UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO - UFOP

Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição

Laboratório de Epidemiologia das Doenças Parasitárias – LEPI

Prevalência da Leishmaniose Visceral Canina na Terra Indígena Xakriabá, norte de Minas Gerais, Brasil.

ANA MARIA SAMPAIO ROCHA

Ouro Preto, MG

Março de 2015

ANA MARIA SAMPAIO ROCHA

Prevalência da Leishmaniose Visceral Canina na Terra Indígena Xakriabá, norte de Minas Gerais, Brasil.

Orientador: *Dr. George Luiz Lins Machado Coelho* – Laboratório de Epidemiologia das Doenças Parasitárias, Escola de Medicina, Universidade Federal de Ouro Preto.
Co-orientador: *Dra. Erica Maria de Queiroz* – Laboratório de Fisiopatologia Molecular, Escola de Medicina, Universidade Federal de Ouro Preto.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em saúde e Nutrição.

Ouro Preto - MG
Março de 2015

R672p Rocha, Ana Maria Sampaio.
Prevalência da Leishmaniose Visceral Canina na terra indígena Xakriabá, norte de Minas Gerais, Brasil [manuscrito] / Ana Maria Sampaio Rocha. - 2015.
90f.: il.: color; grafs; tabs; mapas.

Orientador: Prof. Dr. George Luiz Lins Machado Coelho.
Coorientadora: Profa. Dra. Erica Maria Queiroz.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Programa em Saúde e Nutrição.
Área de Concentração: Saúde Coletiva.

1. Leishmaniose visceral. 2. Terra Indígena Xakriabá. 3. Diagnóstico molecular. I. Coelho, George Luiz Lins Machado. II. Queiroz, Erica Maria . III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Titulo.

CDU: 616.993.161

Catalogação: www.sisbin.ufop.br

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Nutrição – ENUT
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte e três dias do mês de março de dois mil e quinze, às catorze horas, na Sala Cinquenta e Um da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna **Ana Maria Sampaio Rocha**. A Banca Examinadora, definida anteriormente, foi composta pelos Professores Patricia Flávia Quaresma (Fiocruz), Lívia de Figueiredo Diniz (UFOP) e George Luiz Lins Machado Coelho (UFOP). Dando início ao exame, a aluna apresentou sua dissertação de mestrado intitulada: **"Prevalência de Leishmaniose Visceral Canina na Terra Indígena Xacriabá, norte de Minas Gerais, Brasil"**. Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado à dissertação. Após julgamento, os membros da Banca decidiram por:

☒ APROVAR ☐ REPROVAR

Patricia Quaresma
Profa. Dra. Patricia Flávia Quaresma (Fiocruz),
Examinadora Externa.

Lívia de Figueiredo Diniz
Profa. Dra. Lívia de Figueiredo Diniz (UFOP),
Examinadora Externa.

George Luiz
Prof. Dr. George Luiz Lins Machado Coelho (UFOP)
Orientador.

AMSRocha
Ana Maria Sampaio Rocha (UFOP),
Mestranda.

COLABORADORES:

Jaime Costa da Silva (DSEI/MG/ES)

Dra. Érica Maria de Queiroz (UFOP/MG)

Dr. Eduardo de Castro Ferreira (FIOCRUZ /MT)

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

Dr. Edelberto Santos Dias (FIOCRUZ /MG)

Dra. Hélida Monteiro de Andrade (UFMG/MG)

INSTITUIÇÕES PARCERIAS:

Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ

Universidade Federal de Minas Gerais

Distrito Sanitário Especial Indígena, Secretária de Saúde Indígena, Ministério da Saúde.

SUPORTE FINANCEIRO:

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

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

À Deus, por sempre iluminar cada momento da minha vida e proporcionar a realização do mestrado;

À minha família, em especial aos meus queridos pais, Joaquim Geraldo Rocha e Maria das Graças Sampaio Rocha, e aos meus irmãos Carlos, Marcelo e Leonardo, pelo amor, carinho, incentivo e torcida. Vocês são o que eu tenho de mais precioso!

Ao professor Dr. George Luiz Lins Machado Coelho, pela orientação, confiança, aprendizado, paciência, dedicação, incentivo, amizade e empenho durante todo o meu trabalho. E mais do que isso, por ser um exemplo de pesquisador, de ser humano, de ética, compromisso e sabedoria.

À Dra. Érica Maria de Queiroz, pela sua co-orientação nesse trabalho, pelo auxílio nas técnicas moleculares, pelos ensinamentos, dedicação e amizade.

Ao Jaime Costa da Silva, responsável técnico pelo Departamento de Zoonoses e Doenças Transmissíveis por Vetores da Secretaria Especial de Saúde Indígena do Ministério da Saúde, por toda a colaboração no desenvolvimento desse projeto na Terra Indígena Xakriabá.

Ao Dr. João Carlos França e Silva, pela disponibilidade, parceria e colaboração essencial na necropsia dos animais.

Ao Dr. Eduardo de Castro Ferreira, pelo aprendizado com as técnicas moleculares, pela paciência, amizade, incentivo e disposição em compartilhar suas experiências profissionais.

Ao Dr. Edelberto Santos Dias, pela colaboração ao emprestar todos os materias necessários para a atividade de necropsia.

A Dra. Hélida Monteiro de Andrade, pela colaboração em me auxiliar nas técnicas moleculares para caracterização das culturas isoladas.

À Secretaria Especial de Saúde Indígena, em Xakriabá, pela colaboração em toda a execução das atividades de campo realizada nas aldeias.

Aos agentes de zoonose do município de São João das Missões, pelo auxílio na coleta das amostras do inquérito e apoio ao trabalho de campo.

Aos indígenas Xakriabá, pela receptividade ao trabalho e permissão para avaliação dos cãe.

Aos amigos do Laboratório de Epidemiologia das Doenças Parasitárias (LEPI/UFOP), equipe fantástica, que colaborou direta e indiretamente para a realização do meu mestrado. Em especial, aos meus amigos Vivian, Aline, Keila, Gabi, Rosi e Cássio que além de colaborarem em atividades voltada ao meu projeto, estavam sempre disponíveis para compartilhar conhecimentos, companherismo e amizade.

A eterna República Bem Boladas e aos meus amigos PVICantina pelos momentos de conversas sérias e momentos de descontração. Vocês fizeram com que cada momento difícil, dessa trajetória, ganhasse leveza.

As minhas queridas amigas Helen, Letícia, Bruna, Ana Laura e Lívia. Agradeço pela amizade, paciência ao me escutarem falar do mestrado e quando me fizeram enxergar com bom humor, os desafios que foram surgindo em cada momento dessa trajetória. Obrigada por estarem sempre presentes!

Ao programa de Pós-graduação em Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, pela oportunidade oferecida para a realização do mestrado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

“Eu quase que não sei. Mas desconfio de muita coisa” (Guimarães Rosa)

Sumário

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

LISTA DE TABELAS ..... **xi**

ANEXOS ..... **xii**

LISTA DE ABREVIATURAS ..... **xiii**

RESUMO ..... **xv**

ABSTRACT ..... **xvii**

1. INTRODUÇÃO **1**

1.1 – As leishmanioses 1
1.2 – A leishmaniose visceral 2
1.3 – O reservatório canino 3
1.4 – O diagnóstico da LVC 5
1.5 - População negligenciada e a leishmaniose visceral 8
1.6 – A leishmaniose visceral e a terra indígena Xakriabá 9

2. JUSTIFICATIVA **12**

3. OBJETIVOS **14**

3.1 - Objetivo geral 14
3.2 – Objetivos específicos 14

4. METODOLOGIA **16**

4.1 - Desenho do estudo 16
4.2 - Período e área do estudo 17
4.3 - Questões Éticas e Fonte de Dados Epidemiológicos 18
4.4- Diagnóstico Sorológico e Critério de Positividade 19
4.5 - Eutanásia dos cães sororeagentes 19
4.6 – Necropsia 20
4.6.1 - Avaliação Clínica dos Animais 20
4.6.2 - Obtenção das Amostras Biológicas 20
4.7 – Diagnóstico parasitológico das amostras dos cães necropsiados 21
4.7.1 – Cultura e Isolamento das Cepas de *Leishmania* 21
4.7.2 – Exame Direto por Esfregaços e Aposição dos Tecidos 22
4.8 - Diagnóstico Molecular (Padrão Ouro) 23

4.8.1 - Extração de DNA 23
4.8. 2 – PCR Convencional 23
4.8.3 – Identificação das espécies de *Leishmania* 24
4.8.4 - Visualização dos resultados 25
4.9 - Processamento e análise de dados 25

5. RESULTADOS 28

6. DISCUSSÃO 39

7. CONCLUSÕES 46

8. PERSPECTIVAS 48

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 50

10. ANEXOS 69

Anexo II 70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama do fluxo do diagnóstico da LVC, na Terra Indígena Xakriabá 16

Figura 2 - Delimitação da Terra Indígena Xakriabá 18

Figura 3 - Gráfico de Prevalência da Leishmaniose Visceral Canina na Terra Indígena Xakriabá 28

Figura 4 - Gel representativo dos fragmentos de 120 pb dos produtos amplificados pela PCR-IRBP e PCR-kDNA 29

Figura 5 - Gel representativo dos fragmentos gerados pela PCR-RFL 29

Figura 6 - Mapa temático da distribuição da positividade canina pelo diagnóstico sorológico do ELISA, por polo base de saúde, na Terra Indígena Xakriabá 34

Figura 7 - Mapa temático da distribuição da positividade canina pelo diagnóstico sorológico do ELISA e o diagnóstico molecular PCR-kDNA, por polo base de saúde, na Terra Indígena Xakriabá 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Percentual de positividade do disgnóstico molecular (PCR-kDNA) 30

Tabela 2 - Análise do desempenho dos métodos sorológicos em comparação ao método moléculas (PCR-kDNA) 31

Tabela 3 - Percentual de positividade do disgnóstico molecular (PCR-kDNA) em relação aos grupos sorológicos 32

Tabela 4 - Diagnóstico molecular realizado em amostras dos cães necropsiados 33

Tabela 5 - Distribuição da soropositividade canina por aldeia e técnica sorológica 36

Tabela 6 - Distribuição da soropositividade canina em ambos testes sorológicos (ELISA e RIFI) 37

ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética Animal (CEUA/UFOP) 52
Anexo 2 – Roteiro para necropsia de cães em leishmaniose Visceral 53

LISTA DE ABREVIATURAS

CA – Cães assintomáticos

CEUA - Comitê de Ética Animal

CRMV – Conselho Regional de Medicina Veterinária

CS – Cães sintomáticos

CZ - Centro de zoonoses

CZ – Zona Cinza (Indeterminado)

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DPP - *Dual-Path Platform*

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

ELISA - - Teste imunoenzimático negativo

ELISA - Teste imunoenzimático

ELISA ZC - Teste imunoenzimático indeterminado

ELISA+ - Teste imunoenzimático positivo

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FN – Falso Negativo

FP - Falso Positivo

FUNAI – Fundação Nacional do Índio

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IRBP - Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein

kDNA - Ácido desoxirribonucléico do cinetoplasto

LIT - *Liver Infusion Tryptose*

LV - Leishmaniose visceral

LVC - Leishmaniose visceral canina

LVH - Leishmaniose visceral humana

PCR - Reação em cadeia da polimerase

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

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

RIFI- - Reação de Imunofluorescência Indireta negativa

RIFI+ - Reação de Imunofluorescência Indireta positiva

SIH - Sistema de Informações Hospitalares

SIM - Sistema de Informações sobre Mortalidade

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TIX – Terra Indígena Xakriabá

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto

VN -Verdadeiro Negativo

VP - Verdadeiro Positivo

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

RESUMO

A terra indígena Xakriabá está localizada em área endêmica para a zoonose Leishmaniose Visceral (LV) no norte de Minas Gerais. A LV é uma parasitose relevante, apresentando elevada mortalidade em casos humanos não tratados. Os cães são considerados os mais importantes reservatórios domésticos da LV. O diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, o controle do inseto vetor e a eutanásia de cães infectados são ações adotadas no controle da doença. Medidas de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), preconizadas pelo Ministério da Saúde (MS), não tem sido efetivas. Um dos motivos é a permanência de reservatórios caninos nas áreas endêmicas, geralmente por falhas no diagnóstico sorológico, pela demora na retirada sistemática de parte dos cães soropositivos e soroconversão de animais indeterminados não retirados de área contribuindo assim para a manutenção do ciclo da doença. No ano de 2011, os métodos diagnósticos sorológicos para LVC, recomendados pelo MS, eram o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) como método de triagem e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (titulação > 1:40) como teste confirmatório. No entanto, esses testes sorológicos apresentam limitações podendo apresentar taxas subestimadas de infecção (falso-negativos) e resultados sorológicos indeterminados (zona cinza). O objetivo desse trabalho foi determinar as prevalências para LVC por diferentes métodos de diagnóstico utilizando amostras de sangue dessecado em papel de filtro (SDPF). As técnicas sorológicas utilizadas foram o ELISA e a RIFI. O diagnóstico molecular foi realizado a partir da técnica PCR-kDNA para o gênero *Leishmania* utilizando o iniciador A: 5´ (C/G) (C/G) (G/C) CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3´ e iniciador B: 5´ GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3´ que amplificamcam a região conservada do minicírculo do DNA do cinetoplasto do parasito. Os animais foram agrupados em diferentes perfis sorológicos: ELISA+/RIFI+, ELISA+/RIFI-, indeterminado em ELISA/RIFI+, indeterminado em ELISA/RIFI-, ELISA-, e realizada a comparação de proporções do diagnóstico molecular positivo para cada um dos desses grupos. Os resultados da prevalência da infecção determinada pela ELISA foi 33.3% (317/950), pela RIFI 15.4% (69/447) e pela PCR kDNA foi igual a 14,8% (140/948). A porcentagem dos resultados positivos utilizando a técnica molecular do diagnóstico molecular variou significativamente ($p<0.001$) de acordo com o perfil sorológico: ELISA+/RIFI+ (n=41; 36,6%); ELISA+/RIFI- (n=276; 17,7%), indeterminado em ELISA/RIFI+ (n=28; 57,1%), indeterminado em ELISA/RIFI- (n=100; 15,0%), ELISA- (n= 503; 8,9%). A

técnica do ELISA demonstrou que sensibilidade de 45,7 % e especificidade de 68,7 %. Já a técnica de RIFI apresentou a sensibilidade de 32% e a especificidade de 89%. A acurácia da técnica do ELISA foi de 9,5% e do RIFI foi de 24,2%, o que demonstra que o primeiro teste foi menos concordante do que o teste RIFI em relação ao diagnóstico molecular (PCR-kDNA). Dessa forma, o diagnóstico molecular permitiu identificar falhas no diagnóstico quando comparados aos métodos sorológicos no diagnostico infecção do cão, comprometendo as medidas de controle da doença na terra indígena Xakribá.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral, Terra Indígena, testes sorológicos, diagnóstico molecular, cães infectados e *L. infantum.*

ABSTRACT

The indigenous land of Xakriabá is located in an endemic region for zoonosis Visceral Leishmaniasis (VL) in the north of Minas Gerais. VL is a relevant disease with high mortality in untreated human cases. Dogs are considered the most important domestic reservoir of VL. Treatment of human cases, the insect vector control and euthanasia of infected dogs are actions taken to control the disease. Surveillance measures and control of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL), recommended by the Health Ministry (HM), have not been effective. One reason is the permanence of canine reservoirs in the endemic areas, usually for failure of serological diagnosis, the delay in the systematic removal of parts of seropositive dogs and seroconversion of indeterminate animals not removed from the area, leading to the preservation of the disease cycle. In 2011, the serological diagnosis methods for LVC, recommended by HM, were the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), as a screening method and the Immunofluorescence Assay (IFA) (titration> 1:40), as a confirmatory test. However, these serological tests have limitations and may have underestimated rates of infection (false negatives) and serological indeterminate results (gray zone). The aim of this study was to determine the prevalence for CVL through different methods of diagnosis using samples of dried blood on paper filter (DBPF). The serological techniques used were ELISA and IFA. The molecular diagnosis was made from the PCR-kDNA technique for Leishmania using the starter A: 5'(C / G) (C / G) (G / C) CC (C / A) CTA T (T / A) T ACC AAC TAC CCC 3' and the starter B: 5'GAG GGG GGG CGT TCT GCG AA 3' which amplify the conserved region of the DNA minicircle of the parasite's kinetoplast. The animals were grouped into different serological profiles: ELISA + / IFA + ELISA + / RIFI- indeterminate ELISA / IFA + indeterminate ELISA / RIFI-, Elisabeth, and a comparison of the positive molecular diagnostic ratios for each of these groups was performed. The results of the prevalence of certain infection by ELISA was 33.3% (317/950), 15.4% by IFAT (69/447) and PCR kDNA was equal to 14.8% (140/948). The percentage of positive molecular diagnosis varied significantly ($p < 0.001$) according to the serological profile: ELISA + / IFAT + (n = 41; 36.6%); ELISA + / RIFI- (n = 276; 17.7%), unspecified for ELISA / IFA + (n = 28; 57.1%), unspecified for ELISA / RIFI- (n = 100; 15.0%), Elisabeth (n = 503; 8.9%). The ELISA technique showed a sensitivity of 45.7% and the specificity was 68.7%. Already the IFA

technique achieved the sensitivity of 32.0% and specificity of 89.0%. The reproducibility of the ELISA technique was 9.5% and IFA was 24.2%, which shows that the first test was less consistent than the IFA in relation to molecular diagnosis (kDNA-PCR). Thus, the molecular diagnosis showed high frequency of failure diagnosis of serological methods regarding the dog's infection, compromising the disease control measures in the indigenous land of Xakribá.

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

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 – As leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de enfermidades, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, os quais, transmitidos por via vetorial, induzem patogenicidade e alterações clínicas bem distintas entre si. Esse complexo de doenças pode comprometer pele, mucosas e vísceras, acometendo tanto o homem quanto os animais. As mesmas possuem grande importância para a saúde pública por apresentar alta dificuldade no que se refere ao controle epidemiológico, além de possuírem ampla distribuição. Segundo, a Organização Mundial de Saúde (2010), as leishmanioses são definidas, como enfermidades em expansão e para as quais não se dispõe de instrumentos de controle adequados. Estima-se, que ocorram 1,3 milhões de novos casos e, que anualmente, 20.000 a 30.000 pessoas venham a morrer por essa infecção (LAISON & SHAW, 1987; WHO, 2014).

A infecção é ocasionada pelo parasita do gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida, família Trypanossomatidae (Ross, 1903). É um parasita digenético, que altera a sua morfologia entre o hospedeiro vertebrado e invertebrado. Nos hospedeiros mamíferos, de diferentes ordens, assumem a forma amastigota que invade e multiplica-se nas células do sistema monocítico fagocitário (SMF). A forma promastigota está presente no meio extracelular, na luz do trato digestivo dos flebotomíneos (BIGELI, OLIVEIRA JÚNIOR e TELES, 2012; PALATNIK-DE-SOUSA DAY, 2011).

A transmissão dos parasitos do gênero *Leishmania*, se dá por fêmeas de dípteros pertencentes à família Phlebotominae sendo os gêneros *Lutzomyia* presentes no Novo Mundo (FRANÇA, 1924), e os gêneros *Phlebotomus* existentes no Velho Mundo (RONDANI, 1840). Existe grau variável de especificidade entre as espécies de *Leishmania* e o hospedeiro invertebrado (GONTIJO & MELO 2004), podendo assim, somente algumas espécies serem incriminadas como vetores.

As leishmanioses possuem formas clínicas distintas podendo ser agrupadas como: leishmaniose cutânea, caracterizada pelo aparecimento de ulcerações na pele; a leishmaniose cutâneomucosa, doença que pode provocar deformidades irreversíveis, principalmente na face dos pacientes; a leishmaniose cutâneodifusa, responsável por lesões nodulares não ulcerativas

disseminadas em todo o corpo e a leishmaniose visceral (LV), sendo essa a forma mais grave, que pode evoluir para o óbito quando não tratada (REITHINGER et al., 2007; WHO, 2014).

A distribuição das leishmanioses se faz mundialmente em regiões tropicais e subtropicais, tendo a capacidade de se adaptar a diferentes ecossistemas (WHO, 2014). Nas Américas, o Brasil se destaca como o país de maior número de ocorrências descritas destas zoonoses e, Minas Gerais, é o estado da região sudeste que apresenta o maior registro de casos da doença (ALVAR et al., 2012; BASIL 2006).

Os diferentes padrões de transmissão existentes, no Brasil, devido à diversidade de agentes, hospedeiros, reservatórios, situação epidemiológica e vetores ocorrendo em diferentes ecossistemas, resultam na dificuldade do controle (CURTI, 2009). As dinâmicas regionais e locais vão se diferenciando em aspectos geográficos específicos que estão relacionados aos parasitos, vetores, ecossistemas e processos sociais.

1.2 – A leishmaniose visceral

A LV é endêmica em 88 países, tendo aproximadamente de dois a quatro milhões de casos registrados por ano no sul da Europa, América Central e Sul, África e Ásia (ALVAR et al., 2012). Assim como outras doenças tropicais, os dados epidemiológicos são incompletos, e os dados oficiais subestimam o real problema da doença no mundo, uma vez que a LV é de notificação compulsória em apenas 40% dos países em que ocorre (THAKUR, 2000; ALVAR et al., 2012).

A espécie responsável pela LV, no Brasil, é *a Leishmania infantum*, atualmente, considerada sinonímia da *Leishmania chagasi* (ROMERO & BOELART, 2010; LUKES et al., 2007). A principal espécie vetora, responsável pela transmissão do parasita no Novo Mundo é o *Lutzomyia longipalpis* (GENARO, 2002; FRANÇA-SILVA et al., 2005), embora o *Lutizomyia evansi* seja o vetor em parte da Colômbia e Venezuela (TRAVI et al., 1990; BENDEZU et al., 1995).

O cão, quando infectado, é considerado o mais importante reservatório doméstico e, certamente contribui para a mudança no perfil epidemiológico da doença, uma vez que a ocorrência de casos caninos geralmente precede o surgimento de casos humanos (MARZOCHI et al., 1994; OLIVEIRA et al., 2000; BORGES et al., 2014; TEIXEIRA-NETO, 2014).

No Brasil se destaca em número de casos humanos, apresentado 95% dos casos registrados nas Américas (ALMEIDA et al., 2013). A parasitose vem demonstrando expansão, principalmente em áreas urbanas, e somente no ano de 2012 foram notificados 3.038 casos humanos, com uma incidência de ordem de 1,57/100.000 habitantes e uma taxa de letalidade de 7,1%. O grupo mais acometido são crianças com até nove anos de idade, compreendendo 41,9% dos casos humanos no país. Dos 27 estados brasileiros 25 já notificaram casos autóctones da doença (BRASIL, 2012).

No entanto, mesmo com o registro compulsório dos casos de leishmanioses, as subnotificações ainda são elevadas. Essas falhas estão relacionadas aos sistemas de informações e aos métodos de captura-recaptura dos casos. SOUZA-GOMES et. al (2007), ao analisar casos confirmados de LV com base nos sistemas de informação, constaram uma subnotificação de 42,2% e 45,0% no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) em relação ao Sistema de Informações Hospitalares (SIH) e Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM).

A LV tem grande importância na saúde pública devido à sua ampla distribuição e alta letalidade, principalmente em crianças desnutridas, idosos, pacientes portadores de co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana e em pacientes não tratados (HOMMEL et al., 1995; GUERIN et al., 2002; WHO, 2010). O processo de expansão da doença é observado em quase todo o território brasileiro, principalmente em áreas com crescente urbanização e alto índice de pobreza (CESSE et al., 2001; CERBINO-NETO et al., 2009). O aumento das notificações de casos de leishmanioses na região norte de Minas Gerais, em cidades como Montes Claros, Janaúba e Varzelândia, ilustram o processo de expansão dessa zoonose no Estado (FRANÇA-SILVA et al., 2003; MICHALSKY et al., 2011; DIAS et al., 2007).

1.3 – O reservatório canino

O cão (*Canis familiares)* ocupa posição de destaque na epidemiologia da LV (BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEGO, 2012). Nas Américas, o Brasil se destaca como o país com maior prevalência de LVC (BANETH et al., 2008; BANETH & SOLANO-GALLEGO, 2012). Essa prevalência da infecção canina varia de 4% a 75%, dependendo da região avaliada e do método de diagnóstico utilizado (CAMARGO-NEVES et al., 2001; FRANÇA-SILVA et al., 2003; MICHALSKY et al., 2011; DIAS et al., 2007; ALMEIDA et al., 2010; COURA-VITAL et

al., 2011; FELIPE et al., 2011; BIGELI et al., 2012; SILVEIRA et al., 2012; FIGUEIREDO et al. 2014).

O acometimento do cão por LV tem importância considerável, devido ao fato desse ser um reservatório competente para a zoonose, apresentar uma estreita relação com os seres humanos e pela infecção canina ser mais prevalente e apresentar um grande número de animais assintomáticos (MARZOCHI, 1985; LAURENTI et al., 2013).

BANETH et al. (2008) observaram que cães infectados, assintomáticos, possuíam cerca de 20% de parasitismo cutâneo, albergando assim o parasita na derme e garantindo a transmissão da doença. O cão, portanto, é considerado uma importante fonte de infecção para os vetores, sendo encontrado em todos os focos da doença humana e caracterizado como o principal reservatório doméstico na cadeia de transmissão da LV (DEPLAZES et al., 1995; MAIA et al., 2010). Vários autores se posicionam a favor da retirada dos cães infectados, como medida de controle na transmissão da infecção (CAMARGOS-NEVES et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2000; FRANÇA-SILVA el al., 2003; MAIA et al., 2008; PRADO et al., 2011).

Em um estudo de intervenção realizado por ASHFORD et al. (1998), no município de Jacobina, estado da Bahia, áreas em que ocorreu eliminação de cães soropositivos para LVC, foi demonstrado uma redução na prevalência dessa doença no cão, 36% para 10%. Já a área controle em que os cães foram examinados, mas onde os cães soropositivos não foram removidos, a incidência da infecção canina veio a aumentar, variando de 16% a 27%. Além disso, houve uma diminuição significativa nos casos humanos depois do início dessa intervenção, sugerindo que a eliminação de cães soropositivos pode afetar a incidência de casos da LV canina e humana.

Diante dessas evidências, o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) do Ministério da Saúde (MS) (MORENO et al., 2002; ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008) vem preconizando a eutanásia dos cães sororeativos (Brasil 2006). No entanto, para o efetivo controle dessa infecção, faz-se necessário que essas ações, sejam realizadas o mais breve possível, não devendo ultrapassar 90 dias após o diagnóstico. Segundo COURTENAY et al. (2002), seriam necessários 105 dias após a soroconversão para o cão se tornar fonte de infecção para flebotomíneos; segundo esses autores o xenodiagnóstico poderia ser positivo aproximadamente seis meses após ter sido picado por fêmeas de flebotomíneos infectadas.

No entanto, essa medida de controle provoca grande discussão e falta de consenso entre os especialistas. Ao contrário dos autores anteriormente citados, vários autores também são

contrários a retirada dos cães infectados como medida de controle de saúde pública. SABROZA et al. (1992), EVANS et al. (1992), CERBINO et al. (2009) e COSTA (2011) não observaram associação entre a positividade canina e os casos de LV humana, questionando a eutanásia de cães soropositivos. DIETZE et al. (1997) ao realizar um estudo de intervenção, no estado do Espírito Santo, observou que em áreas que nas quais houve a eliminação de cães sororeativos, a positividade humana aumentou na mesma proporção que na área onde não houve remoção dos cães infectados por *Leishmania.*

Um dos motivos para essas discordâncias é a falta de acurácia dos métodos sorológicos empregados no diagnóstico da infecção por *Leishmania* sp. A avaliação sorológica do cão não conta com métodos diagnósticos 100% sensíveis e específicos (FERREIRA et al, 2007; GRIMALDI et al. 2012; QUINNEL et al. 2013). Outro motivo, como citado anteriormente, é a demora da retirada do reservatório infectado. COSTA et al. (2011) acreditam que a transmissão da LV entre humanos deve ser mais bem investigada para se mensurar o potencial real do cão como reservatório da doença.

1.4 – O diagnóstico da LVC

A LVC é uma enfermidade crônica e cuja evolução está relacionada a diferenças genéticas entre as raças e indivíduos e a ativação de resposta imunológica de cada animal (SANCHEZ-ROBERT et al. 2008). Em relação a LVC o tamanho da pelagem, habitação, presença de outros reservatórios e status imunológico do cão podem estar associados à susceptibilidade para o desenvolvimento da infecção por LV (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001; FRANÇA-SILVA et al., 2003; BARBOZA et al., 2006; DANTAS-TORRES 2006).

O processo da infecção no animal nem sempre reproduz sintomas clínicos, sendo o período de incubação da doença extremamente variável (NELSON & COUTO, 2001; SOLANO-GALLEGO, 2009). As alterações causadas pela LVC são consequência da ação direta do parasita e da deposição de imunocoplexos em vários órgãos e tecidos afetados, condição esta que pode desencadear sintomas variados, desde aparentemente sadio até o grave estado terminal (NOLI, 1999; SOLANO- GALEGO, 2009). Dentre os principais sinais e sintomas clínicos no cão estão

as lesões cutâneas, linfoadenopatia, perda de peso, anemia, afecções oculares, onicogrifose, e esplenomegalia (BRASIL 2006; DIOUANI et al., 2008).

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

O teste parasitológico é o padrão ouro no diagnóstico das leishmanioses e é imprescindível na rotina da saúde pública. Este consiste em uma metodologia de demonstração direta em esfregaços, impressões teciduais (*imprint*) ou no cultivo do parasita. É um método invasivo, mas que apresenta especificidade de 100% ao nível de gênero. No entanto, a sensibilidade da mesma é afetada pelo grau de parasitismo do indivíduo. Nos cães sintomáticos, os métodos parasitológicos podem apresentar 80% de sensibilidade. Já nos cães oligossintomáticos e principalmente nos assintomáticos, a sensibilidade desses métodos diminui (BRASIL 2006; BANETH E AROCH 2008).

O diagnóstico imunológico tem sido amplamente empregado na determinação da prevalência da infecção canina (ABRANCHES et al., 1998). Até o ano de 2011, era preconizada pelo MS a realização de inquéritos soroepidemiológico utilizando o ensaio imunoenzimático (ELISA) para a triagem e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) como exame confirmatório (BRASIL, 2006). Atualmente, os métodos preconizados pelo MS são o teste imunocromatográfico DPP como triagem e a ELISA como método confirmatório (Nota Técnica Conjunta N°01/2011).

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

O teste de ELISA foi descrito em 1971 (ENGVALL & PERLMAN, 1971), sendo introduzido em 1976, porHOMMEL (1976) no diagnóstico das leishmanioses. É o teste mais utilizado para imunodiagnóstico de LV, por ser automatizado, rápido, de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a RIFI. A sensibilidade e especificidade do mesmo podem variar de acordo o antígeno utilizado ou com alterações que venham a sofrer o protocolo. Assim, a sensibilidade e especificidade da técnica podem variar entre 90 e 100% e entre 71 e 100%, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2005; ZANETTE et al., 2006; MIRÓ et al., 2008; SILVA et al., 2012).

A RIFI, descrita pela primeira vez em 1964 por DUXBURY & SADUN, apresenta, para amostras de soro de animais infectados, sensibilidade que varia entre 87 e 100% e especificidade de 80 a 100% (MACHADO et al., 2007; METTLER et al., 2005; ZANETTE, 2006). A baixa especificidade apresentada é devida a reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos (FERREIRA, 2007; ZANETTE, 2008). Além disso, é uma técnica que não possibilita leitura automatizada o que necessita de profissionais capacitados e inviabiliza a análise de um grande número de amostras.

Os teste imunocromatográficos, ou testes rápidos como também são chamados, utilizam como antígeno o rK39, tem sido amplamente empregados no diagnóstico de LV humana e canina. São testes de simples execução e de resultado rápido, podendo ser realizados com amostras de sangue total, de soro ou plasma. Além disso, a execução desses testes não necessita de todo o aparato do laboratório, podendo ser realizado em campo em inquéritos epidemiológicos. A sensibilidade e especificidade dessa técnica variam entre 77% e 91,5%, e 61 a 100%, respectivamente (REITHINGER et al., 2002; ZANETTE, 2006; LEMOS et al., 2008; LIMA et al., 2010). Em comparação com os testes sorológicos ELISA e RIFI, os testes imunocromatográficos apresentam sensibilidades e especificidades inferiores, condição essa que faz com que alguns autores afirmem que o seu uso limita o diagnóstico confirmatório (LIMA et al., 2010; SILVA, 2012).

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

Diante das limitações apresentadas pelas técnicas de diagnóstico imunológico, o método molecular tem sido amplamente empregado. Com o progresso da biologia molecular e o advento da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR - (SAIKI et al., 1985), esse tipo de teste diagnóstico tornou-se sensível e de identificação rápida do parasita. RODGERS et al. (1990) mostraram que a técnica de PCR é capaz de detectar o kDNA equivalente a um parasita e, a partir de então, esta técnica passou a ser utilizada no diagnóstico da LV (CUPOLLILLO et al.,1994; DEGRAVE et al., 1994). O diagnóstico molecular quando comparado com outras técnicas, apresenta maior sensibilidade e especificidade utilizando mesmo material biológico (FERREIRA, 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Além de maior acurácia, essa técnica permite detectar o início da infecção, ao contrário da sorologia que tem maior aplicabilidade em estágios mais avançados da doença. Mesmo com várias vantagens, o diagnóstico molecular não é acessível na rotina da vigilância epidemiológica.

1.5 - População negligenciada e a leishmaniose visceral

A LV é uma enfermidade prevalente em condições de pobreza, que contribui para a manutenção da exclusão social e o quadro de desigualdade em saúde (CARNEIRO, 2013). O processo de ocorrência dessa infecção conta com determinantes, que na maioria das vezes, estão relacionadas a populações negligenciadas. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (2010), mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, o que representa um sexto da população mundial. Os determinantes como pobreza, migração, ocupação humana desorganizada, condições precárias de habitação e saneamento e a ocorrência de desnutrição estão intimamente associadas a indivíduos mais carentes ou vulneráveis (WERNECK, 2010).

Assim, como outras doenças transmissíveis, a LV apresenta maior impacto e incidência em populações que são negligenciadas diante das determinantes impostas pelas políticas econômicas e sociais. As condições socioeconômicas e socioambientais, existentes no contexto de vida dessas populações interagem no processo de transmissão da doença, permitindo não apenas o aumento dos coeficientes de incidência, morbidade e letalidade, mas também expansão geográfica e a geração de diferentes perfis de acometimento (NEGRÃO & FERREIRA, 2014).

Condições socioeconômicas e socioambientais interagem na eco-epidemiologia da LV. SHERLOCK (1996), em um estudo realizado na Bahia, observou que a prevalência de cães infectados, a desnutrição dos indivíduos e a densidade vetorial estavam associadas a péssimas condições sanitárias e baixo nível sócio-econômico da população. Esse fato vem de encontro com os achados de CESSE et al. (2001), no estado de Pernambuco, que verificaram que as baixas condições financeiras e habitações precárias favoreceram a infecção por *L. infantum* em seres humanos. OLIVEIRA et al. (2001), por meio da análise espacial, associou a presença de LV humana à densidade de infecção canina, nas diferentes microrregiões de Belo Horizonte, assim como à presença de áreas com alta densidade vetorial, e condições socioeconômicas inadequadas.

Os indígenas são parte constituinte das populações negligenciadas, e sofrem como os demais com diversas doenças infecto parasitárias. Esses povos apresentam taxas de mortalidade e morbidade, por doenças infecto parasitárias, três a quatro vezes maiores que a população brasileira não indígena (ESCOBAR, 2003; SERAFIM, 2004). Tal condição está associada a determinantes como: má nutrição, carência de saneamento básico e convívio próximo a animais, favorecendo a transmissão de diversas parasitoses (PENA, 2004; SOUZA et al., 2014). A LV está incluída no perfil de morbimortalidade indígena e, tem como um importante determinante de risco o estado nutricional do indivíduo, fator esse que está atrelado às baixas condições socioeconômicas (COIMBRA JR. & SANTOS, 2001; SCRIMSHAW & SANGIOVANNI, 1997).

1.6 – A leishmaniose visceral e a terra indígena Xakriabá

Os povos indígenas existentes, no Brasil, constituem menos de 0,4% da população total do país. A estimativa é que existam 305 etnias distribuídas em quase todo o território nacional, sendo aproximadamente 817,9 mil indígenas (IBGE, 2013). Essa é uma população que sofre com as mudanças socioculturais, econômicas e ambientais e que, além disso, é marcada pela desassistência à saúde.

A implementação da Política Nacional de Atenção à Saúde dos Povos Indígenas, a mais de 10 anos, com a criação dos Distritos Sanitários Especiais Indígenas (DSEI), não sanou a deficiência na gestão de informação em saúde, não contemplando censos ou outros inquéritos que

venham propiciar a construção de um perfil epidemiológico dessa população (Coimbra Jr. e Santos, 2001). Poucos são os registros e quando esses existem as responsáveis por esses dados parciais são a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), a Fundação Nacional do Índio (FUNAI) e outras organizações não-governamentais as fornecedoras (SANTOS et. al., 2014).

Assim como para as outras doenças infecto parasitárias, raros são os relatos na literatura acerca da LV nessa população, principalmente, quando se trata dos estudos dos reservatórios domésticos. Segundo ANTÔNIO et al. (2010), dentre os 63 cães procedentes a Terra Indígena Krenak, 29 estavam positivos, com prevalência igual a 46%. O agente etiológico detectado nessa TI, através do diagnóstico molecular, foi a *Leishmania infantum*.

Na Terra Indígena Xakriabá,(TIX) localizada no município de São João das Missões, na região norte do estado de Minas Gerais, QUARESMA et al. (2011) observaram uma soroprevalência canina de 15,31% analisando cães de duas das 32 aldeias existentes. Nessa mesma Terra Indígena (TI), RÊGO et al. (2014) relataram, que em uma dessas aldeias, a principal espécie vetora coletada foi a *Lu. longipalpis*.

O mesmo programa, proposto pelo MS, tem como o objetivo a redução das formas graves, diminuição das taxas de letalidade e o grau de morbidade, assim como os níveis de transmissão da doença (BRASIL, 2010; 2011). Diante dos raros estudos e da carência de informações a cerca da epidemiologia da LV, em terras indígenas, a condução do que é proposto pelo PVC-LV não é executada ou não é registrada.

A TIX apresenta vários pontos importantes para a busca de informações a cerca da LV. A reserva esta situada em área endêmica para as leishmanioses. Estudos apontaram presença do vetor/hospedeiros e nenhum inquérito canino abrangente foi realizado a fim de prever e impedir os casos humanos. Além disso, segundo observações de SIRIO (2012), nas crianças (0 a 12 anos) Xakriabá, a prevalência da desnutrição recente (Peso/Idade) é igual a 6,3%, e a pregressa (Altura/Idade) igual a 16,3%. Dessa forma, frente a presença de grupos populacionais vulneráveis fica evidente a necessidade de determinar a prevalência da infecção por *Leishmania* sp no reservatório canino, e as área de risco, a fim de otimizar as medidas de controle da doença.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A LV é endêmica em vários municípios da região onde está localizada a TIX, como observado nas áreas urbanas de alguns municípios do norte de Minas Gerais, como em Montes Claros, Janaúba e Varzelândia, ilustrando o processo de expansão dessa zoonose no Estado (FRANÇA-SILVA et al., 2003; MICHALSKY et al., 2011; DIAS et al., 2007). Esses estudos tem destacado a importância do cão na consolidação da endemia nessas áreas geográficas, muitas vezes antecedendo o aparecimento de casos humanos.

Pouco se conhece sobre a prevalência da leishmaniose na população canina na TIX, e sobre o papel do cão na cadeia epidemiológica da doença nessa área. Além disso, parâmetros epidemiológicos necessitam ser estabelecidos para subsidiar as ações de controle, a fim de estimar o risco a que essa população está exposta.

A relevância desse trabalho, portanto, está respaldada na falta de informação sobre a amplitude dessa zoonose na TIX, e na necessidade de esclarecer algumas limitações do uso do sangue dessecado em papel filtro no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Estimar a prevalência da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) na Terra Indígena Xakriabá, segundo parâmetros sorológicos e moleculares.

3.2 – Objetivos específicos

1. Determinar a prevalência da LVC na TIX, por método sorológico e molecular;
2. Avaliar o desempenho da sorologia utilizando eluato de sangue dessecado em papel filtro Klabin nº 1, em relação à PCR, utilizada como indicativo de presença/ausência da infecção na população canina;
3. Determinar a correlação entre os resultados obtidos, validando os testes sorológicos utilizados a partir da acurácia dos mesmos;
4. Determinar a prevalência da sorologia indeterminada, e sua correlação com o método molecular;
5. Identificar a espécie do parasito do gênero *Leishmania*, utilizando a PCR-kDNA;
6. Determinar a presença de infecção em diferentes tecidos de uma amostra de cães infectados;
7. Caracterizar a espécie do parasito;
8. Apresentar a distribuição espacial da infecção na área de estudo.

METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1 - Desenho do estudo

O estudo foi do tipo transversal censitário para identificação de cães com sorologia positiva para a leishmaniose. As mesmas amostras passaram por diagnóstico molecular, sendo possível a identificação das espécies de *Leishmania* sp. responsáveis pela infecção do cão (Figura 1). Tendo como base os domicílios em que houve a coleta da amostra canina, os dados gerados foram georreferenciados para a construção de um sistema de informação cartográfico-epidemiológico dessa terra indígena de Minas Gerais.

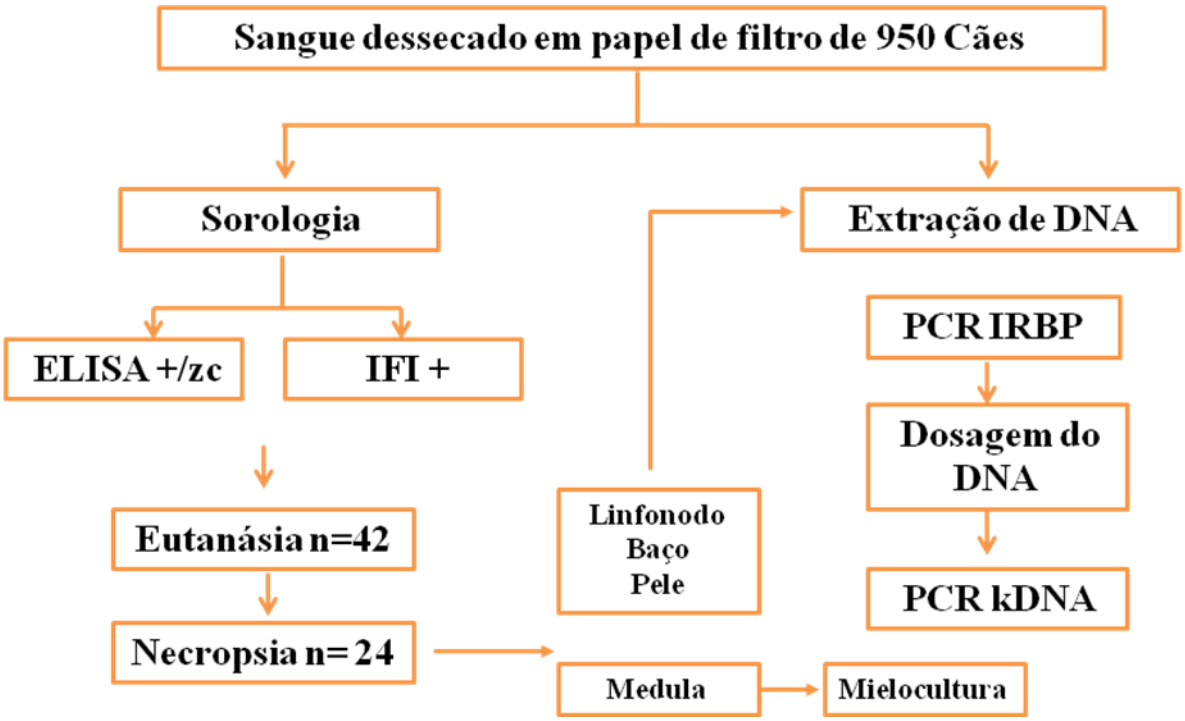

Figura 1: Diagrama do fluxo do diagnóstico da LVC, na Terra Indígena Xakriabá.

4.2 - Período e área do estudo

O presente estudo foi realizado no ano de 2011, na população canina da TIX (14°53’01” de latitude Sul e 44°05’26” de longitude Oeste), localizada no município de São João das Missões, norte de Minas Gerais, Brasil (Figura 1). O município faz limites com os municípios de Miravânia, Manga e Itacarambi, e está localizado no alto-médio do São Francisco, micro região do Vale do Peruaçu. A área indígena possui 530,74 km², correspondente a 78,07% da superfície total do município (IBGE, 2010; ESCOBAR, 2012).

A TIX é organizada em 32 aldeias, distribuídas em cinco polos base de saúde e possui população de 7.760 indivíduos, dos quais mais de 50% tem idade abaixo de 24 anos (IBGE, 2010). Como área constituinte da região norte do estado de Minas Gerais, apresenta vegetação de transição entre o cerrado e a caatinga, com zonas de mata mais densa próximo às fontes de água, e clima semi-árido com longos períodos de estiagem. A ocupação dos indígenas no território se faz dependente da disponibilidade de água, fato esse que limita as possibilidades de subsistência, tornando a porção do território delimitada cada vez menor e mais insuficiente e que faz algumas aldeias apresentarem estado lastimável de pobreza (QUARESMA, 2011; ESCOBAR, 2012).

A avaliação da prevalência da LVC foi realizada em 17 aldeias (Brejo Mata Fome, Caatinguinha, Custódio, Imbaúba, Itapicuru, Morro Falhado, Pedra Redonda, Prata, Riachão, Riachinho, Riacho comprido, Riacho do Brejo, santa Cruz, São Domingos, Sapé, Sumaré III e Terra Preta) estando essas distribuídas no polo base de saúde Itapicuru, Brejo Mata Fome e Sumaré. Nenhuma aldeia dos polos base Rancharia e Pindaíbas foram avaliadas nesse inquérito.

A população canina foi estimada, baseada no número da população, estabelecendo uma relação de um cão para sete humanos - 1:7 (MAGNABOSCO, 2006). Sendo assim, estimou-se uma população de aproximadamente 1200 cães.

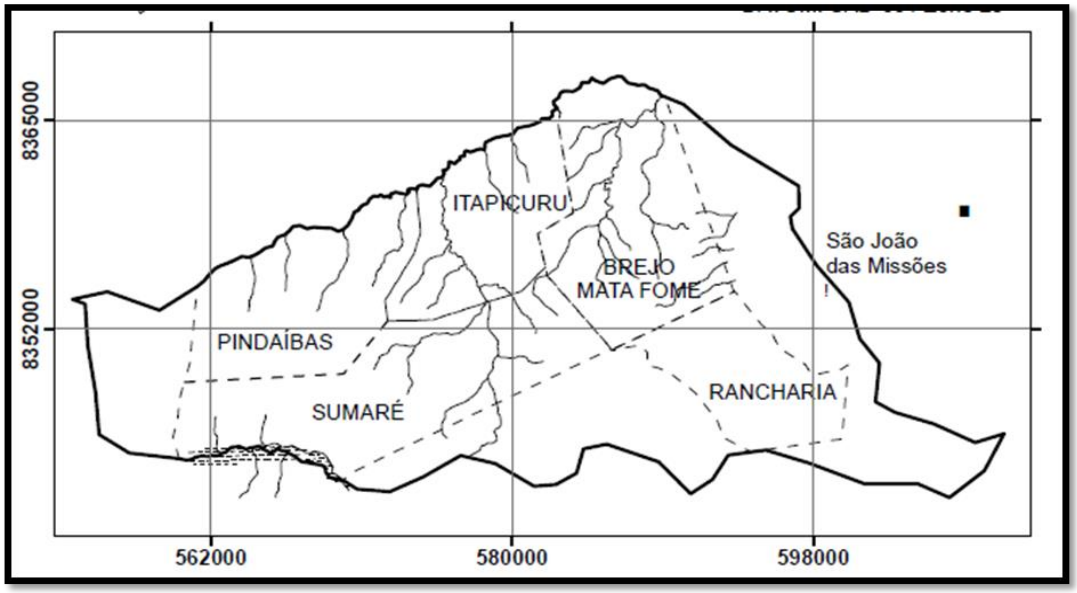

Figura 2: Delimitação da Terra Indígena Xakriabá e sua distribuição nos cinco pólos base de saúde.

4.3 - Questões Éticas e Fonte de Dados Epidemiológicos

Todos os animais investigados no presente estudo foram registrados em uma ficha, fornecida pela secretaria de saúde do município de São João das Missões, que constava o nome do proprietário, o nome do cão, sexo, raça e função do animal, coordenadas geográficas do domicílio, identificação da aldeia e o número do RG do domicílio.

Foi solicitado aos proprietários de cães sororeagentes, a autorização por escrito para realização dos procedimentos de eutanásia. Todos esses procedimentos foram realizados por veterinários do DSEI, segundo as normas vigentes do Comitê de Ética Animal, proposta essa aprovada no CEUA/UFOP (Processo do protocolo: 2010-39) (Anexo I).

4.4- Diagnóstico Sorológico e Critério de Positividade

Assumindo os critérios de positividade estabelecidos pelo MS, no ano de 2011, foram empregados como métodos diagnósticos sorológicos para LVC, o ELISA e a RIFI como teste confirmatório (Biomanguinhos, Fiocruz/RJ, Brasil). As reações foram realizadas no Laboratório de Epidemiologia das Doenças Parasitárias da Escola de Medicina da UFOP. Foram considerados como positivos e, portanto, indicados para a eutanásia, os cães com positividade para ELISA, absorbância maior que zona cinza e RIFI com o título > 1:40.

Os cães sororeagentes, escolhidos para a necropsia, tiveram amostras biológicas coletadas. Assim, a realização do teste imunocromatográfico DPP® (Biomanguinhos, Fiocruz/RJ, Brasil), metodologia empregada a partir do ano de 2012, como método de triagem e substituição do teste de RIFI (Nota Técnica Conjunta N°01/2011), foi possível em amostras de soro desses animais.

4.5 - Eutanásia dos cães sororeagentes

Os cães identificados como positivos pelo diagnóstico sorológico formam eutanasiados, conforme recomendado pelo PVC-LV (BRASIL, 2006). A eutanásia foi realizada utilizando o protocolo de sedação com posterior aplicação venosa de cloreto de potássio, em conformidade com a Portaria do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) 2012. Para tal, foi aplicada no cão selecionado para eutanásia a dose de 1 ml de Cloridrato de Xilazina a 5% por 10 quilogramas de peso vivo. Após a constatação da sedação, o animal foi administrado, ia endovenosa, por cloreto de potássio. A morte do cão foi verificada através de ausculta da área de reflexão cardíaca para verificar a ausência de batimentos, verificação da dilatação da pupila e execução do teste de sensibilidade ao toque na córnea. Os 42 cães destinados à eutanásia, foi escolhida uma amostra de 24 animais para necropsia, sendo realizada a identificação, exame clínico e coleta de material biológico desses animais.

4.6 – Necropsia

4.6.1 - Avaliação Clínica dos Animais

O exame clínico dos cães foi realizado pelo médico veterinário Dr. João Carlos França e Silva, seguindo as normas vigentes do CFMV (2012). Os registros da condição clínica de cada animal foram realizados em formulário próprio (ANEXO II). Foi avaliada a presença de alopecia, ulceração, descamação cutânea, conjuntivite, onicogrifose, emagrecimento dentre outras. A partir dessa avaliação os animais puderam ser classificados em assintomáticos, os que não apresentavam sinais clínicos, e sintomáticos, animais que possuíam sinais clínicos (BRASIL, 2006).

4.6.2 - Obtenção das Amostras Biológicas

Foi realizada coleta de uma amostra de 5ml de sangue periférico, por punção da veias cefálica ou jugular, em tubos para coleta de sangue sem anticoagulante, para separação do soro. Dessa amostra foipossível a realização do teste sorológico DPP (n=24). A coleta da medula óssea foi realizada na região da crista da tíbia do cão, utilizando agulha 18G acoplada em uma seringa de 20,0 ml. Antes deste procedimento, os animais foram sedados com solução de cloridrato de xilazina (Dopaser® - Lab. Hertape Calier), na dose de 1,1-2,2 mg/kg PV, por via intramuscular, músculo semitendinoso, utilizando-se seringa de 1, 3 ou 5ml e agulha 25 x 8. Após apresentarem estado de relaxamento muscular, os animais foram anestesiados com solução de thionembutal (Thiopentax® - Lab. Cristália), sendo 1grama ressuspendido em 40 ml de soro fisiológico, dose de 5-15 mg/kg PV, por via endovenosa, veia cefálica, usando scalp nº 21, 23 ou 25G, de acordo com o tamanho do animal e seringa de 3, 5 ou 10ml, de acordo com o volume a ser administrado. Após este procedimento, foram aguardados cerca de 2-5 minutos até que o animal apresentasse plano anestésico profundo, evidenciado pela rotação de globo ocular, ausência de reflexos interdigitais profundos, superficiais e corneal e respiração abdominal. Em seguida, com o animal ainda anestesiado foi realizada logo após a punção de medula óssea, utilizando-se para isso uma dose extra de thionembutal, via endovenosa e, logo após, injeção de 20ml de solução de cloreto

de potássio saturada (20% de cloreto de potássio em água bidestilada), via endovenosa. Uma vez atestado o óbito do animal, a necropsia foi realizada subseqüentemente. Foi realizada incisão no flanco esquerdo para exposição dos intestinos, para coleta do fragmento de linfonodo mesentérico. Além disso, foram coletados também um fragmento do tecido do baço e da borda distal da orelha. O material biológico coletado (da borda distal da orelha, baço e linfondo mesentérico) foi devidamente identificado, armazenado e congelado a -80°C para a posterior realização das técnicas moleculares. A carcaça do animal foi acondicionada em saco plástico e destinada ao aterro controlado do município de São João das Missões.

4.7 – Diagnóstico parasitológico das amostras dos cães necropsiados

4.7.1 – Cultura e Isolamento das Cepas de *Leishmania*

As amostras de medula óssea dos animais amostrados foram transferidas em condições de esterilidade para três tubos de vidro contendo 3 mL do meio de cultura difásico NNN/LIT COSTA et al., 1983). Esse meio foi preparado a partir da associação dos meios de NNN (NICOLLE, NOVY & NEAL, 1908) e o LIT (Liver infusion Tryptose, CAMARGO, 1964). Essas foram armazenadas em caixa de isopor, à temperatura ambiente por dois dias e posteriormente em estufa tipo B.O.D, à temperatura de 25ºC ± 1ºC. Após três ou quatro dias as amostras foram submetidas à limpeza para retirada de coágulo, em ambiente estéril (capela de fluxo laminar). O exame foi realizado em intervalo de quatro a sete dias, em microscópio ótico, objetiva de 10X ou 40X, colocando-se uma gota sobre lâmina; a cultura foi considerada positiva quando foi observada a presença de pelo menos uma forma promastigota de *Leishmania*. As amostras isoladas foram expandidas em meio NNN/LIT, passando de tubos de ensaio para erlenmeyers de 50 a 150 ml até atingir o volume final de 100.000.000 células, em aproximadamente 40ml de meio de cultura, para realização da PCR. A contagem dos parasitos foi realizada em câmara de Neubauer. Quando a amostra atingiu o volume de células desejado o meio líquido foi centrifugado a 3000 rpm, 4ºC, por 15 minutos, para sedimentação das células, lavado e resuspendido em PBS por dois ou três vezes, posteriormente congelado a – 20ºC.

Amostras negativas foram acompanhadas por pelo menos quatro semanas. Após esse período, as amostras que continuaram negativas, foram descartadas.

Uma vez obtido o isolamento, os isolados de *Leishmania* foram mantidas à temperatura de 23ºC e a massa de cada uma foi obtida, através de repiques sucessivos em todas as etapas do cultivo a cada 7 dias, em condições ótimas de esterilidade. O inoculo foi transferido inicialmente para dois tubos de NNN/LIT. Posteriormente, em intervalos de sete dias, cada passagem foi expandida sequencialmente para erlenmeyers de 25, 125, 250 ml. Após cinco dias, com a cultura em fase exponencial de crescimento, o material foi examinado microscopicamente, a viabilidade dos flagelados foi observada, avaliando-se sua motilidade e a ausência de contaminantes. Uma alíquota de 1 ml da cultura foi retirada, identificada e criopreservada em nitrogênio líquido, tendo-se utilizado solução de glicerina a 10% como crioprotetora.

4.7.2 – Exame Direto por Esfregaços e Aposição dos Tecidos

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

4.8 - Diagnóstico Molecular (Padrão Ouro)

4.8.1 - Extração de DNA

Para extração de DNA das amostras de sangue em papel filtro Klabin n° 1, foi realizado o protocolo de acordo com MONBRISON et. al. (2007) adaptado. Um quadrado (0,5 cm de lado) de papel impregnado com sangue foi cortado em um tubo tipo Eppendorf estéril de 1,5 mL, contendo solução de saponina 5% e incubado durante 60 minutos. Após centrifugação de 3 minutos a 12.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o papel filtro foi incubado com 200 µl da resina Instagene Matrix® a 56 °C por 30 minutos, sendo levado ao vórtex três vezes a cada 15 minutos. Posteriormente os tubos foram incubados a 100°C por 8 minutos antes da centrifugação de três minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante (20 a 30 µl) foi coletado com cuidado para evitar o transporte da resina. O DNA extraído foi diluído em H_2O estéril na proporção 1:5 e mantido a -20°C até o momento da PCR.

As amostras coletadas de pele, baço, fígado, medula e linfonodo foram acondicionadas a -80ºC e posteriormente submetidos à extração do DNA. A metodologia para extração seguiu a orientação do fabricante do Wizard® Genomic DNA PuRIFIcation System (Prodimol). Após a extração e purificação o DNA foi reidratado e armazenado -20ºC até o momento do uso.

4.8. 2 – PCR Convencional

As amostras de DNA extraído dos tecidos e dos papeis de filtro foram avaliados primeiramente pela PCR-IRBP. As reações da PCR-IRBP são dirigidas à amplificação de fragmentos dos genes constitutivos de mamíferos sendo utilizados para reações de controle endógeno da qualidade e integridade do DNA extraído. O par de iniciadores utilizados foi, o IRBPfwd: 5’TCC AAC ACC ACC ACT GAG ATC TGG AC 3’ e o IRBPrev: 5’ GTG AGG AAG AAA TCG GAC TGG CC 3’, tendo como produto amplificado um segmento de 120pb (FERREIRA et al, 2010). As amostras, uma vez positivas para o PCR-IRBP, foram avaliadas para a detecção do DNA de *Leishmania* spp.

O par de iniciadores utilizado para o gênero *Leishmania* visou a amplificação da região conservada do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) do parasito. Os iniciadores A: 5´ (C/G) (C/G) (G/C) CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3´ e iniciador B: 5´ GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3´ (DEGRAVE ET AL., 1994) amplificaram um segmento de 120 pb. As reações foram preparadas para um volume final de 25µl contendo 5,0µl de DNA (correspondendo a 40 ng, para produtos de extração de DNA de papel de filtro, de 10 -20 ng, para amostras de DNA de cultura e de 30 a 300 ng, para amostras de DNA de tecidos), 0,5µl (10 pmol) de cada iniciador (Bioneer), 9,37µl de água ultra-pura (GibcoTM) e uma "bead" (Ready-to-go PCR beads - GE Healthcare) contendo, após reconstituição para 25µl, uma concentração de 100 µM de cada dNTP em 5 mM de Tris-HCl (pH 9.0 em temperatura ambiente), 25mM de KCl, 2,5 mM de MgCl2, BSA, aproximadamente 0,5U DNA polimerase e tampão de reação. A amplificação foi feita em equipamento termociclador automático (Perkin-Elmer-Geneamp PCR Sistem 2400) utilizando-se o seguinte programa: 94ºC por 4 minutos seguidos de 35 ciclos de: 94ºC por 30 segundos para desnaturação, 60ºC por 30 segundos para anelamento e 72ºC por 30 segundos para extensão; extensão final a 72ºC por dez minutos.

4.8.3 – Identificação das espécies de *Leishmania*

A técnica de RFLP utiliza enzimas de restrição que cortam a dupla fita de DNA pelo reconhecimento de uma pequena seqüência de nucleotídeos, usualmente de quatro a seis pares de bases de tamanho. O kDNA das espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmani. (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania chagasi)* (= *Leishmania (Leishmania) infantum*) apresenta seqüências suficientemente distintas para ser utilizado na diferenciação destas espécies. Segundo VOLPINI (2004), a digestão com a endonuclease HaeIII (*Haemophilus aegyptius*) possibilita a distinção das três espécies. Para a identificação das espécies de *Leishmania* nas amostras de cães "PCR positivos" para o gênero *Leishmania* foi utilizada a enzima HaeIII , que digere *L. (L). amazonensis* em um fragmento de 116 pb; *L. (V.) braziliensis* em dois fragmentos, de 80 e 40 pb; *L. (L.) chagasi* em fragmentos de 120, 80, 60 e 40 pb. A técnica foi realizada conforme descrito por Andrade et al. (2006) com modificações. Uma mistura prévia contendo 2U (0,2µl) da enzima de restrição HaeIII (Invitrogen™), 2,0µl do tampão da

enzima 10X (Invitrogen™), 7,8µl de água ultra-pura (GibcoTM) posteriormente adicionada de 15µl de produto amplificado, homogeneizada e incubada a 37ºC, por 4 horas, em banho-maria.

4.8.4 - Visualização dos resultados

Os produtos amplificados resultantes da PCR-IRBP e PCR kDNA foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose com concentração de 1,5% e submetido a corrente de 60V e 110V (Fonte BioRad), antes e após separação das bandas, respectivamente, imerso em tampão TBE 1X (Tris-base a 89mM pH 8,0; ácido bórico a 89mM e EDTA a 2mM). Foram aplicados no gel 25 µl do produto amplificado misturados a 5 µl de tampão de corrida (azul de bromofenol). O marcador de peso molecular utilizado foi o ØX 174 (InvitrogenTM) que, após digerido pela enzima HaeIII, apresentou 11 fragmentos variando de 72 a 1357 pb.

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

4.9 - Processamento e análise de dados

Os dados foram digitados e analisados no programa SPSS versão 22.0.

A prevalência de LV foi calculada a partir da razão entre o número de cães soropositivos e a população canina analisada.

O desempenho das técnicas sorológicas foi avaliado através do cálculo da sensibilidade, especificidade e a acurácia, considerando como “padrão ouro” o diagnóstico molecular pelo PCR-kDNA. O teste pareado de McNemar foi utilizado para avaliar a presença de diferença significativa entre as proporções de resultados positivos obtidos pelos diferentes métodos diagnósticos, assumindo como significativo $p<0,05$.

O teste de Pearson foi utilizado para determinar diferença significativa entre as proporções de resultados positivos para o PCR-kDNA nos diferentes perfis sorológicos, assumindo como significativo $p<0,05$.

O georreferenciamento dos domicílios foi realizado a partir de coordenadas geodésicas capturadas a partir do GPS marca Garmim modelo Etrex 10, utilizando a projeção Universal Transverse Mercator categoria SAD69, Zona 23. Mapas temáticos foram confeccionados no programa Map Info para descrever a distribuição dos domicílios com cães infectados.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Todos os cães (n=950) encontrados em 17 aldeias, pertencentes à TIX, passaram por avaliação do diagnóstico sorológico e molecular para determinação de prevalência e distribuição especial de LV. Adicionalmente, a metodologia molecular possibilitou a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção do cão. Os dados também permitiram a comparação da eficiência de diagnóstico, validade e reprodutibilidade dos métodos empregados.

Amostras de SDPF foram coletadas de 950 cães, em sua maioria machos (74,9%) e todos de raça não definida.

A soroprevalência da LV na TIX para o teste do ELISA e de RIFI foi de 33,4% (n=371/950) e 15,4% (n=69/447), respectivamente, enquanto a soroprevalência combinada (positividade em ELISA e RIFI) foi de 4,3% (n= 42/950). Segundo o diagnóstico molecular, a prevalência foi de 14,80% (n=140/948 (Figura 3).

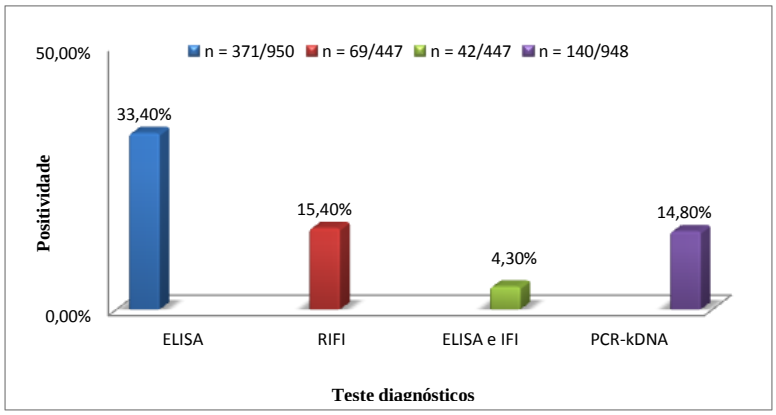

Figura 3 – Gráfico da prevalência de LVC na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil, no ano de 2011, por diferentes técnicas de diagnóstico. ELISA (Teste imunoenzimático), RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta), PCR-kDNA (Reação em Cadeia da Polimerase - Ácido desoxirribonucléico do cinetoplasto).

De 140 cães positivos pelo diagnóstico molecular (PCR-kDNA), 62 (44,3%) amostras puderam ser identificadas quanto à espécie envolvida na infecção. Destas, em sua totalidade, a única espécie presente foi *L. infantum* (Figuras 4 e 5).

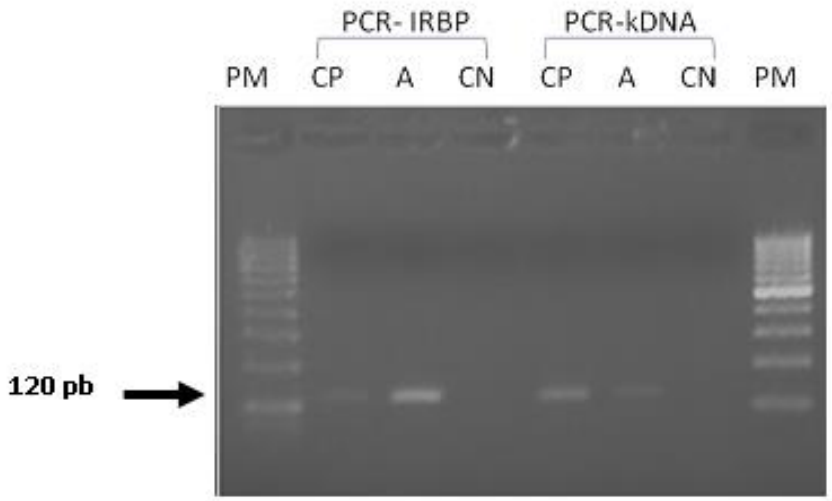

Figura 4: Gel representativo dos fragmentos de 120 pb dos produtos amplicicados do gene constitutivo da β globina do cão (PCR-IRBP) e do kDNA de *Leishmania* (PCR-kDNA) representados na eletroforese em gel de agarose 1,5% para validação do precesso de extração do DNA e para identificação do DNA do parasito, respectivamente. Pb (pares de base) PM (peso molecular), A (amostra dos cães do estudo, NC (controle negativo).

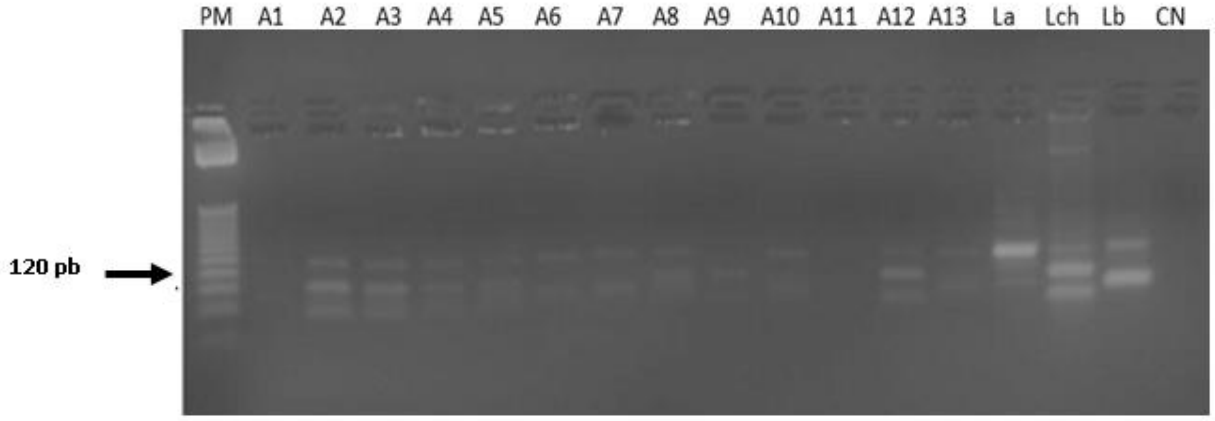

Figura 5: Gel representativo dos fragmentos dos fragmentos gerados pelo PCR-RFLP em gel de agarose 4,0%, tendo como objetivo a caracterização das espécies de *Leishmania* . Pb (pares de base) PM (peso molecular), A1 a A13 (amostras dos cães do estudo), La (*L. amazonensis*), Lch (*L. infantum*), Lb (*L. brasiliensis*), NC (controle negativo).

A tabela 1 demonstra o percentual de positividade para o diagnóstico molecular (PCR-kDNA), das amostras de SDPF (n=948), em relação aos subgrupos sorológicos: ELISA+/RIFI+, ELISA+/RIFI-, indeterminado em ELISA/RIFI+, indeterminado em ELISA/RIFI-, ELISA-. Os grupos sorológicos não identificados para eutanásia ELISA-, ELISA ZC / RIFI -, ELISA + / RIFI – apresentaram positividade pelo diagnóstico molecular (PCR-kDNA) de 8,9%, 15,0% e 17,7%, respectivamente. Por outro lado, os grupos indicados para eutanásia ELISA + / RIFI + e ELISA ZC / RIFI + apresentaram presença do DNA do parasita em 57,1% e 36,6%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Percentual de positividade do diagnóstico molecular (PCR-kDNA), das amostras de SDPF, em relação aos subgrupos sorológicos que determinou ou não a eutanásia dos cães, segundo PVC-LV, na Terra Indígena Xakriabá, no ano de 2011.

	PCR-kDNA		
Teste Sorológico	**Negativo**	**Positivo**	**Total de Amostras**
ELISA -	458 (91,1%)	45 (8,9%)	503
ELISA ZC / RIFI -	85 (85,0%)	15 (15,0%)	100
ELISA + / RIFI -	227 (82,3%)	49 (17,7%)	276
ELISA ZC / RIFI +	12 (42,9%)	16 (57,1%)	28
ELISA + / RIFI +	26 (63,4%)	15 (36,6%)	41
TOTAL	808 (85,2%)	140 (14,8%)	948

Nota: ELISA - (Teste imunoenzimático negativo) ELISA + (Teste imunoenzimático positivo), ELISA ZC (Teste imunoenzimático indeterminado), RIFI - (Reação de Imunofluorescência Indireta negativa), RIFI + (Reação de Imunofluorescência Indireta positiva), PCR-kDNA (Reação em Cadeia da Polimerase - Ácido desoxirribonucléico do cinetoplasto). P< 0,0001

O índice de desempenho dos testes sorológicos foi avaliado a partir de comparações com o diagnóstico molecular (padrão ouro). Tal análise buscou avaliar a reprodutibilidade e validade do diagnóstico sorológico, considerando as seguintes análises: kappa, sensibilidade, especificidade, verdadeiro positivo (VP), falso negativo (FN), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) (Tabela 2).

A técnica do ELISA realizada nas amostras de SDPF demonstrou que 64 amostras eram verdadeiros positivos, 76 amostras falsos negativos, 555 amostras eram verdadeiros negativos e que 253 amostras eram falsos positivos, de acordo com o padrão ouro (PCR-kDNA). A sensibilidade da mesma técnica 45,7 %, a especificidade foi de 68,7 %, o VPP foi de 20,0 % e o VPN de 88,0 %. Ao analisar a técnica de RIFI nas amostras de SDPF, foi observado que 31 amostras eram verdadeiros positivos, 64 amostras falsos negativos, 38 amostra falso positivas e 312 amostras verdadeiro negativas. A sensibilidade da técnica foi 32,0 %, especificidade de 89,0%, o VPP e o VPN foram 44,9 % e 82,97 %, respectivamente (Tabela 2). A técnica de RIFI obteve o melhor resultado, tendo menor número de amostras verdadeiro positivo e falso negativo. A concordância da técnica do ELISA foi de 9,5% e do RIFI foi de 24,2%.

Tabela 2: Análises do desempenho dos métodos sorológicos em comparação ao método molecular (PCR-kDNA), em amostras SDPF de cães da Terra Indígena Xakriabá, Brasil, 2011.

Método Sorológico	VP	FN	FP	VN	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	p*	kappa (%)
ELISA	64	76	253	555	45,7	68,7	20,0	88,0	<0,0001	9,5
RIFI	31	64	38	312	32,0	89,0	44,9	82,9	0,013	24,2

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

A tabela 3 demonstra o percentual de positividade para o diagnóstico molecular (PCR-kDNA), das amostras de SDPF (n=948), em relação aos grupos sorológicos indicativos para eutanásia. De acordo com o PVC-LV (BRASIL, 2006), os grupos sorológicos ELISA-, ELISA ZC / RIFI -, ELISA + / RIFI – não são indicados para a realização de eutanásia. Entretanto, nesses grupos, a metodologia molecular identificou 12,4% de positividade dos cães. Nos grupos sorológicos indicados para eutanásia (ELISA + / RIFI + e ELISA ZC / RIFI +), foi observado presença de DNA do parasita em 44,9% das amostras (Tabela 3).

Tabela 3 - Percentual de positividade do diagnóstico molecular (PCR-kDNA), das amostras de SDPF, em relação aos grupos sorológicos que determinou ou não a eutanásia dos cães, segundo MVC-LV, na TIX, no ano de 2011.

Resultado Sorológico	PCR-kDNA		Total de
	Negativo	Positivo	Amostras
ELISA + / RIFI + e ELISA ZC / RIFI +	38 (55,1%)	31 (44,9%)	69
ELISA-, ELISA ZC / RIFI -, ELISA + / RIFI -	770 (87,6%)	109 (12,4%)	879

Nota: ELISA - (Teste imunoenzimático negativo) ELISA + (Teste imunoenzimático positivo), ELISA ZC (Teste imunoenzimático indeterminado), RIFI - (Reação de Imunofluorescência Indireta negativa), RIFI + (Reação de Imunofluorescência Indireta positiva), PCR-kDNA (Reação em Cadeia da Polimerase - Ácido desoxirribonucléico do cinetoplasto). $p < 0,0001$

Do universo de 950 cães analisados, 42 (4,3%) apresentaram soropositividade na combinação de ELISA e RIFI e foram eutanasiados, conforme estabelecido pelo PVC-LV. Dentre esses animais, 24 (n=24/42) foram selecionados aleatoriamente para a necropsia. A sintomatologia clínica característica de LVC foi observada em 95,2% (n=20/24) dos cães necropsiados. Os sintomas mais comumente encontrados foram: esplenomegalia (80,9%), onicogrifose (80,9%), linfoadenopatia (76,2%) e emagrecimento (19,0%). Os resultados do diagnóstico molecular (PCR-kDNA) realizado para todos os tecidos coletados estão apresentados na Tabela 3. A presença do DNA do parasita pelo diagnóstico molecular (PCR-kDNA), foi observada na totalidade das 24 amostras de cada tecido (linfonodo mesentérico, borda distal da orelha, medula e baço), com exceção da pele que apresentou 91,7% de positividade. Para as amostras de SDPF desses mesmos animais (n=24), foi observada menor positividade sendo positiva em apenas 62,5% das amostras pelo diagnóstico molecular (PCR-kDNA) (Tabela 3). No teste parasitológico de *imprinting* de tecidos, realizado nas amostras dos cães necropsiados (n=24), não foram observadas forma amastigota.

Adicionalmente, foi realizado teste imunocromatográfico DPP em alíquotas de sangue venoso (n=21) e a cultura de medula dos mesmos cães necropsiados (n=24), apresentando 42,8% e 50% de positividade, respectivamente (dados não mostrados). Na mielocultura, as formas promastigotas foram identificadas como *L. infantum*.

A análise molecular, a partir da PCRk-DNA, foi realizada em todos os tecidos dos cães necrospsiados. O percentual de positividade segue descrito na tabela 4, tanto para os tecidos quanto para as amostras de sangue dessecadas em papel de filtro desses mesmos animais.

Tabela 4: Diagnóstico molecular realizado em amostras dos cães necropsiados, na Terra Indígena Xakriabá, no ano de 2011.

	Diagnóstico Molecular - PCR kDNA		
Tecidos avaliados	Positivo	Negativo	Total de Amostras
Baço	24 (100%)	0	24
Linfonodo mesentérico	24 (100%)	0	24
Medula óssea	23 (100%)	0	23
Pele (borda distal da orelha)	22 (91,7%)	2 (9,3%)	24
SDPF	15 (62,5%)	9 (37,5%)	24

Nota: PCR-kDNA (Reação em Cadeia da Polimerase - Ácido desoxirribonucléico do cinetoplasto)

O diagnóstico molecular apresentou grande positividade (100%) na avaliação dos tecidos dos cães necropsiados, com exceção da borda distal da orelha (91,7%). No entanto, na avaliação das amostras de SDPF desses mesmos cães a técnica apresentou uma proporção de positividade bem menor (62,5%).

A partir dos dados de prevalência, foram construídos gráficos da distribuição espacial de LVC nos três pólos base de saúde da TIX, analisados utilizando o diagnóstico sorológico ELISA anti-LVC e molecular pelo PCR-kDNA, respectivamente (figuras 6 e 7).

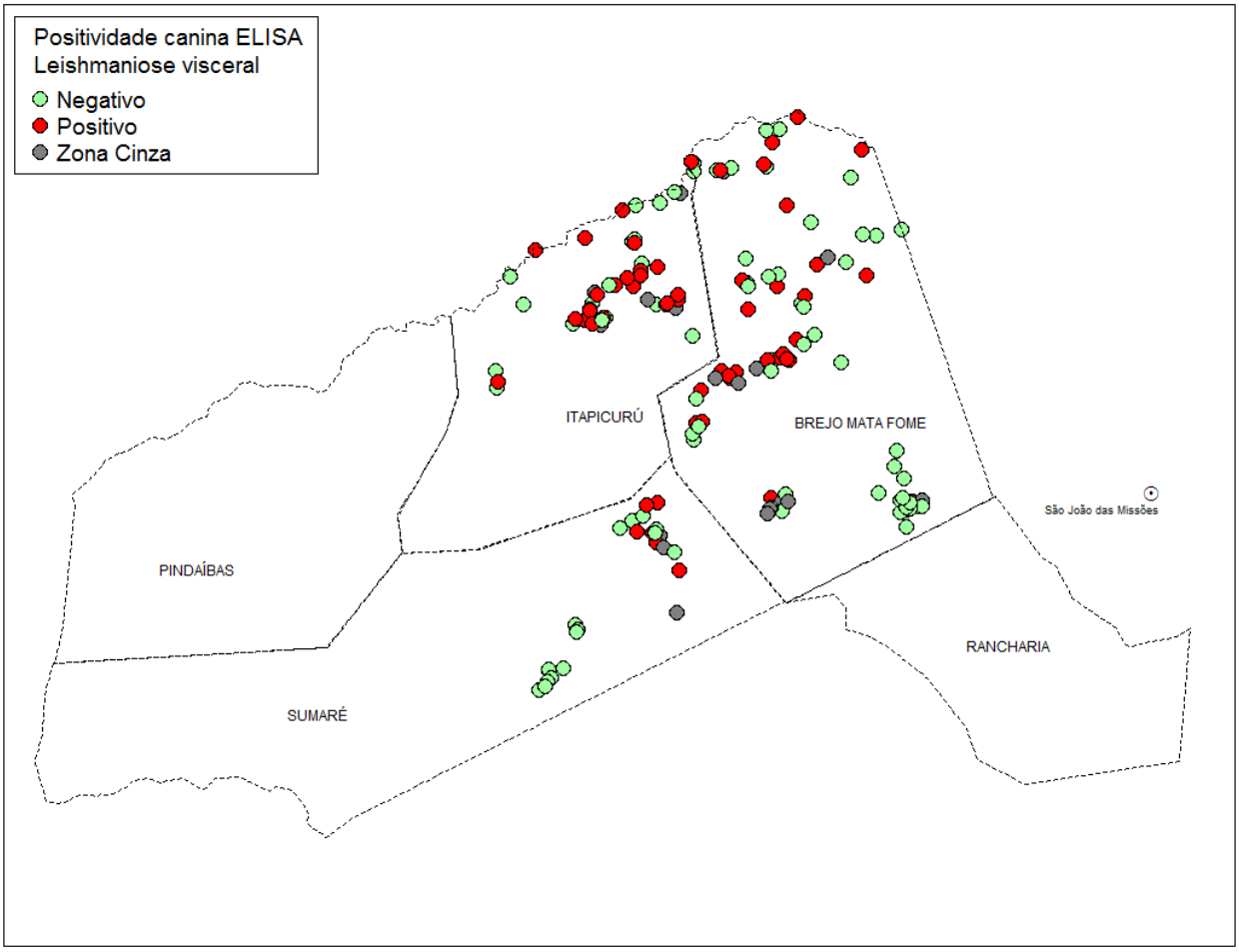

Figura 6 – Mapa temático da distribuição da soropositividade canina pelo diagnóstico sorológico ELISA, por polo base de saúde, na Terra Indígena Xakriabá,, Minas Gerais, Brasil, 2011.

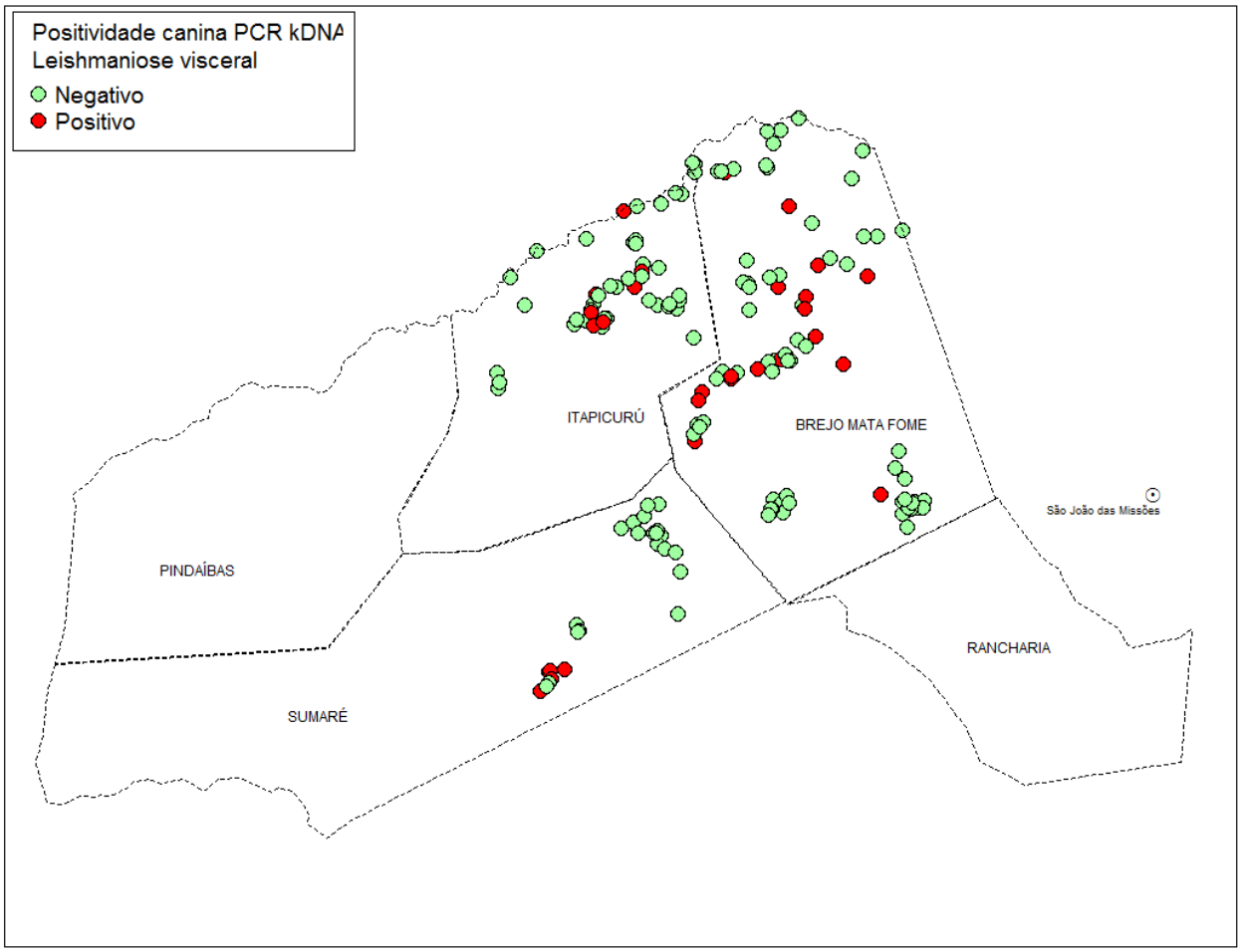

Figura 7 – Mapa temático da distribuição da positividade canina pelo diagnóstico molecular PCR-kDNA, por polo base de saúde, na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil, 2011.

Como observado no mapa da distribuição de LVC, pelo método sorológico (Figura 5) e pelo método molecular (PCRk-DNA) (FIGURA 6) a maioria dos cães positivos concentraram-se na região norte da TIX, correspondendo às áreas dos pólos base Itapicuru e Brejo Mata Fome. O polo base Sumaré apresentou uma pequena localidade de cães infectados. Foi observada diferenças na distribuição dos cães infectados de acordo com o método diagnóstico utilizado. Áreas do polo base Sumaré, modificaram o seu perfil de positividade conforme o método diagnóstico empregado. Além disso, a distribuição dos cães com sorologia positiva foi mais dispersa se comparada aos cães diagnosticados infectados pelo método molecular (PCR-kDNA).

A taxa de positividade canina distribuiu-se heterogeneamente entre as aldeias avaliadas, tanto para o teste sorológico ELISA como também para teste sorológico RIFI (Tabela 5). Essa

variação foi de 60,0% a 12,1% para o teste do ELISA e de 84,0% a 0,0% para o teste do RIFI. A aldeia Custódio foi a que apresentou a maior taxa de prevalência no teste ELISA (60%) e a aldeia Riacho do Brejo foi a que apresentou a maior taxa considerando o teste RIFI (84,0%). Com a combinação dos testes ELISA e RIFI a aldeia Riacho do Brejo foi a que apresentou a maior prevalência da LVC (12,4%) e seis não possuíram cães infectados (Tabela 6).

Tabela 5 – Distribuição da soropositividade canina por aldeia, por técnica sorológica, na Terra Indígena Xakriabá no ano de 2011.

ALDEIA	SOROPOSITIVIDADE - Teste ELISA - Cães positivos/Cães avaliados	SOROPOSITIVIDADE - Teste RIFI - Cães positivos/Cães avaliados
Brejo Mata Fome	47/94 (50,0%)	9/61 (14,75%)
Catinguinha	28/59 (47,5%)	5/35 (14,28%)
Custódio	3/5 (60,0%)	0/5 (0%)
Imbaúba	31/64 (48,4%)	2/42 (4,76%)
Itapicuru	29/88 (32,9%)	0/37(0%)
Morro Falhado	23/41 (56,0%)	1/32 (3,12%)
Pedra Redonda	2/13 (15,4%)	1/4 (25,0%)
Prata	18/88 (20,45%)	8/22 (36,30%)
Riachão	10/24 (41,7%)	2/12 (16,66%)
Riachinho	13/49 (26,5%)	0/26 (0%)
Riacho Comprido	4/33 (12,1%)	1/11 (9,09%)
Riacho do Brejo	18/121 (14,90%)	37/44 (84,00%)
Santa Cruz	30/76 (39,5%)	1/41 (2,44%)
São Domingos	14/34 (41,2%)	0/20 (0%)
Sapé	16/45 (35,6%)	0/20 (0%)
Sumaré III	13/83 (15,7%)	2/13 (15,38%)
Terra Preta	18/33 (54,5%)	0/22 (0%)
Total	**317/950 (33,4%)**	**69/497 (15,43%)**

Tabela 6 – Percentual de positividade canina, em ambos os testes (ELISA e RIFI), por aldeia, na Terra Indígena Xakriabá, no ano de 2011.

ALDEIA	**SOROPOSITIVIDADE** Cães positivos / Total de cães avaliados (%)
Brejo Mata Fome	7/94 (6,0)
Catinguinha	5/59 (8,0)
Custódio	0/5 (0,0)
Imbaúba	2/64 (3,0)
Itapicuru	0/88 (0,0)
Morro Falhado	1/41 (2,0)
Pedra Redonda	0/13 (0,0)
Prata	8/88 (9,1)
Riachão	2/24 (8,0)
Riachinho	0/49 (0,0)
Riacho Comprido	0/33 (0,0)
Riacho do Brejo	15/121 (12,4)
Santa Cruz	0/76 (0,0)
São Domingos	0/34 (0,0)
Sapé	0/45 (0,0)
Sumaré III	2/83 (2,0)
Terra Preta	0/33 (0,0)
Total	**42/950 (4,3)**

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A prevalência de cães infectados na TIX foi de 4,3%, segundo o critério de positividade combinado adotado pelo MS até 2011 (BRASIL, 2006), que era ELISA e RIFI. Utilizando um único critério – o ELISA, essa positividade foi maior, e igual a 33,4% dos cães. Assumindo apenas o resultado da RIFI, utilizada como método confirmatório, a soropositividade foi bem menor (15,3%). O diagnóstico molecular (PCR-kDNA) identificou DNA do parasito em 14,8% de cães infectados. A sensibilidade e especificidade e acurácia do eluato em relação ao método molecular para o método do ELISA foi igual a 45,7% e 68,7% e para o RIFI foi igual a 32,0% e 89,0%, respectivamente. A discordância entre os métodos sorológicos em relação ao molecular apontam as limitações do uso do eluato de sangue em papel filtro como amostra para as reações sorológicas. A espécie prevalente na TIX foi a *L. infantum*. A prevalência da LVC variou significativamente entre as aldeias e pólos-base de saúde.

Estudos transversais para determinar a prevalência da LVC são importantes para o monitoramento da doença em áreas endêmicas. Com a recente expansão da LV para as áreas urbanas, as comunidades rurais têm sido frequentemente negligenciadas pelos órgãos de saúde pública. Apesar da descentralização das ações de saúde, que ocorreu também nas comunidades indígenas, com a criação dos Distritos Sanitários Especiais Indígenas, estas continuam submetidas a precárias condições de vida e de saúde; carecendo de saneamento básico adequado, a nutrição é inadequada e às altas taxas de infecções parasitárias, além de outras doenças (PENA, 2004; COIMBRA Jr., 2014).

A realização de inquéritos caninos nas terras indígenas é de fundamental importância, pois essas comunidades, além de serem negligenciadas, apresentam um grande contingente de crianças vulneráveis à infecção pela LV. Um fator que contribui para o maior risco de infecção por LV é a ocorrência de magreza entre as crianças indígenas (SOUZA, 2014). Esta contribui para baixa resistência imunológica, com um possível aumento no risco para doenças infecciosas. Segundo CERF et al. (1987) a desnutrição constitui-se em forte fator de risco para LV, agravando o quadro clínico, e aumentando as chances de morte em crianças. De acordo com informações do I Inquérito Nacional de Saúde e Nutrição Indígena, as crianças são as que apresentam maior prevalência de desnutrição crônica (COIMBRA Jr., 2014). Portanto, como a vulnerabilidade para o mau estado nutricional é maior nas crianças indígenas com menor idade, principalmente em

relação ao déficit de estatura, indicativo de déficit nutricional crônico, são estas as mais susceptíveis de contrair a infecção (PEDRAZA et al., 2014).

A soroprevalência de LVC encontrada na TIX foi semelhante à encontrada em outros estudos realizados na região norte do estado de Minas Gerais, onde essa terra indígena está inserida. Segundo PRADO et al. (2011), o município de Montes Claros, no período de 2007 a 2009, registrou prevalência canina de 6,3%, assumindo como sororeagententes aqueles que apresentavam positividade concomitante para os testes do ELISA e do RIFI. MONTEIRO et al (2005), avaliando amostras de SDPF procedentes de cães do município de Januária, determinou uma soroprevalência em torno de 5% a partir do teste sorológico RIFI.

Na TIX, como era de esperar, a prevalência sorológica variou segundo o teste diagnóstico utilizado, como observado também por QUARESMA et al. (2011) nessa mesma terra indígena. Esses autores utilizaram as mesmas técnicas sorologias que empregamos neste trabalho. Ao utilizarmos uma reação mais sensível – o ELISA, geralmente utilizada como triagem, a prevalência foi maior (33,4%), como esperado. Com o uso isolado do teste confirmatório – a RIFI, a prevalência foi menor e igual a 15,3%. Quando assumimos o resultado combinado e em série destas duas reações a prevalência foi significativamente menor (4,3%).

Os resultados obtidos na comparação dos métodos sorológicos em relação ao método molecular demonstraram o baixo desempenho da sorologia, identificando baixos índices de sensibilidade do teste ELISA (45,7%) e do RIFI (32,0%). A especificidade foi menor para o teste do ELISA (68,7%) do que o RIFI (89%), fato esse que gerou um alto número de cães falsos positivos (n=253).

A acurácia dos testes sorológicos em relação ao diagnóstico molecular foi fraca. Mesmo com a melhora de especificidade, os dados apresentados revelam um alto número de cães positivos que não foram identificados pelos métodos sorológicos. O número de FN para a técnica do ELISA foi de 76 cães (8,0%) e para a técnica da RIFI foi de 64 cães (14,3%). Os animais positivos não detectados pelos métodos sorológicos, na medida em que não foram retirados na época adequada, continuaram provavelmente a manter o ciclo da LV na área. Portanto, as ações de controle envolvendo o reservatório canino, implementadas pelo DSEI, provavelmente não foram totalmente efetivas. Essa avaliação vem ao encontro do que foi observado por ROSARIO et al. (2005) e GRIMALDI et al. (2012) quando afirmam que as falhas no PVC-LV estão na acurácia dos métodos de diagnósticos adotados para a identificação dos cães positivos. Alem disso, esses

dados demonstram que os testes sorológicos subestimam as taxas de infecção quando comparadas as taxas detectadas pelos métodos moleculares (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; COURA-VITAL et al., 2011).

O método de coleta da amostra de SDPF é muito apropriado para a dinâmica dos trabalhos de campo e inquéritos sorológicos. No entanto, esse tipo de amostra apresenta limitações. A baixa acurácia obtida nos testes sorológicos provavelmente tem como uma das justificativas, o uso do eluato de SDPF. A conservação desse tipo de amostra pode vir a não preservar as imunoglobulinas, permitindo a queda significativa dos títulos de anticorpos, por interferência das condições de temperatura e umidade. O estudo de SILVA (2005) aponta para existência de limitações e cuidados a serem tomados no armazenamento das amostras de SDPF, mas defendem que essa condição não justifica a abolição deste método de coleta.

Na infecção do cão por *L. infantum*, existe variação na duração, constância e intensidade da parasitemia. Além disso, a carga parasitária em cada tecido varia sendo influenciada pelo tropismo do parasita e a resposta imune local (Maia e Campino, 2008). Sabe-se que a sensibilidade da PCR é maior em amostras de DNA extraídas de tecidos (baço, linfonodos e medula óssea) em relação ao sangue total, mas a coleta dessas amostras in vivo é muito invasiva e, praticamente impossível, para a realização de inquéritos caninos. Segundo GOMES et al. (2007) e MAIA et al. (2009), para estudos epidemiológicos a campo, a PCR a partir do DNA de sangue total de cães é apropriada para a confirmação dos exames sorológicos, situação essa que foi observada no presente estudo.

A maioria dos cães necropsiados apresentou sintomatologia clínica característica de LVC, sendo a maioria de oligossintomáticos (54,5%), assintomáticos (27,3%) e sintomáticos (18,2%). ANTONIO et al. (2011), avaliando a prevalência de LVC na terra indígena Krenak, também observou que as maiorias dos cães soropositivos eram sintomáticas. Ao contrário do observado nessas terras indígenas, a presença de sinais clínicos não é frequente em cães soropositivos. MICHALSKY et al. (2007) observaram que os cães sintomáticos apresentaram-se quatro vezes mais infectantes para *L. longipalpis* que os assintomáticos ou oligossintomáticos. Portanto, a ausência de sinais não isenta o cão da possibilidade de transmissão e, quando não removidos, podem ser responsáveis pela manutenção do ciclo de ser transmissão do parasito. Esse fenômeno é um dos aspectos mais controversos do controle da leishmaniose visceral.

A maioria dos autores se posicionam pela necessidade da retirada dos cães infectados (FRANÇA-SILVA el al., 2003; MAIA et al. 2008), mas outros autores (CERBINO et al., 2009; COSTA, 2011) tem questionado essa ação de saúde pública, por não observarem de forma sistemática uma estreita relação entre a presença de infecção canina e casos humanos. Apesar das discordâncias entre os autores, os resultados de mielocultura e do diagnóstico molecular dos tecidos obtidos dos animais necropsiados na TIX corroboraram os resultados sorológicos combinados obtidos. Entretanto, ao contrário do esperado, observamos uma baixa concordância do diagnóstico molecular com os resultados do DPP. Outros autores, também tem observado discordância entre os resultados moleculares e sorológicos com esse teste rápido.

Independente do critério de diagnóstico utilizado, a distribuição dos cães infectados pela LV foi heterogenia entre as aldeias e obteve uma representação distinta para cada método diagnóstico realizado. O diagnóstico molecular das amostras de SDPF e dos tecidos avaliados apresentou alta positividade e baixa concordância com os resultados obtidos pelos testes sorológicos. Tal resultado corrobora com outros estudos de prevalência realizados em áreas endêmicas para LV, apontando que os testes sorológicos subestimam a taxa de infecção canina quando comparados com o diagnóstico molecular, o que dificulta as ações de controle da doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; COURA-VITAL et al., 2011).

Assumindo os cães soropositivos como infectados, a heterogeneidade na distribuição da infecção canina indica que essas áreas, provavelmente, apresentam uma variabilidade quanto aos fatores ambientais associados à infecção canina.

A densidade vetorial é um dos principais fatores associados à infecção canina (MICHALSKI et al., 2005; OLIVA el al., 2006). Segundo REGO et al. (2014) a principal espécie de flebotomíneo endêmica, nessa terra indígena, é a *Lutzomya longipalpis*, vetor comprovado da *L. infantum*, no continente Americano. A densidade vetorial é influenciada por condições ambientais e climáticas favoráveis, tais como temperatura, pluviosidade, umidade do ar (XIMENES et al., 2006; BARATA et al., 2004), balanço hídrico do solo e disponibilidade de matéria orgânica (JERALDO et al., 2012). As condições ambientais dessa TI, caracterizada por matas densas próximas às fontes de água e a presença de rochas calcárias propiciam uma presença vetorial no entorno dos domicílios. Nessa terra indígena, localizada na região do polígono da seca, os domicílios geralmente estão localizados nos ambientes mais úmidos,

próximos aos rochedos, locais geralmente com alta densidade vetorial (DIAS et al., 2007; ALMEIDA et al., 2014).

A presença de reservatórios silvestres nas áreas endêmicas é o outro fator da cadeia epidemiológica que pode interferir na variabilidade da prevalência da LVC. QUARESMA et al. (2011) observou nesta TI roedores (*Thrichomys apereoides, Rhipidomys mastacalis e Rattus rattus*) infectados por *L. infantum*. Esses dois fatores da cadeia epidemiológica são muito influenciados pelas variações sazonais observadas no clima e degradação ambiental. O hábito dos indígenas em destruírem o meio ambiente através das "coivaras" para o preparo da terra para o plantio, pode estar favorecendo a aproximação da fauna silvestre para o ambiente peri e intra domiciliar. Essa mudança no padrão epidemiológico da leishmaniose coloca em risco populações humanas susceptíveis a infecção, principalmente nas áreas com alta prevalência de déficits nutricionais.

Apesar da ausência de registro de LV em humanos até o ano de 2011, a presença de cães infectados é um alerta para o risco de uma possível ocorrência de casos humanos. Tem-se observado uma correlação positiva entre a infecção humana e a canina (Grimaldi et al, 2012). No Brasil, conhecer a distribuição geográfica da infecção é um método adotado pela vigilância epidemiológica da LV, permitindo a identificação de áreas silenciosas em que não existe a notificação de casos e, consequentemente, medidas de controle não são adotadas (PALATNIK-DESOUSA & DAY, 2011).

Nessa TI, a espécie responsável pela infecção dos cães, identificada cada pela PCR RFLP, nas amostras de SDPF, e no material extraído da cultura da medula óssea e nos tecidos (linfonodo mesentérico, baço, borda distal da orelha, medula óssea), foi a *L. infantum*, assim como observado por QUARESMA et al. (2011).

Esses achados demonstram que a TIX é receptiva para a LV humana, com a necessidade urgente de implementar ações de controle.

Para o melhor conhecimento e mapeamento das áreas de risco para LV faz-se necessário a realização do inquérito canino em todas as aldeias presentes na TIX. A extensão territorial dessa TI, dificuldade de acesso em determinadas localidades e o número reduzido dos agentes de zoonose foram limitações que fizeram com que a avaliação da LVC fosse realizada em apenas 17 aldeias das 32 existentes.

A técnica sorologia de IFI não foi realizada em todas as amostras dos cães da TIX (n=950). Os testes sorológicos foram executados conforme a recomendação do MS, em que o teste de ELISA era utilizado para triagem e o teste de RIFI era o método diagnóstico confirmatório. Assim, a RIFI só foi realizada em amostras indeterminadas ou positivas delo ELISA.

A caracterização da espécie envolvida na infecção dos cães só foi possível de ser realizada em 62 amostras (44,3%) ficando pendente essa avaliação em outros 72 cães positivos para o diagnóstico molecular. A utilização de amostras de SDPF pode justificar essa dificuldade de identificação, pois o volume de DNA do parasito no sangue do animal gerou pouco produto amplificado para atuação da enzima de restrição.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

As informações obtidas nesse estudo que avaliou a prevalência da LVC na TIX, empregando diferentes métodos diagnósticos, permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

- A TIX apresenta uma alta freqüência de infecção canina para LV, sendo estes importantes reservatórios para manutenção do clico da doença;
- O método molecular permitiu identificar falhas nos métodos sorológicos empregados pelo MS para o diagnóstico da LVC;
- O grande número de cães falsos negativos mantidos na TIX, por não atenderem aos critérios de eutanásia preconizados pelo MS, provavelmente garantiram o não sucesso das ações de controle adotadas pelo DSEI;
- Sugere a necessidade de mudança do algoritmo para ações que envolvam o diagnóstico sorológico da infecção do reservatório canino.

PERSPECTIVAS

8. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos pelo inquérito canino do presente estudo trouxeram informações que nortearam as primeiras ações em saúde relacionadas à LV na TIX. Além disso, já está em andamento a quantificação da carga parasitárias desses cães com o objetivo de avaliar o papel do mesmo no processo de transmissão da LV nessa área.

Atualmente, no laboratório de epidemiologia das doenças parasitárias da UFOP, vem sendo realizado uma nova avaliação da LVC na TIX, tendo como prioridade as aldeias que não participaram do inquérito apresentado. Existe também, um projeto de mestrado, em andamento, que tem como objetivo realizar conhecimento da fauna de flebotomíneos existentes nas aldeias, que apresentaram maior prevalência da LVC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P., CAMPINO, L., SANTOS-GOMES, G. M., 1998. Leishmaniose canina. Novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controlo da leishmaniose visceral humana. *Acta Méd*. Port., 11: 871-875.

ALMEIDA, A. B. P. F.; MENDONÇA, A. J.; SOUSA, V. R. F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1610-1615, 2010.

ALMEIDA, A. S.; WERNECK, G. L.; RESENDES, A .P. C. Object-oriented remote sensing image classRIFIcation in epidemiological studies of visceral leishmaniasis in urban areas. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 30, n. 8, p. 1639-1653, 2014.

ALVAR J, VÉLEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P, CANO J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*; v.7: n 35671, 2012.

ALVAR, JORGE; CAÑAVATE, C.; MOLINA, RICARDO; MORENO, J.; NIETO, JAVIER. Canine leishmaniasis. *Advances in parasitology*, v. 57, p. 1–88, 2004.

ANDRADE, H.M., REIS, A.B., DOS SANTOS, S.L., VOLPINI, A.C., MARQUES, M.J., ROMANHA, A.J.,. Use of PCR-RFLP to identify Leishmania species in naturally infected dogs. *Vet. Parasitol*. n 140, p. 231–238, 2006.

ANTÔNIO, E. G. et al. Leishmaniose visceral canina na Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 27(3) : 603-607, mar, 2011.

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

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniases. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 4. ed. Philadelphia: *Elsevier Saunders*. cap. 73, p. 735-748, 2012.

BANETH, GAD; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, LAIA; BOURDEAU, PATRICK; FERRER, LLUIS. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in parasitology*, v. 24, n. 7, p. 324–30, 2008.

BARATA, R. A. et al. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil.*Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. vol.99, n.5, pp. 481-487, 2004.

BARBOZA, D. C. P. M.; GOMES NETO, C. M. B.; LEAL, D. C.; et al.. Estudo de coorte em áreas de risco para Leishmaniose visceral canina, em municípios da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. *Rev. Bras. Saúde Prod. An*., v. 7, n. 2, p.152- 163, 2006.

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

BIGELI, J. G.; OLIVEIRA JR, W. P.; TELES, N. M. M. Diagnosis of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagas i*infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.45, n.1, p.18-23, 2012.

BIGELI, J.G.; OLIVEIRA JUNIOR, W.P.; TELES, N.M.M. Diagnosis of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 45(1):18-23, 2012.

BORGES, L. F. N. M. et al. Prevalência e distribuição espacial da leishmaniose visceral em cães do município de Juatuba, Minas Gerais, Brasil. *Cienc. Rural*. vol.44, n.2, pp. 352-357.2014.

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

CAMARGO-NEVES V. L. F. DE, KATZ G, RODAS L. A. C., POLETTO D W, LAGES L C, SPINOLA R. M. F., CRUZ O. G. Use of spacial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, São Paulo, Brazil, 1998 – 1999. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro; 17 (5): 1263-7, 2001.

CARNEIRO, D. M. T. Estudo epidemiológico sobre a Leishmaniose Visceral em centro urbano de médio porte com transmissão antiga e persistente de *Leishmania infantum*. 123 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Saúde Coletiva. Universidade Federal da Bahia, 2013.

CERBINO-NETO, J.; WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. N. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 25, n. 7, p. 1543- 1551, 2009.

CERF, B.J., JONES, T.C., BADARO, R., SAMPAIO, D., TEIXEIRA, R., JOHNSON JR, W.D.. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 156 (6):1030-1033. 1987.

CESSE, E. A. P.; CARVALHO, E. F.; ANDRADE, P. P.; RAMALHO, W. M.; LUNA, L. Organização do espaço urbano e expansão do Calazar. *Revista Brasileira de Saúde Materno e Infantil*, Recife, v. 1, n. 2, p. 167-76, 2001.

CESSE, E. A. P.; CARVALHO, E. F.; ANDRADE, P. P.; RAMALHO, W. M.; LUNA, L. Organização do espaço urbano e expansão do Calazar. *Revista Brasileira de Saúde Materno e Infantil*, Recife, v. 1, n. 2, p. 167-76, 2001.

COIMBRA JR C.E.A & SANTOS R.V. Perfil epidemiológico da população indígena no Brasil. Documento do Trabalho n°3. Universidade Federal de Rondônia e Escola Nacional de Saúde Pública. 2001.

COSTA, Carlos Henrique Nery. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? a critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba , v. 44, n. 2, p. 232-242, Apr. 2011 .

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; ROATT, B. M.; AGUIARSOARES, R. D. O.; REIS, L. E. S.; BRAGA, S. L.; MORAIS, M. H. F.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, San Francisco, v. 5, n. 8, p.1-10, 2011.

COURTENAY O, QUINNELL RJ, GARCEZ LM, SHAW JJ, DYE C. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* 186: 1314-1320.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G. JR.; MOMEN, H. (1994). A general classRIFIcation of New World Leishmania using numerical zymotaxonomy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50:296-311.

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

DANTAS-TORRES F, BRITO MEF, BRANDÃO-FILHO SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet Parasitol* 140: 54-60, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Leishmania infantum versus Leishmania chagasi: do not forget the laws of nomenclature. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, v.101, p.117- 118, 2006.

DE SANTIS, B. et al. Desempenho do teste rápido imunocromatográfico (TRI) para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina: comparação com outros métodos sorológicos em cães suspeitos de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 50, n. 3, p. 198-205, 2013.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M. & LOPES, U. (1994). Use of Molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 89 (3): 463-469.

DEPLAZES, P, SMITH, NC, ARNOLD P, LUTZ H, ECKERT J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol*, v.17, n.9, Sep, p.451-8, 1995.

DIAS ES, FRANÇA-SILVA JC, SILVA JC, MONTEIRO EM, KENIA MP, GONÇALVES CM, BARATA RA. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no estado de Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 40: 49-52. 2007.

DIETZE R, BARROS GB, TEIXEIRA L, HARRIS J, MICHELSON K, FALQUETO A, COREY R 1997. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis* 25: 1240-1242.

DIOUANI, M. F., N. B. A. BOUAFIF, ET AL. (2008). Dogs L. infantum infection from an endemic region of the north of Tunisia: a prospective study. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis* 85(1-4): 55-61.

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

ESCOBAR A.L.; SONTOS, R.V.; COIMBRA C. E. A. Jr. Avaliação de crianças indígenas Pakaanóva (Wari'), Rondônia, Brasil. *Ver. Brás saúde Mater Infant*, 3(4): 475-81, 2003.

ESCOBAR, Suzana Alves. Os projetos sociais do povo indígena Xakriabá e a participação dos sujeitos: entre o "desenho da mente", a "tinta no papel" e a "mão na massa". 2012. 215 f. Tese (Doutorado em Educação) – Faculdade de Educação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

EVANS TG, Teixeira MJ, MCAULIFFE IT, VASCONCELOS IAB, VASCONCELOS AW, SOUSA AQ, LIMA JWO, PEARSON RD. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. *Journal of Infectious Diseases* 166:1124-1132, 1992.

FELIPE, I. M. A.; AQUINO, D. M. C.; KUPPINGER, O.; SANTOS, M. D. C.; RANGEL, M. E. S.; BARBOSA, D. S.; BARRAL, A.; WERNECK, G. L.; CALDAS, A. J. M. Leishmania infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 106, n. 2, p. 207-211, 2011.

FERREIRA E. C., de LANA M, CARNEIRO M, REIS AB, PAES DV, SILVA ES, SCHALLING H, GONTIJO CM. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol* 2007; 146(3-4): 235-241.

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

FIGUEIREDO, MÁRCIA JANETE DE FÁTIMA MESQUITA DE et al. Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. *Ciênc. anim. bras.* 2014, vol.15, n.1, pp. 102-106.

FRANÇA-SILVA JC, BARATA RA, COSTA RT, MONTEIRO EM, MACHADO-COELHO GLL, VIEIRA EP, PRATA A, MAYRINK W, NASCIMENTO E, FORTES-DIAS CL, SILVA JC, DIAS ES. Importance of Lutzomyia longipalpis in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha municipality, Minas Gerais, Brazil.*Vet Parasitol* 2005; 131: 213-220.

FRANÇA-SILVA, JOÃO C; COSTA, ROBERTO T DA; SIQUEIRA, A. M. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary parasitology*, v. 111, n. 2-3, p. 161–73, 2003.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Departamento de Saúde Indígena. Indicadores de Saúde Indígena, (2000-2007). Brasília (DF): Fundação Nacional de Saúde; 2007.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana / Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P.M.P. (Ed.). Parasitologia Humana. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2012. p. 36-72.

GOMES A.H.S., FERREIRA I.M.R., LIMA M.L.S.R., CUNHA E.A., GARCIA A.S., ARAÚJO M.L.F. & PEREIRA-CHIOCCOLA V.L. 2007. PCR identification of Leishmania in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol*. 144:234- 241.

GONTIJO, C.M.F. & MELO, M.N. (2004). Leishmaniose Visceral no Brasil. Rev. Bras. *Epidemiol*. Vol. 7, Nº 3

GORDON JE. Synergism of malnutrition and infectious disease. In: Beaton GH, Bengoa JM, editors. *Nutrition in preventive medicine*. Geneva: WHO; 1976. p. 193-209. (WHO Monograph Series, 62).

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

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

IBGE - Instituto de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2010: características da população e dos domicílios. Rio de Janeiro, 2010.

IBGE - Instituto de Geografia e Estatística. O Brasil Indígena. 2013. Disponível em: Acesso em: 25 jun.2013.

IKEDA-GARCIA, F. A.; FEITOSA, M. M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Clínica Veterinária*, São Paulo, ano. XI, n. 62, p. 32-38, 2006.

JERALDO, V. L. S. et al. Sandfly fauna in an area endemic for visceral leishmaniasis in Aracaju, State of Sergipe, Northeast Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. [online]. 2012, vol.45, n.3, pp. 318-322. ISSN 0037-8682.

Kar, K (1995). Serodiagnosis of leishmaniasis. *Critical Reviews in Microbiology*. 21(2):123-152.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol 1 Academic Press Inc. (London) 1-120.

LAURENTI MD, ROSSI CN, MATTA VLR, TOMOKANE TY, CORBETT CEP, SECUNDINO NFC, et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol*. 2013;196(3-4):296-300.

LEMOS, E. M.; LAURENTI, M. D.; MOREIRA, M. A.; REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; RAYCHAUDHURI, S.; DIETZE R. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Tropica, Basel*, v. 107, n. 2, p. 205-207, 2008.

LIMA, V.M.; FATTORI, K.R.; MEICHELIN, A.F.; SILVEIRA NETO, L.; VASCONCELOS, R.O. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis, *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 173, n. 3-2, p. 330-333, 2010.

LUKES, J., MAURICIO, I.L., SCHONIAN, G., DUJARDIN, J.C., SOTERIADOU, K., DEDET, J.P., KUHLS, K., TINTAYA, K.W., JIRKU, M., CHOCHOLOVA, E., HARALAMBOUS, C., PRATLONG, F., OBORNIK, M., HORAK, A., AYALA, F.J., MILES, M.A., 2007. Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy. *Proc. Natl. Acad.* Sci. U.S.A. 104, 9375–9380.

MACHADO, J. G.; HOFFMANN, J. L.; LANGONI, H. Imunopatologia da leishmaniose visceral. *Clínica Veterinária*, São Paulo, ano XII, n. 71, p. 50-58, 2007.

MAGNABOSCO, C. População domiciliada de cães e gatos em São Paulo: perfil obtido através de um inquérito domiciliar multicêntrico. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MAIA C., RAMADA J., CRISTÓVÃO J.M., GONÇALVES L. & CAMPINO L. 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. Vet. J. 179:142-144.

MAIA, C, NUNES M, CRISTÓVÃO J, CAMPINO L. Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Trop*, v.116, n.3, dec, p.193-9, 2010.

MAIA, C., CAMPINO, L. 2008 – Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and imune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158 (4), pp. 274 – 287.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil:trends and challenges. *Cad. Saúde Pública*. 2008, vol.24, n.12, pp. 2941-2947.

MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; GOMES, A. A. D.; SILVA, A. R. S.; VIEIRA, R. F. C.; CAMACHO, A. A.; QUINNG, J.; CHANDRASHEKARG, R. Validation of a Leishmania infantum ELISA rapid test for serological diagnosis of Leishmania chagasi in dogs. *Veterinary Parasitology*, Philadelphia, v. 175, n. 1, p. 15-19, 2011.

MARZOCHI M.C., COUTINHO S.G., et al. Leishmaniose Visceral Canina no Rio de Janeiro – Brasil. *Cad. Saúde pública*. 1985; 1 (4) 432 – 446.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.

MICHALSKY EM, GUEDES KS, SILVA FOL, FRANÇA-SILVA JC, DIAS CLF, BARATA RA, DIAS ES. Infecção natural de Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis (Diptera: Psychodidae) por Leishmania infantum chagasi em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2011; 44: 58-62.

MICHALSKY, E.M.; ROCHA, M.F.; LIMA, A.C.V.M.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; IRES, M.Q.; OLIVEIRA, F.S.; PACHECO, R.S.; SANTOS, S.L.; BARATA, R.A.; OMAMNHA, A.J.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to Lutzomyia longipalpis phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol*. V.147, 1-2, p. 67-76, 2007.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, Oxford, v. 24 n. 8, p. 371-378, 2008.

MONTEIRO, E.M.; França da Silva JC, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, Machado-Coelho GLL, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias ES. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Ver Soc Bras Med Trop* 2005; 38: 147-152.

MORENO, J.; ALVAR, JORGE. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in parasitology*, v. 18, n. 9, p. 399–405, 2002.

NEGRÃO, G. N. & FERREIRA, M. E. M. C. Considerações sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana e sua expansão no território brasileiro. *Revista Percurso* – NEMO, Maringá, v. 6, n. 1 , p. 147- 168, 2014.

NELSON, R.W e COUTO, C.G. Doenças protozoárias polissistemicas. In: NELSON et al. Medicina interna de pequenos animais. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 104, p 1031-1038

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

OLIVA G, SCALONE A, MANZILLO VF, GRAMICCIA M, PAGANO A, DI MUCCIO T, GRADONI L 2006. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol* 44: 1318- 1322.

OLIVEIRA LS, JULIÃO FS, SOUZA VMM, FREITAS DS, SOUZA BMPS, ET AL. (2005) A utilização da imunofluorêscencia indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. *Ciência Animal Brasileira* 6: 16 41-47.

OLIVEIRA, A. G; ANDRADE-FILHO, J.D; FALCAO, A. L; BRAZIL, R. P. Study of sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the urban área of Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil, from 1999 to 2000. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 19(4):933-944, jul-ago, 2003.

OLIVEIRA, C. D. L.; ASSUNÇÃO, R. M.; REIS, I. A.; PROIETTI, F. A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 17, n. 5, p. 1231-1239, 2001.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B, DAY, M. J. One health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 4:197, 2011. doi:10.1186/1756-3305-4-197.

PALATNIK-DE-SOUSA,C.B.; DOS SANTOS,V.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; et al.. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. Am. *J. Trop. Med*. Hyg. v. 65, n.5, p. 510-517, 2001.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classRIFIcation of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Chicago, v. 36, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

PEDRAZA, D. F.; SALES, M. C.; QUEIROZ, D. and LEITAO, L. C. A.. Brazilian indigenous children: Review of studies about nutritional status.*Rev. Nutr*. 2014, vol.27, n.4, pp. 473-488.

PENA JL. Perfil sanitário, indicadores demográficos e saúde ambiental após a implantação do Distrito Sanitário Especial Indígena: o caso dos Xakriabá em Minas Gerais [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2004.

PRADO PF, ROCHA MF, SOUSA JF, CALDEIRA DI, PAZ GF, DIAS ES. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011; v.44 n.5 Sept./Oct.

QUARESMA, P. F. Estudo da leishmaniose tegumentar na terra indígena Xakriabá: o parasito, o hospedeiro e os vetores. 2011. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2011.

QUARESMA PF, RÊGO FD, BOTELHO HA, ET AL. Wild, synanthropic and domestic hosts of Leishmania in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2011;105: 579-585.

QUINNELL, RUPERT J; CARSON, C.; REITHINGER, RICHARD; GARCEZ, LOURDES M; COURTENAY, ORIN. Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 1, p. e1992, 2013.

RÊGO FD, SHIMABUKURO PHF, QUARESMA PF, COELHO IR, TONELLI GB, SILVA KMS, BARATA RA, DIAS ES, GONTIJO CMF: Ecological aspects of the Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in the Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. *Parasit Vectors* 2014, 7:220.

REIS, A. B; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A. M. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 112, n. 3-4, p. 102–16, 2006.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R. J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C. R. Rapid Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs: Comparative Study Using an Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, 2002.

REITHINGER, RICHARD; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H. et al. Cutaneous leishmaniasis. 2007.

RODGERS, M.R.; POPPER, J.M. & WIRTH, D.F. (1990). AmplRIFIcation of kinetoplast DNA as a tool in the detection diagnosis of Leishmania. *Experimental Parasitology* 71: 267-275.

ROMERO, G.A.S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - A Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 19;4(1):e584, 2010.

RONDANI C 1840. *Sopra una Specie di Insetto Dittero*, Memoria prima per servire alla ditterologia italiana n°1, Donati, Parma, 16 pp.

ROSÁRIO, E. Y. Do; GENARO, Odair; FRANCA-SILVA, J. C. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude Leishmania and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 2, p. 197–203, 2005.

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

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

SAIKI, R.K.; SANCHES, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN. G.T.; ERLICH, H.A. & ANHEIM, N. (1985). Enzymatic amplRIFIcation of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.

SANCHEZ-ROBERT, E, ALTET, L, UTZET-SADURNI, M, GIGER, U, SANCHEZ, A, FRANCINO, O. (2008). Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. Veterinary Research 39(3): 36.

SANTOS, Juliana Lúcia Costa et al. Leishmaniose tegumentar americana entre os indígenas Xakriabá: imagens, ideias, concepções e estratégias de prevenção e controle. *Saude soc.* vol.23, n.3, pp. 2014.

SERAFIM M. G. Política nacional de atenção aos povos indígenas. In; YAMAMOTO, R. M. (Org.). SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA (Org.). Manual de atenção à saúde da criança indígena brasileira. Brasília: Fundação Nacional de saúde; 2004. p 25-34.

SHERLOCK IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91: 671-683, 1996.

SILVA E. S., GONTIJO C.M.F., MELO MN. Contribution of molecular technjques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends in Parasitol* 2005; 21(12), 550-552.

SILVA, J. P.; WERNECK, G. L.; MACEDO, E. C.; CARVALHO, H.; CRUZ, M. S. P. Fatores associados a infecção por *Leishmania chagasi* em cães domiciliados de Teresina, Estado do Piauí, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília, v. 45, n. 4, p. 480-484, 2012.

SILVA, M. V. Avaliação de testes sorológicos para leishmaniose visceral canina utilizando coleta de amostra sanguínea em papel de filtro, 2005. 193f. Tese de Mestrado em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Ouro Preto, MG.

SILVEIRA, F. T.; CARNEIRO, L. A.; RAMOS, P. K.; CHAGAS, E. J.; LIMA, L. V.; CAMPOS, M. B.; LAURENTTI, M. D.; GOMES, C. M.; CORBETT, C. E. A crosssectional study of canine *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil ratifies a higher prevalence of specific IgG-antibody response than delayedtype hypersensitivity in symptomatic and asymptomatic dogs. *Parasitology Research*, Berlin, v. 111, n. 4, p. 1513-1522, 2012.

SÍRIO, M. A. O. Estado nutricional das crianças de 0 a 12 anos e práticas alimentares da Sociedade Indígena Xakriabá de Minas Gerais. 175 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2012.

SOLANO-GALLEGO, L; KOUTINAS, A; MIRÓ, G; et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. V*eterinary parasitology*. 28; v. 165, n. 1-2, p. 1–18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L; MORELL, P. Prevalence of Leishmania infantumInfection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. *Journal of clinical* …, v. 39, n. 2, p. 560–3, 2001.

SOUSA-GOMESI, M. L.; MOTAII, E. Análise dos registros de leishmaniose visceral pelo método de captura-recaptura. *Rev Saude Publica*, v. 41, n. 6, p. 931-7, 2007.

TÉCNICA CONJUNTA N°01/2011 – CGDT – CGLAB/DEVIT/SVS/MS, publicada em 29 de dezembro de 2011.

TEIXEIRA-NETO, Rafael Gonçalves et al. Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. *Parasites & vectors*, v. 7, n. 1, p. 485-494, 2014.

THAKUR C.P. Socio-economics of visceral leishmaniasis in Bihar (India). Transactions of the *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000; 94:156–157.

TRAVI BL, VÉLEZ ID, BRUTUS L, SEGURA I, JARAMILLO C, MONTOYA J 1990. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg 84*: 676-677.

WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 26 n. 4, p.644-5, 2010.

WHO 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases:First WHO report on neglected tropical diseases. In WHO. Geneva, p. 184.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. *Leishmaniasis.* 2014. Disponível em: http://www.who.int/ topics/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 10 jan. 2015.

XIMENES MF, Castellón EG, De Souza MF, Menezes AA, Queiroz JW, Macedo e Silva VP, et al. Effect of abiotic factors on seasonal population dynamics of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) in northeastern Brazil. *J Med Entomol* 2006; 43:990-5.

ZANETTE, M. F. Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. 2006. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista ―Júlio de Mesquita Filho‖, Araçatuba, 2006.

ANEXOS

10. ANEXOS

Anexo I

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

UFOP
Universidade Federal de Ouro Preto

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo n°. 2010/39, relativo ao uso de animais, do projeto intitulado *"Prevalência da Leishmaniose visceral canina (LVC) na terra indígena Xakriabá, localizada em Minas Gerais, Brasil, em 2010"* e que tem como responsável o Prof. Dr. George Luiz Lins Machado Coelho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA-UFOP).

Este certificado expira em 12/12/2013.

Ouro Preto, 13 de dezembro de 2010.

Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa
Coordenadora da CEUA-UFOP

Anexo II

Roteiro para necropsia de cães com leishmaniose visceral

Número do animal:
Endereço:

1)Dados do animal

- Raça:
- Sexo:
- Idade:
- Cor:
- Castrado?:

2)Sintomatologia clínica

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

- Linfadenopatia ( )

Ectoparasitos ( )pulgas ( )carrapatos

Classificação geral

Assintomático( ) Sintomático( )

Achados de necropsia

Fígado: normal( ) alterado( )

Baço: normal( ) alterado( )

Linfonodo mesentérico: normal( ) alterado( )