

UNIVERSIDADE VALE DO RIO DOCE
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOPATOLOGIA DAS DOENÇAS PARASITÁRIAS E INFECCIOSAS

Eloiza Gonçalves Antônio

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA TERRA INDÍGENA KRENAK,
RESPLENDOR, MINAS GERAIS, BRASIL, 2007**

Governador Valadares

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Antônio, Eloiza Gonçalves

Leishmaniose visceral canina na terra indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007 / Eloiza Gonçalves Antônio – 2009.

115 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Vale do Rio Doce, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Biológicas, Governador Valadares, MG, 2009.

Orientador: George Luiz Lins Machado Coelho

1. Leishmaniose visceral canina. 2. Índios Krenak. I. Coelho, George Luiz Lins Machado. II. Universidade Vale do Rio Doce. III. Título.

CDD 614. 534

ELOIZA GONÇALVES ANTÔNIO

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA TERRA INDÍGENA KRENAK,
RESPLENDOR, MINAS GERAIS, BRASIL, 2007**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências Biológicas como requisito para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas pela
UNIVERSIDADE VALE DO RIO DOCE.

Orientador: Prof. Dr. George Luiz Lins Machado Coelho

Governador Valadares

2009

ELOIZA GONÇALVES ANTÔNIO

LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA TERRA INDÍGENA KRENAK,
RESPLENDOR, MINAS GERAIS, BRASIL, 2007

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências Biológicas como requisito para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas pela
UNIVERSIDADE VALE DO RIO DOCE.

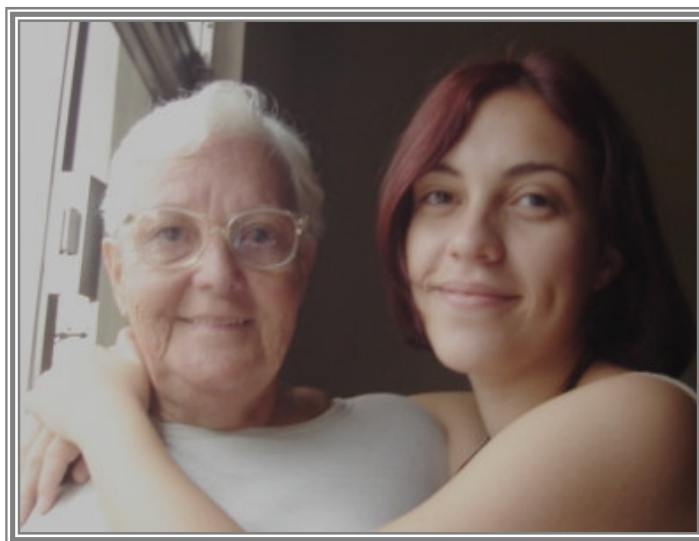
Governador Valadares, 04 de março de 2009.

Banca Examinadora:

Professor: Dr. Edelberto Santos Dias
Centro de Pesquisas René Rachou - Fiocruz

Professor (a): Dra. Patrícia Maria Escalda
Universidade Vale do Rio Doce

Dedico a conclusão deste trabalho ao grande amor da minha vida, minha avó a qual eu considero como mãe. Uma mulher de fibra que conquistou o seu espaço no mundo e no meu coração, um grande exemplo de dignidade e persistência. Graças aos seus esforços contínuos obtive a oportunidade de me tornar uma pessoa melhor. Talvez hoje eu ainda não represente um terço do que essa mulher maravilhosa e apaixonada pela vida é e sempre será. Foi a minha querida e muito amada avó Neuza dos Santos Oliveira a grande responsável pela minha formação intelectual. Agradecerei eternamente a ela o seu amor incondicional por mim. Sigo o meu caminho sempre tentando me espelhar no melhor exemplo de vida que conheço.



Não existem palavras no mundo que expressem o amor e a gratidão que sinto por essa mulher!

À esquerda a Sr^a. Neuza dos Santos Oliveira, minha avó, e a direita a autora da presente dissertação.

Dedico a realização desse trabalho aos meus amigos pelo incentivo e pela confiança em mim depositada.

Dedico este trabalho ao responsável pela minha inserção no mundo científico, meu querido ex-professor de química orgânica Alcides José Monteiro da Silva. Este homem é uma pessoa incrível e abriu as portas da ciência pra mim e me carregou pela mão. Muitíssimo obrigada Cici, lembrarei de você eternamente.

Especialmente a minha irmã Luciene Gonçalves Antônio e ao seu namorado Eduardo pelo grande auxílio oferecido a nós.

Ao meu companheiro dessa jornada Marcos Aurélio Fulgêncio Malacco e seus familiares pela ajuda e apoio incomensuráveis.

Dedico por último aos meus pais, responsáveis por me concederem a vida e por me ensinarem a vive - lá plenamente, vencendo todos os desafios.

Especialmente a minha mãe Eloina Gonçalves Antônio, uma pessoa de coração puro e da qual sinto muita falta. Gostaria de poder estar ao seu lado mãe, em todos os momentos, mas estamos unidas pelo amor que nunca, em nenhum momento deixou de existir, apesar da distância que nos separa.

“Sem a ajuda das pessoas que nos cercam e que acreditam em nós é impossível vencer prontamente aos desafios e aos infortúnios de nossas vidas. Por isso, devemos sempre lembrar que nunca chegamos onde estamos sozinhos.”

Eloiza Gonçalves Antônio

É a todas essas pessoas, que de forma direta e/ou indireta, foram responsáveis pelas minhas conquistas, que dedico essa dissertação.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Nacional de Saúde, pela execução dos inquéritos sorológicos caninos na Terra Indígena Krenak. Pelo acesso aos dados de georreferenciamento, pelo treinamento durante os trabalhos de campo, pelo apoio logístico na realização dos inquéritos sorológicos caninos e pelo encaminhamento das amostras de sangue do segundo inquérito a Fundação Ezequiel Dias.

À Universidade Federal de Ouro Preto, pela parceria com a Universidade Vale do Rio Doce e pela realização da sorologia das amostras de soro coletadas no primeiro inquérito canino. Especialmente ao professor George Luiz Lins Machado Coelho responsável pelas análises.

À FUNED/Instituto Octávio Magalhães – Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças – Setor de Doenças Parasitárias, pela análise das amostras de soro e papel filtro. Especialmente a Eliane Furtado que gentilmente cedeu todos os dados necessários referentes às análises e ao responsável por elas Daniel Moreira de Avelar.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ, Laboratório de Leishmanioses, coordenado pelo professor Edelberto dos Santos Dias, pelas análises das amostras de tecido coletadas, para confirmação do agente etiológico. Especialmente a professora Célia Maria Ferreira Gontijo, que acompanhou o trabalho e aos alunos Patrícia Flávia Quaresma, Rafael Gonçalves Teixeira Neto, Eduardo de Castro Ferreira, Shara Regina da Silva e Ana Cristina Vianna Mariano da Rocha Lima pelo auxílio no diagnóstico molecular.

À professora Maria Norma Melo da Universidade Federal de Minas Gerais, por ter me concedido o estágio de docência, realizado no ICB/Departamento de Parasitologia da UFMG.

À Universidade do Vale do Rio Doce, principalmente ao curso de mestrado em Imunopatologia das doenças parasitárias e infecciosas. Aos professores e a coordenação do curso de mestrado. Especialmente a professora e coordenadora Alda Maria pelo seu apoio e prontidão.

A todos que me ajudaram financeiramente, pois sem eles não seria possível concluir este trabalho.

À minha grande amiga Regina Ceres Garcia, minha colega de curso e que para mim foi praticamente uma mãe. Não tenho como expressar o carinho imenso que tenho por você amiga, realmente a palavra “mãe” é a melhor definição para a forma como você cuidou de mim.

À Marcos Aurélio Fulgêncio Malacco pelo seu amor, apoio e companheirismo em todos os momentos e principalmente pela sua perspicácia e sabedoria. Principalmente pela sua gentileza de me conceder toda ajuda necessária demonstrando a pessoa incrível e amável que é, com a qual tenho imenso prazer em compartilhar mais está conquista. Sempre ao meu lado me ensinando que todo dia é dia de viver e ser feliz.

Aos amigos e companheiros de trabalho da farmácia Dose-Certa (Samara, Mayrone, Maurício, Giuseppe, Lucas, Matoso, Luiz e Laudirene), que foram muito além de colegas de trabalho, mas pessoas incríveis que sempre zelaram por mim e que me acolheram nas horas de dificuldade. Especialmente a Mayrone, minha querida Mázinha e sua família que me aturaram por muito tempo sem reclamar... Este trabalho eu dedico a vocês, parceiros de mais uma jornada, das muitas que ainda virão. A vida realmente é uma grande escola. Muito Obrigada amigos, vocês moram no meu coração!

Ao meu orientador Professor George Luiz Lins Coelho-Machado pela sua dedicação e paciência e pelos ensinamentos a mim passados de grande valor tanto na minha jornada acadêmica como na minha vida pessoal.

As minhas amigas Adriana Oliveira de Paula e Roberta Millar Tarcsay, por todo apoio, principalmente por me ouvirem carinhosamente e pelos seus conselhos maravilhosos. Amo vocês e dedico este trabalho a nossa amizade eterna.

Aos meus amigos, não menos importantes, pois todos moram no meu coração. Muito Obrigada pela amizade: Ludmila, Juliana, Rodolfo, Tia Cristina, Tia Ana, Paulo César, Thalles, Luciana, Luíza Sá, Luíza Malacco, Rodrigo Machado, Silvio Jacome, Victor Marco, Cecília...

"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".

Fernando Pessoa

"É durante as fases de maior adversidade que surgem as grandes oportunidades de se fazer o bem a si mesmo e aos outros".

Dalai Lama

RESUMO

A Terra Indígena Krenak está localizada no município de Resplendor, no estado de Minas Gerais, Brasil. O município de Resplendor é uma área receptiva para leishmaniose visceral canina de acordo com os critérios de classificação do Programa de Controle da Leishmaniose visceral (PCLV) pela presença do vetor *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*, detectada após inquérito entomológico realizado pela Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, em 2007. O objetivo desse trabalho foi verificar a presença de infecção canina por *Leishmania sp.* e a sua prevalência na Terra Indígena Krenak. Foram executados dois inquéritos sorológicos caninos para pesquisa da infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, agente etiológico da leishmaniose visceral. Amostras de sangue total coletado pela via venosa e em papel filtro foram coletadas para determinação dos níveis de anticorpos específicos através da absorvância obtida em ensaio imunoenzimático (EIE) e dos títulos definidos pela reação de imunofluorescência indireta (IFI). A população canina examinada no primeiro inquérito abrangeu todas as aldeias da Terra Indígena Krenak, representado 94% da população canina e no segundo inquérito 97,8% da população canina foi examinada. As taxas de prevalência encontradas no primeiro inquérito por aldeia foram de 40 % na aldeia Barra do Eme, 35% na aldeia Cacique e 76,9% na aldeia Porto da Barca, sendo está última a maior prevalência da LVC encontrada no primeiro inquérito. Dez eutanásias seguidas de necropsia foram realizadas para coleta de material utilizado para o diagnóstico molecular da espécie de *Leishmania sp.* circulante, a única espécie identificada foi a *Leishmania (Leishmania) chagasi*. No segundo inquérito as taxas de prevalência nas aldeias Barra do Eme, Cacique e Porto da Barca foram de 7,7%, 8,3%, 7,1%, respectivamente. A taxa de prevalência global na Terra Indígena Krenak no primeiro inquérito foi 46% e no segundo foi 7,8%. Dentre os cães positivos no primeiro inquérito 10 necropsias foram realizadas, contribuindo para a queda da prevalência da leishmaniose canina por aldeias e na Terra Indígena Krenak no ano de 2007. Não foi observada diferença estatística entre a ocorrência de infecção e as variáveis: sexo, idade e tipo de pelo.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina. Terra indígena Krenak. Prevalência.

ABSTRACT

The aboriginal land Krenak is located in the city of Resplendor, in the state of Minas Gerais, Brazil. The city of Resplendor is a receptive area for canine visceral leishmaniasis in accordance with the criteria of classification of the Program of Control of the visceral Leishmaniasis (PCLV) for the presence of the vector *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*, after detected entomologic inquiry carried through by the State secretary of Health of Minas Gerais, in 2007. The objective of this work was to verify the presence of canine infection for *Leishmania* sp. e its prevalence in the Aboriginal Land Krenak. Two canine serologic inquiries for research of the infection for *Leishmania* had been executed (*Leishmania*) *chagasi*, etiological agent of visceral leishmaniasis. Samples of total blood collected by the venose way and in paper filter had been collected for determination of the levels of specific antibodies through the absorbance gotten in imunoenzimático assay (EIE) and of the headings defined for the reaction of indirect imunofluorescence (IFI). The examined canine population in the first inquiry enclosed all the villages of the Aboriginal Land Krenak, represented 94% of the canine population and in as inquiry 97.8% of the canine population it was examined. The found taxes of prevalence in the first inquiry for village had been of 40% in the village Barra do Eme, 35% in the village Cacique and 76.9% in the village Porto da Barca, being are last the biggest prevalence of the LVC found in the first inquiry. Ten followed euthanasias of autopsy had been carried through for collection of material used for the molecular diagnosis of the species of *Leishmania* sp. circulating, the only identified species was the *Leishmania (Leishmania) chagasi*. In as the inquiry the taxes of prevalence in the villages Barra do Eme, Cacique and Porto da Barca had been of 7.7%, 8.3%, 7.1%, respectively. The tax of global prevalence in the Aboriginal Land Krenak in the first inquiry was 46% and in as he was 7.8%. Amongst the positive dogs in the first inquiry 10 euthanasias had been carried through, contributing for the fall of the prevalence of canine leishmaniasis for villages and in the Aboriginal Land Krenak in the year of 2007. No difference statistics were found between infection and sex, age and type of for.

Key- words: Visceral Canine Leishmaniasis. Aboriginal Land Krenak. Prevalence.

LISTA DE FIGURAS

Figura	1 -	À esquerda, paciente no período de estado da LVA apresentando sintomas de hepatomegalia, esplenomegalia; à direita, paciente no período final da LVA, apresentando emagrecimento e caquexia além dos sintomas de hepatomegalia, esplenomegalia.....	23
Figura	2 -	<i>Lutzomyia (L.) longipalpis</i> , durante o repasto sangüíneo.....	26
Figura	3 -	Formas encontradas no gênero <i>Leishmania</i> . À esquerda a forma promastigota e à direita, a forma amastigota.....	28
Figura	4 -	Ciclo de transmissão da LVA.....	29
Figura	5 -	Cão com sintomas de LVC, Terra Indígena Xakriabá, São João das Missões, Minas Gerais, Brasil, 2007.....	32
Figura	6 -	(1) <i>Dusicyon vetulus</i> e (2) <i>Cerdocyus thous</i>	32
Figura	7 -	(1) <i>Didelphis albiventris</i> e (2) <i>Didelphis marsupialis</i>	33
Figura	8 -	<i>Proechimys canicolous</i>	34
Figura	9 -	<i>Felis catus</i>	34
Figura	10 -	(1) Cão com LV, apresentando apatia, alopecia e lesões no corpo; (2) Cão com onicogrifose; (3) Cão com lesões de face e orelha; (4) Cão apresentando emagrecimento e apatia e (5) Cão com emagrecimento, ceratoconjuntivite lesões de face e orelha.....	36
Figura	11 -	À esquerda exemplo de amostra positiva na IFI, à direita exemplo de amostra negativa.....	39
Figura	12 -	Vista parcial da área ocupada pela Aldeia Cacique, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.....	46

Figura 13 -	Coleta de sangue em papel de filtro, Terra Indígena Krenak, MG, Novembro de 2007.....	50
Figura 14 -	Palestra sendo ministrada pelo médico veterinário do DSEI-MG/ES; Falando com a comunidade indígena sobre as leishmanioses, com ênfase no reservatório canino e no risco de infecção em pessoas jovens e idosas; e; explicando para a comunidade indígena o ciclo de transmissão da doença.....	52
Figura 15 -	Fotos 1 e 2 Pinsher fêmea, sororreagente para <i>L. (L.) chagasi</i> , apresentando alopecia localizada e onicogribose; Fotos 3 a 8, filhote da Pinsher fêmea das fotos 1 e 2, com sorologia positiva e sintomas característicos de LVC com idade de aproximadamente 3 meses, apresentando alopecia generalizada, onicogribose, dermatites e apatia.....	58
Figura 16 -	Cão assintomático, Terra Indígena Xakriabá, São João das Missões, Minas Gerais, 2007.....	70
Figura 17 -	Cão oligossintomático, Terra Indígena Xakriabá, São João das Missões, MG, 2007.....	70
Figura 18-	Cães sintomáticos, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, 2007.....	71
Figura 19 -	Esplenomegalia encontrada entre os cães eutanasiados com sorologia positiva para <i>L. (L.) chagasi</i> , pinça e tesoura cirúrgicas como parâmetro de tamanho, Terra Indígena Krenak, Minas Gerais, 2007.....	71
Figura 20 -	Visualização em Gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata 0,2%; Da esquerda para a direita temos o peso molecular (PM) em seguida as amostras de pele de P1 a P10; e os controles: positivo (CP) e controle negativo (CN). As bandas observadas nas amostras com o mesmo peso molecular do CP indicam a presença de DNA de <i>Leishmania</i> . Todas as amostras de P1 a P10 são positivas.....	72

Figura	21 -	Visualização em gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata 0,2%, dos perfis das bandas geradas após a digestão do produto amplificado através da enzima HAE III; Método de RFLP-PCR. Da esquerda para direita temos o peso molecular (\emptyset 174), seguido dos controles: <i>L. (V.) braziliensis</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L.(L.) chagasi</i> . Amostras de pele de P1 a P10, por último o controle negativo.....	73
Mapa	1 -	Domínio da Mata Atlântica original e remanescente. Observar que a fronteira entre MG e ES, onde se localiza o município de Resplendor, se encontra na área originalmente coberta pela Mata Atlântica.....	46
Mapa	2 -	Distribuição espacial dos domicílios por aldeia, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.....	47
Mapa	3 -	Distribuição espacial dos cães pertencentes à Terra Indígena Krenak, com sorologia indeterminada para LVC no primeiro inquérito sorológico canino realizado em 2007.....	62
Mapa	4 -	Distribuição espacial dos cães pertencentes à Terra Indígena Krenak, com sorologia negativa para LVC no primeiro inquérito sorológico canino realizado em 2007.....	63
Mapa	5 -	Distribuição espacial dos cães pertencentes à Terra Indígena Krenak, com sorologia negativa para LVC no primeiro inquérito sorológico canino realizado em 2007.....	64
Mapa	6 -	Distribuição espacial dos cães pertencentes à Terra Indígena Krenak, com sorologia indeterminada para LVC no segundo inquérito sorológico canino realizado em 2007.....	65
Mapa	7 -	Distribuição espacial dos cães pertencentes à Terra Indígena Krenak, com sorologia negativa para LVC no segundo inquérito sorológico canino realizado em 2007.....	66
Mapa	8 -	Distribuição espacial dos cães pertencentes à Terra Indígena Krenak, com sorologia positiva para LVC no segundo inquérito sorológico canino realizado em 2007.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Primeiro inquérito sorológico canino para a LVC na Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.....	59
Tabela 2 -	Frequências relativas da sorologia e prevalência da LVC por aldeia no primeiro inquérito sorológico canino da LVA, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, abril de 2007.....	60
Tabela 3 -	Avaliação do nível de significância entre os resultados positivos e negativos por aldeias encontradas no I inquérito sorológico canino para a LVA, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.....	60
Tabela 4 -	Avaliação do nível de significância entre os resultados positivos e negativos por aldeias encontradas no II inquérito sorológico canino para a LVA, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.....	60
Tabela 5 -	Avaliação do nível de significância entre as taxas de prevalência encontradas no I e no II inquérito sorológico canino para a LVA, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.....	61
Tabela 6 -	Taxa de prevalência em LVC segundo o sexo no primeiro inquérito, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.....	68
Tabela 7 -	Taxa de prevalência em LVC segundo o sexo no segundo inquérito, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.....	68
Tabela 8 -	Prevalência da LVC por idade no primeiro inquérito, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.....	68
Tabela 9 -	Prevalência da LVC por idade no segundo inquérito, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.....	69

Tabela 10 -	Resultado da análise estatística e taxa de prevalência da LVC por tipo de pêlo no primeiro inquérito realizado na Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.....	69
Tabela 11 -	Resultado da análise estatística e taxa de prevalência da LVC por tipo de pêlo no segundo inquérito realizado na Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.....	69
Tabela 12 -	Caracterização quanto à presença de sinais e sintomas da LVC nos cães eutanásiados no primeiro inquérito sorológico para a LVA, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.....	70
Tabela 13 -	Alterações observadas nos cães eutanásiados no primeiro inquérito sorológico para a LVA, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.....	72

LISTA DE SIGLAS

MS	Ministério da Saúde
NT	Norma Técnica
ELISA	Enzyme-Linked Imunossorbent Assay
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
EIE	Ensaio imunoenzimático
IFI	Imunofluorescência Indireta
PCR	Polimerase Chain Reaction – (Reação em cadeia da polimerase)
RFLP-PCR	Restriction Fragment Length Polymorfism-Polimerase Chain Reaction
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
UNIVALE	Universidade Vale do Rio Doce
CPqRR	Centro de pesquisas René Rachou
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
DSEI-MG/ES	Distrito Sanitário Especial Indígena de Minas Gerais e Espírito Santo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
OMS	Organização Mundial de Saúde
WHO	World Health Organization – (Organização Mundial de Saúde)
SAD- 69	South American Datum – (Sistema Geodésico da América do Sul)
UTC- 3	Coordinated Universal Time – (Tempo Universal Coordenado)
PCLV	Programa de Controle da Leishmaniose Visceral
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LV	Leishmaniose Visceral
SMF	Sistema Fagocitário Mononuclear
GPS	Global Position System – (Sistema de posicionamento Global)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
TI	Terra Indígena
PBS	Phosphate Buffered Saline – (Tampão Fosfato)
Strips	Orifícios
Gold Standard	Teste Padrão Ouro

IAL-SP	Instituto Adolfo Lutz – São Paulo
PNUD	Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
PIB	Produto Interno Bruto
IC	Intervalo de Confiança
χ^2	Teste de Qui-Quadrado
Valor de p	Nível de significância
SUCAM	Superintendência de Controle de Endemias
IVDU	Viciados em drogas intravenosas
pb	Pares de Base

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
1.1	LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA.....	22
1.2	PRIMEIROS REGISTROS DA LVA HUMANA NAS AMÉRICAS E NO BRASIL.....	24
1.3	AGENTE ETIOLÓGICO.....	25
1.4	HOSPEDEIROS INVERTEBRADOS (VETORES).....	25
1.4.1	<i>Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis</i>.....	26
1.4.2	<i>Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi</i>.....	27
1.5	TRANSMISSÃO.....	28
1.5.1	Ciclo de transmissão.....	29
1.6	HOSPEDEIROS VERTEBRADOS (RESERVATÓRIOS DE <i>LEISHMANIA</i>)..	30
1.6.1	Homem.....	30
1.6.1.1	Co-infecção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).....	30
1.6.2	Cão.....	32
1.6.3	Raposas.....	32
1.6.4	Marsupiais.....	33
1.6.5	Outros vertebrados.....	34
1.7	LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	35
1.7.1	Sinais clínicos.....	35
1.7.2	Resposta imune.....	36
1.7.3	Métodos de diagnóstico.....	37
1.7.3.1	Diagnóstico clínico.....	37
1.7.3.2	Diagnóstico parasitológico.....	37
1.7.3.3	Diagnóstico sorológico.....	38
1.7.3.4	Diagnóstico Molecular (PCR).....	40
1.7.4	Validação dos testes diagnósticos para LVA.....	40
1.7.5	Medidas de controle.....	41
2	JUSTIFICATIVA.....	42
3	OBJETIVOS.....	43
3.1	OBJETIVO GERAL.....	43

3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4	METODOLOGIA.....	44
4.1	DESENHO DO ESTUDO.....	44
4.2	ÁREA DE ESTUDO.....	45
4.3	POPULAÇÃO ALVO.....	48
4.3.1	Populações caninas examinadas.....	48
4.4	GEORREFERENCIAMENTO E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL.....	48
4.5	COLETAS DE SANGUE CANINO.....	49
4.5.1	Primeiro Inquérito canino.....	49
4.5.1.1	Identificação das amostras de sangue.....	49
4.5.2	Segundo Inquérito canino.....	50
4.6	DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO.....	51
4.7	CÁLCULOS DE PREVALÊNCIA E INCIDÊNCIA.....	51
4.7.1	Taxa de incidência.....	51
4.7.2	Taxa de prevalência.....	51
4.8	EUTANÁSIA.....	52
4.8.1	Coleta de material “post-mortem”.....	53
4.9	DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	53
4.9.1	Extração de DNA das amostras de tecido animal.....	53
4.9.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	54
4.9.3	Polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP-PCR), para identificação das espécies de <i>Leishmania</i>.....	54
4.10	CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO.....	55
4.10.1	Positividade.....	55
4.10.2	Variáveis.....	55
4.10.3	Sintomas.....	55
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
5	RESULTADOS.....	56
5.1	ALDEIAS.....	56
5.1.1	Barra do Eme.....	56
5.1.2	Cacique.....	57
5.1.3	Porto da Barca.....	59
5.2	INQUÉRITOS SOROLÓGICOS CANINOS.....	59

5.2.1	Taxas de prevalência da LVC do primeiro inquérito.....	59
5.2.2	Comparação entre as taxas de prevalência da LVC nos dois inquéritos na Terra Indígena Krenak, no ano de 2007.....	60
5.3	DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DA LVC.....	61
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA DA ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS SEXO, IDADE E TIPO DE PÊLO.....	68
5.5	SINAIS CLÍNICOS E ALTERAÇÕES DE ÓRGÃOS DO SFM DE CÃES EUTANASIADOS.....	69
5.6	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	72
6	DISCUSSÃO	73
6.1	LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	78
7	CONCLUSÕES	79
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
	REFERÊNCIAS	80
	ANEXOS	91

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral americana é uma zoonose parasitária provocada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi*, transmitida no Brasil por dípteros das espécies *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* e *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi*. Os principais hospedeiros vertebrados desta parasitose são os humanos, os cães, os gambás e as raposas. Sob o aspecto da saúde pública os cães possuem um papel importante na transmissão da doença, devido ao grande contingente de cães infectados e assintomáticos e principalmente pela coabitação com humanos e presença no peridomicílio.

O presente trabalho é um estudo transversal que tem como objetivo principal avaliar a prevalência e a distribuição espacial da leishmaniose visceral canina (LVC) na Terra Indígena Krenak, localizada no município de Resplendor, Minas Gerais, 2007. Ao mesmo tempo, pretende-se averiguar a suscetibilidade à infecção segundo características inerentes aos cães. Para tal, foram executados dois inquéritos sorológicos caninos, com intervalo de sete meses. Os cães sororreagentes do primeiro inquérito foram submetidos à necropsia, na qual foi coletado material para a confirmação do agente etiológico através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa confirmação se faz necessária pelo fato de possíveis reações cruzadas com outras doenças nos testes sorológicos preconizados pelo Ministério Saúde.

Na literatura científica existem poucos relatos acerca desta endemia em terras indígenas do Brasil. Os municípios limítrofes (Goiabeira/MG, Cuparaque/MG, Conselheiro Pena/MG, Itueta/MG e Santa Rita do Itueto/MG) a Resplendor apresentam histórico de casos humanos e caninos da LVA e até o momento não haviam sido registrados quaisquer casos desta endemia na terra Krenak.

1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA

As leishmanioses são doenças com diversidades clínicas e epidemiológicas as quais envolvem muitas espécies de *Leishmania spp.*, vetores flebotomíneos e hospedeiros vertebrados em ambos os ciclos de transmissão zoonótico e antroponótico (DESJEUX, 2001).

A leishmaniose visceral é a forma mais devastadora das leishmanioses por ser usualmente fatal caso não tratada (GENARO, 2002; WHO, 2002). É estimado oficialmente que ocorrem no mundo em torno de 500.000 casos e 59.000 mortes todos os anos devido a

esta forma da doença (WHO, 2002). A leishmaniose visceral ocorre sabidamente em 12 países da América Latina, sendo que 90% dos casos humanos se concentram no Brasil, especialmente na região nordeste (MILES, *et al.*, 1999).

A leishmaniose visceral humana é uma enfermidade infecciosa generalizada, crônica, caracterizada por febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia com leucopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, emagrecimento, edema e estado de debilidade progressivo levando à caquexia e, finalmente, ao óbito se o paciente não for submetido ao tratamento específico (Figura 1). Atualmente se considera a leishmaniose visceral uma doença com formas clínicas diversas, podendo ocorrer desde casos de cura espontânea até manifestações clínicas severas (GENARO, 2002).



Figura 1 - À esquerda, paciente no período de estado da LVA apresentando sintomas de hepatomegalia, esplenomegalia; à direita, paciente no período final da LVA, apresentando emagrecimento e caquexia além dos sintomas de hepatomegalia, esplenomegalia.

Fonte: BRASIL, 2006.

A leishmaniose visceral humana também é conhecida por calazar, palavra de origem indiana da região de Assam “*kala-azar*”, que significa “*febre negra*”. Outras denominações pelas quais é conhecida são: febre dun-dun e esplenomegalia tropical na Índia; calazar infantil ou anemia esplenomegálica, na Bacia do Mediterrâneo; calazar, leishmaniose visceral, calazar americano ou neotropical, em outras regiões (REY, 1991). No Mediterrâneo e em Portugal a doença é conhecida como leishmaniose visceral infantil e, no Brasil, conhecida como leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar (GENARO, 2002).

Segundo o Ministério da Saúde, em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos de LVA humana somaram 48.455 casos, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Nos últimos dez anos, a média anual de casos no País foi de 3.156 casos, e a incidência de dois casos/100.000 habitantes. A doença é mais

frequente em crianças menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de 5 anos. O sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (60%). A razão da maior susceptibilidade das crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica agravado pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas, além de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio. Por outro lado, o envolvimento do adulto tem repercussão significativa na epidemiologia da LV, pelas formas frustras oligossintomáticas ou assintomáticas, além das formas com expressão clínica (BRASIL, 2006).

A prevalência da leishmaniose visceral canina no Brasil tem sido demonstrada entre 1,9 e 25%, em áreas endêmicas (SHERLOCK & ALMEIDA, 1970; MAGALHÃES, *et al.*, 1980; IVERSON, *et al.*, 1983; COUTINHO, *et al.*, 1985).

Do ponto de vista epidemiológico, o calazar canino no Brasil é considerado mais importante do que a doença humana, pois além de ser mais prevalente, apresenta um grande contingente de animais infectados com alto parasitismo cutâneo, servindo como a maior fonte de infecção para os insetos vetores (CUNHA, *et al.*, 1995; GENARO, 2002).

Sem dúvida os cães domésticos *Canis familiaris* são de longe os maiores reservatórios da *L. (L.) chagasi* no ciclo de transmissão da LVA (DEANE, 1956; CUNHA, *et al.*, 1995; COURTERNAY, *et al.*, 1997).

1.2 PRIMEIROS REGISTROS DA LVA HUMANA NAS AMÉRICAS E NO BRASIL

Em 1913, foi descrito o primeiro caso de LVA nas Américas quando Migone no Paraguai relatou um caso suspeito. Tratava-se de um adulto que emigrara da Itália 6 anos antes para o Brasil e residira na região de Porto Esperança, Mato Grosso do Sul, Brasil. O primeiro relato do encontro da *L. (L.) chagasi* no Brasil foi feito por Penna, em 1934, divulgou-se o encontro de *Leishmania* em fragmentos de fígado humano, colhidos, “*post-mortem*”, por viscerotomias de pacientes com suspeita de febre-amarela no Brasil. Dos 47.000 exames realizados, 41 foram positivos para o gênero *Leishmania* sendo observada a seguinte distribuição por estado: Ceará com 15 casos; Bahia com nove; Sergipe com cinco; Alagoas com quatro; Pará e Piauí com três casos cada um; Rio Grande do Norte e Pernambuco com um caso cada um. Pelo fato, dessas amostras terem sido colhidas de diversos pontos do Norte e Nordeste, principalmente de crianças, excluía-se desde logo a possibilidade de se tratar de casos importados (DEANE, 1956). Em 1936, foi encontrado no Brasil o primeiro caso humano autóctone da LVA, registrado em vida. Tratava-se de um indivíduo do sexo

masculino, com 16 anos de idade, residente em Aracaju/AL, cuja mãe e a irmã haviam evoluído a óbito com sintomas idênticos aos do calazar. A irmã foi viscerotomizada constituindo a pista que levou à descoberta do terceiro caso da família. Foram descritos os sintomas e o encontro de *Leishmania* no material oriundo de punção esplênica. Foi também descrita a captura de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* e nenhum outro artrópode hematófago na residência do paciente (CHAGAS, 1936).

1.3 AGENTE ETIOLÓGICO

O agente etiológico da LVA recebeu a denominação de *L. (L.) chagasi* em 1937, por Cunha & Chagas. O protozoário em questão pertence ao filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania sp.* (GENARO, 2002).

No Brasil, o agente etiológico é a *L. (L.) chagasi*, espécie semelhante à *Leishmania (Leishmania) infantum* encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia. Existe uma grande polêmica em torno da origem da LV no Novo Mundo – se ela foi introduzida recentemente, na época da colonização européia e causada pela espécie *L. (L.) infantum*, ou a vários milhões de anos, juntamente com a introdução dos canídeos, devendo a espécie ser classificada como *L. (L.) chagasi*. Os achados de altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia sugerem a origem autóctone (LAINSON, *et al.*, 1987). Entretanto, estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. (L.) chagasi* e a *L. (L.) infantum* uma única espécie e aceitam a hipótese de origem recente nas Américas (MAURICIO, *et al.*, 2000 *apud* GONTIJO & MELLO, 2004).

1.4 HOSPEDEIROS INVERTEBRADOS (VETORES)

A necessidade de um hospedeiro invertebrado no ciclo da *Leishmania* foi admitida desde que foram observadas, por Rogers, em 1904, as formas flageladas que os parasitos assumiam nos meios de cultura. Tanto assim que a fase flagelada num hospedeiro invertebrado foi desde logo incluída na definição do gênero *Leishmania*, muito embora não houvesse ainda comprovação definitiva da existência de tal hospedeiro (WENYON, 1926).

Os vetores da LVA são insetos da ordem Díptera, subordem Nematocera, família Psychodidae, gênero *Lutzomyia*. No Brasil já foram descritas duas espécies como vetores da LVA: *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* Lutz & Neiva (Figura 2), 1912 (GRIMALDI, *et al.*, 1889; KILLIC-KENDRIK, 1990b; GRIMALDI, *et al.*, 1991), e *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* Mangabeira, 1938 (SANTOS *et al.*, 1998).



Figura 2 – *Lutzomyia (L.) longipalpis*, durante o repasto sangüíneo.
Fonte: Foto de José Ribeiro.

1.4.1 *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*

A espécie *L. (L.) longipalpis* Lutz & Neiva, 1912, é aquela que possui a maior importância epidemiológica na transmissão da LVA. A importância epidemiológica da espécie *L. (L.) longipalpis* está relacionada à sua característica sinantrópica, que permitiu o fenômeno de urbanização e expansão da LVA no Brasil. A mudança do cenário epidemiológico da LVA vem ocorrendo desde a década de 90.

Possuindo uma ampla área de distribuição, hoje *L. (L.) longipalpis* tem sido vista como um complexo específico (LAINSON & RANGEL, 2005). Foi Mangabeira (1969) quem deu atenção a uma pequena diferença morfológica entre exemplares machos de *L. (L.) longipalpis* do Ceará e outros do Pará. Lainson & Shaw (1979) sugeriram que a presença de um complexo de flebotomíneos muito similares pode apontar para certas situações anômalas e que era necessária uma revisão taxonômica para *L. (L.) longipalpis*.

A existência de um complexo de espécies obscuro, identificado como *L. (L.) longipalpis*, ajuda consideravelmente na explicação do por que da existência das diferentes manifestações clínicas da LVA na América Latina, especialmente quando isto é considerado à

luz de estudos da natureza da saliva de *L. (L.) longipalpis* de áreas largamente separadas uma das outras (LAINSON & RANGEL, 2005).

Há muito tempo, os vetores hematófagos da doença foram considerados simplesmente como transmissores do parasita. Avanços no campo da entomologia médica, bioquímica e imunologia demonstraram a complexidade das interações parasita-hospedeiro. Vários autores têm avaliado o papel da saliva do vetor como modulador do sistema imunitário do hospedeiro. Durante o repasto sanguíneo a saliva possui uma função importante para evitar o processo de coagulação do sangue a ser ingerido pelo vetor. A saliva dos vetores já estudados até o momento possui uma disposição de compostos farmacologicamente ativos que facilitam o encontro dos vasos sanguíneos e inibem a hemóstase. A hemóstase do hospedeiro é altamente eficiente e inclui diversas vias capazes de convergir prontamente e simultaneamente para superar a perda de sangue no local do ferimento; principalmente a coagulação sanguínea, a agregação plaquetária e a vasoconstrição (RIBEIRO, 1987; RIBEIRO, 1995 & KAMHAWI, 2000). Os vetores conseguem superar estes obstáculos suprimindo as respostas do hospedeiro, através de uma variedade de moléculas anticoagulantes, antiplaquetárias e vasodilatadoras encontradas em suas secreções salivares. Estas substâncias são imunogênicas e eliciam a produção de anticorpos e/ou respostas celulares pró-inflamatórias, essa característica reduz a eficiência da alimentação vetorial e a sua habilidade de transmitir a infecção (KAMHAWI, 2000). Ao passo que diversas outras substâncias salivares foram mostradas como supressoras imunogênicas levando à redução da imunidade inata e adquirida e consequentemente realçando a habilidade dos parasitas de estabelecer-se no hospedeiro (CHAMPAGNE, 1994 & WIKEL, 1999). As propriedades imunomodulatórias e a atividade biológica dos componentes salivares de diversos vetores flebotomíneos são distintas para cada espécie (KAMHAWI, 2000).

1.4.2 *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi*

A partir de 1980 passaram a ser notificados cães com evidências da LVC no município de Corumbá/MS a despeito de *L. (L.) longipalpis* não fazer parte da fauna local (GALATI, *et al.*, 1998). Posteriormente foi demonstrado que *L. (L.) cruzi* é a espécie responsável pela transmissão da LVA na região de Corumbá e Ladário, Mato Grosso do Sul (SANTOS *et al.*, 1998). As fêmeas desta espécie são conhecidas e estruturalmente indistinguíveis daquelas da espécie *L. (L.) longipalpis* (MARTINS *et al.*, 1984). A espécie é conhecida pelo sexo

masculino. A diferenciação se faz pelo aspecto do tufo basal do basistilo, o qual em *L. (L.) cruzi*, é formado por seis cerdas foliáceas, sendo duas delas menores, de situação mais basal e quatro outras, cerca de duas vezes mais longas do que aquelas e implantadas na porção distal do tufo (FORATTINI, 1973).

1.5 TRANSMISSÃO

A leishmaniose visceral americana (LVA) é provocada pelo protozoário denominado *Leishmania (Leishmania) chagasi* (WALTERS *et al.*, 1989a; WALTERS, *et al.*, 1989b; KILLICK-KENDRICK, 1990a; REY, 1991; WILLIAMS, 2002; LAINSON & RANGEL, 2005). Estes parasitos pertencem ao filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (WALTERS, *et al.*, 1989a; WALTERS, *et al.*, 1989b; KILLICK-KENDRICK, 1990a; VITOR, 2002). Este gênero caracteriza-se por apresentar apenas duas formas durante seu ciclo evolutivo: amastigota (intracelular) e promastigota (extracelular) (Figura 3) (REY, 1991). As formas amastigotas vivem dentro dos vacúolos lisossômicos presentes nas células fagocitárias de hospedeiros vertebrados, chamadas de monócitos e macrófagos (LAINSON, *et al.*, 1987; CHANG, *et al.*, 1990; ALEXANDER, *et al.*, 1999). Uma vez no intestino médio do inseto o parasito transforma-se em promastigota, a forma extracelular, a qual pode ser encontrada livre ou agarrada na cutícula intestinal ou nas microvilosidades (WALTERS, *et al.*, 1989a; WALTERS, *et al.*, 1989b; KILLICK-KENDRICK, 1990a), esta forma também é encontrada nos meios de cultura (REY, 1991).

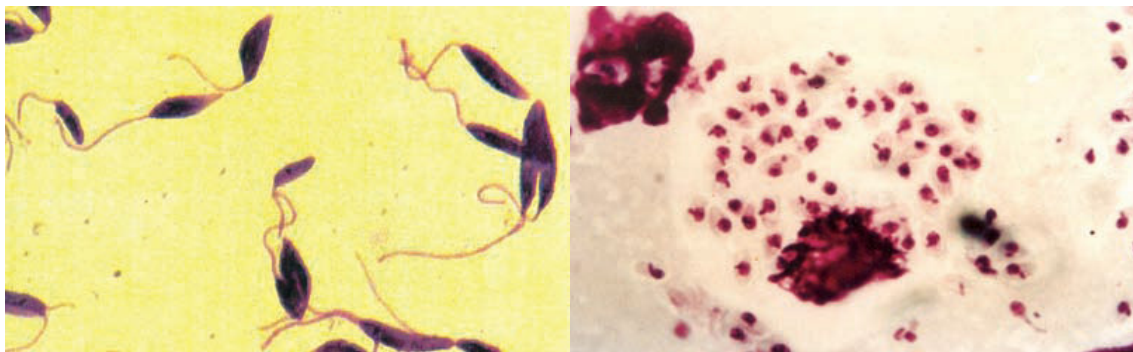


Figura 3 – Formas encontradas no gênero *Leishmania*. À esquerda a forma promastigota e à direita, a forma amastigota.

Fonte: BRASIL, 2006.

1.5.1 Ciclo de transmissão

Maria Von Paungarten Deane e Leônidas Mello Deane em 1954 contribuíram com informações importantes acerca da transmissão da leishmaniose visceral a partir de estudos realizados no Ceará (DEANE & DEANE, 1955).

Os hospedeiros vertebrados são infectados quando formas promastigotas infectantes (metacíclicas) são inoculadas, pelas fêmeas dos insetos vetores, durante o repasto sanguíneo (ALMEIDA, *et al.*, 2003), (Figura 4).

Durante o repasto sanguíneo da fêmea, a saliva do inseto é também inoculada e parece exercer papel importante, não só na lise do tecido adjacente, favorecendo o fluxo de sangue e linfa intersticial para o alimento, como pela ação de substâncias nela contidas capazes de promover a vasodilatação que facilita o permeio de células para o local do repasto (RIBEIRO, 1984; CHARLAB, *et al.*, 1999; ALMEIDA, *et al.*, 2003).

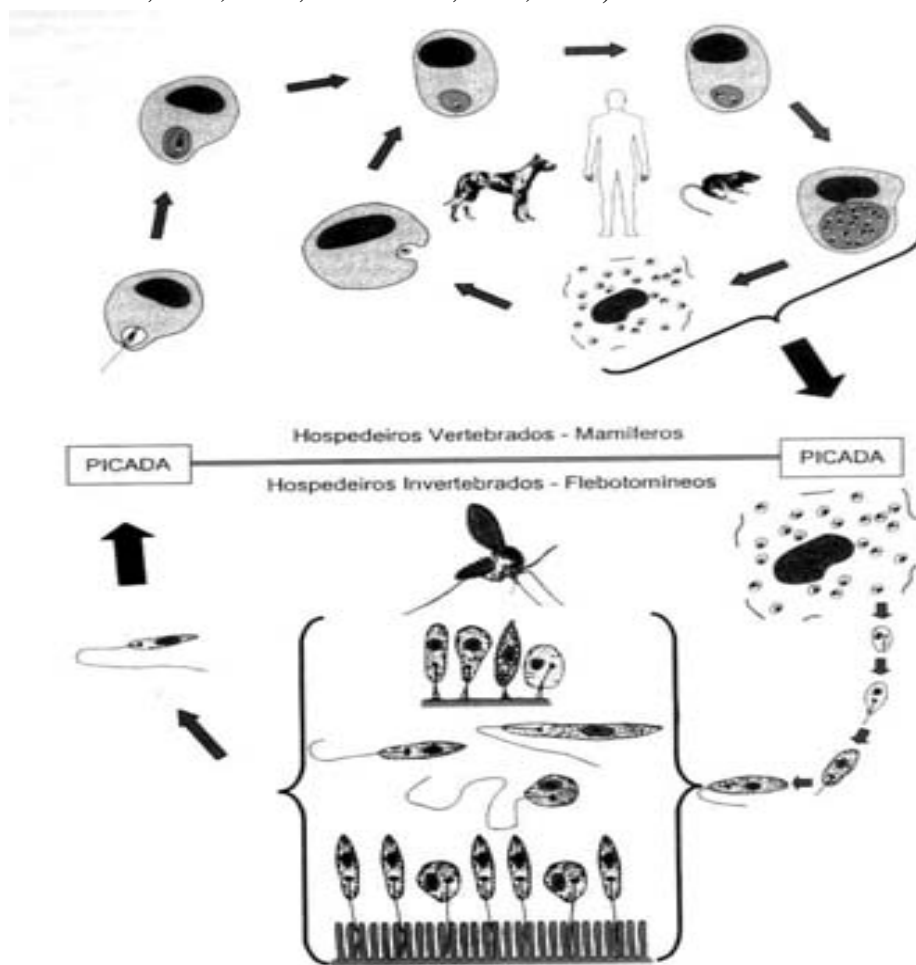


Figura 4 - Ciclo de transmissão da LVA

Fonte: Parasitologia Humana – 10ª. Ed. Ilustração de Nelder F. Gontijo, Departamento de Parasitologia – ICB – UFMG.

1.6 HOSPEDEIROS VERTEBRADOS (RESERVATÓRIOS DE *LEISHMANIA*)

Os principais hospedeiros da LVA já identificados no Brasil são o homem (*Homo sapiens*), as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyus thous*), os gambás (*Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis*) e os cães (*Cannis familiares*).

Leônidas Mello Deane, em 1954, contribuiu com informações importantes acerca do papel do homem, do cão e da raposa “*Lycalopex vetulus*” (*Dusicyon vetulus*) como reservatórios do parasita (DEANE & DEANE, 1955b).

1.6.1 Homem

A suscetibilidade dos humanos à *L. (L.) chagasi* é universal. Suspeitando que os insucessos no controle da leishmaniose visceral no Brasil apontassem para a possibilidade de outros hospedeiros vertebrados além dos cães, Carlos Costa e cols., no Piauí, realizaram um ensaio onde espécimes de *L. (L.) longipalpis* foram colocados para repasto sanguíneo em humanos sintomáticos e assintomáticos para a LVA. Os autores demonstraram que os vetores podem adquirir a infecção em humanos sintomáticos, o mesmo não sendo observado nos assintomáticos. Foi demonstrado que particularmente as crianças desnutridas podem atuar como bons reservatórios vertebrados da *L. (L.) chagasi*. Os autores sugeriram a execução de outros experimentos envolvendo grande número de vetores para se avaliar a competência de portadores assintomáticos como hospedeiros (COSTA *et al.*, 2000).

1.6.1.1 Co-infecção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

A OMS estima que 17 milhões de pessoas estejam infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e que um terço delas viva em zonas endêmicas de leishmaniose. Em 1995, o número total de casos registrados de co-infecção foi igual a 858 casos.

Na Europa, até outubro de 1995, foram registrados 104.259 casos de AIDS; sendo que 66.453 destes ocorreram em países mediterrânicos (Itália, França, Espanha e Portugal). A maioria dos casos de co-infecção “*LEISHMANIA-HIV*” também é encontrada nestes países. Nesses países a infecção com *Leishmania* ocorre em indivíduos imuno-competentes, geralmente na infância, como forma assintomática. Nos últimos anos tem aumentado o número de casos sintomáticos em adultos, a maioria deles em indivíduos HIV positivos. Até 1985, quando o primeiro caso de co-infecção foi diagnosticado, 70% dos casos de leishmaniose eram encontrados nas crianças abaixo de 15 anos; atualmente, 75% dos casos são vistos nos adultos sendo que 50 a 60% deles em indivíduos HIV soropositivos. A OMS estima que entre dois e nove por cento de todos os indivíduos com AIDS do sul europeu desenvolverão LV. Entretanto, esse padrão não é homogêneo; enquanto no sul da França, menos da metade dos casos de LV, em adultos, ocorrem em pacientes soropositivos, na Espanha esta proporção é bem mais elevada.

Nos países em que ambas as infecções são altamente endêmicas, como Brasil e Índia, há uma enorme preocupação das autoridades em saúde, considerando o estabelecimento da propagação do HIV para as áreas rurais e o processo de urbanização das leishmanioses.

Quase todos os casos de co-infecção de *Leishmania* com HIV foram descritos nos pacientes com HIV-1, mas em um foi diagnosticado igualmente o HIV-2. O perfil dos pacientes que sofrem de LV não é diferente dos indivíduos com outras infecções oportunistas HIV-associadas.

Na Europa, o perfil dos casos de co-infecção *Leishmania-HIV* é de indivíduos com idade entre 29 e 33 anos, geralmente do sexo masculino (80 a 85%). A presença da toxicodependência é possivelmente outro fator associado à co-infecção, na medida em que esse hábito estava presente, em 1993, em 66% dos casos HIV positivos (ALVAR, 1997).

Nos pacientes co-infectados os efeitos secundários e recaídas vistas com antimoniais ou com Anfotericina B é mais frequente do que em pacientes imuno-competentes com LV. Quase um quarto de pacientes co-infectados morre durante ou dentro de um mês de tratamento devido a estado grave de depressão do sistema imunitário; mas em vista a toxicidade elevada das drogas usadas na AIDS a terapia deve ser igualmente considerada. A avaliação de tratamentos de primeira escolha e da profilaxia secundária na LV associada com infecção pelo HIV é sempre necessária (ALVAR, 1997).

1.6.2 Cão

O parasitismo natural de cães é uma evidência circunstancial de que o cão possui um papel importante como reservatório doméstico para a infecção (MILES, *et al.*, 1999). Este fato foi evidenciado pela primeira vez em 1954 nos focos de calazar do Ceará (DEANE & DEANE, 1954a).

Na América Latina, o cão é considerado o principal hospedeiro e reservatório da *L. (L.) chagasi* para humanos, causando a leishmaniose visceral (Figura 5).



Figura 5 – Cão com sintomas de LVC, Terra Indígena Xakriabá, São João das Missões, Minas Gerais, Brasil, 2007.

Foto: Eloiza Gonçalves Antônio

1.6.3 Raposa

Em 1954 evidenciou-se o parasitismo natural de um canídeo campestre, a raposa *Lycalopex vetulus* (DEANE & DEANE, 1954), atualmente denominada *Dusicyon vetulus* (Figura 6), por *Leishmania* (DEANE & DEANE, 1954). Também a raposa *Cerdocyon thous* foi identificada como hospedeira vertebrada da LVA. Material proveniente de baço e fígado de raposas *C. thous* suspeitas de LVA foi inoculado em meio de cultura e em hamsteres dos quais foi isolada a *L. (L.) chagasi* (LAINSON, *et al.*, 1987; DINIZ, *et al.*, 2008).



Figura 6 – (1) *Dusicyon vetulus*; (2) *Cerdocyun thous*;
Fontes: Foto 1 do site www.pesc.org.br; e; Foto 2 de Carlos Rivero

1.6.4 Marsupiais

O primeiro hospedeiro vertebrado não-humano e não-canídeo da LVA nas Américas foi descrito em 1984, quando um gambá da espécie *Didelphis albiventris* (Figura 8) encontrado naturalmente infectado por *L. (L.) chagasi* no município de Jacobina/BA. Naquela oportunidade, o material retirado de um entre 57 gambás e inoculado em hamster se mostrou positivo para *Leishmania donovani* (SHERLOCK, *et al.*, 1984; SHERLOCK, *et al.*, 1988). Posteriormente, em área endêmica para a LVA da Colômbia, a espécie *Didelphis marsupialis* (Figura 9) foi incriminada como hospedeira vertebrada da *L. (L.) chagasi* (TRAVI *et al.*, 1994). Posteriormente foi cultivada *L. (L.) chagasi* proveniente de baço, fígado e pele do marsupial *D. marsupialis* (CORREDOR *et al.*, 1989; TRAVI *et al.*, 1998). Também em Belo Horizonte/MG, utilizando teste ELISA com imunofluorescência indireta, teste de aglutinação direta e reação em cadeia da polimerase, a espécie *D. albiventris* foi identificada como hospedeira vertebrada da *L. (L.) chagasi* (SCHALLIG *et al.*, 2007).



Figura 7 – (1) *Didelphis albiventris*; (2) *Didelphis marsupialis*;

Fontes: Foto 1 do site www.animalpicturesarchive.com; e; Foto 2 do site www.cortolima.gov.co

O gambá-de-orelha-preta, *D. marsupialis* (LUND, 1758), e o gambá-de-orelha-branca, *D. albiventris* (LUND, 1841), são espécies de marsupiais didelfídeos extensamente distribuídas na Região Neotropical (EMMONS & FEER, 1990). Por sempre estar presente em focos da LVA com alta prevalência canina, acredita-se que seja evidente que a presença dos marsupiais é um fator de risco para a infecção canina com importante papel epidemiológico (CABRERA *et al.*, 2003).

1.6.5 Outros vertebrados

O roedor *Proechimys canicolous* (Figura 08) foi identificado como infectado pela *L. (L.) chagasi* através da reação em cadeia da polimerase (TRAVI, *et al.*, 1998, OLIVEIRA, *et al.*, 2005).



Figura 8 - *Proechimys canicolous*
Fonte: Foto do site www.es.govt.nz

Os gatos domésticos também já foram incriminados como hospedeiros da leishmaniose visceral tanto no Velho Mundo quanto no Novo Mundo (HERVÁS *et al.*, 1999; SAVANI *et al.*, 2004; MAIA, *et al.*, 2008), (Figura 09).



Figura 9 - *Felix catus*
Fonte: Foto do site <http://farm4.static.flickr.com>

1.7 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

O cão doméstico foi incriminado como hospedeiro da LVA pela primeira vez na Europa por Nicolle, em 1908. No Brasil, o responsável por essa descoberta foi Leônidas Mello Deane & Maria Von Paungarten Deane, em 1954, nos focos de calazar do Ceará, através de punção de fígado e colheita de fragmentos de pele. Sem dúvida os cães domésticos são de longe os maiores reservatórios da *L. (L.) chagasi*, no ciclo de transmissão da LVA (DEANE, 1956; CUNHA, *et al.*, 1995; COURTERNAY, *et al.*, 2002).

A doença no cão pode permanecer latente por longos períodos de tempo que variam de três há vários meses. Segundo alguns autores o início é insidioso e de evolução lenta, podendo levar até mais de um ano para que ocorram sintomas aparentes da LVC (BRASIL, 2006; ALENCAR, 1959). Geralmente os cães infectados apresentam um alto grau de parasitismo cutâneo e visceral, mesmo nas formas assintomáticas da doença (DEANE & DEANE, 1955).

Com a evolução da doença os sintomas mais frequentes são: emagrecimento, alopecia localizada ou generalizada, ceratoconjutivite, dermatite furfurácea, onicogribose, apatia, hipergamaglobulinemia, podendo levar o animal a óbito (FERRER *et al.*, 1999; BRASIL, 2006).

1.7.1 Sinais clínicos

De acordo com os sinais clínicos detectados, os cães podem ser classificados como, assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos (BRASIL, 2006).

Os cães assintomáticos representam a grande maioria dos cães, mesmo com o forte parasitismo cutâneo e visceral não apresentam nenhum sinal clínico aparente. Cerca de 6 em cada 10 cães que contraem a infecção são assintomáticos.

Os cães oligossintomáticos, de áreas com padrão socioeconômico baixo, podem ter o diagnóstico clínico da LVC dificultado, por apresentarem sintomas que se confundem com os da doença, tais como, emagrecimento, alopecia, apatia e pelagem opaca. Já os cães considerados sintomáticos podem apresentar uma ampla gama de sintomas, além dos já citados, como ceratoconjutivite, caquexia, alopecia generalizada, febre, úlceras, onicogribose acentuada, dermatite furfurácea, hipergamaglobulinemia, podendo estes evoluir a óbito (DEANE & DEANE, 1955) (Figura 10).



Figura 10 – (1) Cão com LV, apresentando apatia, alopecia e lesões no corpo; (2) Cão com onicogribose; (3) Cão com lesões de face e orelha; (4) Cão apresentando emagrecimento e apatia e (5) Cão com emagrecimento, ceratoconjuntivite lesões de face e orelha.

Fonte: Brasil/Ministério da Saúde/Norma Técnica de LVA, 2006.

MARZOCHI (1985) também observou que 63,2% dos cães infectados não apresentavam sinais clínicos da doença. Os cães assintomáticos também são fontes de infecção para flebotomíneos e, conseqüentemente, também apresentam papel ativo na transmissão das leishmanioses. Em áreas de transmissão da doença, os casos assintomáticos representam uma alta parcela dos cães infectados, podendo levar a uma subestimação das taxas de prevalência da LVC, dificultando o seu controle SENRA *et al* (1986).

1.7.2 Resposta imune

Em cães susceptíveis após a infecção da pele, ocorre a disseminação do parasita por todo o corpo com posterior desenvolvimento dos sintomas. Dependendo das propriedades tanto do parasita como do hospedeiro, a doença poderá se desenvolver como forma aguda ou crônica. Entre os vários fatores conhecidos, a resposta dos linfócitos T é a que exerce maior influência sobre a infecção. Em contrapartida a proliferação de linfócitos B é intensa e a produção de anticorpos é abundante, porém é deletéria e não protetora.

O aparecimento dos sintomas depende da imunocompetência do animal. Dependendo da fase da doença e das condições imunológicas, muitos cães infectados se apresentam assintomáticos (ALMEIDA, *et al.*, 2003; BRASIL, 2006).

1.7.3 Métodos de diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose canina é ainda um desafio apesar dos avanços feitos no desenvolvimento de diversas técnicas parasitológicas, sorológicas e moleculares. Importância igual deve ser dada à sensibilidade da análise laboratorial adotada e à seleção do material biológico. A técnica padrão deve ter elevada sensibilidade e especificidade, deve ser reprodutível, fácil de executar e adaptável para o uso em laboratórios locais sem equipamento sofisticado, e deve detectar todos os cães infectados por *Leishmania* em um estágio inicial e usar preferencialmente procedimentos não invasivos para obtenção das amostras. Além disso, os custos devem ser tomados a fim escolher que teste diagnóstico poderia ser aplicado. Mais pesquisa é exigida para alcançar estes objetivos (MAIA & CAMPINO, 2008).

1.7.3.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico da LV canina é muitas vezes um problema para o veterinário. Há um amplo espectro de sinais clínicos, desde animais aparentemente saudáveis, passando por oligossintomáticos, até estágios severos da doença. Uma característica importante é a permanência da doença clinicamente inaparente por longos períodos (GONTIJO & MELO, 2004).

1.7.3.2 Diagnóstico parasitológico

A demonstração do parasito pode ser feita em material de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos. O material obtido é utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas, histologia, isolamento em meios de cultura ou inoculação em animais de laboratório. A especificidade desses métodos é de 100%, mas a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição dos parasitos não é homogênea no mesmo tecido, e é dependente do grau de treinamento técnico do observador. A sensibilidade mais alta (98%) é alcançada quando se utiliza aspirado do baço. As punções esplênicas e de medula óssea são consideradas procedimentos invasivos e exigem ambientes apropriados para a

coleta, não sendo procedimentos adequados para estudos epidemiológicos em larga escala (GONTIJO & MELO, 2004).

1.7.3.3 Diagnóstico sorológico

Atualmente, os testes de diagnóstico, mais utilizados em inquéritos populacionais, para avaliar as taxas de prevalência da doença, são a reação de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (EIE). O imunodiagnóstico não é tão preciso quanto os testes parasitológicos que evidenciam a real presença do parasita, pelo fato de possíveis reações cruzadas com tripanosomatídeos. No entanto, por não serem métodos invasivos e de fácil aplicação no trabalho de campo e baixo custo operacional, estes têm sido os métodos de escolha (BRASIL, 2006). Outro motivo para escolha dos testes sorológicos é a marcada estimulação policlonal de linfócitos B, que resulta em hipergamaglobulinemia e grande produção de anticorpos, o que facilita o diagnóstico através de testes sorológicos (GONTIJO & MELO, 2004).

No Brasil, os testes mais utilizados no diagnóstico de LV humana e canina são a IFI e o EIE, sendo considerado, sobretudo este último, teste de escolha para inquéritos populacionais (BRASIL, 2006; GONTIJO & MELO, 2004).

A IFI apresenta baixa especificidade, exige na sua execução pessoal treinado, é uma reação dispendiosa e não adaptada para estudos epidemiológicos em larga escala. Uma das principais limitações da técnica é a ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (SUNDAR & RAI, 2002). Isto dificulta a interpretação dos resultados, pois no Brasil ocorre sobreposição da LV, sobretudo com leishmaniose tegumentar e doença de Chagas (GONTIJO & MELO, 2004).

A IFI consiste na reação de soros com parasitas (*Leishmania*), fixados em lâminas de microscopia.

Numa etapa seguinte, utiliza-se um conjugado fluorescente, para evidenciação da reação. A leitura é realizada com auxílio de microscópio que utiliza incidência de luz azul e ultravioleta, sendo considerados reagentes os soros que apresentarem fluorescência e não reagentes os soros que apresentarem ausência de fluorescência, tomando-se como referência os soros controle positivo e negativo que devem ser incluídos em cada lâmina (Bio-Manguinhos, 2004).

Amostras reagentes - soros que, a partir da diluição 1:40, apresentarem fluorescência na membrana dos parasitas, mais intensa que a coloração de fundo observada no orifício do controle negativo (Figura 11).

Amostras não reagentes - Os soros teste que não apresentarem fluorescência são considerados não reagentes (Figura 11).

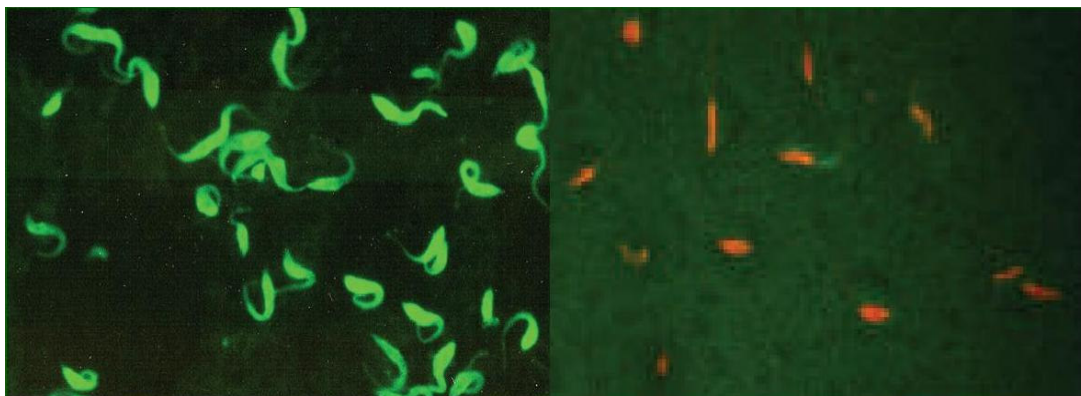


Figura 11 – À esquerda exemplo de amostra positiva na IFI, à direita exemplo de amostra negativa.
Fonte: Manual de IFI – Bio-Manguinhos

Atualmente o teste de ELISA é o mais utilizado para imunodiagnóstico da leishmaniose visceral. É um teste rápido, de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a IFI. O teste é sensível, permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos (EL-AMIN, *et al.*, 1986; GONTIJO & MELO, 2004). O imunoensaio funciona igualmente bem para o diagnóstico da LV canina (BRASIL, 2006; GONTIJO & MELO, 2004; EVANS *et al.*, 1990).

Os antígenos utilizados nos testes diagnósticos são quase sempre derivados de promastigotas de cultura, parasitas intactos ou moléculas solúveis. Estes antígenos apresentam reações cruzadas com outras espécies da família Trypanosomatidae, e mesmo com microorganismos filogeneticamente distantes (SUNDAR & RAI, 2002).

O EIE consiste na reação de soros de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura “*in vitro*”, que são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas/strips (fase sólida). A seguir adicionam-se, devidamente diluídos, os soros controle do teste e as amostras a serem analisadas, que possuindo anticorpos específicos, vão se fixar aos antígenos. Na etapa seguinte, ao se adicionar uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, esta se ligará aos anticorpos caso estejam presentes.

Para evidenciação da reação, utiliza-se uma substância cromógena (tetrametildenzidina- TMB) que pela ação da peroxidase com o peróxido de hidrogênio forma um composto de coloração azul turquesa que ao adicionar-se o ácido sulfúrico que interrompe a reação, passa a apresentar uma coloração amarela, em caso positivo (reagente). Nas cavidades em que não houver anticorpos específicos, não haverá desenvolvimento de cor o que caracteriza uma reação negativa (não reagente).

1.7.3.4 Diagnóstico Molecular (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a detecção do DNA presente no cinetoplasto das *Leishmania* através do processo de amplificação de uma região conservada desse material genético, conhecida como kDNA (DEGRAVE, *et al.*, 1994; FEITOSA *et al.*, 2000; VOLPINI, *et al.*, 2004; ANDRADE *et al.*, 2006).

Trata-se de um método sensível e específico, uma ferramenta importante no diagnóstico de diversas doenças, entre as quais está a LVC (FEITOSA *et al.*, 2000; MARQUES, *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2007; QUARESMA, 2007).

1.7.4 Validação dos testes diagnósticos para LVA

Estudos preliminares de padronização dos testes: EIE e IFI foram realizados por Bio-Manguinhos em conjunto com o Instituto Adolfo Lutz (IAL-SP). Foram identificados 130 cães com suspeita clínica de LVA dos quais foram coletadas amostras de soro e amostras em papel de filtro. Estas amostras foram testadas tanto na IFI quanto no EIE. Para cálculos de sensibilidade e especificidade a IFI foi considerado o teste padrão ouro (“*Gold Standard*”), e os seguintes índices foram encontrados: Sensibilidade para amostras de soro dos cães: 94,54% e especificidade de 91,76%. Já para as amostras coletadas em papel de filtro os índices de sensibilidade e especificidade foram de: 79,45%, e; 90,24%, respectivamente (BIO-MANGUINHOS/IAL, 2004).

1.7.5 Medidas de Controle

As medidas de controle a serem adotadas para a LV no Brasil são três, a saber: tratamento de casos humanos; eutanásia de cães soropositivos, e; uso de inseticidas residuais nas casas e em abrigos dos animais (VIEIRA & COELHO, 1998).

Desde o aparecimento da doença no Brasil, medidas de controle vêm sendo sugeridas.

Na década de 50, uma das medidas sugeridas por Deane & Deane (1956) e preconizada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006), foi a retirada de cães soropositivos através de inquéritos de prevalência da LVC. No entanto, estudos enfocando a estratégia de eliminação canina têm oferecido resultados conflitantes (DIETZE *et al.*, 1997; ASHFORD *et al.*, 1998), principalmente quando a retirada dos animais soropositivos é realizada isoladamente, sem controle vetorial. Esses inquéritos visam prevenir a transmissão da doença para humanos; sendo os mais vulneráveis a sofrer conseqüências graves da doença as crianças, principalmente aquelas com déficit nutricional, os idosos, os indivíduos com resposta imunológica precária, tais como os indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana. Todas essas condições são fatores de risco para o desenvolvimento de quadros graves de leishmaniose visceral (ALVES & BEVILAQUA, 2004; EVANGELISTA, *et al.*, 2009).

As orientações atuais sobre as medidas de controle da LV são dirigidas principalmente ao controle do reservatório canino (BRASIL, 2006). Uma vez que, o cão vem sendo apontado como reservatório da doença e como hospedeiro doméstico, sendo provavelmente o mais importante reservatório natural relacionado com casos humanos (SAVANI *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005). Portanto, faz-se necessário realizar o diagnóstico o mais precocemente possível (ALVES & BEVILAQUA, 2004).

O Programa de Controle da Leishmaniose Visceral tem como medida voltada ao reservatório canino, a retirada de todos os cães soropositivos, devendo estes serem eutanasiados de acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação. Portanto, a prática da eutanásia canina é recomendada a todos os animais sororreagentes e/ou parasitológico positivo. Para a realização da eutanásia, deve-se ter como base a Resolução n.º 76, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre os procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências, dentre as quais merecem destaque:

- Os procedimentos de eutanásia são de exclusiva responsabilidade do médico veterinário, que dependendo da necessidade pode delegar esta prática a terceiros, que realizará

sob sua supervisão. Na localidade ou município onde não existir médico veterinário, a responsabilidade será da autoridade sanitária local;

- Os animais deverão ser submetidos à eutanásia, em ambiente tranqüilo e adequado, longe de outros animais e do alojamento dos mesmos;

- A eutanásia deverá ser realizada segundo legislação municipal, estadual e federal, no que se refere à compra e armazenamento de drogas, saúde ocupacional e a eliminação de cadáveres e carcaças;

- Como métodos de eutanásia são recomendados os barbitúricos e anestésicos inaláveis, como dióxido de carbono, monóxido de carbono e cloreto de potássio para este último será necessária a anestesia geral prévia.

- Os procedimentos de eutanásia, se mal empregados, estão sujeitos à legislação federal de crime ambiental (BRASIL, 2006).

Estudos recentes demonstram tanto a efetividade do controle de reservatórios da infecção isoladamente (ASHFORD *et al.*, 1998;), assim como, outros trabalhos (FRANÇASILVA *et al.*, 2005) demonstram a efetividade conjunta do controle vetorial e retirada de cães soropositivos. Da mesma forma, existe uma verificação da redução das taxas de prevalência e incidência da LVC e LVH apenas com o controle vetorial através do uso de inseticidas nos domicílios e peridomicílios (COSTA, *et al.*, 2007). Diante destes dados, percebe-se que não há um consenso em relação às medidas de controle, mais satisfatórias tanto isoladamente, quanto em associação.

2 JUSTIFICATIVA

O município de Resplendor é considerado área receptiva para leishmaniose visceral canina pelo Ministério da Saúde, e faz divisa com municípios endêmicos para LVA, compartilhando com eles o mesmo eixo viário. Inquérito entomológico realizado em 2007 pela Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais detectou a presença do vetor da leishmaniose visceral *L. (L.) longipalpis*. Como os indígenas Krenak apreciam a prática da caça e freqüentemente introduzem cães das mais diversas origens com este intuito e a área onde está localizada a Terra Indígena possui ecossistemas favoráveis à manutenção do vetor, esse trabalho propõe verificar a infecção canina, a etiologia da infecção, determinar a prevalência, a incidência, a susceptibilidade dos cães e a distribuição espacial dos casos de LVC, na Terra Indígena Krenak, no ano de 2007.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar através de inquérito sorológico a existência de infecção causada por *Leishmania sp.* na população canina da Terra Indígena Krenak, caso encontrados cães reativos, determinar as espécies de *Leishmania* envolvidas e estabelecer sua prevalência.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinar a taxa de prevalência da infecção por *Leishmania sp.* na população canina da Terra Indígena Krenak de acordo com os resultados da sorologia convencional e da obtida pela PCR.

3.2.2 Investigar se há presença de infecção mista de *Leishmania chagasi* e *Leishmania braziliensis*, através da PCR.

3.2.3 Verificar a existência de associação entre a infecção por *Leishmania chagasi* e as variáveis do estudo (sexo, idade e tipo de pêlo).

3.2.4 Determinar a distribuição espacial da LVC e identificar diferença entre as taxa de prevalência observada nas aldeias.

3.2.5 Determinar a porcentagem de cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos da população canina soropositiva eutanasiada.

3.2.6 Detectar as alterações dos órgãos do SFM mais freqüentes observadas durante as necropsias.

4 METODOLOGIA

O estudo transversal de prevalência da LVC teve como base os resultados obtidos em dois inquéritos sorológicos caninos realizados no ano de 2007 na Terra Indígena Krenak, pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), tendo sido executado pelo Distrito Sanitário Especial Indígena de Minas Gerais e do Espírito Santo (DSEI-MG/ES).

O Decreto Nº 3156, de 27 de agosto de 1999, dispõe sobre as condições para a prestação de assistência à saúde dos povos indígenas, no âmbito do Sistema Único de Saúde, pelo Ministério da Saúde, altera dispositivos dos Decretos números 564, de 8 de junho de 1992, e 1.611, de 19 de maio de 1994, e dá outras providências. A alínea III do Artigo 2º estabelece que a interrupção do ciclo de doenças transmissível como uma das diretrizes para a obtenção da universalidade, da integralidade e da equanimidade dos serviços de saúde. Já o Artigo 3º estabelece que: “*O Ministério da Saúde estabelecerá as políticas e diretrizes para promoção, prevenção e recuperação da saúde do índio, cujas ações serão executadas pela Fundação Nacional de Saúde - FUNASA.*” Desta forma, todas as atividades de campo fizeram parte da rotina dos serviços inerentes ao DSEI/MG-ES (ANEXO A).

Todas as atividades executadas são previstas pelas normas técnicas do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006).

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal censitário, para verificação da existência de infecção canina por *Leishmania* e estabelecer as taxas de prevalência da LVC na Terra Indígena Krenak.

Dois inquéritos sorológicos caninos foram realizados em dois períodos distintos. O primeiro inquérito ocorreu no período de 6/04/07 a 11/04/07 e o segundo inquérito no período de 06/11/07 a 10/11/07.

Pretendia-se com a realização de dois ou mais inquéritos sorológicos caninos, verificar se a retirada gradual dos cães teria um impacto significativo sobre a prevalência da infecção por *Leishmania*. Além de monitorar os cães indeterminados, observando se esses seriam positivos nos próximos inquéritos. No entanto, a continuidade do serviço não foi possível.

A nossa hipótese se baseia no controle da população canina infectada por *Leishmania*. A partir do momento que os cães são confirmados como reservatórios de *L. (L.) chagasi* pelos inquéritos sorológicos a eutanásia pode ser adotada como medida de controle.

Somente essa medida de controle pode contribuir expressivamente para a queda das taxas de prevalência da infecção canina? Essa indagação é muito importante, pois a eutanásia e a educação em saúde são as medidas mais fáceis de serem realizadas pelos serviços de saúde no momento atual, visando à prevenção do aparecimento de casos humanos de LV.

4.2 ÁREA DE ESTUDO

A Terra Indígena Krenak está situada em Minas Gerais, na Mesorregião do Vale do Rio Doce, Microrregião de Aimorés, no município de Resplendor, que totaliza uma área de 1075,30 km², dista 445 km da Capital. O município de Resplendor possui uma população de 17.124 habitantes, já a terra indígena apresenta uma população de 300 habitantes, distribuídos em 60 famílias. A proporção de cães por família na terra Krenak é de 1,5 cães e a proporção de cães *per capita* é de 0,3 cães. Limita-se em Minas Gerais com Aimorés, Conselheiro Pena, Cuparaque, Itueta, Santa Rita do Ituêto e Alto Rio Novo no Espírito Santo. O fuso horário de Resplendor é UTC-3. O clima é tropical de verões muito quentes e temperatura média anual oscilando em torno dos 22°C. As atividades econômicas de Resplendor estão voltadas mais expressivamente para a atividade agropastoril. O município de Resplendor registra o índice de desenvolvimento humano (IDH) de 0,730 (PNUD/2000), Produto interno bruto (PIB) de R\$75.600.367,00 e produto interno bruto *per capita* de R\$4.509,42 (GOÉS, PASSOS, LOPES & OLIVEIRA FILHO, 2004; BRASIL, 2008). Essa Terra Indígena foi homologada por decreto no dia 19 de Abril de 2001, publicado no Diário Oficial da União aos 20 de Abril de 2001. Possui superfície de quatro mil e trinta e nove hectares, oitenta e dois hares e quarenta e um centihares, com perímetro de vinte sete mil, quatrocentos e cinco metros e cinquenta e nove centímetros (Figura 12).



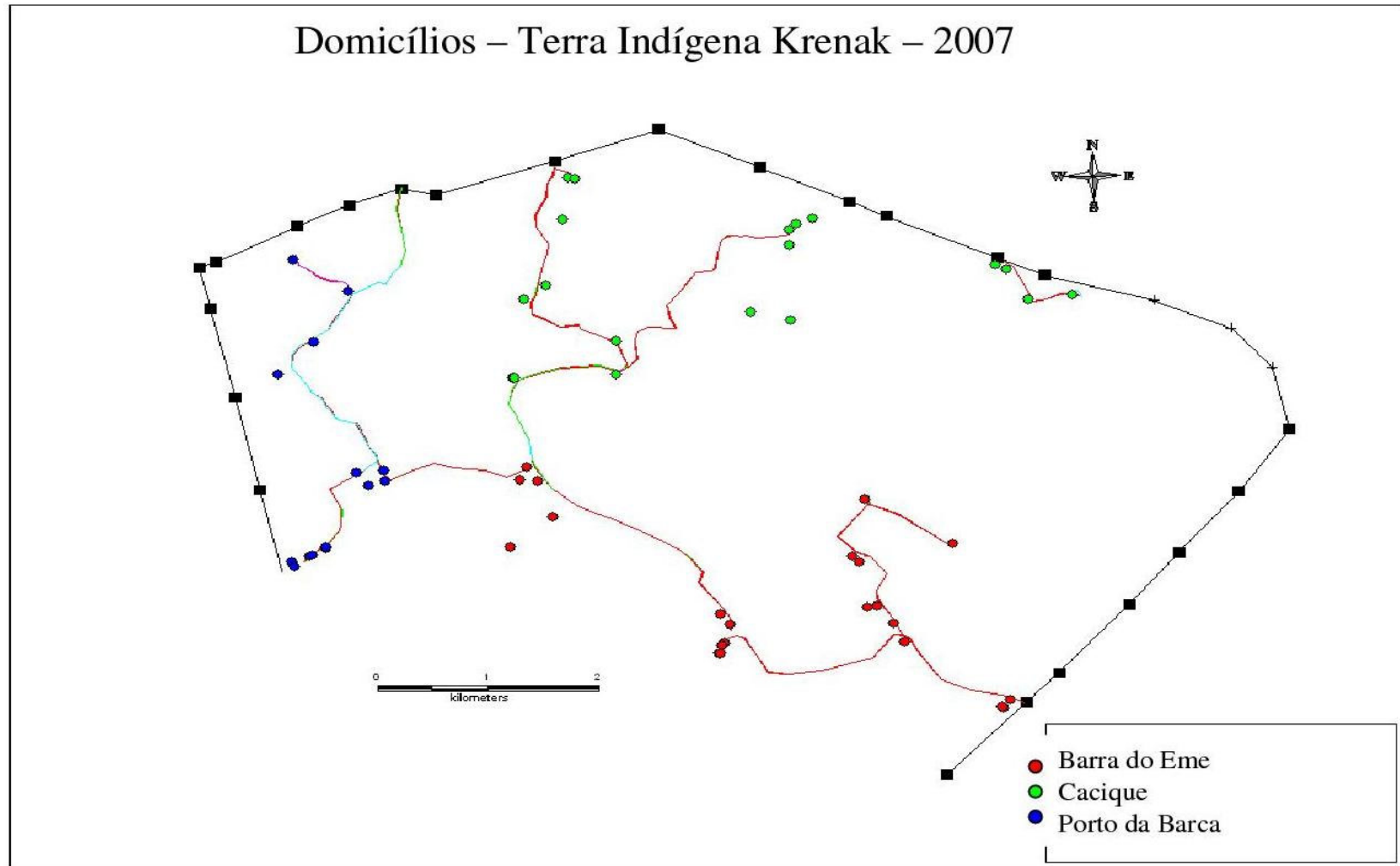
Figura 12- Vista parcial da área ocupada pela Aldeia Cacique, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.
Foto: Eloiza Gonçalves Antônio

A Terra Indígena Krenak ocupa a margem esquerda do Rio Doce, em área outrora ocupada pela Mata Atlântica (Figura 13); atualmente não apresenta nenhuma área remanescente dela. Toda a terra indígena está coberta por pastagens, matas ciliares ou áreas isoladas de matas secundárias principalmente nas regiões de morros e serras. Além do Rio Doce, o território é cortado pelo Rio Eme e pelo Rio Vizicatório. Completando a rede hidrográfica são observadas várias nascentes ao longo de toda essa Terra Indígena. Para controle da execução dos serviços de saúde, ela foi dividida pela Fundação Nacional de Saúde em três áreas (aldeias), a saber: Cacique, Barra do Eme, e Porto da Barca (ANTÔNIO, 2007).



Mapa 1 – Domínio da Mata Atlântica original e remanescente. Observar que a fronteira entre MG e ES, onde se localiza o município de Resplendor, se encontra na área originalmente coberta pela Mata Atlântica.

Fonte: www.rbma.org.br/anuario/images/mapa_dma_rem.jpg



Mapa 2 - Distribuição espacial dos domicílios por aldeia, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.

4.3 POPULAÇÃO ALVO

O universo de análise da presente pesquisa é representado pelos indivíduos da espécie *Canis familiaris* existentes na Terra Indígena Krenak.

4.3.1 Populações caninas examinadas

No primeiro inquérito sorológico canino foram examinados 63 cães provenientes das aldeias Barra do Eme, Cacique e Porto da Barca, representando 94 % da população canina cuja estimativa era de 67 cães no total.

No segundo inquérito sorológico canino foram examinados 90 cães provenientes das aldeias Barra do Eme, Cacique e Porto da Barca, representado 97,8% da população canina, cuja estimativa era de 92 cães no total.

4.4 GEORREFERENCIAMENTO E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL

O georreferenciamento foi realizado pela equipe do DSEI/MG/FUNASA sob a coordenação do Veterinário Marcos Aurélio Fulgêncio Malacco. Para a obtenção das coordenadas geográficas de latitude, longitude e altitude foi utilizado um aparelho GARMIN®, modelo GPSmap Cx. Os pontos geodésicos foram registrados com precisão de três a cinco metros. Em atendimento ao Decreto Federal 89.36, de 20 de junho de 1984, as coordenadas foram tomadas utilizando o datum planimétrico “*South American Datum -1969*” (SAD-69), atual datum planimétrico brasileiro.

A distribuição espacial da LVC canina na Terra Indígena Krenak, foi feita pelo programa “*Map Professional versão 7.5*”.

4.5 COLETAS DE SANGUE CANINO

O DSEI/MG-ES definiu a forma de coleta das amostras a serem encaminhadas ao laboratório de Epidemiologia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e ao Laboratório Central de Referência de Minas Gerais, Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Segundo o médico veterinário do DSEI/MG-ES então responsável técnico pela atividade, a opção pelo método de coleta se deu pela disponibilidade de materiais de consumo. Ao momento do primeiro inquérito havia disponibilidade de seringas, agulhas e vacutainers, optou-se então pela coleta de amostras de soro. No segundo inquérito havia disponibilidade de lancetas e blocos de papel filtro, optou-se pela obtenção de amostras em papel filtro.

As análises foram feitas em paralelo pelo Laboratório de Epidemiologia da Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, e pelo Laboratório de Doenças Parasitárias da Fundação Ezequiel Dias.

Utilizamos o “antígeno da Bio-Manguinhos” para a detecção de anticorpos anti *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) braziliensis*, por este apresentar resultados satisfatórios no diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina.

4.5.1 Primeiro Inquérito canino

O sangue foi colhido por punção da veia braquial e encaminhado para a UFOP; sempre em paralelo para a FUNED.

Todas as amostras de sangue canino coletadas foram encaminhadas juntamente com fichas padronizadas e preenchidas no ato da coleta.

4.5.1.1 Identificação das amostras de sangue

Identificação do animal (nome, idade, sexo e tipo de pêlo).

Nome e endereço completo do proprietário, devidamente preenchido em uma ficha que acompanhou o material enviado ao laboratório.

Identificação do responsável pela coleta do material, os dados do coletor foram

anotados juntamente com a ficha que continha os dados do proprietário do animal e os dados do animal.

Todos os dados foram anotados em fichas separadas pela data da coleta e juntamente com a identificação numérica, feita durante a coleta ao anotar os dados do animal.

4.5.2 Segundo Inquérito canino

Foram colhidas amostras de sangue através de punção da veia marginal auricular do cão, utilizando microlancetas descartáveis e transferindo o material obtido por capilaridade para lâminas de papel de filtro.

A área embebida foi de aproximadamente 3×3 centímetros com distribuição homogênea no papel, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006).

Após secarem, cada folha de papel de filtro, foi separada por lâminas de papel celofane, para evitar a contaminação das amostras de sangue que foram devidamente identificadas.



Figura 13 – Coleta de sangue em papel de filtro, Terra Indígena Krenak, MG, Novembro de 2007.
Foto: Marcos Aurélio Fulgêncio Malacco

Após a colheita do material descrito, o mesmo foi embalado em saco plástico contendo sílica e armazenado a temperatura ambiente durante as coletas na reserva, no fim do dia o material era acondicionado a uma temperatura de 4 °C e posteriormente enviado em um único lote para o laboratório de referência da Fundação Ezequiel Dias.

Todo o material foi devidamente numerado e continha as mesmas informações sobre o animal tanto no bloco de papel filtro contendo o sangue quanto na ficha.

As fichas foram entregues juntamente com o material coletado, ao centro de referência responsável pelas análises do mesmo.

Não foi mantida a mesma metodologia nos dois inquéritos por que não havia tempo suficiente para coleta de soro e nem meios adequados para armazená-lo. Estudos que demonstram que ambas as coletas possuem a mesma capacidade de detecção da infecção por *Leishmania*, havendo o cuidado apenas de processar as amostras de papel filtro dentro do prazo de 30 dias. A origem dos cães que participaram do estudo é indefinida.

4.6 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

As análises das amostras colhidas no primeiro inquérito foram feitas em paralelo pelo Laboratório de Epidemiologia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e pelo Laboratório Central de Referência de Minas Gerais (FUNED), os protocolos utilizados se encontram anexados a este trabalho (Anexo B e C).

4.7 CÁLCULOS DE PREVALÊNCIA E INCIDÊNCIA

4.7.1 Taxa de incidência

Número de casos novos, em determinado período/ número de indivíduos expostos ao risco, no mesmo período X constante.

4.7.2 Taxa de prevalência

Número de casos existentes, em determinado período / número de indivíduos X constante.

4.8 EUTANÁSIA

No transcorrer do trabalho de retirada dos cães soropositivos nos deparamos com pessoas desinformadas, sobre os riscos da manutenção de animais domésticos portadores das leishmanioses, na proximidade dos seus domicílios. Essa falta de conhecimento ocasionou recusas no início dos trabalhos de recolhimento dos cães positivos. Frente a este obstáculo, foram ministradas palestras sobre as leishmanioses nas três aldeias (Figura 16). Em uma das aldeias a comunidade não atendeu a convocação, sendo que nas outras duas houve muito interesse estando presente grande parte das comunidades locais. Após as palestras foi observada redução considerável no número de recusas.



Figura 14 – Palestra sendo ministrada pelo médico veterinário do DSEI-MG/ES; Falando com a comunidade indígena sobre as leishmanioses, com ênfase no reservatório canino e no risco de infecção em pessoas jovens e idosas; e; explicando para a comunidade indígena o ciclo de transmissão da doença.

Foto: Eloiza Gonçalves Antônio.

O procedimento seguiu as normas estabelecidas pela Resolução n.º 76, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre os procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências.

As eutanásias foram executadas por médico veterinário da FUNASA lotado no DSEI/MG-ES. O procedimento foi feito mediante sedação prévia seguida de eletrochoque. As eutanásias foram realizadas no posto de saúde localizado na própria Terra Indígena e que se encontrava desativado. Dez cães (27,8%) detectados positivos no primeiro inquérito foram eutanasiados. Os proprietários que não permitiram a eutanásia assinaram um termo de ciência da recusa, aos quais foram explicadas as conseqüências de se manter um reservatório da LV na área, e lhes assegurado, conforme permitido por lei, uma contraprova a ser realizada pela FUNED. Esse direito também foi informado e os proprietários de alguns dos cães

examinados, cujos resultados foram positivos e/ou indeterminados a solicitaram. A contraprova desses cães foi feita durante as coletas de sangue para o segundo inquérito da LV, na Terra Krenak.

O destino dos cadáveres dos cães eutanasiados obedeceu a RDC nº 33, de 25 de fevereiro de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

4.8.1 Coleta de material “*post-mortem*”

Essas amostras foram colhidas com a finalidade de determinar qual espécie de *Leishmania sp.* foi responsável pela positividade dos cães aos testes de EIE e IFI, visto que ambos podem apresentar reações cruzadas com outros parasitos, inclusive, aqueles distantes filogeneticamente, além de, haver possibilidade infecções mistas.

Foram coletadas amostras de baço, fígado, linfonodos, aspirado de medula óssea e fragmentos de orelha dos cães durante a necropsia.

O procedimento também foi realizado por médico veterinário do DSEI-MG/ES, responsável pelo controle de endemias.

As amostras coletadas foram devidamente acondicionadas em tubos do tipo falcon, embebidas em álcool PA e devidamente identificadas. Após a coleta as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisa René Rachou (LALEI-CpqRR).

4.9 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

4.9.1 Extração de DNA das amostras de tecido animal

Foram realizadas extrações de DNA das amostras de baço, fígado, linfonodos, aspirado de medula óssea e pele, utilizando para tal o “GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit” (Nº do produto: 27-5237-01); Seguindo o protocolo de execução contido no manual do kit (Anexo E).

Após o procedimento de isolamento, o DNA presente nas amostras foi dosado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 260nm e 280nm.

As alíquotas de DNA extraído e dosado foram diluídas em TE com o fim de equivaler a quantidade de DNA (expressa em ng/ μ L) presente em todas as amostras.

4.9.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para realização da PCR foram utilizados iniciadores que restringem a região conservada do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* iniciador A1 e A2: 5' (C/G) (C/G) (G/C) CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3' ; iniciador B: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3' (DEGRAVE *et al.*, 1994), que amplifica um fragmento de 120 pb. As medidas utilizadas de cada reagente foram calculadas para um volume final de 25 μ L contendo 5 μ L de DNA.

O processo de amplificação do DNA da região conservada (kDNA) foi realizado em um termociclador automático (Perkin-Elmer-Geneamp PCR System 2400).

O programa de amplificação escolhido foi: 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 60°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos (extensão). A última etapa (extensão) foi feita a 72°C por 10 minutos (ANEXO F).

Para visualização dos resultados utilizou-se gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata a 0,2%. Aplicamos no gel 5 μ L de cada produto amplificado (amostra, com kDNA amplificado) somado a 5 μ L do tampão de amostra por canaleta. O marcador de peso molecular foi aplicado no gel (\emptyset x174).

4.9.3 Polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP-PCR), para identificação das espécies de *Leishmania*

A técnica RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorfism-Polimerase Chain Reaction) utiliza enzimas de restrição capazes de separar a dupla fita do DNA existente nas amostras previamente amplificadas pela PCR. As enzimas de restrição reconhecem uma sequência específica de nucleotídeos, cujo tamanho pode variar entre 4 e 6 pares de bases. As espécies: *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*, possuem sequências de

aminoácidos distintas entre si, o que possibilita a diferenciação dessas espécies através da técnica de RFLP-PCR. As enzimas comumente utilizadas são a Hae III, capaz de distinguir as três espécies citadas acima e a ApaL 1, que faz distinção entre os complexos *Leishmania* e *Viannia* (VOLPINI, 2003).

Neste trabalho foi utilizada a enzima Hae III (Promega[®], Madison, Wisconsin, USA), pela sua capacidade de identificar as três espécies de *Leishmania*, com possibilidade de estarem causando a infecção na população canina examinada.

4.10 CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO

4.10.1 Positividade

Dois testes foram utilizados para o diagnóstico sorológico, a saber: EIE e IFI, porém o EIE foi utilizado apenas para triagem dos cães. A positividade dos cães foi determinada pelos resultados obtidos através da IFI. De acordo com as normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde, considerou-se nesta pesquisa apenas os resultados da IFI (BRASIL, 2006).

4.10.2 Variáveis

As variáveis analisadas foram o sexo, a idade e o tipo de pelo, dos cães pertencentes à TIK. A classificação dos cães pelo tipo de pelo foi feita pelo veterinário responsável pelas coletas. A avaliação do comprimento dos pelos e sua determinação seguiu parâmetros inerentes a raça de cada cão com auxílio da observação visual dos mesmos¹.

4.10.3 Sintomas

A classificação dos cães como assintomáticos, sintomáticos e oligossintomáticos, foi determinada pelo número de sintomas encontrados, de acordo com a avaliação do médico

¹: Coube ao médico veterinário do DSEI/MG-ES a determinação do comprimento dos pelos dos cães.

veterinário responsável pelo controle de endemias do DSEI/MG-ES² e pelas fichas de necropsia, cedidas pelo CPqRR (ANEXO D). Os cães sem sintomas sugestivos de LV foram classificados como assintomáticos e os cães que possuíam entre um e três sintomas típicos da LV foram considerados oligossintomáticos, ficando aqueles que apresentavam mais de três sintomas de LV classificados como sendo sintomáticos (BRASIL, 2006).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise das correlações entre as variáveis: sexo; idade; e; tipo de pelo, utilizamos o programa “*Epi info* versão 6.4, 2002”.

A comparação das taxas de prevalência de acordo com o sexo, a idade e o tipo de pelo foi realizada através do teste qui-quadrado.

O nível de significância considerado foi o valor de $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

5.1 ALDEIAS

5.1.1 Barra do Eme

No primeiro inquérito havia na aldeia Barra do Eme um total de 30 cães. Quando esta população foi submetida aos testes sorológicos de EIE e IFI, foram obtidos os seguintes resultados: 12 positivos; 12 negativos, e; seis indeterminados.

Ao momento em que se procedeu à busca dos cães positivos para eutanásia, dois deles já haviam evoluído para óbito. Oito animais foram submetidos à eutanásia sendo que os

²: Comunicação pessoal, do médico veterinário responsável pelos inquéritos sorológicos caninos na TI Krenak DSEI/MG-ES, 11 de Abril de 2007, recebida pessoalmente.

proprietários de dois cães positivos recusaram a sua entrega. Esses últimos dois cães se mostraram negativos ao segundo inquérito.

No tocante aos seis cães com resultado indeterminado, um deles desapareceu e cinco permaneceram na aldeia.

Dentre os 12 resultados negativos ocorreu um óbito e quatro desaparecimentos restando sete daqueles cães.

Na ocasião da realização do segundo inquérito, a população canina contava com 39 indivíduos, sendo que 14 deles já estavam presentes no primeiro inquérito. Desta forma, foi observado um incremento de 25 cães.

Dos sete cães negativos do primeiro inquérito, somente um se mostrou positivo no segundo inquérito. Entre os cinco cães indeterminados remanescentes do primeiro inquérito, um se mostrou positivo e quatro se mostraram negativos no segundo inquérito. Os dois cães positivos do primeiro inquérito foram negativos no segundo inquérito.

Entre os 25 cães incrementados e os 14 remanescentes, usando os mesmos testes sorológicos, foram observados os seguintes resultados no segundo inquérito: três positivos; 34 negativos, e; dois indeterminados. Foi observada uma incidência de 0,03%.

5.1.2 Cacique

No primeiro inquérito havia na aldeia Cacique um total de 20 cães. Quando esta população foi submetida aos testes sorológicos de EIE e IFI, foram obtidos os seguintes resultados: sete positivos; 10 negativos, e; três indeterminados.

Dois animais foram submetidos à eutanásia sendo que os proprietários de três cães positivos recusaram a sua entrega e dois desapareceram. No tocante aos três cães com resultado indeterminado, um deles desapareceu e dois permaneceram na aldeia.

Dentre os 10 resultados negativos ocorreram quatro desaparecimentos restando seis daqueles cães.

Na ocasião da realização do segundo inquérito, a população canina contava com 36 indivíduos, sendo que 11 deles já estavam presentes no primeiro inquérito. Desta forma, foi observado um incremento de 25 cães. Dentre os novos cães inseridos na aldeia, um filhote cuja mãe apresentará resultado positivo para o teste de EIE e indeterminado para a IFI, sendo submetida à eutanásia posteriormente. O filhote apresentou os mesmos resultados, positivo para EIE e indeterminado para IFI, além de apresentar sintomatologia sugestiva desde o seu

nascimento, segundo relato do proprietário. Os sintomas apresentados foram: alopecia generalizada; ceratoconjuntivite; dermatite furfurácea; onicogrifose e apatia. O filhote mencionado foi eutanasiado a pedido de seu proprietário (Figura 17).

Dos 10 cães negativos do primeiro inquérito, todos permaneceram negativos no segundo inquérito. Entre os dois cães indeterminados remanescentes do primeiro inquérito, um se mostrou negativo no segundo inquérito. Os três cães positivos do primeiro inquérito foram negativos no segundo inquérito.

Entre os 25 cães incrementados e os 11 remanescentes, usando os mesmos testes sorológicos, foram observados os seguintes resultados no segundo inquérito: três positivos; 31 negativos, e; dois indeterminados.

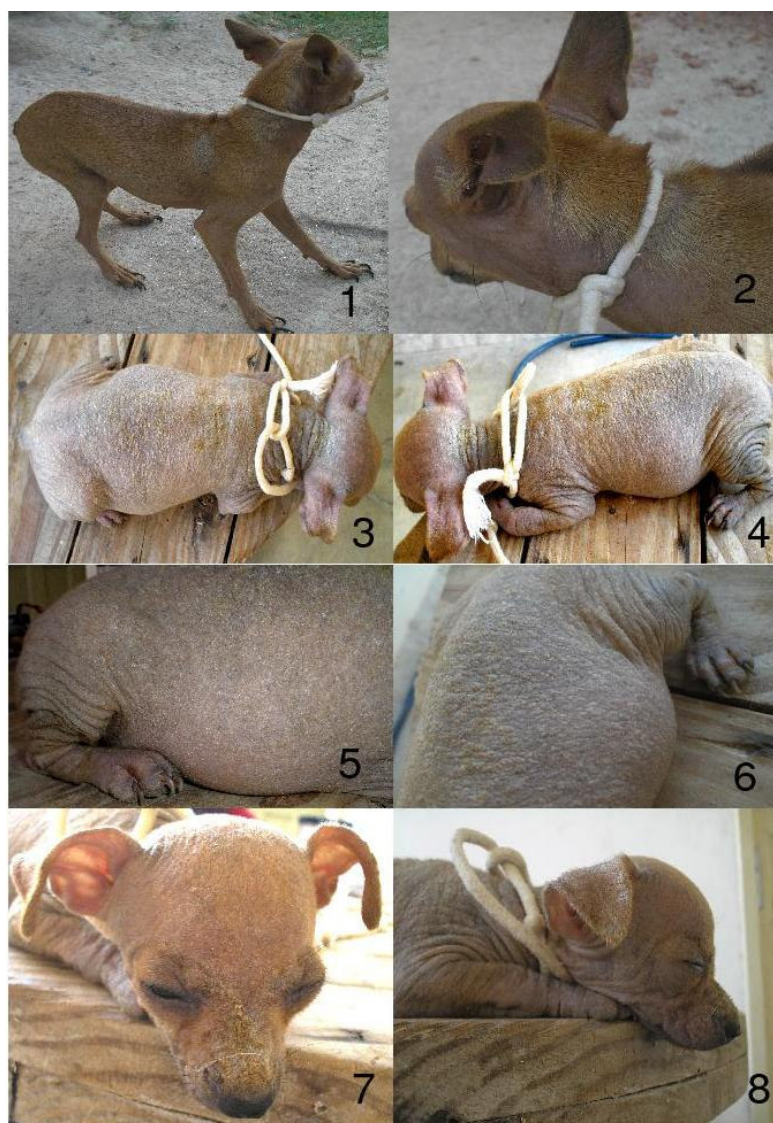


Figura 15 – Fotos 1 e 2 Pinsher fêmea, sororreagente para *L. chagasi*, apresentando alopecia localizada e onicogrifose; Fotos 3 a 8, filhote da Pinsher fêmea das fotos 1 e 2, com sorologia positiva e sintomas característicos de LVC com idade de aproximadamente 3 meses, apresentando alopecia generalizada, onicogrifose, dermatites e apatia.
Fotos: Eloiza Gonçalves Antônio

5.1.3 Porto da Barca

No primeiro inquérito havia na aldeia Porto da Barca um total de 13 cães. Quando esta população foi submetida aos testes sorológicos de EIE e IFI, foram obtidos os seguintes resultados: 10 positivos e três indeterminados.

Entre os 10 cães positivos seis desapareceram. No tocante aos três cães com resultado indeterminado, um deles desapareceu e dois permaneceram na aldeia.

Na ocasião da realização do segundo inquérito, a população canina contava com 15 indivíduos, sendo que seis deles já estavam presentes no primeiro inquérito. Desta forma, foi observado um incremento de nove cães.

Dos quatro cães positivos do primeiro inquérito, três apresentaram resultado negativo no segundo inquérito. Entre os três cães indeterminados remanescentes do primeiro inquérito, dois se mostraram negativos no segundo inquérito e um desapareceu.

Entre os nove cães incrementados e os seis remanescentes, usando os mesmos testes sorológicos, foram observados os seguintes resultados no segundo inquérito: um positivo; 13 negativos, e; um indeterminado. Não ocorreram novos casos de LVC na aldeia Porto da Barca no período entre o primeiro e o segundo inquérito.

5.2 INQUÉRITOS SOROLÓGICOS CANINOS

5.2.1 Taxas de prevalência da LVC do primeiro inquérito

A taxa de prevalência da doença canina encontrada foi de 40% na aldeia Barra do Eme, 35% na aldeia Cacique e 76,9% na aldeia Porto da Barca, com uma taxa global de 46% (Tabela 01).

Tabela 01 – Primeiro inquérito sorológico canino para a LVC na Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.

Aldeia	Frequência Relativa (%)			Intervalo de Confiança (95%)			Prevalência (%)
	Indeterminado	Negativo	Positivo	Indeterminado	Negativo	Positivo	
Barra do Eme	6 (50,0)	12 (54,5)	12 (41,4)	21,1 – 78,9	32,2 – 75,6	23,5 – 61,1	40
Cacique	3 (25,0)	10 (45,5)	7 (24,1)	5,5 – 57,2	24,4 – 67,8	10,3 – 43,5	35
Porto da Barca	3 (25,0)	0 (0,00)	10 (34,5)	5,5 – 57,2	0,0 – 15,4	17,9 – 64,3	76,9
Total	12 (100)	22 (100)	29 (100)				46

A taxa de prevalência da doença canina na aldeia Barra do Eme foi de 7,7%, na aldeia Cacique a prevalência foi de 8,3% e de 7,1% na aldeia Porto da Barca, com uma taxa global de 7,8% (Tabela 02).

Tabela 02 - Frequências relativas da sorologia e prevalência da LVC por aldeia no segundo inquérito sorológico canino da LVA, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, abril de 2007.

Aldeia	Frequência Relativa (%)			Intervalo de Confiança (95%)			Prevalência (%)
	Indeterminado	Negativo	Positivo	Indeterminado	Negativo	Positivo	
Barra do Eme	2 (40,0)	34 (43,6)	3 (43,0)	5,3 – 85,3	32,4 – 55,3	9,9 – 81,6	7,7
Cacique	2 (40,0)	31(39,7)	3 (43,0)	5,3 – 85,3	28,8 – 51,5	9,9 – 81,6	8,3
Porto da Barca	1 (20,0)	13 (16,6)	1 (6,0)	0,5 – 71,6	9,2 – 26,8	0,4 – 57,9	7,1
Total	5 (100)	78 (100)	7 (100,0)				7,8

5.2.2 Comparação entre as taxas de prevalência da LVC nos dois inquéritos na Terra Indígena Krenak, no ano de 2007

A prevalência da LVC na terra indígena Krenak, no primeiro inquérito foi de 46%, no segundo inquérito 7,8%.

Tabela 03 – Avaliação do nível de significância entre os resultados positivos e negativos por aldeias encontradas no I inquérito sorológico canino para a LVA, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.

Aldeias			Valor de p		
			Não Corrigido	Mantel-Haenszel	Correção de Yates
Barra do Eme	X	Cacique	0,57	0,58	0,81
Cacique	X	Porto da Barca	0,01	0,01	0,01
Porto da Barca	X	Barra do Eme	0,01	0,01	0,02

$p < 0,05$ (Significativo)

Tabela 04 – Avaliação do nível de significância entre os resultados positivos e negativos por aldeias encontradas no II inquérito sorológico canino para a LVA, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.

Aldeias			Valor de p		
			Não Corrigido	Mantel-Haenszel	Correção de Yates
Barra do Eme	X	Cacique	0,91	0,91	0,74
Cacique	X	Porto da Barca	0,84	0,84	0,70
Porto da Barca	X	Barra do Eme	0,90	0,90	0,63

$p < 0,05$ (Significativo)

Tabela 05 – Avaliação do nível de significância entre as taxas de prevalência encontradas no I e no II inquérito sorológico canino para a LVA, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.

Aldeia	Prevalência (%)		Não Corrigido	Valor de p	
	I	II		Mantel-Haenszel	Correção de Yates
Barra do Eme	40,0	7,7	0,01	0,01	0,01
Cacique	35,0	8,3	0,01	0,01	0,02
Porto da Barca	76,9	7,1	0,01	0,01	0,01

p < 0,05 (Significativo)

5.3 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DA LVC

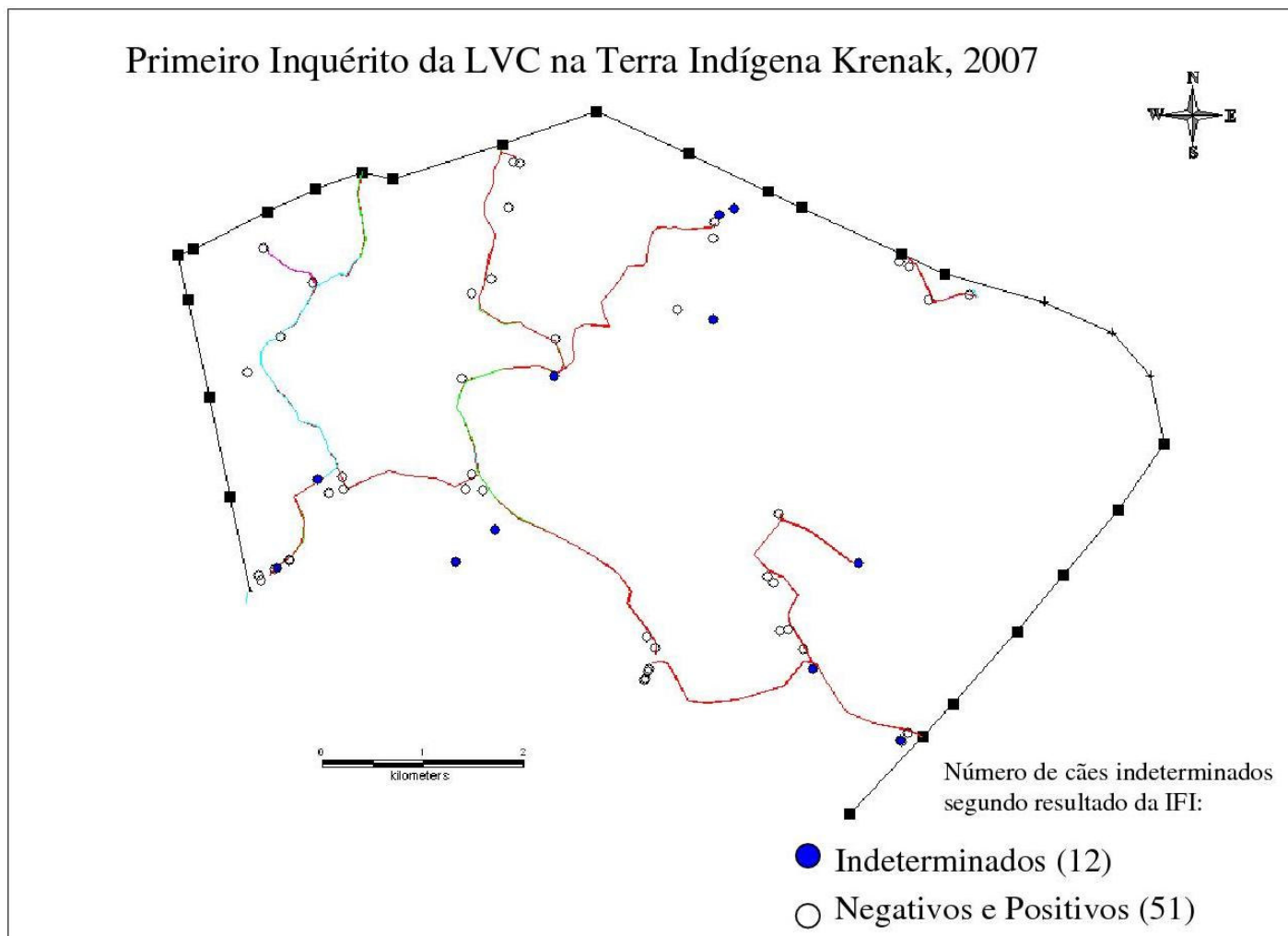
Através dos dados obtidos com o georreferenciamento da TIK, foi possível estabelecer a distribuição espacial da LVC cruzando os dados do georreferenciamento com os resultados sorológicos obtidos. A representação da dispersão da LVC na TIK foi analisada através de mapas.

No primeiro inquérito houve uma distribuição homogênea da infecção canina frente às altas taxas de prevalência encontradas, em especial na aldeia Porto da Barca (76,9%).

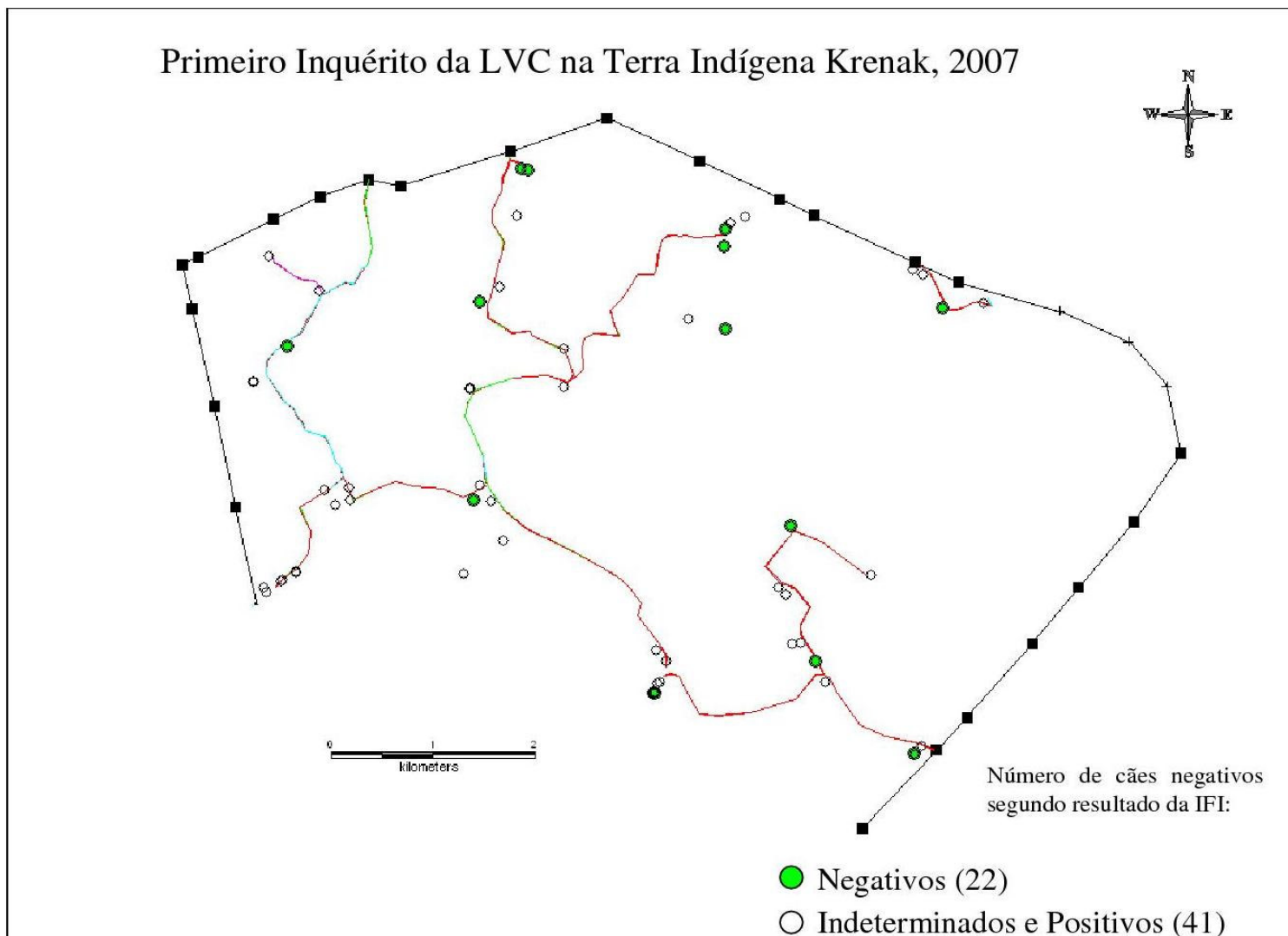
A distribuição da infecção canina no segundo inquérito foi heterogênea, ocorrendo apenas alguns casos isolados e as taxas de prevalência sofreram uma queda significativa. As aldeias apresentaram taxas de prevalência extremamente próximas umas das outras.

Durante o processamento dos dados sete mapas foram gerados. Dentre os sete mapas gerados, seis representam a situação em que se encontrava a ocorrência da LVC nos dois momentos do estudo.

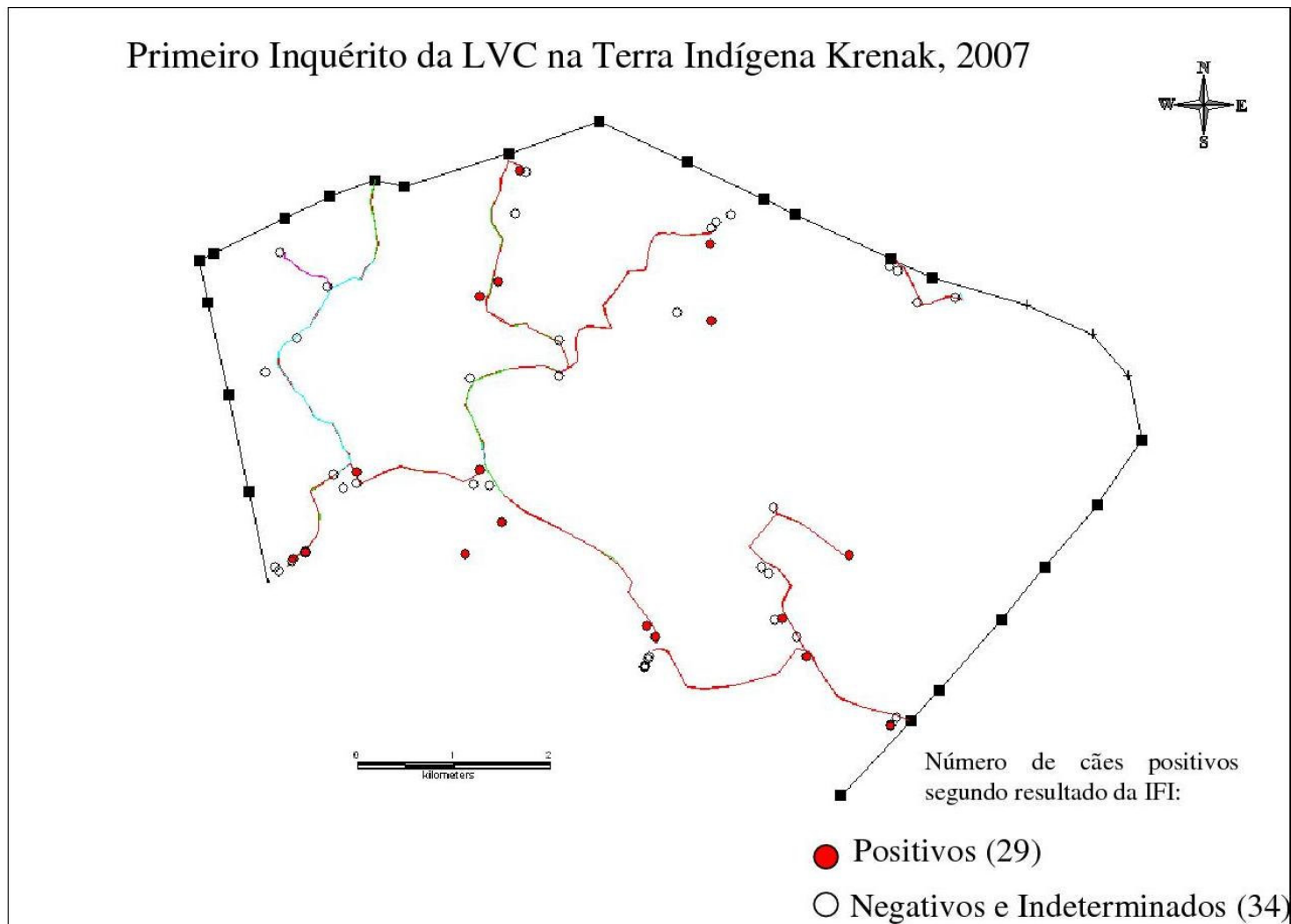
Nas casas com mais de um cão, ocorreram sobreposições de casos, pela falta de distinção do programa utilizado “*Map Professional* versão 7.5”. Sendo assim, visualizamos separadamente cada resultado diagnóstico de ambos os inquéritos soroepidemiológicos.



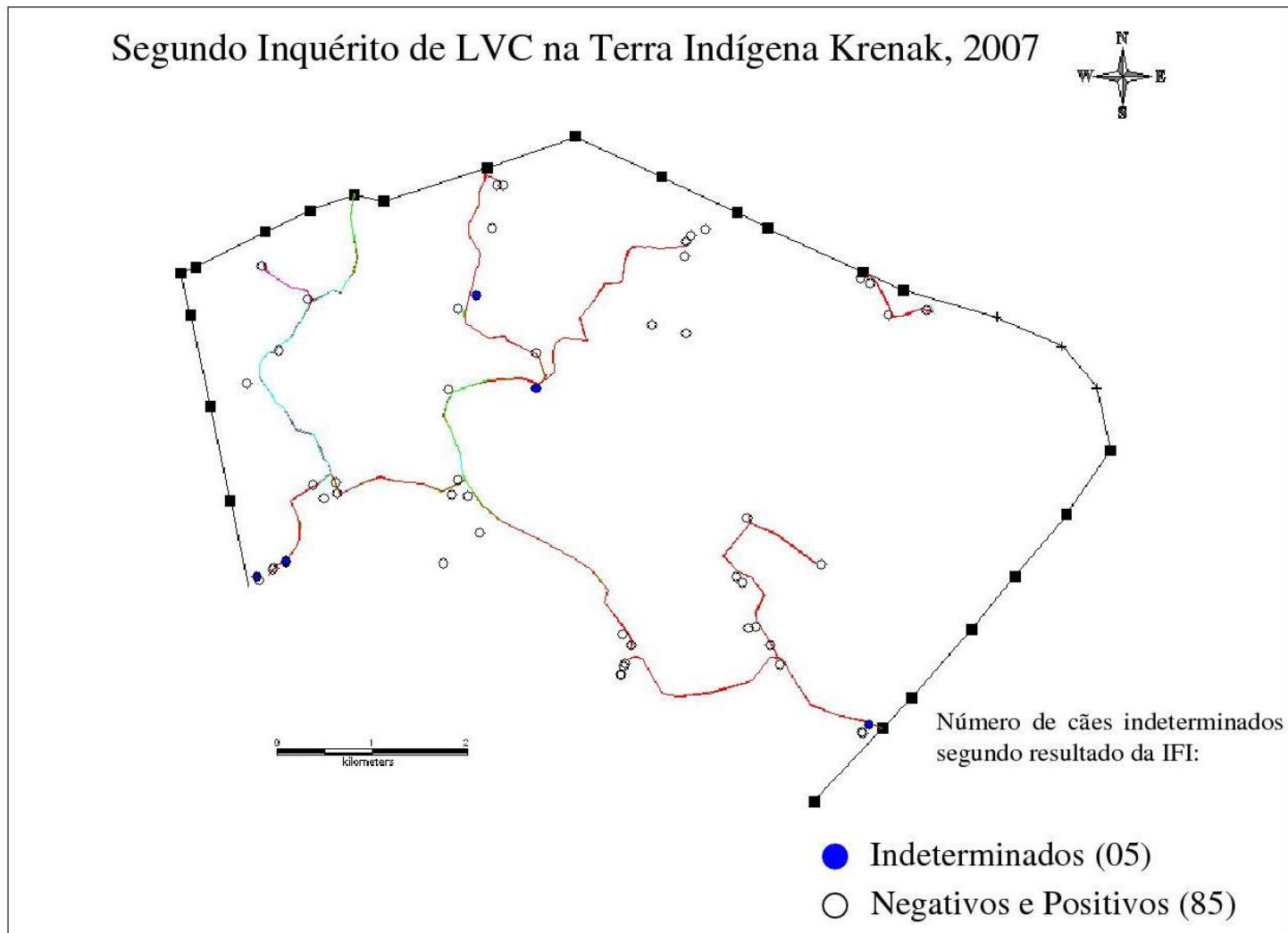
Mapa 3 – Distribuição espacial dos cães pertencentes à Terra Indígena Krenak, com sorologia indeterminada para LVC no primeiro inquérito sorológico canino realizado em 2007.



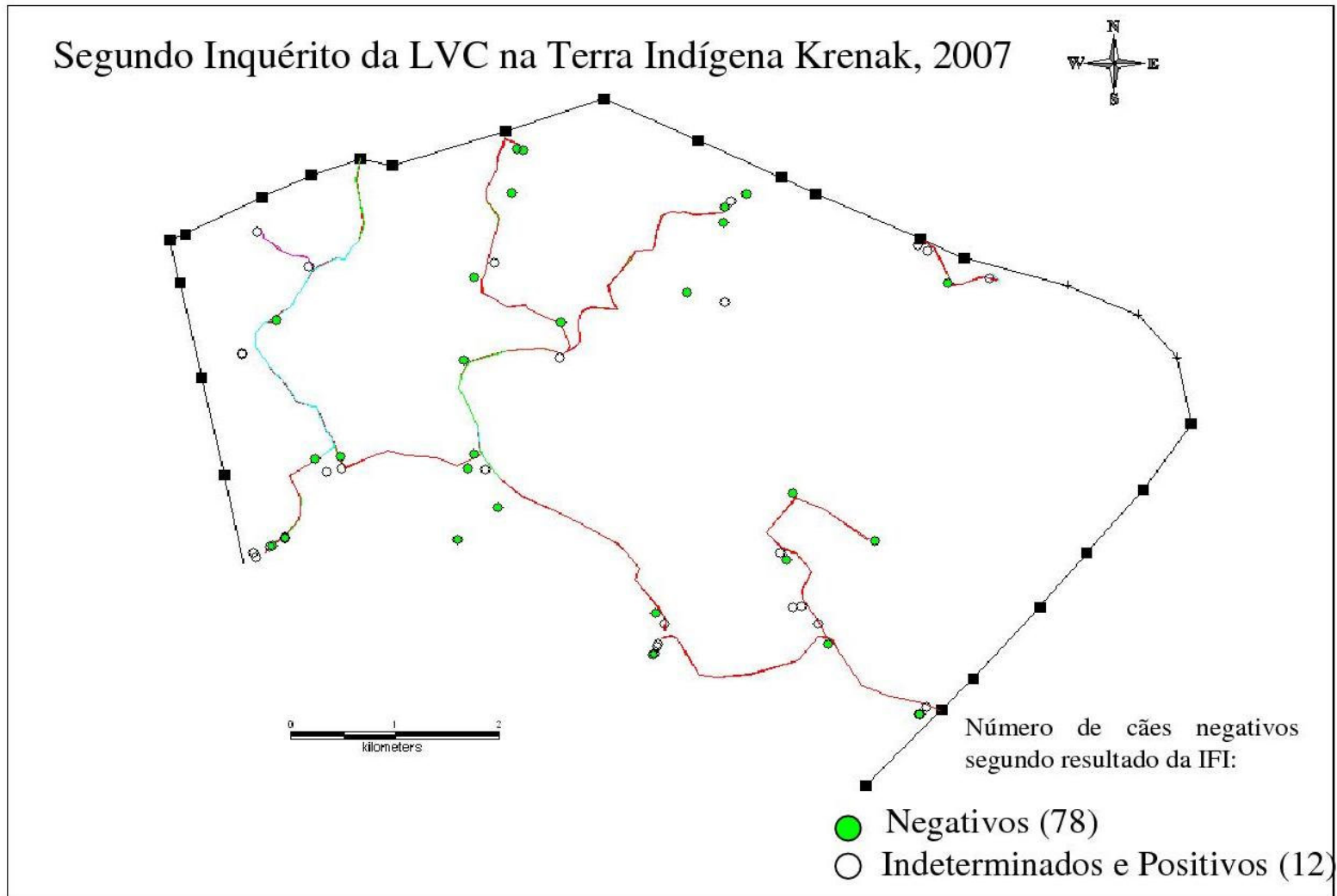
Mapa 4 – Distribuição espacial dos cães pertencentes à Terra Indígena Krenak, com sorologia negativa para LVC no primeiro inquérito sorológico canino realizado em 2007.



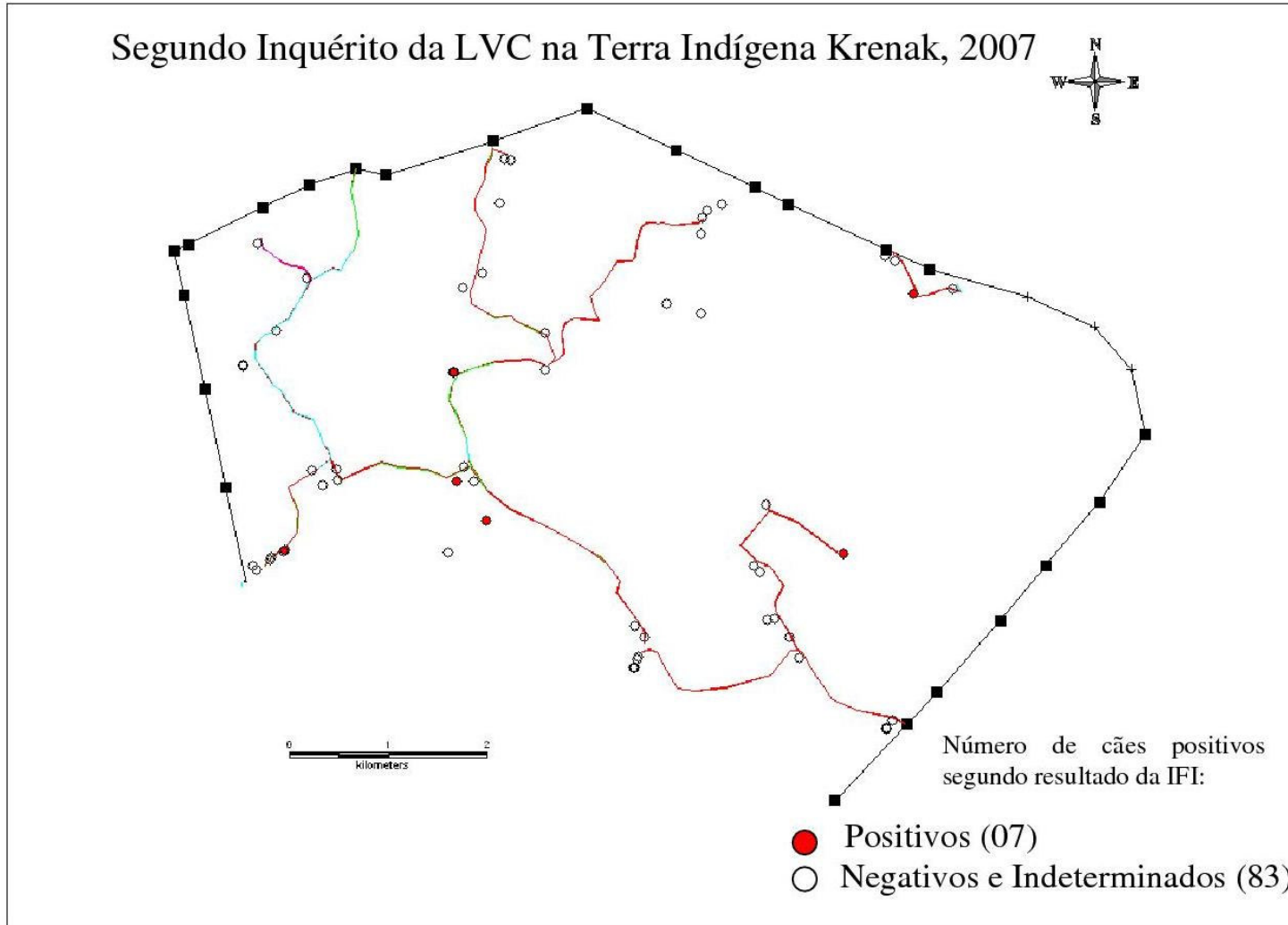
Mapa 5 – Distribuição espacial dos cães pertencentes à Terra Indígena Krenak, com sorologia negativa para LVC no primeiro inquérito sorológico canino realizado em 2007.



Mapa 6 – Distribuição espacial dos cães pertencentes à Terra Indígena Krenak, com sorologia indeterminada para LVC no segundo inquérito sorológico canino realizado em 2007.



Mapa 7 – Distribuição espacial dos cães pertencentes à Terra Indígena Krenak, com sorologia negativa para LVC no segundo inquérito sorológico canino realizado em 2007.



Mapa 8 – Distribuição espacial dos cães pertencentes à Terra Indígena Krenak, com sorologia positiva para LVC no segundo inquérito sorológico canino realizado em 2007.

5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICA DA ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS SEXO, IDADE E TIPO DE PÊLO

Foi realizado o teste de χ^2 , para todas as variáveis, e calculadas as taxas de prevalência da LVC dos inquiridos realizados. As tabelas 06 e 07 mostram os resultados obtidos referentes à variável sexo, no primeiro e no segundo inquiridos, respectivamente.

Tabela 06 – Taxa de prevalência em LVC segundo o sexo no primeiro inquirido, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.

Sexo	Distribuição Relativa (%)	Nº de cães examinados	Prevalência (%)	Nº de cães reativos	Intervalo de Confiança (95%)
Machos	40,3	26	50,0	13	26,4– 63,4
Fêmeas	59,7	37	43,2	16	35,7– 73,6
Total	100,0	63	46,0	29	

$p= 0,59 > 0,05$ (Não Significativo)

Tabela 07 – Taxa de prevalência em LVC segundo o sexo no segundo inquirido, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.

Sexo	Distribuição Relativa (%)	Nº de cães examinados	Prevalência (%)	Nº de cães reativos	Intervalo de Confiança (95%)
Machos	51,12	46	10,87	5	29,0 – 96,3
Fêmeas	48,88	44	4,54	2	3,7 – 71,0
Total	100,0	90	7,8	7	

$p= 0,26 > 0,05$ (Não Significativo)

As tabelas 08 e 09 mostram os resultados obtidos referentes à variável de idade, no primeiro e no segundo inquiridos, respectivamente.

Tabela 08 – Prevalência da LVC por idade no primeiro inquirido, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.

Grupo Etário	Distribuição Relativa (%)	Nº de cães examinados	Prevalência (%)	Nº de cães Reativos	Intervalo de Confiança (95%)
0,0 – 0,5	4,8	3	33,3	1	0,1 – 15,3
0,5 – 1,0	40,3	26	42,0	11	27,2 – 62,1
1,0 – 2,0	16,1	10	60,0	6	6,8 – 34,5
2,0 – 3,0	16,1	10	20,0	2	0,7 – 19,7
3,0 – 4,0	3,2	2	50,0	1	0,7 – 19,7
4,0 – 5,0	9,7	6	50,0	3	1,9 – 23,7
5,0 – 6,0	4,8	3	66,7	2	0,7 – 19,7
> 6,0	4,8	3	100	3	1,9 – 23,7
Total	100	63	46,0	29	41,7 – 67,5

$p= 0,25 > 0,05$ (Não Significativo)

Tabela 09 – Prevalência da LVC por idade no segundo inquérito, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.

Grupo Etário	Distribuição Relativa (%)	Nº de cães examinados	Prevalência (%)	Nº de cães Reativos	Intervalo de Confiança (95%)
0,0 – 0,5	15,9	6	0	0	0,0 – 41,0
0,5 – 1,0	30,7	26	11,5	3	9,9 – 81,6
1,0 – 2,0	19,3	17	5,9	1	0,4 – 57,9
2,0 – 3,0	13,6	13	15,4	2	3,7 – 71,0
3,0 – 4,0	6,8	6	0,0	0	0,0 – 41,0
4,0 – 5,0	5,7	5	0,0	0	0,0 – 41,0
5,0 – 6,0	3,4	4	25,0	1	0,4 – 57,9
> 6,0	4,5	5	0,0	0	0,0 – 41,0
Total	100	90	7,8	07	3,7 – 17,6

$p=0,28 > 0,05$ (Não Significativo)

As tabelas 10 e 11 mostram os resultados obtidos referentes a variável referente ao tipo de pêlo, no primeiro e no segundo inquéritos, respectivamente.

Tabela 10 – Resultado da análise estatística e taxa de prevalência da LVC por tipo de pêlo no primeiro inquérito realizado na Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.

Tipo de Pêlo	Distribuição Relativa (%)	Nº de cães examinados	Prevalência (%)	Nº de cães Reativos	Intervalo de Confiança (95%)
Curto	93,6	59	44,0	26	76,3 – 98,1
Longo	6,4	4	75,0	3	1,9 – 23,7
Total	100,0	63	46,0	29	41,7 – 67,5

$p=0,40 > 0,05$ (Não Significativo)

Tabela 11 – Resultado da análise estatística e taxa de prevalência da LVC por tipo de pêlo no segundo inquérito realizado na Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.

Tipo de Pêlo	Distribuição Relativa (%)	Nº de cães examinados	Prevalência (%)	Nº de cães Reativos	Intervalo de Confiança (95%)
Curto	84,4	76	7,9	6	42,1 – 99,6
Longo	13,3	12	8,3	1	0,4 – 57,9
Médio	2,3	2	0,0	0	0,2 – 38,5
Total	100,0	90	7,8	7	0,0 – 41,0

$p=0,30 > 0,05$ (Não Significativo)

5.5 SINAIS CLÍNICOS E ALTERAÇÕES DE ÓRGÃOS DO SFM DE CÃES EUTANASIADOS

A porcentagem de cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos foi de 27,3%, 54,5%, 18,2%, respectivamente, dentre os cães eutanasiados (Tabela 12).

Tabela 12 – Caracterização quanto à presença de sinais e sintomas da LVC nos cães eutanasiados no primeiro inquérito sorológico para a LVA, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.

Classificação	Número de cães	Porcentagem (%)
Assintomáticos	3	27,3
Oligossintomáticos	6	54,5
Sintomáticos	1	18,2

Para os cães sororreagentes aos testes de ELISA e RIFI, submetidos à medida de controle prevista pelo MS “eutanásia”, foram preenchidas fichas individuais de necropsia, com as quais foi possível separá-los em grupos, de acordo com os sinais clínicos avaliados em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos.

Na figura 24 está apresentado um cão assintomático, sem presença de quaisquer sinais clínicos de LVC.



Figura 16 - Cão assintomático, Terra Indígena Xakriabá, São João das Missões, Minas Gerais, 2007.
Foto: Eloiza Gonçalves Antonio

Na figura 25 está apresentado um cão oligossintomático. Os sinais clínicos e sintomas que podem ser observados são adenopatia linfóide, pequena perda de peso, pelagem opaca e apatia.



Figura 17 - Cão oligossintomático, Terra Indígena Xakriabá, São João das Missões, Minas Gerais, 2007.
Foto: Eloíza Gonçalves Antônio

Na Figura 26 estão sendo apresentados cães sintomáticos que possuem todos ou alguns sinais mais comuns da doença, como as alterações cutâneas (alopecia, dermatite

furfurácea, úlceras, hiperqueratose), onicogrifose, emagrecimento, ceratoconjutivite e parestia dos membros posteriores.



Figura 18- Cães sintomáticos, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, 2007
Foto: Eloiza Gonçalves Antônio

Durante as necropsias foram preenchidas fichas clínicas com as quais foi possível determinar os animais infectados como sendo assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Foram observadas alterações dos órgãos do Sistema Fagocitário Mononuclear, tais como: Esplenomegalia; Hepatomegalia; e; Linfadenopatia (Tabela 13).

Material coletado para PCR e RFLP-PCR “*post mortem*” para detecção da infecção por *L. chagasi*, nos cães soropositivos necropsiados (Figura 27).



Figura 19– Esplenomegalia encontrada entre os cães eutanasiados com sorologia positiva para *L. chagasi*, pinça e tesoura cirúrgicas como parâmetro de tamanho, Terra Indígena Krenak, Minas Gerais, 2007.
Foto: Eloiza Gonçalves Antônio

Tabela 13 – Alterações observadas nos cães eutanasiados no primeiro inquérito sorológico para a LVA, Terra Indígena Krenak, Resplendor, Minas Gerais, Brasil, 2007.

Sintoma	Número de cães	Porcentagem (%)
Alopecia	3	27,3
Cegueira	1	9,1
Ceratoconjutivite	2	18,2
Dermatite furfurácea	1	9,1
Emagrecimento	10	90,9
Onicogribose	8	72,7
Opacidade de córneas	1	9,1
Opacidade de pêlo	7	63,9
Esplenomegalia	10	100,0
Hepatomegalia	6	63,7
Linfoadenopatia	2	18,2

5.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Dentre os tecidos analisados os melhores resultados foram obtidos com as amostras de pele e linfonodos.

A PCR das amostras de pele comprovou a positividade já averiguada pelos testes sorológicos (EIE e IFI) de todos os cães necropsiados.

Dentre as 10 amostras de pele analisadas todas foram positivas para o gênero *Leishmania* (Figura 28).

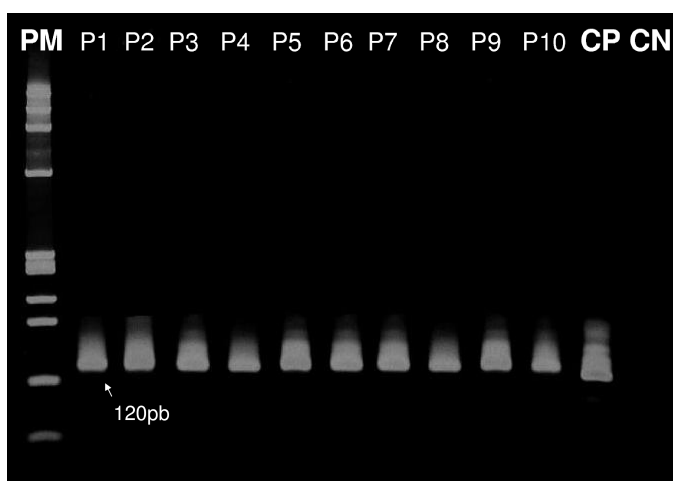


Figura 20 – Visualização em Gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata 0,2%; Da esquerda para a direita temos o peso molecular (PM) em seguida as amostras de pele de P1 a P10; e os controles: positivo (CP) e controle negativo (CN). As bandas observadas nas amostras com o mesmo peso molecular do CP indicam a presença de DNA de *Leishmania*. Todas as amostras de P1 a P10 são positivas.

Fotos: Eloiza Gonçalves Antônio

RFLP-PCR das amostras de pele (Figura 30) e de linfonodo definiu a espécie de *Leishmania* em questão como *L. (L.) chagasi*, comprovando a infecção canina pelo agente etiológico da LVC. Dentre as dez amostras analisadas seis foram positivas quando utilizado o método RFLP-PCR. Nenhuma outra espécie de *Leishmania sp.* foi identificada nos tecidos examinados além da *L. (L.) chagasi*.

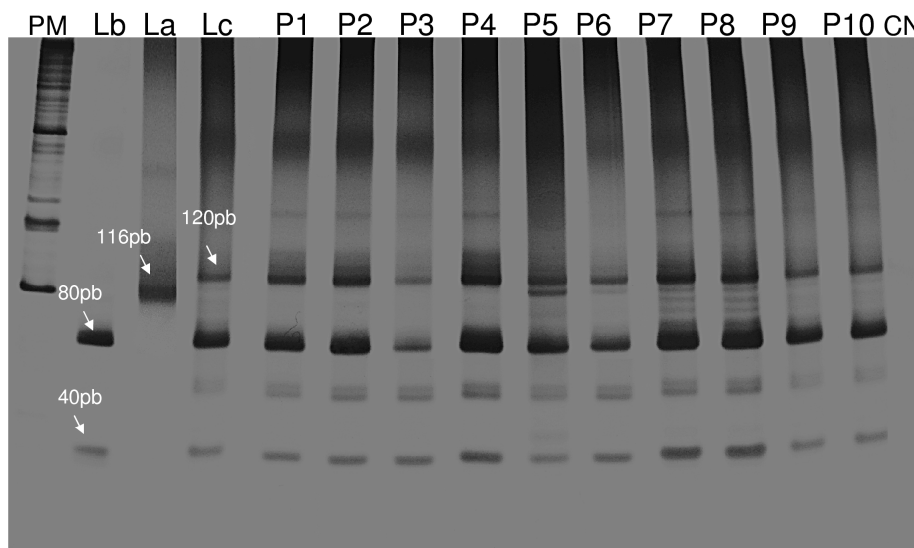


Figura 21 – Visualização em gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata 0,2%, dos perfis das bandas geradas após a digestão do produto amplificado através da enzima HAE III; Método de RFLP-PCR. Da esquerda para direita temos o peso molecular ($\emptyset 174$), seguido dos controles: *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*. Amostras de pele de P1 a P10, por último o controle negativo.

Foto: Eloiza Gonçalves Antônio.

6 DISCUSSÃO

Na presente pesquisa foram examinados 94% (n = 63) da população canina no primeiro inquérito e 97,8% (n = 90) no segundo, percentuais muito próximos do obtido por FRANÇA-SILVA *et al.* (2002) que trabalhou com 96,1% da população canina de Montes Claros/MG. SARMENTO *et al.* (2007) examinou 98 cães pertencentes a duas aldeias Guarani, sem mencionar o percentual de animais trabalhados na população total, número próximo ao de animais trabalhados no segundo inquérito canino da Terra Indígena Krenak.

No primeiro inquérito as amostras foram coletadas na forma de sangue total para posterior retirada da fração de soro. A este respeito, BRAGA *et al.* (1998) em seu trabalho encontrou de 1,84 a 2,85 vezes mais cães positivos quando trabalhando com as amostras de soro, do que quando usou amostras de eluato. Por sua vez PALATINIK *et al.* (2001) bem como FERREIRA *et al.* (2004), observaram em suas pesquisas maior número de falso-

negativos quando utilizaram eluatos do que quando utilizaram soro. Tudo isso reforça a fidedignidade dos resultados obtidos nesta etapa da pesquisa.

No segundo inquérito foi utilizada a coleta de amostras em papel filtro para a posterior extração de eluato de soro. Apesar dos achados de vários autores (BRAGA *et al.*, 1998; PALATINIK *et al.* 2001; FERREIRA *et al.*, 2004) alguns pesquisadores vem utilizando o eluato para o diagnóstico de diversas doenças infecciosas dentre elas a LVC, encontrando altos índices de concordância com os resultados obtidos pelo uso de soro (MACHADO-COELHO *et al.*, 1995; GOMES *et al.*, 2001). A este propósito Da SILVA, (2005) em testes de EIE e IFI no diagnóstico da LVC, encontrou alta concordância entre os resultados obtidos com eluato e soro.

Segundo, GENARO *et al.* (2002) a IFI não é uma técnica espécie-específica, possibilitando reações cruzadas com outros tripanosomatídeos dificultando o seu uso em áreas que ocorre Doença de Chagas e Leishmaniose Tegumentar. Isto nos levou a confirmação do agente etiológico por meios moleculares mais sensíveis e específicos, quando comparados aos testes sorológicos. Uma vez que existe registro de casos da leishmaniose tegumentar americana por *Leishmania braziliensis* na TIK, os cães reativos poderiam ser portadores de infecções mistas ou ainda de infecção por *Leishmania braziliensis*. Desta forma, o teste de PCR se mostrou muito útil para verificar a real positividade para o gênero *Leishmania*, corroborando com os resultados satisfatórios obtidos por QUARESMA (2007). Já o teste RFLP-PCR foi usado na determinação da infecção unicamente por *Leishmania chagasi* em todos os cães positivos os quais foram submetidos à eutanásia no presente estudo.

A inusitada prevalência encontrada no primeiro inquérito (46%) supera em muito a média da prevalência da LVC no Brasil que gira em torno de 1,9 a 35% (EVANS *et al.*, 1990; NUNES *et al.*, 1991). Geralmente as taxas encontradas no Brasil são menores, como segue: 23,5% em Jequié/BA (PARANHOS-SILVA *et al.*, 1996); 36% em Jacobina/BA (ASHFORD *et al.*, 1998); 25,8% em Barra de Guaratiba/RJ (CABRERA, 1999); 9,7% em Montes Claros/MG (FRANÇA-SILVA *et al.*, 2002); 13,7% na zona urbana e 12,4% na zona rural em Governador Valadares (MALAQUIAS *et al.*, 2006); 21,4% em cães de rua e 26,2% em cães domésticos de Itamaracá/PE (RONDON *et al.*, 2008). No entanto a literatura cita algumas situações onde a prevalência supera a média esperada para o país, como por exemplo no trabalho executado em Teresina/PI, onde se encontrou 42% de prevalência com o registro da incidência de 35% (COSTA, TAPETY & WERNECK, 2007) ou no trabalho realizado em Itapipoca/CE onde se registrou a prevalência de 39% (EVANS *et al.*, 1992). No entanto nenhum dos trabalhos encontrados superou a prevalência encontrada na presente pesquisa.

Embora se tenha encontrado prevalência de 46% no primeiro inquérito, na análise das prevalências por aldeia da TIK, foram encontrados os valores de 76,9% para Porto da Barca, 40% para Barra do Eme e 35% para Cacique. Observe-se que à exceção da aldeia Cacique, as demais aldeias se encontravam com prevalência acima dos valores esperados para o Brasil, de acordo com informações de EVANS *et al.* (1990) e NUNES *et al.* (1991).

São recomendadas estratégias de controle da LV no Brasil envolvendo tratamento sistemático de casos humanos, eliminação de cães soropositivos e uso de inseticidas residuais nas casas e nos abrigos dos animais (VIEIRA & COELHO, 1998; BRASIL, 2006). Entre os dois inquéritos da presente abordagem houve uma redução de 38,2% e a única intervenção executada foi a retirada e subsequente eutanásia de cães positivos após o primeiro inquérito. Alguns trabalhos mencionam que somente a retirada dos cães positivos não possui efeito relevante na redução da prevalência da LV (EVANS *et al.*, 1992; DYE, 1996; DIETZE *et al.*, 1997; PARANHOS-SILVA *et al.*, 1998). No entanto, intervindo somente com a retirada de cães positivos, ASHFORD *et al.* (1998) conseguiram redução da prevalência da LVC de 36% para 10% no período de dois anos em Jacobina/BA. Observe-se, no entanto, que a redução de prevalência observada no trabalho de ASHFORD *et al.* (1998) não chega a ser tão acentuada quanto a observada no presente trabalho. No município de Porteirinha/MG foi verificado que a retirada sistemática de cães positivos associada a medidas de controle vetorial proporcionaram redução da incidência da LV tanto em humanos quanto na população canina (FRANÇA-SILVA *et al.*, 2005).

Em vista da redução de prevalência da LVC mediante a retirada dos cães positivos observada no presente trabalho, há que se relevar a importância deste feito em relação à saúde dos indígenas residentes na localidade abordada. A este respeito, SOUZA, *et al.* (2008) avaliaram dois tipos de intervenção executadas em Feira de Santana/BA: aplicação residual de inseticidas associada a retirada de cães positivos ao teste de ELISA, e; aplicação residual de inseticidas sem qualquer intervenção na população canina. A retirada dos cães associada à aplicação de depósitos residuais de inseticidas apresentou-se melhor do que a aplicação de inseticidas isoladamente. Quando trabalhando com as medidas associadas foi obtida redução na taxa de incidência de casos humanos de LV em 29% no primeiro ano e 44% no segundo ano. Segundo eles, o efeito protetor da triagem e eliminação de cães encontra fundamento no conhecimento atual sobre a transmissão dessa infecção, pois ao retirar cães infectados reduz-se a quantidade de fontes de infecção para os flebótomos. Outros estudos, entretanto, referem não haver correlação entre a prevalência da infecção canina e a incidência da LV em humanos, sugerindo a existência de outros possíveis fatores de interferência na efetividade da

retirada de cães como medida de controle da LV (OLIVEIRA E ARAÚJO, 2003; EVANS *et al.*, 1992; ASHFORD *et al.*, 1998; COURTENAY *et al.*, 2002).

A realização dos inquéritos sorológicos caninos na TIK mesmo sem ter sido registrado qualquer caso humano ou canino da LV tem importância que transcende a simples verificação da presença desta parasitose. A este respeito, EVANGELISTA, GONÇALVES & SIBAJEV (2009), trabalharam no município de Boa Vista/RR, onde a quase totalidade da população acometida era indígena. Dessa forma, ressaltam a importância de se controlar a doença canina em virtude da presença de vetores e de população humana suscetível. Anteriormente ALVES e BEVILAQUA (2004), já ressaltavam a importância do controle da população canina positiva para LV buscando evitar o aparecimento de casos humanos que muitas vezes podem ser fatais.

Os cães positivos para LV e assintomáticos geralmente ocupam boa parte do contingente de animais infectados (BRASIL, 2006). A este respeito, OLIVEIRA *et al.* (1998) enaltecem a importância do inquérito sorológico canino para a identificação dos animais infectados. Além disso, afirma-se que os reservatórios caninos possuem papel fundamental na expansão da doença em áreas endêmicas (SANTOS *et al.*, 2005). Segundo SENRA *et al.* (1986) os cães positivos e aparentemente sadios têm grande importância epidemiológica, pois à primeira vista podem levar a se subestimar a infecção pela *Leishmania chagasi*. Enquanto MARZOCHI (1985) menciona 63,2% de cães assintomáticos entre a população de animais positivos, no presente estudo observou-se 27,3% de cães assintomáticos, mostrando que neste caso o número de assintomáticos estava aquém do esperado. No entanto este pequeno número de assintomáticos causou problemas no momento do recolhimento dos animais para eutanásia, pois os donos se recusavam a entregá-los, alegando que os mesmos estavam sadios. Isto reveste de importância a execução do presente inquérito, para a identificação destes animais.

Alguns autores pontuam correlação positiva entre LVC e variáveis tais como sexo (ALENCAR & CUNHA, 1963; LANOTTE *et al.*, 1975; AMORÁ, 2006; DANTAS-TORRES, BRITO & BRANDÃO-FILHO, 2006), idade (ALENCAR & CUNHA, 1963; LANOTTE *et al.*, 1975; POZIO *et al.*, 1981; ABRANCHES *et al.*, 1991; BORGES, 2006; DANTAS-TORRES, BRITO & BRANDÃO-FILHO, 2006) e comprimento dos pelos (POZIO *et al.*, 1981; FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003). Por outro lado, outros autores não conseguiram identificar correlação entre LVC e quaisquer variáveis relacionadas aos animais (FEITOSA *et al.*, 2000; GONTIJO & MELO, 2004; SOUZA & ALMEIDA., 2008). Da mesma forma, na presente pesquisa não foi encontrada correlação positiva entre LVC e sexo, idade e comprimento dos pelos dos animais positivos.

Ainda em relação ao controle, o tratamento do cão não é uma medida recomendada, pois não diminui a importância do cão como reservatório do parasito. As tentativas de tratamento da leishmaniose visceral canina, por meio de drogas tradicionalmente empregadas (antimoniato de N- metil glucamina, anfotericina B, isotionato de pentamidina, alopurinol, cetoconazol, fluconazol, miconazol, itraconazol), tem tido baixa eficácia. O uso rotineiro de drogas em cães induz à remissão temporária dos sinais clínicos, não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito limitado na infectividade de flebotomíneos e levam ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano (BRASIL, 2006).

Além disso, o uso do antimoniato de N-metil-glucamina, utilizada na terapêutica humana, foi testado em cães, com diferentes esquemas terapêuticos e, no entanto, resultaram em fracasso e, muitas vezes, exarcebação da doença, provocando intensa dermatite furfurácea; outras vezes, ocorrendo apenas melhoria do estado geral e dos sintomas, mas com parasitismo, sobrevivendo a morte antes do término do mesmo (BRASIL, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que os medicamentos utilizados para tratar humanos não sejam utilizados em cães. A esse respeito, a Portaria interministerial Nº 1.426 publicada no Diário Oficial da União nº133, em 6 de julho de 2008, proíbe o tratamento da leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

A rotina de captura de cães errantes é essencial, especialmente em áreas urbanas, por ser fonte disseminadora de diversas doenças de importância médica-sanitária, entre elas a LV, devendo esta ser realizada pelo município rotineiramente de acordo com as normas estabelecidas no código sanitário.

Em áreas com transmissão de LV humana ou canina, é recomendado que seja realizado previamente o exame sorológico canino antes de proceder à doação de cães. Caso o resultado seja sororreagente, deverão ser adotadas as medidas de vigilância e controle recomendadas pelo Programa de Controle da LV – Norma Técnica – 2006, expedida pelo MS.

Atualmente, existem duas vacinas contra a leishmaniose visceral canina registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Para uma delas, a LEISH IMUNE®, ainda não há dados na literatura que confirmem seu custo-benefício e efetividade para o controle de reservatório da leishmaniose visceral canina em programas de saúde pública. E a

outra, a LEISH TEC®, apesar de ter sido aprovada pelos seus resultados preliminares nos ensaios de Fase I e II, ainda está em fase de avaliação em ensaio clínico de Fase III³.

Os canis de residências e, principalmente, os canis de “*pet shop*”, clínicas veterinárias, abrigo de animais, hospitais veterinários e os que estão sob a administração pública devem utilizar obrigatoriamente telas do tipo malha fina, com objetivo de evitar a entrada de flebotomíneos e conseqüentemente a redução do contato com os cães.

Em condições experimentais, foi demonstrada a eficácia na utilização de coleiras impregnadas com deltametrina 4% como medida de proteção individual para os cães contra picadas de flebotomíneos. Entretanto, para a sua adoção em programas de saúde pública, a fim de interromper o ciclo de transmissão doméstico, é necessário executar estudos longitudinais que demonstrem sua efetividade como medida de controle (BRASIL, 2006).

6.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Durante a realização do estudo entraves de caráter técnico ocorreram. A realização dos inquéritos sorológicos não foi executada com a mesma metodologia. No segundo inquérito realizado não haviam meios adequados para o acondicionamento de amostras de soro total, além da falta de material suficiente para todas as coletas. Acreditamos, no entanto, que esses procedimentos não interferiram nos resultados, pois segundo da Silva (2005) ambas as coletas (sangue total e papel de filtro) possuem a mesma capacidade de detecção da infecção por *Leishmania sp.*, quando se tomam os cuidados necessários no acondicionamento das amostras, e quando a sorologia do papel filtro é processada dentro do prazo de 30 dias.

Como os cuidados de conservação foram tomados e frente a necessidade de realizarmos o segundo inquérito para avaliação das taxas de prevalência da LVC na TIK, após a retirada dos cães positivos, o mesmo foi executado e as amostras foram coletadas em papel filtro. A opção por papel de filtro foi feita pela FUNASA, que justificou optar por este tipo de coleta em decorrência da falta de material e tempo hábil, alegando que as coletas de sangue total são dispendiosas e demoradas.

³: Comunicação pessoal do professor George Luís Lins Coelho-Machado, em 20 de outubro de 2008, recebida pessoalmente.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados encontrados na presente pesquisa, conclui-se que:

- Confirmou-se a infecção de cães por *L. (L.) chagasi* na TIK; a PCR e RFLP-PCR, foram ferramentas úteis e de alta sensibilidade para identificação da espécie *L. (L.) chagasi* na população canina da TIK;
- ao exame pela RFLP-PCR não foi encontrada infecção mista de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania chagasi* entre os cães necropsiados;
- não foi encontrada correlação significativa entre LVC e sexo, idade e tipo de pelo dos cães;
- foi encontrada distribuição homogênea dos casos de LVC no primeiro inquérito, após a intervenção de controle observou-se apenas casos isolados; encontrou-se diferença estatisticamente significativa entre as três aldeias somente no primeiro inquérito sorológico canino.
- entre os cães necropsiados, 54,5% eram oligossintomáticos, 27,3% eram assintomáticos e 18,2% eram sintomáticos; Entre os cães submetidos a necropsia, os sinais clínicos mais frequentes foram esplenomegalia, hepatomegalia, emagrecimento, onicogribose, opacidade de pelo, linfadenopatia, alopecia e ceratoconjutivite;
- as alterações mais frequentes nos órgãos do SFM foram a esplenomegalia (100%), hepatomegalia (63,7%) e linfadenopatia (18,2%);

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para compreendermos melhor a epidemiologia da leishmaniose visceral canina e evitar o surgimento de casos humanos na Terra Indígena Krenak, se fazem necessários inquéritos sorológicos caninos periódicos, seguidos da retirada dos cães soropositivos e estudos sobre a densidade de flebotomíneos. Além disso, é necessário o acompanhamento da população canina com ênfase na origem dos cães introduzidos na terra indígena. A busca ativa de casos humanos também é de extrema importância por existirem relatos de casos suspeitos sem notificação.

REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, P. et al. **An experimental model for canine leishmaniosis.** Parasite Immunology. n.13, p.537-550, 1991a.
- ALENCAR, J.E.; CUNHA, R.V. — **Inquéritos sobre calazar canino no Ceará; novos resultados.** Revista Brasileira Malariologia e Doenças Tropicais. n.15: p. 391-403, 1963.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSELL, D.G. **Leishmania species: models of intracellular parasitism.** Journal of Cellular Science, n. 18, p.2993-3002, 1999.
- ALVAR, J. et al. **Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy.** Annals of Tropical Medicine and Parasitology. n. 88, p. 371–378. 1994.
- ALVAR, J. et al. **Leishmania and Human Immunodeficiency Virus Coinfection: the First 10 Years.** Clinical Microbiology Reviews. p. 298–319, 1997.
- ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. **Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997.** Cadernos de Saúde Pública n. 20, p. 259-265, 2004.
- AMORÁ, S.S.A. et al. **Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil.** Ciência Rural. V.36, n.6, p.1854-1859, 2006.
- ANTÔNIO, E.G. **Observações pessoais durante o processo de coleta de sangue para inquéritos e operações de eutanásia.** Resplendor, abril e novembro de 2007.
- ASHFORD, D.A. et al. **Studies on control of visceral leishmaniasis: Impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil.** American Journal of Tropical Medicine. n.55, p.53-57, 1998.
- BORGES, A.P.B. **Composição do líquido sinovial de cães com ruptura do ligamento cruzado cranial.** Ciência Rural. v. 29, n. 2, pp. 285-289, 1999.
- BRAGA, M.D. et al. **Control of visceral canine leishmaniasis: comparasion of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. n. 31, p.419-424,1998.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estimativa das populações residentes em primeiro de julho de 2008 segundo os municípios**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2008/POP2008_DOU.pdf> Acesso em: 07 out. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução Diretora Colegiada n.º 33**, de 25 de Fevereiro de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde & Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União n.º 133**, em 6/07/2008 a Portaria interministerial N.º 1.426, de 11 de julho de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006**. 120 p.: il. color – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências: Resolução n.º. 76, de 20 de junho de 2002** .

BRASIL. Presidência da República. **Decreto de 19 de abril de 2001 – homologa a demarcação administrativa da Terra Indígena Crenaque (Krenak), localizada no Município de Resplendor, Estado de Minas Gerais**.

BRASIL. Presidência da República. **Decreto n.º 51.838, de 6 de março de 1963 – baixa normas técnicas especiais para o combate às leishmanioses**.

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

CHAGAS, E. **Primeira verificação em indivíduo vivo, da leishmaniose visceral no Brasil**. Brasil Médico, Rio de Janeiro, n. 50, p.221-222, 1936.

CHAMPAGNE, D. **The role of salivary vasodilators in bloodfeeding and parasite transmission**, Parasitology Today, n.10, p.430–433,1994.

CHANG, K.P.; CHAUDHURI, G.; FONG, D. **Molecular determinants of Leishmania virulence**. Annual Revision of Microbiology, p.44, p.499-529, 1990.

CHARLAB, R. et al. **Toward na understanding of biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagus sand fly *Lutzomyia longipalpis***. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. n. 96, p. 15155-15160, 1999.

CORREDOR, A. et al. ***Didelphis marsupialis* an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, n. 83, p.195.

COSTA, C.H.N. et al. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **Journal of Infectious Diseases**, n. 182, p.997-1000, 2000.

COSTA, C.H.; TAPETY, C.M.; WERNECK, G.L. **Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. n.4, p. 415-419, 2007.

COUTINHO, S.G. et al. **A survey for American cutâneos and visceral leishmaniosis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil), where the human disease occur**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz: n. 80, p.17-22, 1985.

CUNHA, S.; FREIRE, M.; EULALIO, C. **Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, n. 89, p.155-158, 1995.

DANTAS-TORRES, F. **Leishmania infantum versus leishmania chagasi: do not forget the Law of priority**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 101, p.117-118, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. **Visceral leishmaniasis in Brazil: revesting paradigms of epidemiology and control**. Revista do. Instituto de Medicina Tropical. São Paulo, n. 48(3), p.151-156, 2006.

DA SILVA, M.V. **Avaliação de testes sorológicos para leishmaniose visceral canina utilizando coleta de amostra sanguínea em papel de filtro**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, 2005.

DE ALMEIDA, M.C. et al. **Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 98, n.7, p. 861-870, 2003.

DE ANDRADE, H. M. et al. **Use of PCR–RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs**. Veterinary Parasitology, n.60 p.231–238, 2006.

- DEANE, L.M. **Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará.** Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956.
- DEANE, L. M.; DEANE, M. P. **Encontro de cães naturalmente infectados por *Leishmania donovani* no Ceará.** O Hospital, Rio de Janeiro, n. 45, p.703-707, 1954.
- DEANE, L. M.; DEANE, M. P. **Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, n.4: p.198-212, 1962.
- DEANE, L.M.; DEANE, M.P. **Visceral leishmaniosis in Brazil. Geographical distribution and transmission.** Revista de Medicina Tropical. São Paulo n. 4, p.69-212, 1962.
- DEANE, L. M. **Leishmaniose Visceral no Brasil., Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Ceará.** Thesis de Livre Docencia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1956.
- DEANE, L. M.; DEANE, M. P. - 1954 - **Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará.** - O Hospital, Rio de Janeiro, n.45: p.419-421.
- DEANE, L. M.; DEANE, M. P. **Encontro de cães naturalmente infectados por *Leishmania donovani* no Ceará.** - O Hospital, Rio de Janeiro, n.45: p.703-707, 1954a.
- DEANE, M. P.; DEANE, L. M. **Infecção natural de *Phlebotomus longipalpis* por leptomonas, provavelmente de *Leishmania donovani*, em um foco de calazar, no Ceará.** - O Hospital, Rio de Janeiro, n. 45: p.697-701, 1954.
- DEANE, M. P.; DEANE, L. M. **Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente parasitada por pela *Leishmania donovani*.** - O Hospital, Rio de Janeiro, n.46: p.651-653, 1954a.
- DEANE, L.M. **Leishmaniose visceral no Brasil - estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará.** Serviço Nacional de Educação Sanitária. Rio de Janeiro, p.162, 1956.
- DEGRAVE, W. et al. **Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini-review.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, n. 89, p. 463-469, 1994.
- DESJEUX, P. **The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, n. 95, p.239-243, 2001.

DINIZ, S. A. et al. **Animal reservoirs for leishmaniasis in densely populated urban areas.** Journal of Infectology Developing Countries. n. 2(1), p. 24-33, 2008.

EL-AMIN, E.R. et al. **Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect haemagglutination.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, n. 80, p.271-274.

EVANGELISTA, L.S.M.; GONÇALVES, L.M.F.; SIBAJEV, A. **Leishmaniose visceral canina no Estado de Roraima.** Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia, Londrina, Artigo: 484, v. 3, n. 2, 2009.

EVANS, T.G. et al. **Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnosis methods.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, n. 42, p. 118-123, 1990.

EVANS, T.G. et al. **Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil.** Journal Infected Disease. n. 166(5), p. 1124-32, 1992.

FEITOSA, M.M. **Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. Anais: Primeiro Fórum sobre Leishmaniose Visceral Canina.** Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, pp. 9-6, 2006.

FERRER, L. **Clinical aspects of canine leishmaniosis: an update.** In: Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Hoechst Roussel Veterinary, Barcelona, Spain, p. 6-10, 1999.

FRANÇA-SILVA, J.C. et al. **Epidemiology of canine visceral leishmanioses in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil.** Veterinary Parasitology. n. 111, p.161-173, 2003.

FRANÇA-SILVA, J.C. et al. **Importance of Lutzomyia longipalpis in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil.** Veterinary Parasitology. n. 10, n.131, p. 213-20, 2005.

GALATI, E.A.B. et al. **Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil.** Medical and Veterinary Entomology, n. 12, p.315-317, 1998.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral americana.** In NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O. & LINARDI, P.M. Parasitologia humana. 10 ed., São Paulo: Editora Atheneu, n. 10: p. 56-72, 2002.

- GOES, J.C.S. et al. **Projeto Resplendor**. Disponível em:> Acesso em: 07 out. 2008.
- GOMES, H.S.A. et al. **PCR identification of Leishmania in diagnosis and control of canine leishmaniasis**. Veterinary Parasitology, n. 64, p.234-241, 2007.
- GOMES, Y. et al. **Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances**. Veterinary Journal. n.175, p.45-52, 2008.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. **Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas**. Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.
- GRIMALDI, G. Jr. et al. **Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon Region of Brazil**. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, n. 44, p.645-661, 1991.
- GRIMALDI, G. Jr.; TESH, R.B.; McMAHON, D. **A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World**. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, n. 41, p.687-725, 1989.
- HERVÁS, J. et al. **Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain**. Journal of Feline Medicine and Surgery, n. 1, v. 2 (june), p.100-105, 1999.
- BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Resplendor**. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Resplendor#cite_note-IBGE_Pop_2008-0> Acesso em: 07 out. 2008.
- IVERSON, L.B. et al. **Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina urbana do Município de São Paulo, Brasil (1979-1982)**. Revista de Medicina Tropical. São Paulo n. 25, p. 310-317,1983.
- KAMHAWI, S. **The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of Leishmania infections**. Microbes and Infection, n. 2, p. 1765-1773, 2000.
- KILLIK-KENDRICK, R. **The lifecycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host**. Annals Parasitologia Humana e Comparada. n. 65, p.37-42, 1990a.
- KILLIK-KENDRICK, R. **Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review**. Medical and Veterinary Entomology, n. 4, p.1-24, 1990b.

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

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J.J. **Infect stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, n. 82, p.421-424, 1987.

LAINSON, R. et al. **American visceral leishmaniasis: on the origin of *L. (L.) chagasi*.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. n. 81, p. 517, 1987.

LANOTTE, G. et al. **Écologie des leishmanioses dans le Sud de la France. VIII. Complément à l'application épidémiologique de la technique d'immunofluorescence: les titres géométriques et arithmétiques molaires dans la leishmaniose canine.** Annales De Parasitologie Humaine Et Comparée . n. 50, p.1-5, 1975.

LUTZ, A.; NEIVA, A. **Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, n. 4, v. 1, p.85-95, 1912.

MAGALHÃES, P.A. et al. **Calazar na zona do Rio-Doce- Minas Gerais. Resultado das medidas profiláticas.** Revista do Instituto de Medicina Tropical. São Paulo n. 22, p.197-202, 1980.

MAIA, C.; NUNES, M.; CAMPINO, L. **Importance of Cats in Zoonotic Leishmaniasis in Portugal** Vector-Borne And Zoonotic Diseases. Vol. 8, n. 4, 2008.

MALAQUIAS, L.C. et al. **Serological screening confirms the reemergence of canine leishmaniosis in urban and rural areas in Governador Valadares, Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil.** Parasitology Research. n. 100(2), p. 233-239, 2007.

MANGABEIRA, O. **Sobre duas novas espécies de *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae).** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, n. 33, p.349-356, 1938.

MANGABEIRA, O. **Sobre a sistemática e biologia dos *Phlebotomus* do Ceará.** Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais, n. 21, p.3-25, 1969.

MARTINS, A.V. et al. **Nota sobre *L. (L.) cruzi* (Mangabeira, 1938), com a descrição da fêmea (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae).** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, n. 79, 439-442, 1984.

MARZOCHI, M.C.A. **Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro – Brasil.** *Cadernos de Saúde Pública*, n. 1, p.432-446, 1985.

MAURICIO, I.L.; STOHARD, J.R.; MILES, M.A. **The strange case of *Leishmania chagasi***. Parasitology Today, n. 16, p. 188-189, 2000 *apud* GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. **Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas**. Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

MICHALICK, M.S.M. **Gênero *Leishmania***. In: NEVES, D.P.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Parasitologia humana. 10 ed. São Paulo, Editora Atheneu, n. 10 p. 31-35, 2002.

MILES, M.A. et al. **Canine leishmaniasis in America Latina: control strategies for visceral leishmaniasis**. Congresso de Barcelona sobre leishmaniose canina. p.46-53.

NUNES, V.L. et al. **Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. n. 34(3), p. 299-300, 2001.

NUNES, C.M. et al. **Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil**. Veterinary Parasitology. n. 153, p.19-23, 2008.

OLIVEIRA, F.S. et al. **PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil**. Veterinary Parasitology. n. 129, p. 219-227, 2005.

PALATNICK DE SOUZA, C.B. et al. **Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. n. 65, p. 510-7, 2001.

PALATNICK DE SOUZA, C.B. et al. **Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, n. 65, p.510-517, 2001 *apud* GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. **Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas**. Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

PARANHOS-SILVA, M. et al. **A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi***. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. n.55, p.39-44, 1996.

QUARESMA, P.F. **Diagnóstico molecular da Leishmaniose Visceral Canina e quantificação da carga parasitária através da PCR**. Dissertação de mestrado. Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, 2007.

QUINNELL, R.J. et al. **The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian, Brazil**. Parasitology, n. 115, p.63-156, 1997.

REY, L. **Leishmania e leishmanioses: os parasitos**. In. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 182-192, 1991.

RIBEIRO, J.M.; ROSSIGNOL, P. A.; SPIELMAN, A. Role of mosquito saliva in blood vessel location. In. **Journal of Experimental. Biology**. n.108 p. 1-7, 1984.

RIBEIRO, J.M. **Role of saliva in blood-feeding by arthropods**. In. Annual Review. Entomology. n.32, p. 463–478, 1987.

RIBEIRO, J.M. **Vector salivation and parasite transmission**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, n.82, p.1–3, 1987.

RIBEIRO, J.M. **Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists?** In. Infectious. Agents and Diseases. n. 4, 63–152, 1995.

RIBEIRO, J.M. **Vector saliva and its role in parasite transmission**, Experimental. Parasitology. n.69, p.104–106, 1989.

RONDON, F.C. et al. **Cross-sectional serological study of canine Leishmania infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil**. Veterinary Parasitology. n.155, p.24-31, 2008.

SANTOS, S.O. et al. **Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis**. Medical and Veterinary Entomology, n. 12, p.315-317, 1998.

SARMENTO, A.M.C. et al. **Estudo da leptospirose em cães e gatos, da leishmaniose e da doença de Chagas em cães de aldeias indígenas guaranis em Parelheiros, Município de São Paulo-SP**. Veterinária e Zootecnia. v.6, n.2, p.193-203, 2007.

SAVANI, E.S.M.M. et al. **Vigilância da leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo**. Revista de Saúde Pública, São Paulo, n.2, v.37, p.260- 262, 2003.

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

SCHALLIG, H.D.F.H. et al. ***Didelphis marsupialis* (Common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil)**. Vector-Borne and Zoonotic Diseases n. 3, v. 7, p.387-393, 2007.

SENRA, M.S.; PIMENTEL, P.S.R.; SOUZA, P.E.F.P. **Leishmaniose visceral em Santarém, Pará. Aspectos gerais do controle. Inquérito Sorológico de cães e tratamento dos casos humanos.** *Hitéia Médica, Belém*, n. 7: p.23-32, 1986.

SHERLOCK, I.A.; ALMEIDA, S.P. **Notas sobre calazar canino no estado da Bahia.** *Revista Brasileira Malariologia e Doenças Tropicais*. n. 22, p.231-242, 1970.

SHERLOCK, I.A. et al. **Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, n. 79, v. 4, p. 511, 1984.

SHERLOCK, I.A. et al. **Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. IV. Investigações sobre reservatórios silvestres e comensais.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, n. 21. p.23-27, 1988.

SIDERIS, V.L. et al. **Canine visceral leishmaniosis in the great Athens área, Greece.** *Parasite* n.: 3, p.125-130, 1996.

SILVA, A.V.M. **Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos.** *Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro*, v.21, n.1, p.324-328, 2005.

SUNDAR, S.; RAI, M. **Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis.** *Clin. Diagn. Lab. Immunol*, n. 9, p.951-958, 2002 *apud* GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. **Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas.** *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

TRAVI, B.L. et al. ***Didelphis marsupialis*, na important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *L. (L.) chagasi* in Colombia.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, n. 50, v. 5, p. 557-565, 1994.

TRAVI, B.L. et al. **Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forest of northern Colombia.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. n. 92, p.275-278, 1998.

TRAVI, B.L. et al. ***L. (L.) chagasi*: clinical and parasitological observations in experimentally *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis.** *Experimental Parasitology*, n. 88, p.73-75, 1998.

VIEIRA, J.B.F.; COELHO, G.E. **Leishmaniose visceral ou calazar: Aspectos epidemiológicos e de controle.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. n.31, p.85-92, 1998.

VITOR, R.W. de A. **Protozoa**. In NEVES, DP; MELO, AL; GENARO, O.; LINARDI, PM. Parasitologia humana. 10 ed., São Paulo: Editora Atheneu, p.24-26, 2002.

WALTERS, L.L. et al. **Ultrastructural biology of *Leishmania (Viannia) panamensis* (= *Leishmania braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association**. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, n. 40, p.19-39, 1989.

WALTERS, L.L. et al. **Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae)**. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, n. 41, p.295-317, 1989.

WENYON, C.M. Protozoology Bailliére Tindall & Cox, Londres. v. 1, 1926.

WILLIAMS, P. **Psychodidae**. In NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. Parasitologia humana. 10 ed., São Paulo: Editora Atheneu, p. 311-319, 2002.

WIKEL, S.K. **Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission**. International Journal for Parasitology. n.29, p.851–859, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **New treatment for leishmaniasis is 95% effective**. Bulletin of World Health Organization, n. 80, p.688, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **New treatment for leishmaniasis is 95% effective**. Bulletin of World Health Organization, n. 80, p.688, 2002.

ANEXOS

ANEXO A - FUNDAMENTOS LEGAIS

1) Constituição Federal

O Artigo 6º reza: “São direitos sociais a educação, **a saúde**, o trabalho, o lazer, a segurança, a previdência social, a proteção à maternidade e à infância, a assistência aos desamparados, na forma desta Constituição.” O Inciso XI do Artigo 20º estabelece como bem da União: “as terras tradicionalmente ocupadas pelos índios.” O Inciso XIV do Artigo 22º estabelece que compete privativamente à União legislar sobre populações indígenas. O Inciso V do Artigo 129º da Constituição estabelece como função institucional do Ministério Público defender judicialmente os direitos e interesses das populações indígenas. O Parágrafo 1º do Artigo 215º garante, dentre outras coisas, a observação da medicina tradicional dos povos, pois reza que: “O Estado protegerá as manifestações das culturas populares, **indígenas** e afro-brasileiras, e das de outros grupos participantes do processo civilizatório nacional.”

Pela sua importância, transcreve-se, a seguir, o Capítulo VIII, Dos Índios:

CAPÍTULO VIII
Dos Índios

Art. 231. São reconhecidos aos índios sua organização social, costumes, línguas, crenças e tradições, e os direitos originários sobre as terras que tradicionalmente ocupam, competindo à União demarcá-las, proteger e fazer respeitar todos os seus bens.

§ 1.º São terras tradicionalmente ocupadas pelos índios as por eles habitadas em caráter permanente, as utilizadas para suas atividades produtivas, as imprescindíveis à preservação dos recursos ambientais necessários a seu bem-estar e as necessárias a sua reprodução física e cultural, segundo seus usos, costumes e tradições.

§ 2.º As terras tradicionalmente ocupadas pelos índios destinam-se a sua posse permanente, cabendo-lhes o usufruto exclusivo das riquezas do solo, dos rios e dos lagos nelas existentes.

§ 3.º O aproveitamento dos recursos hídricos, incluídos os potenciais energéticos, a pesquisa e a lavra das riquezas minerais em terras indígenas só podem ser efetivados com autorização do Congresso Nacional, ouvidas as comunidades afetadas, ficando-lhes assegurada participação nos resultados da lavra, na forma da lei.

§ 4.º As terras de que trata este artigo são inalienáveis e indisponíveis, e os direitos sobre elas, imprescritíveis.

§ 5.º *É vedada a remoção dos grupos indígenas de suas terras, salvo, ad referendum do Congresso Nacional, em caso de catástrofe ou epidemia que ponha em risco sua população, ou no interesse da soberania do País, após deliberação do Congresso Nacional, garantido, em qualquer hipótese, o retorno imediato logo que cesse o risco.*

§ 6.º *São nulos e extintos, não produzindo efeitos jurídicos, os atos que tenham por objeto a ocupação, o domínio e a posse das terras a que se refere este artigo, ou a exploração das riquezas naturais do solo, dos rios e dos lagos nelas existentes, ressalvado relevante interesse público da União, segundo o que dispuser lei complementar, não gerando a nulidade e a extinção direito a indenização ou a ações contra a União, salvo, na forma da lei, quanto às benfeitorias derivadas da ocupação de boa-fé.*

§ 7.º *Não se aplica às terras indígenas o disposto no art. 174, §§ 3.º e 4.º.*

Art. 232. *Os índios, suas comunidades e organizações são partes legítimas para ingressar em juízo em defesa de seus direitos e interesses, intervindo o Ministério Público em todos os atos do processo.*

2) Decreto Federal Nº 3156, de 27 de agosto de 1999

O Decreto Federal Nº 3156, de 27 de agosto de 1999, dispõe sobre as condições para a prestação de assistência à saúde dos povos indígenas, no âmbito do Sistema Único de Saúde, pelo Ministério da Saúde, altera dispositivos dos Decretos números 564, de 8 de junho de 1992, e 1.61, de 19 de maio de 1994, e dá outras providências.

Os Artigos primeiro a quarto definem o escopo das ações e o responsáveis pela execução e financiamento, como segue:

“Art. 1º *A atenção à saúde indígena é dever da União e será prestada de acordo com a Constituição e com a Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, objetivando a universalidade, a integralidade e a equanimidade dos serviços de saúde.*

Parágrafo único. *As ações e serviços de saúde prestados aos índios pela União não prejudicam as desenvolvidas pelos Municípios e Estados, no âmbito do Sistema Único de Saúde.*

Art. 2º *Para o cumprimento do disposto no artigo anterior, deverão ser observadas as seguintes diretrizes destinadas à promoção, proteção e recuperação da saúde do índio, objetivando o alcance do equilíbrio bio-psico-social, com o reconhecimento do valor e da complementaridade das práticas da medicina indígena, segundo as peculiaridades de cada comunidade, o perfil epidemiológico e a condição sanitária:*

I - o desenvolvimento de esforços que contribuam para o equilíbrio da vida econômica, política e social das comunidades indígenas;

II - a redução da mortalidade, em especial a materna e infantil;

III - a interrupção do ciclo de doenças transmissíveis;

IV - o controle da desnutrição, da cárie dental e da doença periodontal;

V - a restauração das condições ambientais, cuja violação se relacione diretamente com o surgimento de doenças e de outros agravos da saúde;

VI - a assistência médica e odontológica integral, prestada por instituições públicas em parceria com organizações indígenas e outras da sociedade civil;

VII - a garantia aos índios e às comunidades indígenas de acesso às ações de nível primário, secundário e terciário do Sistema Único de Saúde - SUS;

VIII - a participação das comunidades indígenas envolvidas na elaboração da política de saúde indígena, de seus programas e projetos de implementação; e

IX - o reconhecimento da organização social e política, dos costumes, das línguas, das crenças e das tradições dos índios.

Parágrafo único. A organização das atividades de atenção à saúde das populações indígenas dar-se-á no âmbito do Sistema Único de Saúde e efetivar-se-á, progressivamente, por intermédio dos Distritos Sanitários Especiais Indígenas, ficando assegurados os serviços de atendimento básico no âmbito das terras indígenas.

Art. 3º O Ministério da Saúde estabelecerá as políticas e diretrizes para promoção, prevenção e recuperação da saúde do índio, cujas ações serão executadas pela Fundação Nacional de Saúde - FUNASA.

Parágrafo único. A FUNAI comunicará à FUNASA a existência de grupos indígenas isolados, com vistas ao atendimento de saúde específico.

Art. 4º Para os fins previstos neste Decreto, o Ministério da Saúde poderá promover os meios necessários para que os Estado, Municípios e entidades governamentais e não-governamentais atuem em prol da eficácia das ações de saúde indígena, observadas as diretrizes estabelecidas no art. 2º deste Decreto.”

A execução das atividades por Distritos Sanitários Especiais Indígenas (DSEIs) está prevista no Artigo 8º que menciona: “A FUNASA contará com Distritos Sanitários Especiais Indígenas destinados ao apoio e à prestação de assistência à saúde das populações indígenas.”

3) Lei Federal Nº 9836, de 23 de setembro de 1999, Lei Arouca

A Lei Federal Nº 9836, de 23 de setembro de 1999, Lei Arouca, acrescenta dispositivos à Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, que “*dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências*”, instituindo o Subsistema de Atenção à Saúde Indígena.

É relevante pontuar que o Art. 19-F estabelece que “*dever-se-á obrigatoriamente levar em consideração a realidade local e as especificidades da cultura dos povos indígenas e o modelo a ser adotado para a atenção à saúde indígena, que se deve pautar por uma abordagem diferenciada e global, contemplando os aspectos de assistência à saúde, saneamento básico, nutrição, habitação, meio ambiente, demarcação de terras, educação sanitária e integração institucional.*”

O Parágrafo Primeiro do Artigo 19º-G prescreve que o Subsistema de Atenção à Saúde Indígena terá como base os Distritos Sanitários Especiais Indígenas.

4) Portaria N° 852, do Presidente da FUNASA, de 30 de setembro de 1999

A Portaria N° 852, do Presidente da FUNASA, de 30 de setembro de 1999, cria os Distritos Sanitários Especiais Indígenas, os Conselhos Distritais de Saúde Indígena e os Conselhos Locais de Saúde Indígena. Ela também estabelece as atribuições dos Chefes dos DSEIs e das Casas de Apoio à Saúde do Índio (CASAI).

ANEXO B – ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE); AMOSTRAS DE SORO: MANUAL
DE INSTRUÇÕES DE USO DO KIT EIE – LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA – BIO-
MANGUINHOS

Material fornecido pelo kit EIE – Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos

Identificação	Componentes	Apresentação
R-01	Diluyente de amostra/conjugado [5X]	2 Frascos de 45 mL
R-02	Lecitina de leite	1 Saco de 10 g
R-03	Tampão de lavagem [20X]	2 Frascos de 60 mL
R-04	Diluyente do substrato	1 Frasco de 60 mL
R-05	Cromógeno (TMB)	1 Frasco de 0,7 mL
R-06	Substrato (H ₂ O ₂)	1 Frasco de 0,2 mL
R-07	Ácido sulfúrico 2 M	1 Frasco de 30 mL
R-08	Controle Positivo	1 Frasco de 0,25 mL
R-09	Controle Negativo	1 Frasco de 0,25 mL
R-10	Conjugado	1 Frasco de 0,4 mL
R-11	Molduras c/ 6 strips duplas sensibilizadas	4 Molduras
	Folhas Adesivas	8 Folhas
	Manual de instruções de uso	1 Manual

Procedimento do teste para amostras de soro:

1 – Preparo do diluyente de amostras/conjugado:

Nº strips duplas	Nº reações	R-01 (5X)	R-02 (pesar)	H ₂ O destilada
1	até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
2	até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
3	até 48	8 mL	0,8 g	32 mL
4	até 64	10 mL	1 g	40 mL
5	até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
6	até 96	6 mL	1,4 g	56 mL

2 – Diluir em tubos 5 μ L dos controles e das amostras de soros de cães a serem analisadas, previamente homogeneizadas, em 500 μ L do diluyente de amostra/conjugado (1:100).

3 – Distribuir 100 μ L dos controles já diluídos da seguinte forma: na coluna 1 fileira “A” e “B” o controle positivo, na “C” e “D” o controle negativo, na “E” e “F” somente o diluyente de amostra/conjugado (sem soro) que servirá de controle do conjugado. Nos outros orifícios,

distribuir 100 μL das amostras testes, já diluídas nos respectivos orifícios correspondentes (seguir protocolo).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 19	Amostra 27	Amostra 35	Amostra 43	Amostra 51	Amostra 59	Amostra 67	Amostra 75	Amostra 83
B	CP	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 20	Amostra 28	Amostra 36	Amostra 44	Amostra 52	Amostra 60	Amostra 68	Amostra 76	Amostra 84
C	CN	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 21	Amostra 29	Amostra 37	Amostra 45	Amostra 53	Amostra 61	Amostra 69	Amostra 77	Amostra 85
D	CN	Amostra 6	Amostra 6	Amostra 22	Amostra 30	Amostra 38	Amostra 46	Amostra 54	Amostra 62	Amostra 70	Amostra 78	Amostra 86
E	SS	Amostra 7	Amostra 15	Amostra 23	Amostra 31	Amostra 39	Amostra 47	Amostra 55	Amostra 63	Amostra 71	Amostra 79	Amostra 87
F	SS	Amostra 8	Amostra 16	Amostra 24	Amostra 32	Amostra 40	Amostra 48	Amostra 56	Amostra 64	Amostra 72	Amostra 80	Amostra 88
G	Amostra 1	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 25	Amostra 33	Amostra 41	Amostra 49	Amostra 57	Amostra 65	Amostra 73	Amostra 81	Amostra 89
H	Amostra 2	Amostra 10	Amostra 18	Amostra 26	Amostra 34	Amostra 42	Amostra 50	Amostra 58	Amostra 66	Amostra 74	Amostra 82	Amostra 90

CP = Controle Positivo

CN = Controle Negativo

SS = Sem Soro

4 – Selar os “strips” com folha adesiva e incubar a 37°C por 30 minutos.

5 – Preparo do tampão de lavagem:

Volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

Nº strips duplas	Nº de placas	R-03	H ₂ O destilada
até 3	½	20 mL	380 mL
até 6	1	25 mL	475 mL
até 9	1 ½	30 mL	570 mL
até 12	2	35 mL	665 mL
até 15	2 ½	40 mL	760 mL
até 18	3	45 mL	855 mL
até 21	3 ½	50 mL	950 mL
até 24	4	55 mL	1045 mL

6 – Deslocar cuidadosamente a folha adesiva, aspirar o conteúdo e lavar 6 vezes com tampão de lavagem (200 μL /orifício). Aguardar 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

7 – Diluir o conjugado no diluente de amostra/conjugado, preparado anteriormente.

Nº strips duplas	Nº reações	R-01 diluído	R-10
1	até 16	5 mL	5 μL
2	até 32	5 mL	5 μL
3	até 48	10 mL	10 μL
4	até 64	10 mL	10 μL
5	até 80	15 mL	15 μL
6	até 96	15 mL	15 μL

8 – Homogeneizar bem e distribuir 100 μL da diluição do conjugado em cada orifício “strips”.

9 – Selar e incubar os “strips” conforme descrito no item 4 e aspirar e lavar conforme descrito no item 6.

10 – Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro.

11 – Preparo do substrato:

N° strips duplas	N° reações	R-04	R-05	R-06
1	até 16	2,5 mL	25 μL	5 μL
2	até 32	4 mL	40 μL	8 μL
3	até 48	6 mL	60 μL	12 μL
4	até 64	8 mL	80 μL	16 μL
5	até 80	10 mL	100 μL	20 μL
6	até 96	12 mL	120 μL	24 μL

12 – Distribuir 100 μL do substrato rapidamente em todos os orifícios.

13 – Incubar a temperatura ambiente, ao abrigo de luz, durante 30 minutos.

6 – Bloquear a reação adicionando 50 μL de ácido sulfúrico 2 M em todos os orifícios. Em seguida, proceder à leitura.

15 – Leitura:

Ligar o espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450nm para leitura e sem a utilização de filtro de referência (620-630nm). Após alguns minutos para estabilização do feixe de luz, zerar o aparelho no ar (sem a microplaca) e em seguida, iniciar a leitura da microplaca de teste.

16 – Cálculo do “Cut-off” (ponto de corte): $\text{CO} = \text{X CN} \times 2$

$\text{CO} = \text{“Cut-Off”}$

$\text{X CN} = \text{Média da densidade ótica dos orifícios do Controle Negativo}$

17 – Resultados:

Amostras reagentes = As que apresentam densidade ótica igual ou superior ao “Cut-Off”.

Amostras não reagentes = As que apresentam densidade ótica inferior ao “Cut-Off”

18 – Faixa Cinza

CO

Amostras não reativas	Faixa Cinza	Amostras reativas
-----------------------	-------------	-------------------

19 – Validação do teste:

Considerar o teste válido quando os valores da DO (densidade ótica) estiverem na faixa descrita a seguir:

- Controle positivo: $\geq 0,500$ de DO
- Controle negativo: $\geq 0,500 \leq 0,120$ de DO

5.6.1 Ensaio imunoenzimático (EIE) amostras colhidas em papel de filtro

1 – Preparo do diluente de amostras/conjugado:

N° strips duplas	N° reações	R-01 (5X)	R-02 (pesar)	H ₂ O destilada
1	até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
2	até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
3	até 48	8 mL	0,8 g	32 mL
4	até 64	10 mL	1 g	40 mL
5	até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
6	até 96	6 mL	1,4 g	56 mL

2 – Em tubos previamente descontaminados, limpos e secos, colocar 2 picotes (6 mm) de cada amostra coletada em papel de filtro Whatman n° 1 ou 1 picote (6 mm) para papel Klabin 80, nos tubos correspondentes.

3 – Adicionar 400 μL de diluente de amostra/conjugado por tubo, para as amostras coletadas em papel Whatman n° 1 ou 500 μL para amostras coletadas em papel Klabin 80.

4 – Colocar a estante de tubos em agitador rotacional para eluir as amostras coletadas em papel de filtro. Deixar os tubos em leve agitação por 1 hora.

5 – Diluir em tubos, 5 μL dos soros controle positivo e negativo, previamente homogeneizados, em 500 μL do diluente de amostra/conjugado (1:100).

6 – Distribuir 100 μL dos controles e das amostras eluídas da seguinte forma: na coluna 1 fileira “A” e “B” o soro controle positivo, na “C” e “D” o controle negativo, na “E” e “F” somente o diluente de amostra/conjugado (sem soro) que servirá de controle do conjugado. Nos outros orifícios, distribuir 100 μL das amostras teste já eluídas, nos respectivos orifícios correspondentes (seguir protocolo).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 19	Amostra 27	Amostra 35	Amostra 43	Amostra 51	Amostra 59	Amostra 67	Amostra 75	Amostra 83
B	CP	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 20	Amostra 28	Amostra 36	Amostra 44	Amostra 52	Amostra 60	Amostra 68	Amostra 76	Amostra 84
C	CN	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 21	Amostra 29	Amostra 37	Amostra 45	Amostra 53	Amostra 61	Amostra 69	Amostra 77	Amostra 85
D	CN	Amostra 6	Amostra 6	Amostra 22	Amostra 30	Amostra 38	Amostra 46	Amostra 54	Amostra 62	Amostra 70	Amostra 78	Amostra 86
E	SS	Amostra 7	Amostra 15	Amostra 23	Amostra 31	Amostra 39	Amostra 47	Amostra 55	Amostra 63	Amostra 71	Amostra 79	Amostra 87
F	SS	Amostra 8	Amostra 16	Amostra 24	Amostra 32	Amostra 40	Amostra 48	Amostra 56	Amostra 64	Amostra 72	Amostra 80	Amostra 88
G	Amostra 1	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 25	Amostra 33	Amostra 41	Amostra 49	Amostra 57	Amostra 65	Amostra 73	Amostra 81	Amostra 89
H	Amostra 2	Amostra 10	Amostra 18	Amostra 26	Amostra 34	Amostra 42	Amostra 50	Amostra 58	Amostra 66	Amostra 74	Amostra 82	Amostra 90

CP = Controle Positivo

CN = Controle Negativo

SS = Sem Soro

7 – Selar os “strips” com a folha adesiva e incubar a 37°C por 30 minutos.

8 – Preparo do tampão de lavagem:

Volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

Nº strips duplas	Nº de placas	R-03	H ₂ O destilada
até 3	½	20 mL	380 mL
até 6	1	25 mL	475 mL
até 9	1 ½	30 mL	570 mL
até 12	2	35 mL	665 mL
até 15	2 ½	40 mL	760 mL
até 18	3	45 mL	855 mL
até 21	3 ½	50 mL	950 mL
até 24	4	55 mL	1045 mL

9 – Deslocar cuidadosamente a folha adesiva, aspirar o conteúdo e lavar 6 vezes com tampão de lavagem (200 µL/orifício). Aguardar 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

10 – Preparo do conjugado:

Nº strips duplas	Nº reações	R-01 diluído	R-10
1	até 16	5 mL	5 µL
2	até 32	5 mL	5 µL
3	até 48	10 mL	10 µL
4	até 64	10 mL	10 µL
5	até 80	15 mL	15 µL
6	até 96	15 mL	15 µL

11 – Homogeneizar bem e distribuir 100 µL da diluição do conjugado em cada orifício dos “strips”.

12 – Selar e incubar os “strips” conforme descrito no item 7 e aspirar e lavar conforme descrito no item 9.

13 – Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro.

6 – Preparo do substrato:

Nº strips duplas	Nº reações	R-04	R-05	R-06
1	até 16	2,5 mL	25 µL	5 µL
2	até 32	4 mL	40 µL	8 µL
3	até 48	6 mL	60 µL	12 µL
4	até 64	8 mL	80 µL	16 µL
5	até 80	10 mL	100 µL	20 µL
6	até 96	12 mL	120 µL	24 µL

15 – Distribuir 100 μL do substrato rapidamente em todos os orifícios.

16 – Incubar a temperatura ambiente, ao abrigo de luz, durante 30 minutos.

17 – Bloquear a reação adicionando 50 μL de ácido sulfúrico 2 M em todos os orifícios. Em seguida, proceder à leitura.

18 – Leitura:

Ligar o espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450nm para leitura e sem a utilização de filtro de referência (620-630nm). Após alguns minutos para estabilização do feixe de luz, zerar o aparelho no ar (sem a microplaca) e em seguida, iniciar a leitura da microplaca de teste.

19– Cálculo do “*Cut-off*” (ponto de corte): $\text{CO} = \text{X CN} \times 2$

$\text{CO} = \text{“Cut-Off”}$

$\text{X CN} = \text{Média da densidade ótica dos orifícios do Controle Negativo}$

20 – Resultados:

Amostras reagentes = As que apresentam densidade ótica igual ou superior ao “*Cut-Off*”.

Amostras não reagentes = As que apresentam densidade ótica inferior ao “*Cut-Off*”.

21 – Cálculo do “*Cut-off*” (ponto de corte): $\text{CO} = \text{X CN} \times 2$

$\text{CO} = \text{“Cut-Off”}$

$\text{X CN} = \text{Média da densidade ótica dos orifícios do Controle Negativo}$

22 – Resultados:

Amostras reagentes = As que apresentam densidade ótica igual ou superior ao “*Cut-Off*”.

Amostras não reagentes = As que apresentam densidade ótica inferior ao “*Cut-Off*”.

23 – Faixa Cinza

CO

Amostras não reativas	Faixa Cinza	Amostras reativas
-----------------------	----------------	-------------------

24 – Validação do teste:

Considerar o teste válido quando os valores da DO (densidade ótica) estiverem na faixa descrita a seguir:

- Controle positivo: $\geq 0,500$ de DO

- Controle negativo: $\geq 0,500 \leq 0,120$ de DO

ANEXO C – REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (IFI) AMOSTRAS DE SORO; AMOSTRAS DE SORO: MANUAL DE INSTRUÇÕES DE USO DO KIT EIE – LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA – BIO-MANGUINHOS

Material fornecido pelo kit IFI – Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos

Identificação	Componentes	Apresentação
R-01	Antígeno de Leishmania	4 Frascos de 6 mL
R-02	Conjugado Anti-cão/FITC	1 Frasco de 1 mL
R-03	Glicerina tamponada pH 9,0 ± 0,5	1 Frasco de 25 mL
R-04	Azul de Evans 0,1%	1 Frasco de 2,5 mL
R-05	Controle Negativo	1 Frasco de 0,5 mL
R-06	Controle Positivo	1 Frasco de 0,5 mL
	Caixa com 50 lâminas	4 caixas
	Manual de instruções de uso	1 Manual

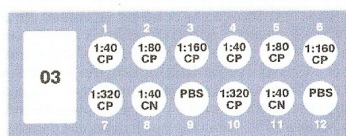
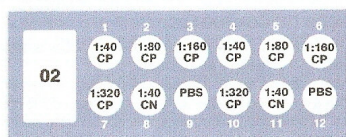
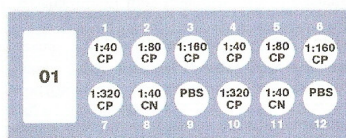
Titulação do conjugado:

1 – Ferver as lamínulas em água destilada por 30 minutos, após a água entrar em ebulição, e deixá-las estocadas em álcool comercial até a utilização, quando deverão ser cuidadosamente limpas e secas com o auxílio de gaze ou papel absorvente.

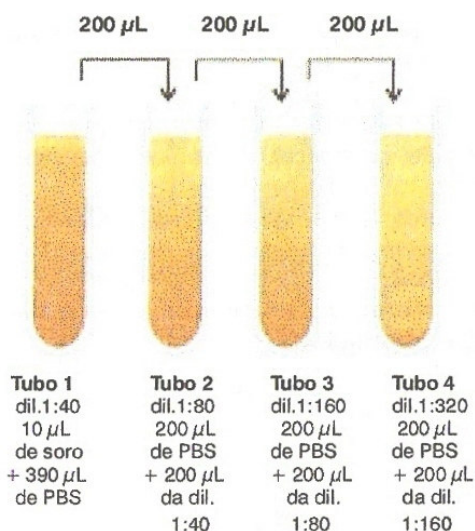
2 – Separar 3 lâminas e pingar 10 μ L do antígeno em cada orifício, tendo o cuidado de mantê-lo homogêneo durante o preparo.

3 – Deixar secar de um dia para o outro a temperatura ambiente ou duas horas a 37°C, para uma boa fixação dos parasitas.

4 – Fazer um protocolo de trabalho, conforme modelo abaixo, indicando a posição das diluições do Controle Positivo (CP), e do Controle Negativo (CN), além dos controles do conjugado (PBS).



5 – Diluir em PBS (tampão fosfato) o controle positivo 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, e diluir o controle negativo 1/40, utilizando o esquema de diluição seriada a seguir:



Homogeneizar o conteúdo de cada tubo antes de transferir o volume de 200 µL para o tubo seguinte.

6 – Adicionar 10 µL das diluições de soro por orifício, conforme o seu protocolo, em cada uma das 3 lâminas anteriormente preparadas.

7 – Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C, em estufa.

8 – Lavar as lâminas três vezes em PBS, nas cubas de lavagem, por 5 minutos cada banho.

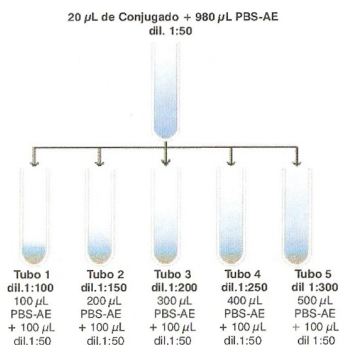
9 – Lavar rapidamente as lâminas, uma vez em água destilada.

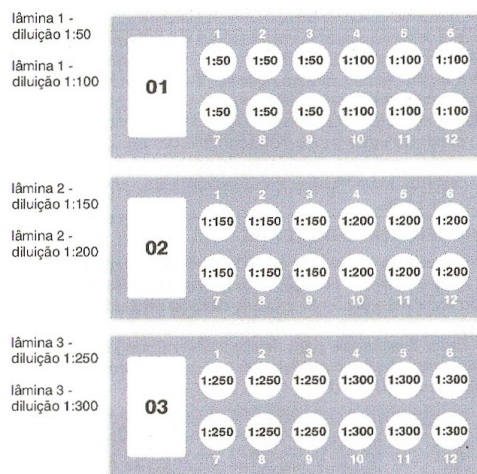
10 – Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos a 37°C, em estufa, para secar. No entanto não exceder muito nesta etapa.

11 – Preparar uma solução de PBS-Azul de Evans (PBS-AE) a 0,004%. Colocar em um tubo 120 µL de Azul de Evans (0,1%) e 2880 µL de PBS.

12 – Diluir o conjugado anti-Ig cão marcado com fluoresceína, conforme descrito a seguir

13 – Adicionar 15 µL das diluições do conjugado por orifício nas lâminas correspondentes conforme esquema a seguir:





6 – Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C, em estufa.

15 – Lavar as lâminas três vezes com PBS em cuba de lavagem apropriada, 5 minutos cada lavagem e, em seguida, lavar rapidamente as lâminas uma vez em água destilada.

16 – Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos em estufa a 37°C para secagem.

No entanto, não exceder muito nesta etapa.

17 – Adicionar de 3 a 4 gotas de glicerina tamponada sobre as lâminas, cobrindo-as com lamínula. Mantê-las ao abrigo da luz e umidade, até o momento da leitura.

18 – Definição do título do conjugado:

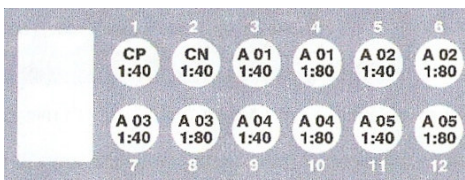
Para a leitura, utilizar microscópio de imunofluorescência e objetiva com aumento de 40X. O título do conjugado será a diluição em que se observar fluorescência até o poço correspondente ao título do controle positivo, e ausência de fluorescência as diluições correspondentes ao controle negativo e ao PBS (controle do conjugado).

Os limites aceitáveis da titulação do conjugado para aprovação do teste de IFI estão em torno de 1:100 até 1:640.

Procedimento do teste:

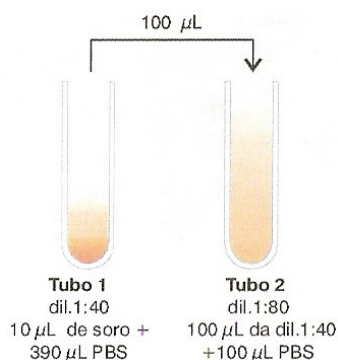
1 - Ferver as lamínulas em água destilada por 30 minutos, após a água entrar em ebulição, e deixá-las estocadas em álcool comercial até a utilização, quando deverão ser cuidadosamente limpas e secas com o auxílio de gaze ou papel absorvente.

2 – Fazer o protocolo para determinar o número de lâminas a serem preparadas, considerando o número de amostras e suas diluições (1:40 e 1:80).



3 - Pingar 10 μL do antígeno em cada orifício da lâmina, tendo o cuidado de mantê-lo homogêneo durante o preparo. Deixar secar de um dia para o outro a temperatura ambiente, ou duas horas a 37°C , para uma boa fixação dos parasitas.

4 - Diluir os soros amostra e teste (1:40 e 1:80) e os controles positivo (1:40) e negativo (1:40), em PBS, conforme esquema a seguir:



5 - Adicionar 10 μL das diluições de soro por orifício, conforme o protocolo previamente elaborado. Deve-se tomar cuidado para que as amostras não se misturem durante a incubação.

6 - Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C .

7 - Lavar as lâminas três vezes em PBS, nas cubas de lavagem por 5 minutos cada banho.

8 - Lavar rapidamente as lâminas, uma vez em água destilada.

9 - Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos a 37°C para secar. No entanto, não exceder muito nesta etapa.

10 - Preparar, momentos antes do uso, uma solução PBS-AE, conforme a tabela a seguir:

Nº lâminas	Volume de PBS	Volume de Azul de Evans (0,1%)
2	480 μL	20 μL
4	960 μL	40 μL
6	640 μL	60 μL

11 - Diluir o conjugado na proporção adequada, conforme titulação prévia. Adicionar 15 μL da diluição do conjugado em cada orifício das lâminas.

12 - Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C , em estufa.

13 - Lavar as lâminas três vezes em PBS, nas cubas de lavagem por 5 minutos cada banho.

6 – Lavar rapidamente as lâminas, uma vez em água destilada.

15 – Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos a 37°C para secar. No entanto, não exceder muito nesta etapa

16 – Adicionar de 3 a 4 gotas de glicerina tamponada sobre as lâminas, cobrindo-as com lamínula. Mantê-las ao abrigo da luz e umidade, até o momento da leitura.

17 – É recomendado que a leitura da reação ocorra no período de até 4 horas após a execução do teste, mantendo-se as lâminas ao abrigo da luz.

18 – Leitura e Interpretação:

18.1 – Utilizar um microscópio de fluorescência e objetiva de 40X. Focalizar a lâmina na posição do controle positivo e observar a fluorescência presente, de acordo com o padrão descrito a seguir.

18.2 – Focalizar a lâmina na posição do controle negativo e observar a ausência de fluorescência nos parasitas, bem como a coloração de fundo “*background*”.

18.3 – Proceder à leitura das amostras, considerando os padrões a seguir:

Amostras reagentes – Aqueles soros que, a partir da diluição 1:40, inclusive, apresentarem fluorescência na membrana dos parasitas, mais intensa que o “*background*” observado no orifício do controle negativo.

Amostras não reagentes – Os soros teste não apresentarem fluorescência.

ANEXO D – FICHA DE NECRÓPSIA



Ministério da Saúde
Fundação Nacional de Saúde

Distrito Sanitário Especial Indígena
de Minas Gerais e Espírito Santo

Nº: Código:
Foto inicial: Foto final:

Data: 05/11/2007 Nome do animal: Tigresinha
Raça: Americana Sexo: Idade:
Resenha:
Proprietário: Aldeia:
Latitude: Longitude: Altitude:

DADOS CLÍNICOS

Emagrecimento:

LEVE
MODERADO
ACENTUADO

Edema de patas:

AUSENTE
PRESENTE

Alopecia:

AUSENTE
LOCALIZADA
GERAL

Úlceras:

AUSENTES
LOCALIZADAS
GERAL

Pelagem:

NORMAL
OPACA

Opacificação das córneas:

PRESENTE
AUSENTE

Dermatite furfurácea:

PRESENTE
AUSENTE

Cerato conjuntivite:

PRESENTE
AUSENTE

Paresia dos membros:

PRESENTE
AUSENTE

Onicogribose:

PRESENTE
AUSENTE

Cegueira:

PRESENTE
AUSENTE

ANEXO E – EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO ANIMAL – GENOMICPREP CELLS AND TISSUE DNA ISOLATION KIT

Instructions

product code:
27-5237-01

GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit

Warning

For research use only.
Not recommended or
intended for the diagnosis
of disease in humans
or animals.
Do not use internally or
externally in humans
or animals.



74003907 Ed. AC



GE imagination at work

Handling

Storage
Store the RNase A solution
at 4 °C. Store all other com-
ponents at room tempera-
ture.

Page finder

Components of the kit	3
Quality control	3
Materials not supplied	3
World Wide Web address	3
Safety warnings and precautions	4
Introduction	5
Protocols	
1. Extraction of DNA from cultured cells and body fluids	6
2. Extraction of DNA from bird, fish and frog nucleated whole blood	13
3. Extraction of DNA from animal tissue	18
4. Extraction of DNA from plant tissue	21
5. Extraction of DNA from Gram-negative bacteria	26
Troubleshooting	31
References	37
Companion products	38
Licenses	39
Trademarks	40

● p2

Quality control

Each lot of GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit is tested for contaminating DNA and DNases and for the ability to isolate DNA of high quality and yield. Isolated DNA is also subjected to restriction enzyme digestion and PCR as further verification of quality.

Materials not supplied

Reagents

- Isopropanol (2-propanol)
- Ethanol (70%)
- Proteinase K

Components of the kit

The following components are included in this product:

Cell lysis solution*	35 ml
Protein precipitation solution	12 ml
DNA hydration solution	10 ml
RNase A solution**	250 µl

*If the cell lysis solution contains a precipitate, incubate the bottle in a warm water bath (37 °C) and mix by swirling the bottle intermittently. Continue to incubate and swirl until the precipitate has dissolved. Allow the cell lysis solution to cool to room temperature before using.

**Store the RNase A solution at 4 °C.

For additional materials required see Materials not Supplied, pages 3–4.

World Wide Web address

<http://www.gehealthcare.com/lifesciences>

Visit the GE Healthcare home page for regularly updated product information.

3 Extraction of DNA from animal tissue

Samples may be fresh, frozen or fixed. Collect fresh animal tissue samples quickly and keep on ice at all times.

Cell lysis

Using the following procedure, 55 samples can be processed with the kit.

- 3.1 Chill a 1.5 ml tube containing 600 µl of cell lysis solution on ice. The solution will turn cloudy.
- 3.2 Add 10–20 mg of fresh or frozen tissue to the chilled cell lysis solution, remove from ice, and quickly homogenize using 30–50 strokes with a microfuge tube pestle. Keep homogenized samples on ice until Step 3.3. For fixed tissue, add 600 µl of cell lysis solution and then heat the sample at 65 °C for 15 min before homogenizing.
- 3.3 Incubate the lysate at 65 °C for 15–60 min. (Any remaining unlysed tissue particles will be removed during the protein precipitation step.) Alternatively, if maximum yield is required, add 3 µl of Proteinase K solution (20 mg/ml) to the lysate and incubate at 55 °C for 3 h to overnight, or until the tissue has dissolved.

RNase treatment

- 3.4 Add 3 µl of RNase A solution to the cell lysate.
- 3.5 Mix the sample by inverting the tube 25 times and incubate at 37 °C for 15–60 min.

● p3 ● p18

Protein precipitation

- 3.6 Cool the sample to room temperature.
- 3.7 Add 200 µl of protein precipitation solution to the RNase A-treated cell lysate.
- 3.8 Vortex vigorously at high speed for 20 s to mix the protein precipitation solution uniformly with the cell lysate.
- 3.9 Centrifuge at 13 000–16 000 × *g* for 3 min. The precipitated proteins will form a tight pellet. (See troubleshooting section if pellet is not visible or tight.)

DNA precipitation

- 3.10 Carefully pour the supernatant containing the DNA into a clean 1.5 ml tube containing 600 µl of 100% isopropanol. Discard the tube containing the precipitated protein pellet.
- 3.11 Mix the sample by inverting gently 50 times until the white threads of DNA form a visible clump.
- 3.12 Centrifuge at 13 000–16 000 × *g* for 1 min; the DNA will be visible as a small white pellet.
- 3.13 Pour off the supernatant and drain the tube on clean absorbent paper. Add 600 µl of 70% ethanol. Invert the tube several times to wash the DNA pellet.
- 3.14 Centrifuge at 13 000–16 000 × *g* for 1 min. Carefully pour off the ethanol without dislodging the DNA pellet.
- 3.15 Drain the tube on clean absorbent paper and allow the sample to air-dry 10–15 min.

DNA hydration

- 3.16 Add 100 µl of DNA hydration solution to the DNA pellet (100 µl will give a concentration of 100 µg/ml if the total yield is 10 µg DNA).
- 3.17 Allow the DNA to rehydrate overnight at room temperature. Alternatively, heat at 65 °C for 1 h. Tap the tube periodically to aid in dispersing the DNA.
- 3.18 Store at 2–8 °C.

Results

Yields from animal tissue range from 0.5–10 µg of DNA per mg of tissue.

Limitations of the procedure

The yield of DNA obtained from animal tissues largely depends on the number of nucleated cells in the sample. The number of cells varies greatly with the type of tissue used. Yields may be low if samples are not collected on ice or if they are stored improperly.

ANEXO F – PROTOCOLO DA PCR – ILLUSTRATM PURETAQ READY-TO-GO PCR BEADS

GE Healthcare

illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads

Product Booklet

Codes: 27-9557-01 (0.2 ml tubes/plate of 96)
27-9557-02 (0.2 ml tubes/5 plates of 96)
27-9558-01 (0.5 ml tubes, 100 reactions)
27-9559-01 (0.2 ml tubes, 96 reactions)



1. Legal

GE and GE monogram are trademarks of General Electric Company. illustra, puReTaq, Ready-To-Go, GenomicPrep, and GFX are trademarks of GE Healthcare companies.

This product is sold under licensing arrangements with Roche Molecular Systems, F Hoffmann-La Roche Ltd and the Perkin-Elmer Corporation. Purchase of this product is accompanied by a limited license to use it in the Polymerase Chain Reaction (PCR) process for research in conjunction with a thermal cycler whose use in the automated performance of the PCR process is covered by the up-front license fee, either by payment to Perkin-Elmer or as purchased, i.e. an authorized thermal cycler.

© 2006 General Electric Company – All rights reserved.

GE Healthcare reserves the right, subject to any regulatory and contractual approval, if required, to make changes in specification and features shown herein, or discontinue the product described at any time without notice or obligation.

Contact your GE Healthcare representative for the most current information and a copy of the terms and conditions.

<http://www.gehealthcare.com/lifesciences>

GE Healthcare UK Limited,
Amersham Place, Little Chalfont,
Buckinghamshire, HP7 9NA UK

Page finder

1. Legal	3
2. Handling	4
2.1. Safety warning and precautions	4
2.2. Storage	4
2.3. Quality control	4
3. Components of the kit	5
4. Materials not supplied	6
5. Introduction	7
6. Protocols	8
6.1. Avoiding nucleic acid contamination	8
6.2. Preliminary preparations and general handling instructions	8
6.3. PCR with Ready-To-Go PCR Beads	9
6.4. Thermal Cycling	10
7. Appendix	11
7.1. Primers and templates – general considerations	11
7.2. Primer annealing temperatures	11
7.3. Magnesium chloride concentration	12
7.4. Thermal cycling parameters	12
8. Troubleshooting	13
9. References	18
10. Companion products	19

2. Handling

2.1. Safety warnings and precautions

Warning: For research use only. Not recommended or intended for diagnosis of disease in humans or animals. Do not use internally or externally in humans or animals.

All chemicals should be considered as potentially hazardous. We therefore recommend that this product is handled only by those persons who have been trained in laboratory techniques and that it is used in accordance with the principles of good laboratory practice. Wear suitable protective clothing such as laboratory overalls, safety glasses and gloves. Care should be taken to avoid contact with skin or eyes. In the case of contact with skin or eyes wash immediately with water. See material safety data sheet(s) and/or safety statement(s) for specific advice.

2.2. Storage

Store at ambient room temperature in the airtight foil pouch with the desiccant. Once opened, completely reseal the pouch, fold the sealed edge over several times and seal with a clip. Store unopened and resealed pouches in a desiccator to maximize product lifetime.

2.3. Quality control

Each batch of puReTaq Ready-To-Go PCR beads are thoroughly tested for quality performance. Specifications for release are based upon performance, purity, and reproducibility of each individually dispensed reaction.

3. Components of the kit

The newly developed puReTaq™ Ready-To-Go™ Polymerase Chain Reaction (PCR) Beads are premixed and predispensed complete reactions for performing PCR amplifications. The beads contain recombinant puReTaq DNA polymerase, an industry leader for ambient stability and purity. These PCR beads have been optimized for endpoint- and intercalating dye-based real-time PCR amplifications. With the exception of primer and template, the convenient, ambient temperature-stable beads provide all the necessary reagents to perform 25- μ l polymerase chain reactions. The beads are available predispensed into either 0.2-ml thin-walled micro-well plates (sufficient for 96 reactions), 0.2-ml thin-walled tubes or 0.5-ml PCR tubes.

The following components are included in this product:

puReTaq Ready-To-Go PCR Beads: Room temperature-stable beads containing stabilizers, BSA, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ~2.5 units of puReTaq DNA polymerase and reaction buffer. When a bead is reconstituted to a 25 μ l final volume, the concentration of each dNTP is 200 μ M in 10 mM Tris-HCl, (pH 9.0 at room temperature), 50 mM KCl and 1.5 mM MgCl₂.

World Wide Web address: www.gehealthcare.com/lifesciences

Visit the GE Healthcare home page for regularly updated product information.

5. Introduction

PCR, or Polymerase Chain Reaction, is a method for the *in vitro* amplification of a specific sequence of DNA. A typical PCR contains template DNA containing the target sequence to be amplified, two primers that are complementary to the target DNA sequence, nucleotides, and a thermal-stable DNA polymerase. The reaction mixture is repeatedly cycled through alternating periods of thermal denaturation, annealing, and extension, resulting in exponential amplification of the target DNA sequence (1,2,3). puReTaq Ready-To-Go PCR beads are designed and manufactured using a proprietary technology licensed to GE Healthcare. Optimized specifically for PCR, the Ready-To-Go reaction beads are formulated with high quality buffer, nucleotides (dNTPs), and recombinant puReTaq DNA polymerase - only template DNA and template-specific primers need to be added. The Ready-To-Go PCR bead format significantly reduces the number of pipetting steps, thereby decreasing handling errors and increasing reproducibility.

4. Materials not supplied

Reagents

- **Water** - Use only deionized or distilled water that is sterile and free of contaminating nucleic acid.
- **DNA template** - Best results are obtained with high quality DNA, as discussed on page 11.
- **Primers (template-specific)** - Guidelines for primer design and use are described on page 11.
- **Mineral oil** - If required for the thermal cycler being used.

Equipment

- **Supplies for liquid handling** - Gloves, vials, and pipette tips should be sterile; pipettor and microcentrifuge. Perform all reactions in the plastic microcentrifuge tubes provided in the kit; these tubes are suitably sterile for thermal cycling.
- **Ice bucket or cold block** - For maintaining puReTaq PCR beads at 4°C during rehydration and prior to thermal cycling.
- **Thermal cycler** - For cycling according to the specified conditions.

6. Protocols

6.1. Avoiding nucleic acid contamination

puReTaq PCR beads have passed rigorous quality tests to ensure the lowest possible levels of contaminating prokaryotic and eukaryotic nucleic acids. Adherence to some simple precautions will prevent the reintroduction of contamination. Use sterile pipette tips with filters for dispensing, select molecular biology grade water (or better) to formulate all buffers, and wherever possible, autoclave all buffers prior to use. In addition, work in a laminar air flow hood or PCR bubble that has been illuminated with UV light. It is important to analyze or pipette PCR products in an area separate from that where the reactions will be set up.

To minimize environmental contamination with amplified products, routinely treat all work surfaces with a 10% (v/v) bleach solution. Ideally, allow the bleach to contact the surface for at least 10 minutes prior to wiping away with sterile water.

6.2. Preliminary preparations and general handling instructions

Please note that the beads contain buffers, dNTPs, enzyme, stabilizers, and BSA, all which have been pretreated to minimize contamination. Discard any beads that were accidentally dislodged from their respective containers.

Prepare the PCR beads as follows:

1. Remove the desired quantity of tubes from the foil pouch. Remove individual tubes from a strip of eight by cutting the plastic link between tubes with scissors.
2. Examine these tubes to verify that a bead is visible at the bottom of each tube. The beads are carefully screened by weight and appearance. Please discard any beads that appear substantially

smaller or misshapen - an indication of moisture contamination. Please refer to the recommended storage conditions.

3. If necessary, gently tap the tube against a hard surface to force each bead to the bottom of the tube.
4. Place the tubes into a container that allows easy access during your experiment. The beads are now ready for use.

6.3. PCR with Ready-To-Go PCR Beads

For general information concerning primer design and cycling parameters, refer to Appendixes 1–4.

When performing PCR amplifications, exercise extreme care to prevent DNA contamination as described above. Each PCR bead is designed for use in a 25 μ l reaction volume (one PCR bead/tube).

When resuspended in a final volume of 25 μ l, each reaction will contain 1.5 mM MgCl₂. Please refer to Appendix 3 if a higher concentration of MgCl₂ is desired.

1. For each reaction, add the following to a tube containing a PCR bead:

Note: Do not mix the tube contents until all the components (below) have been added to the tube containing the bead.

5' (forward) primer (5–25 pmol)	X μ l
3' (reverse) primer (5–25 pmol)	Y μ l
Template DNA*	Z μ l
Sterile high-quality water	to a final volume of 25 μ l

*Start with 50 pg for a simple template such as plasmid DNA, or 50 ng for a complex template such as genomic DNA. Avoid template amounts > 1 μ g.

2. Snap the caps (provided) onto the tubes, pushing down firmly to ensure a tight fit. Mix the tube contents by gently flicking the tube

with a finger. Vortex gently and then centrifuge the tube for a few seconds to bring the components to the bottom of the tube. The reaction is fully dissolved and mixed when it appears clear.

3. Place the reaction mixtures on ice or in a cold block until ready for cycling. Minimize the time on ice prior to cycling to prevent formation of background reaction products.

6.4. Thermal Cycling

The optimal cycling profile for a given PCR system and thermal cycler will vary and must be determined empirically. Cycle number can range from 20 to 40 depending on the desired yield of product. Thermal cycling results and product yield can vary with cycle conditions and thermal cycler used. Read the instructions provided with your thermal cycler and optimize reaction conditions accordingly.

7. Appendix

7.1. Primers and templates - general considerations:

In general, PCR primers should be 15–30 bp in length with a GC content of ~ 50%. Complementarity between primer pairs and within each primer must be avoided to minimize the production of primer-dimers. There are a number of excellent Web sites for designing primers - some of our favorites are: www.oligo.net, www.abrf.org, and www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html

Template DNA purified by a variety of methods is a suitable substrate for PCR, but high quality DNA produces the most reproducible results. A typical PCR contains < 1 μ g of template DNA and primers at a concentration of 0.2–1.0 μ M. The optimal quantity of template and primers must be determined empirically for each new combination of template and primer. The reaction conditions described in this protocol are general recommendations only.

7.2. Primer annealing temperatures

The optimal annealing temperature depends on the sequence of the primers and their homology to the template DNA. With the Ready-To-Go PCR bead format, annealing temperatures slightly higher than those used in standard reactions should be used if nonspecific products are present following amplification. The annealing temperatures of the chosen primers often vary from their estimated melting temperatures (T_m). Although amplification is more specific at higher annealing temperatures, there might be some loss of longer target sequences during amplification and an overall reduction in yield. In contrast, when lower annealing temperatures are used, nonspecific amplification often increases along with an increase in specific target amplification. On occasion, it is necessary

to reoptimize annealing temperatures to achieve maximum performance. We recommend altering the temperature in increments of 2–5°C, starting at 10°C below the original annealing temperature.

7.3. Magnesium chloride concentration

When each PCR bead is rehydrated in a reaction volume of 25 μ l, the mixture will contain 1.5 mM MgCl₂. If a higher concentration of Mg²⁺ is desired, the following table can be used to determine the volume of a sterile 10 mM MgCl₂ solution that should be added to increase the Mg²⁺ concentration of the reaction. If MgCl₂ is added to the reaction, decrease the amount of water added to the reaction to maintain a final reaction volume of 25 μ l.

Final [MgCl ₂]	Volume of 10 mM MgCl ₂ to add
2.0 mM	1.25 μ l
2.5 mM	2.50 μ l
3.0 mM	3.75 μ l
3.5 mM	5.00 μ l
4.0 mM	6.25 μ l
4.5 mM	7.50 μ l
5.0 mM	8.75 μ l

7.4. Thermal cycling parameters

A standard three-step endpoint PCR cycling protocol consists of multiple cycles of denaturation (95°C), annealing (40–60°C) and extension (72°C). An initial denaturation step (95°C for 5 minutes) is recommended to ensure complete denaturation of the template DNA.

In some cases, it may be possible to amplify a target sequence using a two-step PCR where the denaturation step (95°C) is followed by a combined annealing/elongation step (50–65°C). For most standard, three-step PCRs, 35 cycles produces a 105–109-fold amplification of the target sequence. PCR product yield can be improved by increasing the number of cycles to 40.

8. Troubleshooting

Problem	Possible causes/solutions	Problem	Possible causes/solutions
1. No amplification	<ol style="list-style-type: none"> 1. The thermal cycler did not function properly. Improper cycling conditions can result in poor amplification. Consider testing PCR beads in a control reaction with template DNA and primers previously shown to work successfully. 2. Primer was omitted from the reaction. PCR beads contain no primer; they must be added to the reaction by the researcher. 3. The reaction volume was incorrect. Each PCR bead should be resuspended to a final reaction volume of 25 μl. Further dilution of the beads will severely compromise performance. Volumes less than 25 μl will alter salt concentrations and alter primer annealing stringency. 4. Insufficient DNA was used in the PCR. The amount of DNA required to generate good signal can vary between 		<ol style="list-style-type: none"> 4. <i>Continued.</i> different PCR systems. Titrate the amount of template in the reaction, starting with 50 pg for a simple template such as plasmid DNA, or 50 ng for a complex template such as genomic DNA. 5. The quality of the DNA template was poor. Impure DNA might fail to amplify. To inactivate contaminating enzyme activities, heat the template DNA to 95°C for 5 minutes before use in PCR. Alternatively, isolate template DNA by another method. 6. Examine beads for size and uniformity. If the pouch was previously opened and the beads subsequently stored without properly resealing the pouch, atmospheric moisture will rehydrate the beads. The result will be beads that are misshapen or markedly smaller. Reactions containing such beads should be discarded. To achieve optimum performance and maximum
2. Excessive background amplification	<ol style="list-style-type: none"> 6. <i>Continued.</i> storage lifetime, store the beads in a desiccator after resealing the pouch by folding over the opened edge several times and clipping shut with a paper clip or the equivalent. 1. Too much template DNA was added to the reaction. Reduce the amount of template DNA in the reaction until the smearing is eliminated. 2. The reaction utilized more than 35 cycles. Although the yield of PCR product can be increased by increasing the number of cycles to 40, this can produce spurious bands and increased background. Reduce the number of cycles until the smearing is eliminated. 3. Cycling conditions vary depending on the thermal cycler used. Optimize cycling conditions based on the manufacturer's recommendations. 		<ol style="list-style-type: none"> 4. The annealing temperature was too low. The optimal annealing temperature depends on the sequence of the primers and their homology to the template DNA. With the Ready-To-Go PCR bead format, annealing temperatures might vary slightly from those used in standard master mix PCR. Reoptimization of annealing temperature might be required. Increase the annealing temperature by 2–5°C increments. 5. The quality of the DNA template was poor. Impure DNA can fail to amplify properly. Use freshly prepared DNA or isolate the template by another method. 6. Too much primer was added to the reaction, resulting in the formation of primer-dimer bands. Excessive primer:template ratios can cause an abundance of low molecular weight bands and smearing. Titrate the amount

Problem	Possible causes/solutions
	<p>6. <i>Continued.</i> of primers in the reaction until the primer-dimer band is eliminated.</p> <p>7. Primers were not properly designed. Complementarity between primer pairs and within each primer should be avoided.</p>
3. Nonspecific amplification	<p>1. The primers hybridized to a secondary site on the template. Design new primers that are less specific for the secondary site. Increase the annealing temperature by 2–5°C increments until the desired specificity is achieved.</p> <p>2. Contamination in primers, template, or buffers. Prepare fresh materials.</p>

9. References

1. Mullis, K. B. *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263–273 (1986).
2. Mullis, K. B. and Faloona, F. A., *Methods Enzymol.* **155**, 335–350 (1987).
3. Saiki, R. K. *et al.*, *Science* **230** 1350–1354 (1985)

10. Companion products

Product	Pack size	Product number
GenomicPrep™ Blood DNA Isolation Kit	100 purifications	27-5236-01
GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit	55 purifications	27-5237-01
GFX™ MicroPlasmid Prep Kit	250 purifications	27-9601-02
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	100 purifications	27-9602-01
GFX 96 PCR Purification Kit	2 × 96 plates	25-6902-01
100 Base-Pair Ladder	100 µg	27-4007-01

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)