.	9o.	10o.	11o.	12o.	13o.	14o.	15o.			
Intervenção	Vila Grace	12	12	10	16	0	44	14	16	30	6	41	25	80	32	35	373	24,86	20,08
Intervenção	Maracanã 1	0	3	2	2	0	0	6	2	23	11	4	31	15	16	5	120	8	9,37
Intervenção	Maracanã 2	3	2	0	23	0	16	5	1	6	3	0	52	14	6	3	134	8,93	13,67
Intervenção	Maracanã 3	1	5	2	10	0	2	0	0	7	2	0	35	20	15	0	99	6,6	9,94
Intervenção	Maracanã 4	16	4	0	1	0	7	17	6	18	17	2	57	48	0	14	207	13,8	17,23
Controle	Morrinhos 1	16	12	3	12	0	0	1	7	6	5	1	71	10	23	9	176	11,73	17,62
Controle	Morrinhos 2	1	1	1	15	0	1	32	15	23	23	0	87	19	20	53	291	19,4	23,94
Controle	Morrinhos 3	14	18	24	86	0	17	48	58	120	36	39	283	555	412	294	2004	133,6	170,75
Controle	Morrinhos 4	0	14	2	5	0	8	10	8	4	3	0	33	64	54	9	214	14,26	20,01
Controle	João Alves	13	0	11	22	0	13	6	3	6	1	11	13	20	49	5	173	11,53	12,38
Total		76	71	55	192	0	108	139	116	243	107	98	687	845	627	427	3791		

Tabela 4. Número de *Lutzomyia longipalpis* capturados em Montes Claros/MG, por ponto, área e bimestre, 2013 a 2015.