JULIA TERESA RIBEIRO DE LIMA

Ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. e *Brucella* spp. na população indígena e em cães habitantes da Terra Indígena Tapirapé e em cães habitantes da Terra Indígena Karajá

SÃO PAULO

2013

JULIA TERESA RIBEIRO DE LIMA

Ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. e *Brucella* spp. na população indígena e em cães habitantes da Terra Indígena Tapirapé e em cães habitantes da Terra Indígena Karajá

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2817
FMVZ

Lima, Julia Teresa Ribeiro de
Ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. e *Brucella* spp. na população indígena e em
cães habitantes da Terra Indígena Tapirapé e em cães habitantes da Terra Indígena Karajá /
Julia Teresa Ribeiro de Lima. -- 2013.
118 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo,
2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares.

1. Leishmaniose. 2. Brucelose. 3. Cães. 4. Aldeias indígenas. 5. Diagnóstico. I. Título.

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado: "Avaliação de agentes zoonóticos em cães de aldeias indígenas Tapirapé", protocolado sob o n.º 1745/2009, utilizando 250 (duzentos e cinquenta) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Solange Maria Gennari, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 07/04/2010.

We certify that the Research "Evaluation of zoonotic agents in dogs from Tapirapé indians communities", protocol number 1745/2009, utilizing 250 (two hundred and fifty) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Solange Maria Gennari, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 04/07/2010.

São Paulo, 08 de abril de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LIMA, Julia Teresa Ribeiro de

Título: Ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. e *Brucella* spp. na população indígena e em cães habitantes da Terra Indígena Tapirapé e em cães habitantes da Terra Indígena Karajá

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Dedico este trabalho aos meus pais Luís Pedro de Lima Jr e Natália Ribeiro de Lima, como forma de reconhecimento e agradecimento por todo o apoio e confiança que sempre depositaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por estarem sempre incentivando e apoiando as minhas decisões;

Aos meus irmãos George, Giselle e Rafael que eu tanto admiro por cada particularidade;

Ao Fernando Silveira Marques pelo carinho, amizade, apoio, paciência e pelos agradáveis dias em sua companhia;

Ao professor Dr. Rodrigo Martins Soares pela orientação, pelos ensinamentos e pelo apoio oferecido nos momentos em que mais precisei;

À professora Dra. Solange Maria Gennari pela oportunidade e confiança;

À professora Dra. Lara Borges Keid pela contribuição e ensinamentos fundamentais para a conclusão do meu trabalho;

Às professoras Dra. Márcia Dalastra Laurenti e Dra. Rosângela Zacarias Machado pela disponibilidade, contribuição e importante auxílio na minha pesquisa;

A todos os professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo que contribuíram de forma significativa para a minha formação;

À Sandra D'Auria e Maria Cecília Camargo do Laboratório de Zoonoses do Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo pelo auxílio na realização dos exames laboratoriais;

À Thaíse Yumie Tomokane do Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da USP e a Márcia Jusi do Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP pelo auxílio e contribuição na realização dos exames laboratoriais;

Aos amigos Andréa, Herbert, Igor, Tatiana, Amália, Felipe, Danilo, Francisco pela amizade, companhia, convívio e por proporcionarem um ambiente agradável, quase que familiar, durante esses anos;

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ/USP que direta ou indiretamente contribuíram para minha adaptação e aprendizado nesta jornada;

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e a todos os seus funcionários;

À FAPESP pelo auxílio financeiro processo 2011/05277-5.

RESUMO

LIMA, J. T. R. **Ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. e *Brucella* spp. na população indígena e em cães habitantes da Terra Indígena Tapirapé e em cães habitantes da Terra Indígena Karajá.** [Occurrence of infection by *Leishmania* spp. and *Brucella* spp. in the indigenous population and in dogs inhabitants from Tapirapé Indigenous Villages and in dogs inhabitants from Karajá Indigenous Villages]. 2013. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

As leishmanioses são antroponoses de caráter crônico e distribuição mundial e apresentam uma incidência estimada de 2 milhões de novos casos por ano, entre leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT). Os cães são bastante susceptíveis à infecção por LV e devido à sua estreita relação com o homem, são considerados os reservatórios de maior importância para a transmissão da doença ao ser humano. As leishmanioses ocorrem de forma endêmica nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, fazendo-se necessária a realização de inquéritos sorológicos, visando conhecer a situação epidemiológica da doença nas áreas com transmissão ativa ou com potencial de transmissão. A brucelose é uma zoonose de distribuição mundial que causa infecção sistêmica no homem e diminuição da eficiência reprodutiva e aborto em espécies domésticas e silvestres. No Brasil, a brucelose devido a *Brucella abortus* é a infecção brucélica mais prevalente, seguida da *B. suis* e *B. canis*. Devido ao caráter zoonótico e a perdas reprodutivas é importante diagnosticar animais infectados para interromper a transmissão da doença. A partir do exposto, realizou-se um inquérito sorológico em humanos e em cães habitantes de aldeias indígenas da região amazônica do Brasil, com o objetivo de identificar áreas endêmicas para *Leishmania* spp. e *Brucella* spp. O presente estudo analisou amostras de soro e sangue de todos os indígenas e cães habitantes da Terra Indígena Tapirapé, assim como de cães da Terra Indígena Karajá, através dos testes sorológicos ELISA e RIFI para a pesquisa de leishmaniose e dos testes sorológicos IDGA e AAT, além da PCR para a pesquisa de brucelose. Os resultados obtidos para os humanos apresentaram prevalências de 0,4% e 0,9% para LT e brucelose, respectivamente. Todos os humanos foram negativos para LV. Para os cães das aldeias Tapirapé os resultados de prevalência

foram 1,8%, 0,9% e 6,1% para LV e LT e brucelose, respectivamente. Os cães das aldeias Karajá apresentaram resultados negativos para LV e prevalências de 0,9% e 5,2% para LT e brucelose, respectivamente. Os resultados obtidos neste estudo indicam baixa ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. e ocorrência moderada de infecção por *Brucella* spp. Embora as leishmanioses se apresentem pouco disseminadas nas áreas estudadas, requerem atenção, assim como a brucelose, para a tomada de medidas de controle e profilaxia.

Palavras-chave: Leishmaniose. Brucelose. Cães. Aldeias indígenas. Diagnóstico.

ABSTRACT

LIMA, J. T. R. **Occurrence of infection by *Leishmania* spp. and *Brucella* spp. in the indigenous population and in dogs inhabitants from Tapirapé Indigenous Villages and in dogs inhabitants from Karajá Indigenous Villages.** [Ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. e *Brucella* spp. na população indígena e em cães habitantes da Terra Indígena Tapirapé e em cães habitantes da Terra Indígena Karajá]. 2013. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Leishmaniasis is a chronic antroponose of worldwide distribution and has an estimated incidence of 2 million new cases per year between visceral leishmaniasis (VL) and cutaneous leishmaniasis (CL). Dogs are very susceptible to infection by VL and due to its close relationship with man, are considered the most important reservoirs for disease transmission to humans. Leishmaniasis occurs in endemic form in the North, Northeast, Midwest and Southeast, making it necessary to carry out serological surveys, to determine the epidemiological situation of the disease in areas with active transmission or potential of transmission. Brucellosis is a zoonosis of worldwide distribution that causes systemic infection in man and decreased reproductive efficiency and abortion in domestic and wild species. In Brazil, brucellosis due to *Brucella abortus* is the most prevalent *Brucella* infection, followed by *B. suis* and *B. canis*. Due to the zoonotic and reproductive losses, the diagnose of infected animals is important to interrupt transmission of the disease. From the foregoing, we performed a serological survey in humans and dogs living in indigenous communities in the Amazon region of Brazil, with the aim of identifying endemic areas for *Leishmania* spp. and *Brucella* spp. The present study analyzed blood and serum samples of all humans and dogs from Tapirapé indigenous villages as well as dogs from Karajá indigenous villages by serological tests ELISA and IFAT for detecting leishmaniasis and serological tests AGID and AAT and also PCR for the detection of brucellosis. The results showed prevalence rates of 0.4% and 0.9% for LT and brucellosis in humans, respectively. All humans tested negative for LV. For the dogs from Tapirapé villages, the results of prevalence were 1.8%, 0.9% and 6.1% for LV and LT and brucellosis, respectively. The results for dogs from Karajá villages showed prevalence rates of 0.9% and 5.2% for LT and brucellosis, respectively, and these dogs tested negative for LV. The results of this study indicate low occurrence

of infection by *Leishmania* spp. and moderate occurrence of infection by *Brucella* spp. Although slightly disseminated in the studied areas, leishmaniasis requires attention, such as brucellosis, for taking control measures and prophylaxis.

Keywords: Leishmaniasis. Brucellosis. Dogs. Indigenous. Diagnosis.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS EMPREGADOS PARA O DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE CANINA, DIRECIONADOS À REGIÃO INTERESPAÇADORA (ITS) DO GENE CODIFICADOR DO RNA RIBOSSOMAL DE <i>BRUCELLA</i>	63
TABELA 2 -	PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>L. (L.) CHAGASI</i> E ANTI- <i>L. (L.) AMAZONENSIS</i> NOS HUMANOS DAS ALDEIAS TAPIRAPÉ EXAMINADOS POR ALDEIA PELA RIFI FMVZ-USP (1:40).	68
TABELA 3 -	PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>BRUCELLA</i> LISA NOS HUMANOS DAS ALDEIAS TAPIRAPÉ EXAMINADOS POR ALDEIA PELA AAT.	68
TABELA 4 -	PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>L. (L.) CHAGASI</i> E ANTI- <i>L. (L.) AMAZONENSIS</i> EM CÃES DA TERRA INDÍGENA TAPIRAPÉ EXAMINADOS POR ALDEIA PELOS MÉTODOS ELISA E RIFI (1:40) REALIZADOS NOS DIFERENTES LABORATÓRIOS.	70
TABELA 5 -	DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>BRUCELLA</i> SPP. EM CÃES DAS ALDEIAS DE ETNIA TAPIRAPÉ, PELO TESTE AAT E IDGA.	71
TABELA 6 -	PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>L. (L.) CHAGASI</i> E ANTI- <i>L. (L.) AMAZONENSIS</i> DOS CÃES DA TERRA INDÍGENA KARAJÁ, EXAMINADOS POR ALDEIA PELOS MÉTODOS ELISA E RIFI (1:40), REALIZADOS NOS DIFERENTES LABORATÓRIOS.	72
TABELA 7 -	DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>BRUCELLA</i> SPP. NOS CÃES DAS ALDEIAS DA TERRA INDÍGENA KARAJÁ PELOS TESTES AAT E IDGA.	73
TABELA 8 -	ANIMAIS REAGENTES A PELO MENOS UM DOS TESTES REALIZADOS, QUANDO TESTADOS PARA <i>L. (L.) CHAGASI</i> E <i>L. (L.) AMAZONENSIS</i>	74
TABELA 9 -	DETECÇÃO DE DNA DE <i>BRUCELLA</i> SPP. PELA PCR NAS AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL DOS CÃES DAS ALDEIAS DA ETNIA KARAJÁ.	75
TABELA 10 -	ANIMAIS REAGENTES A PELO MENOS UM DOS TESTES REALIZADOS, QUANDO TESTADOS PARA <i>BRUCELLA</i> SPP.	76
TABELA 11 -	GRAU DE CONCORDÂNCIA ENTRE OS TESTES REALIZADOS NOS DIFERENTES LABORATÓRIOS.	78

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MAPA DE LOCALIZAÇÃO DAS ALDEIAS PERTENCENTES ÀS TERRAS INDÍGENAS TAPIRAPÉ (À ESQUERDA) E KARAJÁ (À DIREITA).....	51
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

2ME = 2-Mercaptoetanol

AAT = Antígeno Acidificado Tamponado

DNA = Ácido Desoxirribonucléico

EDTA = Ácido Etileno-Diamino-Tetracético

ELISA = Ensaio Imunoenzimático

FCAV = Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

FM = Faculdade de Medicina

FMVZ= Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

IDGA = Imunodifusão em Gel de Ágar

IgG = Imunoglobulina G

IgM = Imunoglobulina M

ITS = Internal Transcribed Sequence

kDa = Kilodalton

LIT = Liver Infusion Tryptose

LT = Leishmaniose Tegumentar

LV = Leishmaniose Visceral

LVC = Leishmaniose Visceral Canina

LPS = Lipopolissacarídeos

M = Molar

MAPA = Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MgCl₂ = Cloreto de Magnésio

NaCl = Cloreto de sódio

pb = Pares de bases

PBS = Phosphate Buffer Solution

PCR = Reação em Cadeia pela Polimerase

PNCEBT = Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose

PVC-LV = Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral

pH = Potencial Hidrogeniônico

RIFI= Reação de Imunofluorescência Indireta

rpm = Rotações por minuto

RPMI = Roswell Park Memorial Institute

SES = Secretaria de Estado de Saúde

Taq = *Thermus aquaticus*

TBE = tris-borato-EDTA

TE = tampão Tris-EDTA

TRIS = Tris (hidroximetil) amino metano

Tris HCl = Tris (hidroximetil) amino metano com ácido clorídrico

Tris-borato = Tris (hidroximetil) amino metano com borato

UI = Unidade Internacional

UNESP = Universidade Estadual Paulista

USP= Universidade de São Paulo

VPS= Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

X= vezes

X^2 = Qui quadrado

μM = Micromolar

μL = Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 LEISHMANIOSES	19
1.1.1 Etiologia	19
1.1.2 Patogenia	20
1.1.3 Vetores	22
1.1.4 Hospedeiros e Reservatórios	23
1.1.5 Epidemiologia	24
1.1.6 Sinais Clínicos	26
1.1.7 Diagnóstico	28
1.1.8 Controle	31
1.2 BRUCELOSE	32
1.2.1 Etiologia	32
1.2.2 Patogenia	35
1.2.3 Epidemiologia	36
1.2.4 Sinais Clínicos	38
1.2.5 Diagnóstico	39
1.2.6 Controle	42
2 JUSTIFICATIVA	44
3 OBJETIVOS	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 POPULAÇÕES ABORDADAS E COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	50
4.1.1 Local do Estudo	50
4.1.2 Período de Realização das Coletas	51
4.1.3 População Humana	52
4.1.4 População Canina	52
4.1.5 Colheita de Sangue	52
4.2 PESQUISA DE LEISHMANIOSE	53
4.2.1 Diagnóstico Sorológico	53
4.2.2 Diagnóstico Parasitológico	61
4.3 PESQUISA DE BRUCELOSE	62

4.3.1 Diagnóstico Sorológico	62
4.3.2 Reação em Cadeia pela Polimerase	62
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
5 RESULTADOS	67
5.1 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	67
5.1.1 Sorodiagnóstico Humano	67
5.1.2 Sorodiagnóstico Canino	69
5.2 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE	75
5.3 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	77
5.3.1 Esfregaço em Lâmina	77
5.3.2 Isolamento do Agente	77
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
6 DISCUSSÃO	80
7 CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS	93
ANEXOS	115

1 INTRODUÇÃO

No decorrer do texto serão apresentadas revisões sobre aspectos importantes referentes às leishmanioses e à brucelose.

1.1 LEISHMANIOSES

Nos itens a seguir serão abordadas informações relevantes sobre características gerais, aspectos clínicos e epidemiológicos das leishmanioses.

1.1.1 Etiologia

As leishmanioses são antroponoses de caráter crônico e de distribuição mundial, causadas por protozoários da ordem kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Este gênero é dividido em dois subgêneros: *Leishmania*, com desenvolvimento restrito à porção anterior e média do tubo digestivo do vetor (ROSS, 1903) e *Viannia*, com desenvolvimento desde o intestino posterior até a porção anterior do tubo digestório (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987).

O gênero *Leishmania* inclui várias espécies que acarretam manifestações viscerais e cutâneas que, classicamente, são subdivididas em duas formas: leishmaniose tegumentar (LT), que apresenta manifestação cutânea, mucocutânea ou cutânea difusa e leishmaniose visceral (LV), uma das formas mais severas, com alterações sistêmicas e por vezes cutâneas (MICHALSKY et al., 2002), comuns no cão e no homem.

Considerando as diferentes manifestações clínicas em humanos, as principais espécies de *Leishmania* podem ser classificadas em três complexos: o complexo *L. donovani*, que compreende a *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*, responsáveis pela doença visceral; o complexo *L. mexicana* que inclui a *L. (L.)*

mexicana, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) enrietti* e são responsáveis pela doença em sua forma cutânea; e o complexo *L. braziliensis* que abrange as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) equatoriensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) shawi*, responsáveis pela doença em sua forma mucosa ou mucocutânea (LAINSON; SHAW, 1987).

Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e oito espécies descritas, somente em animais. No entanto, no Brasil são reconhecidas pelo menos oito espécies de *Leishmania* responsáveis por doença humana, sendo a forma tegumentar causada principalmente pela *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais raramente, pela *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*, enquanto a *L. (L.) chagasi* é a responsável pela doença visceral (GRIMALDI; TESH, 1993; BRASIL, 2007). Cada espécie apresenta particularidades concernentes às manifestações clínicas, a vetores, reservatórios e padrões epidemiológicos, à distribuição geográfica e até mesmo à resposta terapêutica (VALE; FURTADO, 2005).

1.1.2 Patogenia

Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam-se de duas formas evolutivas principais: as amastigotas, que são formas intracelulares obrigatórias, com formato oval, flagelo não exteriorizado e se desenvolvem em células do hospedeiro vertebrado; e as promastigotas, que são flageladas, têm formato alongado e se desenvolvem no tubo digestivo dos insetos vetores, sendo a forma infectante para o hospedeiro vertebrado. Ambas as formas se multiplicam por divisão binária (LAINSON; WARD; SHAW, 1977; SLAPPENDEL, 1988; ALENCAR; NEVES; DIETZE, 1991).

Leishmania spp. é um parasita heteroxeno, necessitando de dois hospedeiros para completar seu ciclo de vida, um vertebrado mamífero e um hospedeiro invertebrado (vetor) (VASSÍLIOS, 1993; MARSELLA; DE GOPEGUI, 1998). A transmissão geralmente ocorre pela participação de fêmeas dos insetos vetores,

conhecidos como flebotomíneos, que se infectam com *Leishmania* ao se alimentarem em um hospedeiro vertebrado que apresente amastigotas do parasito nos macrófagos presentes na derme (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987). Dentro do trato digestório do inseto as formas amastigotas se transformam em promastigotas entre 24 a 48 horas após a ingestão. Ainda no intestino do inseto, as promastigotas se reproduzem e migram para o esôfago e faringe. Durante o próximo repasto sanguíneo elas são regurgitadas e inoculadas na derme do hospedeiro vertebrado (KAMHAWI, 2006). Após inoculação, as promastigotas infectantes ligam-se aos macrófagos por meio de diversos receptores celulares, sendo subsequentemente fagocitadas, localizando-se em um vacúolo que se funde com lisossomas, denominado vacúolo parasitóforo. Ao serem fagocitados, os parasitas são convertidos em formas amastigotas, que posteriormente multiplicam-se e rompem as células hospedeiras para então infectarem outras células mononucleares (MAUËL, 1990).

Embora a principal forma de transmissão da infecção seja pela picada do hospedeiro invertebrado, existem relatos sobre transmissão na ausência do vetor. Em humanos, há relatos de transmissão vertical de *Leishmania* (LOW; COOKE, 1926; MEINECKE et al., 1999), transmissão entre doadores de sangue (OTERO et al., 2000), devido ao compartilhamento de agulhas e seringas (BOSCH et al., 2002) e há ainda um relato de transmissão venérea entre um homem infectado e sua esposa em área livre da doença e do vetor (SYMMERS, 1960).

A ocorrência de LV em um canil localizado em área não endêmica e livre do vetor foi relatada, sugerindo a possibilidade de transmissão da infecção por *L. infantum* na ausência do vetor invertebrado (GASKIN et al., 2002). Há relatos na literatura que indicam a ocorrência de transmissão da infecção por transfusão sanguínea (OWENS et al., 2001; DE FREITAS et al., 2006). A transmissão vertical da infecção em cães também foi sugerida (MASUCCI et al., 2003; DUBEY et al., 2005; ROSYPAL et al., 2005), embora tenham sido publicadas evidências anteriores indicando que a transmissão vertical não ocorre na espécie canina (ANDRADE et al., 2002).

1.1.3 Vetores

Os insetos envolvidos na epidemiologia da LV pertencem à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, sendo *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie nas Américas (LAINSON; RANGEL, 2005) e considerada por muito tempo como a principal transmissora da doença. Entretanto, estudos demonstraram a participação de *Lutzomyia cruzi* como vetor no Mato Grosso do Sul (DOS SANTOS et al., 1998) e a *Lutzomyia intermedia* no litoral do município do Rio de Janeiro (MARZOCHI et al., 1994). Os vetores envolvidos na transmissão da *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*, um dos agentes responsáveis pela manifestação da LT, são *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia reducta* e *Lutzomyia olmeca nociva* (Amazonas e Rondônia). Estas espécies são pouco antropofílicas, o que justifica uma menor frequência de infecção humana por esta *Leishmania*. Seu principal vetor, *Lu. flaviscutellata*, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em diferentes habitats de países fronteiriços ao Brasil e nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Bahia, Ceará, Maranhão, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo, ocorrendo em matas úmidas, onde apresenta densidade elevada (BRASIL, 2007). Para se alimentarem, os flebotomíneos inserem suas peças bucais semelhantes a um serrote na pele do hospedeiro e as agita para produzir um pequeno ferimento no qual o sangue flui dos capilares superficiais (LANE, 1993). É esse dano tecidual associado com a criação da ferida que libera macrófagos da pele e/ou amastigotas libertos na poça de sangue, e permite a sua absorção no abdômen do inseto. A alteração das condições (diminuição da temperatura, o aumento do pH) durante a passagem do hospedeiro mamífero para o intestino médio do vetor provoca o desenvolvimento do parasita no interior do vetor (BATES; ROGERS, 2004; KAMHAWI, 2006).

1.1.4 Hospedeiros e Reservatórios

Devido à sua estreita relação com o homem, o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) tem sido considerado o reservatório de maior importância para a transmissão da LV ao ser humano (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987). Esses animais são bastante susceptíveis à infecção e, embora alguns cães possam vir a óbito em poucos meses, outros mantêm a infecção por anos, tornando-se uma importante fonte de infecção devido ao alto parasitismo na pele frequentemente observado (ASHFORD, 1996). Além disso, estudos epidemiológicos reforçam a importância do cão como reservatório para infecções humanas ao demonstrarem a correlação entre a distribuição espacial de cães soropositivos e ocorrência de casos humanos (OLIVEIRA et al., 2001; MARGONARI et al., 2006).

Outros canídeos, como as raposas das espécies *Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*, tem sido incriminados como reservatórios do agente, entretanto, estes animais silvestres não vivem próximos a habitações humanas, tendo assim uma importância secundária na epidemiologia da doença (LAINSON et al., 1983; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). Há relatos de infecção natural por *L. (L.) chagasi* em marsupiais (*Didelphis albiventris*) (SHERLOCK et al., 1984; SHERLOCK, 1996) e roedores (*Nectomys squamipes*), evidenciando que outros mamíferos silvestres podem estar envolvidos na manutenção do ciclo enzoótico deste protozoário, atuando como reservatórios primários. Por serem considerados animais sinantrópicos, representam uma importante fonte de infecção para humanos (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

As aves possuem algumas características fisiológicas que impedem o desenvolvimento da infecção por *Leishmania* spp. (ZILBERSTEIN; SHAPIRA, 1994). Além disso, alguns autores sugerem que a infecção existente nos flebotomíneos pode ser reduzida com a ingestão de sangue de aves devido à ação de DNases desencadeadas pelos eritrócitos nucleados (SCHLEIN et al., 1983). Entretanto, embora as aves não atuem como reservatórios, a galinha doméstica (*Gallus gallus*) pode favorecer a ligação entre o ciclo de transmissão silvestre e o doméstico por serem muito atraentes para os flebotomíneos e também para hospedeiros reservatórios de *L. (L.) chagasi*, como as raposas. Assim, em algumas regiões, a

presença de galinhas domésticas deve ser tida como um fator de risco para a LV (ALEXANDER et al., 2002; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

Com relação à LT, são numerosos os registros da infecção em animais domésticos, entretanto, não há evidências científicas que comprovem o papel destes como reservatórios das espécies de *Leishmania*, sendo considerados hospedeiros acidentais da doença. Embora haja muitos relatos de infecção natural de cães por espécies dermatrópicas (FENECH, 1997; REITHINGER; DAVIES, 1999; GONTIJO et al., 2002; MADEIRA et al., 2003, 2006; RYAN et al., 2003; CASTRO et al., 2007; MASSUNARI et al., 2009) a capacidade do cão transmitir a infecção para o flebotomíneo parece ser baixa (TRAVI; TABARES; CADENA, 2006). Já foram registradas como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais da LT algumas espécies de roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres. A *L. (L.) amazonensis* foi isolada de roedores silvestres do gênero *Proechymis* e *Oryzomys*. Embora o papel desempenhado por estes animais silvestres no ciclo de transmissão ainda não tenha sido bem definido, as evidências encontradas indicam estes roedores como reservatórios desta espécie de *Leishmania* (BRASIL, 2007).

1.1.5 Epidemiologia

As leishmanioses ocorrem em 98 países ou territórios, com mais de 350 milhões de pessoas em risco. Dados publicados indicam uma incidência estimada de 2 milhões de novos casos por ano, sendo 500 mil casos de leishmaniose visceral e 1,5 milhões de leishmaniose tegumentar (ALVAR et al., 2012).

A LV é responsável por um número estimado de mais de 50 mil óbitos por ano, sendo superada apenas pela malária, dentre as doenças parasitárias. A doença concentra 90% dos casos em 6 países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Nepal (QUINNELL; COURTENAY, 2009; WHO, 2010). Dos casos humanos registrados no Novo Mundo, 90% estão concentrados no Brasil (LAINSON; RANGEL, 2005).

A LT é mais amplamente distribuída, com cerca de um terço dos casos ocorrendo em cada uma das três regiões: as Américas; a bacia do Mediterrâneo; e

Ásia ocidental do Oriente Médio para a Ásia Central. Os dez países com as mais elevadas contagens de casos estimados são Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru, e juntos, respondem por cerca de 70 a 75% da incidência de leishmaniose cutânea no mundo (WHO, 2010).

No Brasil, no início da década de 50, a LV era uma doença tipicamente rural concentrada principalmente na região nordeste. No entanto, desde o início da década de 80 a doença vem sofrendo modificações no seu perfil epidemiológico e agora é caracterizada por expansão geográfica em áreas urbanas (WERNECK, 2010). A urbanização da LV tem sido associada a processos de migração ligados à deterioração das condições sociais e econômicas da população (HARHAY et al., 2011). As alterações antrópicas contribuíram para a dispersão de animais silvestres que servem como fonte de alimentação aos insetos e ocasiona a adaptação de várias espécies a diferentes ecótopos (GOMES et al., 1989; SHAW, 2007). A proximidade do homem às áreas florestais e a criação de animais domésticos atraem uma grande quantidade de espécies de flebotomíneos ao peridomicílio. Ao serem atraídos, estes insetos se estabelecem nessas áreas e a presença destes pode contribuir para a manutenção do ciclo de transmissão, estabelecendo o elo entre animais doméstico e a população (MISSAWA; LOROSA; DIAS, 2008).

Até a década de 1950 a LT disseminou-se praticamente por todo o território nacional, coincidindo com o desflorestamento provocado pela construção de estradas e instalação de aglomerados populacionais, com maior incidência nos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Ceará e Pernambuco. A partir daí até a década de 1960, a doença parece ter entrado em declínio, com o desmatamento já completado nas regiões mais urbanizadas do país, além da relativa estabilidade das populações rurais (FURTADO, 1994). A partir da década de 1980 tem sido observado crescimento da endemia, tanto em magnitude quanto em expansão geográfica, com surtos epidêmicos na regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Norte do Brasil (BRASIL, 2007). Nas áreas de colonização recente, a expansão está associada à derrubada de matas para construção de estradas, novos núcleos populacionais e ampliação de atividades agrícolas, sendo mais comum na Amazônia (PAES et al., 2000) e Centro-Oeste, onde atinge principalmente a população migrante, frequentemente poupando os indígenas (FURTADO, 1994). No Brasil, a LT é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à sua

magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional. Atualmente apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras (BRASIL, 2007).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) ocorre de forma endêmica nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste e em todos os Estados tem sido relatada a associação de cães infectados e a presença do vetor com processos de desmatamentos subsequentes (MILES et al., 1999; LAINSON; RANGEL, 2005;). A expansão da doença para áreas consideradas não endêmicas tem sido observada em algumas regiões do Brasil. Atualmente, 21 dos 27 Estados do Brasil relataram transmissão autóctone da LVC (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

1.1.6 Sinais Clínicos

A manifestação da doença depende de interações entre fatores referentes aos parasitos, tais como espécie e cepa e fatores relativos ao hospedeiro, como resposta imune (PEARSON; SOUSA, 1996; CARDOSO; CABRAL, 1998) resultando em amplo espectro de sinais clínicos.

A forma visceral da doença é crônica e progressiva e afeta vários órgãos, incluindo o baço, o fígado, a medula óssea, os linfonodos e a pele (CARDOSO; CABRAL, 1998). Em cães infectados a doença manifesta-se principalmente sob a forma visceral, crônica e progressiva e, frequentemente, observam-se lesões cutâneas (ALVAR et al., 2004).

A infecção pela *L. (L.) chagasi* em humanos caracteriza-se por um amplo espectro clínico, que pode variar desde a forma assintomática até a apresentação mais grave caracterizada por anemia, febre, hepatoesplenomegalia, distúrbios hemorrágicos e perda de peso, que, se não tratada, pode levar o paciente à morte (BADARÓ et al., 1986; PEARSON; SOUSA, 1996; QUEIROZ; ALVES; CORREIA, 2004). A evolução clínica da LV pode ser dividida em períodos: período inicial, período de estado e período final. O período inicial caracteriza o início da

sintomatologia que pode variar de paciente para paciente, mas na maioria dos casos inclui febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia leve. O período de estado é caracterizado por febre irregular, geralmente associada a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia. Apresenta um quadro clínico com mais de dois meses de evolução, na maioria das vezes associado a comprometimento do estado geral. Caso não seja feito o diagnóstico e tratamento, a doença evolui progressivamente para o período final, com febre contínua e comprometimento mais intenso do estado geral, incluindo desnutrição, edema dos membros inferiores que pode evoluir para anasarca, hemorragias, icterícia e ascite. Nestes pacientes, o óbito geralmente é determinado por infecções bacterianas e/ou sangramentos (BRASIL, 2006).

O período de incubação da LVC é muito variável, sendo que os sinais clínicos da doença podem tornar-se evidentes meses ou anos após o animal ter sido infectado (SLAPPENDEL, 1988; GENARO, 1993). Em cães acometidos por LV, as alterações histopatológicas mais frequentemente descritas são observadas no baço, fígado, medula óssea, linfonodos, rins, pulmões, e tegumento (GENARO, 1993; TAFURI, 1995). A infecção resulta em manifestações clínicas diversas, variando desde infecções sub-clínicas até a forma crônica e progressiva da doença, ocorrendo febre irregular por longos períodos, perda progressiva de peso, caquexia, anemia, hepatoesplenomegalia e linfadenomegalia generalizada (GONZÁLEZ et al., 1990; GENARO, 1993). Estes animais, quando acometidos pela doença, podem apresentar lesões cutâneas, principalmente descamação e eczema, em particular no espelho nasal e orelha, pequenas úlceras rasas, localizadas mais frequentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações e pelo opaco. Nas fases mais adiantadas da doença, observa-se, com grande frequência, onicogrifose (SLAPPENDEL, 1988; CARDOSO; CABRAL, 1998), esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômito, além da hiperqueratose. Na fase final da infecção, ocorre em geral a paresia das patas posteriores, caquexia, inanição e morte. Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo (BRASIL, 2006).

A LT possui uma grande variedade de manifestações clínicas, histopatológicas e imunológicas (CONVIT; PINARDI; RONDÓN, 1972). Uma delas é a forma cutânea, caracterizada pela presença de lesões exclusivamente na pele, as quais podem curar espontaneamente ou evoluir para lesões crônicas com cicatrizes desfigurantes. Outra forma é a leishmaniose cutânea disseminada, caracterizada por múltiplas lesões papulares geralmente ulceradas, distribuídas por diferentes partes do tegumento. Há a forma cutânea difusa, menos comum, caracterizada por lesões papulares ou nodulares, deformantes e graves, com ampla distribuição pela superfície corporal e ainda a forma mucocutânea, caracterizada por lesões ulcerativas e destrutivas das mucosas ou junções muco-cutâneas (CARVALHO et al., 1994; CARDOSO; CABRAL, 1998; DE OLIVEIRA-NETO et al., 2000). Esta forma apresenta um granuloma constituído de linfócitos e macrófagos, com poucos parasitos (MAGALHÃES et al., 1986). As lesões se iniciam no ponto de inoculação das promastigotas infectantes, através da picada do vetor, para qualquer das espécies de *Leishmania* causadoras da doença. A lesão primária é geralmente única, embora eventualmente múltiplas picadas do flebotomíneo ou a disseminação local possam gerar um número elevado de lesões (MARZOCHI, 1992). A infecção por *L. (L.) amazonensis* causa lesões nodulares e úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente, alguns indivíduos podem desenvolver o quadro clássico da leishmaniose cutânea difusa (BRASIL, 2007). As lesões nodulares que não ulceram são ricas em protozoários (LAINSON; SHAW, 1972).

Nos cães, a úlcera cutânea sugestiva costuma ser única, eventualmente múltipla, localizada nas orelhas, focinho ou bolsa escrotal. No entanto, deve-se estar atento a outras doenças que causem úlceras, tais como neoplasias, piodermites e micoses (BRASIL, 2007).

1.1.7 Diagnóstico

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico de LV. O diagnóstico é rotineiramente realizado com base na avaliação conjunta de parâmetros clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. Entretanto, um diagnóstico

definitivo e seguro requer a demonstração do parasito através de métodos parasitológicos (ALVAR et al., 2004). O diagnóstico parasitológico permite maior confiança, pois se baseia na observação direta do parasita (DEANE; DEANE, 1962; LONGSTAFFE; GUY, 1985; GRIMALDI; TESH, 1993; FERRER et al., 1995), podendo ser realizado a partir do exame direto de esfregaços ou cortes histológicos, inoculação em hamsters ou cultura *in vitro* de aspirados ou tecidos dos animais suspeitos (GRIMALDI; TESH, 1993). O material coletado para realização desse método pode ser proveniente de punção aspirativa ou biópsia esplênica, aspirado de medula óssea, linfonodos ou biópsia de pele (BRAGA et al., 1998; FERRER, 1999; ASHFORD, 2000).

O diagnóstico clínico é bastante complexo, pois a doença no homem e nos animais apresenta sinais e sintomas inespecíficos, podendo ser confundida com diversas doenças (SINGH; SIVAKUMAR, 2003; GONTIJO; MELO, 2004). Por este motivo, os exames laboratoriais possuem um importante papel no auxílio do diagnóstico da LV.

Muitos testes sorológicos podem ser utilizados tais como reação de fixação de complemento, hemaglutinação indireta, reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), imunoprecipitação em gel e western blot (FERRER et al., 1995; SCALONE et al., 2002; ALVES; BEVILACQUA, 2004).

As provas sorológicas comumente utilizadas para o inquérito epidemiológico canino são a RIFI e o ELISA. Estes testes podem utilizar como antígenos, parasitos íntegros (promastigotas ou amastigotas), extratos solúveis de *Leishmania* (ALVAR et al., 2004), ou ainda proteínas recombinantes (REITHINGER et al., 2002). A escolha do antígeno é de suma importância, tanto para o diagnóstico individual da LV como para estudos epidemiológicos (BADARÓ et al., 1986). Os métodos que utilizam parasitos íntegros como antígenos apresentam elevada sensibilidade enquanto os métodos que utilizam extratos solúveis de parasitos ou proteínas recombinantes apresentam especificidade superior (ALVAR et al., 2004).

A especificidade das provas sorológicas é prejudicada pela ocorrência de reações cruzadas com outros agentes da família Trypanosomatidae, como o agente causador da doença de Chagas. Portanto, seus resultados não devem ser utilizados como indicadores de infecção por *Leishmania*, particularmente em áreas onde a doença de Chagas é endêmica (ALVES; BEVILACQUA, 2004; LAURENTI, 2009).

O método ELISA destaca-se pela simplicidade de execução e economia, quando realizado em larga escala. Sua sensibilidade é alta, mas a especificidade é de grupo, podendo revelar reações cruzadas (REY, 2001). A sensibilidade e especificidade deste método dependem do tipo de antígeno empregado. As técnicas que utilizam antígeno bruto são limitadas em termos de especificidade, por apresentar reações cruzadas não somente com tripanosomatídeos, mas também com outros organismos filogeneticamente distantes (RACHAMIM et al., 1991; MELO, 2004; ZANETTE, 2006). A utilização de antígenos recombinantes ou purificados melhora a sensibilidade e a especificidade da técnica (MOREIRA et al., 2007)

A RIFI tem sido utilizada como diagnóstico em inquéritos em populações de cães por demonstrar alta sensibilidade e uma boa especificidade, além de ser um teste de fácil execução, rápido na emissão do resultado e custo relativamente baixo (ALVES; BEVILACQUA, 2004). Utilizam-se as formas promastigotas de *Leishmania* spp. como antígenos (REY, 2001) fixados em lâmina (FERREIRA; ÁVILA, 2001).

Na LV, o teste imunocromatográfico rápido que utiliza o antígeno recombinante rK39 tem sido bastante empregado pela fácil utilização em campo, além de ser um método sensível, específico e de rápida execução (LAURENTI, 2010).

Nos últimos anos, os métodos moleculares passaram a ser empregados com mais frequência no diagnóstico da LV. O desenvolvimento da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) proporcionou grande avanço para o diagnóstico da leishmaniose. *Primers* para amplificar sequências encontradas em DNA genômico ou DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* spp. foram testados em vários tecidos, e demonstrou ser uma técnica altamente sensível e específica, além de poder ser aplicada em várias amostras clínicas, a partir de diferentes tecidos, bem como de aspirado de linfonodos, medula óssea e sangue periférico (IKONOMOPOULOS et al., 2003). Em estudo comparando diversos métodos da PCR aplicados em amostras de sangue, demonstrou-se maior sensibilidade utilizando *primers* específicos para o kDNA (LACHAUD, 2002).

Para diagnóstico da LV em humanos, a Intradermoreação de Montenegro (IDR) pode ser empregada, porém, seu resultado é sempre negativo durante a progressão da doença e, não deve ser utilizada para o diagnóstico precoce. Este

exame torna-se positivo após a cura clínica na maioria dos pacientes em um período de seis meses a três anos após o término do tratamento (BRASIL, 2006).

1.1.8 Controle

As leishmanioses são doenças de transmissão vetorial e de notificação compulsória, conforme estabelece a Portaria GM/MS Nº 5 de 21 de fevereiro de 2006, sendo endêmicas em vários estados do território Nacional. As intervenções para o controle das leishmanioses requerem ações de vigilância, prevenção e controle que devem ser concentradas entre os setores da saúde animal e da saúde humana e desenvolvidas por equipe profissional multidisciplinar.

A vigilância epidemiológica da LV é um dos componentes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV), coordenado pelo Ministério da Saúde, cujos objetivos são reduzir as taxas de letalidade e grau de morbidade, através do diagnóstico e tratamento precoces dos casos, bem como diminuir os riscos de transmissão, mediante o controle da população de reservatórios e do vetor transmissor. A vigilância da LV compreende a vigilância entomológica, de casos humanos e de casos caninos. A análise da situação epidemiológica indicará as ações de prevenção e controle a serem adotadas (BRASIL, 2009a).

Os programas de vigilância e controle da LV preconizam a realização de inquéritos sorológicos caninos, visando conhecer a situação epidemiológica da doença nas áreas com transmissão ativa ou com potencial de transmissão e, ao mesmo tempo, identificar os cães sorologicamente positivos para posterior eliminação dos mesmos. Entretanto, deve-se enfatizar a importância dos parâmetros sensibilidade e especificidade, frente ao impacto da eliminação do cão devido à metodologia empregada (BRAGA et al., 1998).

Nas investigações sorológicas preconizadas pelo PVC-LV, a prova de ELISA era utilizada para a triagem, enquanto a RIFI, para a confirmação das amostras reveladas positivas pelo ELISA. Entretanto, em dezembro de 2011 o Ministério da Saúde lançou uma nota técnica (ANEXO A) determinando a substituição do

protocolo diagnóstico da LVC, o qual passou a utilizar o teste rápido imunocromatográfico como teste de triagem e o ELISA como teste confirmatório. O novo protocolo foi adotado pelo PVC-LV e vem sendo implantado gradativamente em todos os Estados brasileiros.

A partir de 2007, as ações de educação continuada dos profissionais que atuam nas áreas de diagnóstico, tratamento e controle vetorial, são as estratégias que vem sendo implementadas junto aos DSEI (Distrito Sanitário Especial Indígena) com o objetivo de aumentar a capacidade de resposta e intervenção do nível local no que tange a vigilância e controle das leishmanioses. Em 2010, essas ações foram intensificadas por intermédio do fomento e financiamento de capacitações voltadas especialmente para os DSEI, das regiões centro oeste e norte, que nos últimos anos concentram o maior número de casos de LTA confirmado na população indígena, respectivamente (BRASIL, 2011a).

1.2 BRUCELOSE

Nos itens a seguir serão abordadas informações relevantes sobre características gerais, aspectos clínicos e epidemiológicos da brucelose.

1.2.1 Etiologia

A brucelose é uma doença infectocontagiosa de evolução crônica provocada por uma bactéria intracelular facultativa pertencente ao gênero *Brucella*. Este gênero de bactérias se replica em fagócitos mononucleares do hospedeiro, inibindo os mecanismos extracelulares da resposta imune (SALDARRIAGA; OSSA, 2002).

A brucelose é uma zoonose de distribuição mundial que causa diminuição da eficiência reprodutiva e aborto em espécies domésticas e silvestres. Esta doença produz infecção sistêmica que compromete muitos órgãos e tecidos, apresentando sinais inespecíficos (REDKAR et al., 2001). Além de causar grande impacto

econômico, possui importância na saúde pública e animal, visto que afeta diversas espécies animais e pode ser transmitida também aos seres humanos. Nos animais a doença está relacionada a problemas reprodutivos e no homem geralmente produz quadros de infecção generalizada (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Acredita-se que seja uma das zoonoses mais importantes em todo o mundo, afetando cerca de 500 mil pessoas ao ano e provavelmente um número ainda maior de animais (LÓPEZ-GOÑI; MORIYÓN, 2004).

Devido seu caráter zoonótico, torna-se de primordial importância a identificação das fontes de infecção, a fim de orientar a tomada de decisão para o bloqueio da transmissão ao ser humano e a outros animais susceptíveis (ACHA; SZYFRES, 2001).

Em 1887, David Bruce isolou pela primeira vez uma bactéria do baço de soldados ingleses, mortos na Ilha de Malta, denominando-a *Micrococcus melitensis*. Dez anos mais tarde, Bang isolou do útero e membranas fetais oriundas de abortamento de fêmeas bovinas, um microrganismo que foi denominado *Bacillus abortus*. Em 1918, Alice Evans demonstrou que os microrganismos descritos por Bruce e Bang eram muito semelhantes entre si e, por proposta de Meyer em 1920, foi criado, em homenagem a Bruce, o gênero *Brucella* (HIPOLITO; FREITAS; FIGUEIREDO, 1965; NIELSEN; DUNCAN, 1990).

O agente etiológico da brucelose é uma bactéria intracelular facultativa e gram-negativa, na forma de cocobacilo, não formadora de esporos e imóvel, pertencente ao gênero *Brucella*, classe *Proteobacteria* (REDKAR et al., 2001; PROBERT et al., 2004).

Atualmente, o gênero *Brucella* é composto por dez espécies (CLAVAREAU et al., 1998; FOSTER et al., 2007; SCHOLZ et al., 2008, 2010). Cada espécie de *Brucella* pode infectar diferentes espécies animais, mas elas mostram preferência por um determinado hospedeiro para infecção. Assim, a *Brucella melitensis* é responsável pela brucelose ovina e caprina, sendo considerada a mais patogênica das dez espécies, provocando infecções severas em humanos; a *B. abortus* é o principal agente da brucelose bovina e bubalina e apresenta ampla distribuição mundial; a *B. suis* causa brucelose em suínos, lebres e renas, a *B. canis* é responsável pela brucelose canina, enquanto a *B. ovis* é espécie-específica, sendo

responsável pela epididimite nos ovinos (ALTON et al., 1976; VIZCAÍNO et al., 2000; ACHA; SZYFRES, 2001). As espécies *B. neotomae* e *B. microti* foram isoladas de roedores silvestres, porém, não há relatos de infecções humanas por estas espécies de *Brucella* (CORBEL, 1997; SCHOLZ et al., 2008). *B. ceti* e *B. pinnipedialis*, patogênicas para mamíferos marinhos (CLAVAREAU et al., 1998; FOSTER et al., 2007), já foram associadas a granulomas intracerebrais em pacientes com neurobrucelose (SOHN et al., 2003), osteomielite da coluna vertebral (MCDONALD et al., 2006) e a acidentes laboratoriais (BREW et al., 1999). Recentemente a *B. inopinata* foi isolada de uma infecção de implante de mama de uma paciente com sinais clínicos de brucelose, porém, o hospedeiro animal desta espécie ainda não foi identificado (SCHOLZ et al., 2010).

As brucelas são divididas em dois grupos antigenicamente distintos: as lisas ou clássicas, como a *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* e *Brucella suis*, e as rugosas, como a *Brucella ovis* e a *Brucella canis* (METCALF; LUCHSINGER; RAY, 1994; QUINN et al., 1994; CORBEL, 1997). Esta classificação é baseada na composição do lipopolissacarídeo (LPS) na membrana celular. As lisas possuem lipídeo A, núcleo oligossacáride e cadeia O, já as rugosas possuem apenas lipídeo A e parte do núcleo oligossacáride (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; LAGE et al., 2006). Algumas espécies como a *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* são ainda divididas em biótipos (ALTON et al., 1976; ACHA; SZYFRES, 2001). As espécies de *Brucella* e seus biótipos são diferenciadas de acordo com suas características morfológicas, propriedades metabólicas, antigênicas e de cultivo, sorotipagem, fagotipagem, patogenicidade e preferência de hospedeiro (ALTON et al., 1976; VIZCAÍNO et al., 2000).

A constituição da parede celular das brucelas confere a elas uma resistência importante ao meio ambiente. A associação de presença de umidade, sombreamento e baixas temperaturas aumentam a sobrevivência do agente no meio ambiente, ampliando sua chance de alcançar um novo susceptível. A luz solar direta diminui sua sobrevivência (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Os métodos de pasteurização ou a fervura inativam a bactéria, que também é sensível a vários grupos de desinfetantes químicos (LAGE et al., 2006).

A brucelose causada pela *Brucella canis* constitui uma infecção sistêmica, caracterizada por bacteremia prolongada e caráter zoonótico que acomete os cães. A infecção por *B. canis* é responsável por problemas reprodutivos, como abortamento, falhas de concepção, orquite, epididimite e infertilidade. Sinais clínicos não reprodutivos podem ser observados associados aos tecidos ricos em células reticuloendoteliais e infecções assintomáticas também podem ser observadas (KEID, 2006).

Já foi observada a presença persistente da *B. abortus* em descargas vaginais de cães por tempo superior a 42 dias depois do parto ou abortamento (BAEK et al., 2003). Essa descarga, juntamente com restos de abortos dos cães doentes, é o material de maior risco na transmissão do agente para os próprios cães e outras espécies animais, assim como o homem. Embora possa ocorrer excreção urinária e fecal de *B. abortus* pelos cães, este evento tem pouca importância para a disseminação da doença, em razão da eliminação ser incomum e de curta duração. Além disso, o baixo número de microrganismos presentes nessas vias de eliminação e a resistência dos animais ao número reduzido de microrganismos contribuem para essa hipótese (FORBES, 1990).

1.2.2 Patogenia

O agente invade o hospedeiro pelas mucosas dos tratos digestivo, genital, nasal, conjuntival ou então por soluções de continuidade da pele. Após a penetração no organismo do hospedeiro, as brucelas são fagocitadas por macrófagos e outras células fagocitárias, onde sobrevivem e multiplicam-se, sendo posteriormente transportadas aos linfonodos regionais provocando linfadenopatia periférica. O organismo atinge a circulação sanguínea sucedendo bacteremia e disseminação preferencialmente para tecidos ricos em esteróides gonadais e em células reticuloendoteliais, como baço, fígado, linfonodos, medula óssea, útero de fêmeas gestantes, próstata, epidídimos e testículos (CARMICHAEL; KENNEY, 1970; CARMICHAEL; GREENE, 1990; NIELSEN; DUNCAN, 1990; JOHNSON; WALKER,

1992; QUINN et al., 1994). Nas infecções caninas por *B. canis* o período de bacteremia pode ser prolongado.

Uma vez que a *Brucella* spp é capaz de replicar-se intracelularmente, a resposta imune é predominantemente celular. Embora possa ocorrer uma elevação nos níveis de anticorpos séricos, estes não são protetores e apresentam pouca influência na redução da bacteremia e no número de organismos teciduais (CARMICHAEL; GREENE, 1990). Dentre os elementos da imunidade celular tem destaque os macrófagos, as citocinas tipo Th 1 e as células citotóxicas (SALDARRIAGA; OSSA, 2002).

1.2.3 Epidemiologia

De forma geral infecções por *Brucella* ocorrem mais comumente pelo contato direto com animais infectados, por ingestão, inalação e pela via venérea. Microrganismos podem ser eliminados em produtos de abortamento, descargas vaginais, sêmen, urina, leite e outras secreções (QUINN et al., 1994; ACHA; SZYFRES, 2001).

No Brasil, a brucelose devido a *Brucella abortus* é a infecção brucélica mais prevalente, seguida da *B. suis* e *B. canis*. *B. melitensis* e *B. neotomae* nunca foram isoladas no país (POESTER; GONÇALVES; LAGE, 2002).

Brucelose canina

Em função do estreito convívio estabelecido entre os cães e o homem, a brucelose canina apresenta importância do ponto de vista da saúde pública já que humanos podem se infectar por *B. canis*, quando em contato com animais infectados (CARMICHAEL, 1976; NIELSEN; DUNCAN, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; ACHA; SZYFRES, 2001). Além disso, em canis comerciais, a brucelose canina representa um grande risco, podendo causar problemas econômicos decorrentes de perdas reprodutivas (KEID, 2006).

O caráter zoonótico da infecção foi constatado em 1969, após notificação de casos de infecção em seres humanos ocasionados por acidentes em laboratório, confirmados através de evidências sorológicas e isolamento do agente (MORISSET; SPINK, 1969). Casos de infecção humana por *B. canis* vem desde então sendo descritos, tanto adquiridas em laboratórios como doença ocupacional (GODOY et al., 1979; WALLACH et al., 2004), quanto decorrentes do contato direto com cães infectados (BLANKENSHIP; SANFORD, 1975; LUCERO et al., 2005a; LUCERO et al., 2005b; LUCERO et al., 2010). Há ainda casos de infecção em humanos nos quais a fonte de infecção não foi identificada (POLT et al., 1982; ROUSSEAU, 1985; CARMICHAEL; GREENE, 1990; ANGEL et al., 2012).

No Brasil, a brucelose canina é endêmica e a presença de cães infectados por *Brucella* spp. foi confirmada tanto por investigações que isolaram o agente (KEID et al., 2004; KEID et al., 2007a; KEID et al., 2007c; MEGID et al., 2008; LUCERO et al., 2010), como por inquéritos sorológicos (MORAES, C. C. G. et al., 2002; MORAES, I. A. et al., 2002; AZEVEDO et al., 2003; ALMEIDA et al., 2004; AGUIAR et al., 2005; KEID et al., 2007a; KEID et al., 2007c; MEGID et al., 2008; LUCERO et al., 2010). Foi relatada a detecção molecular de *B. canis* em cães no estado do Mato Grosso (SILVA et al., 2012) e a presença de anticorpos anti-*B. canis* e anti-*B. abortus* em cães no estado do Tocantins (DORNELES et al., 2011), entretanto, são ausentes os estudos em comunidades indígenas destes Estados.

A infecção natural de cães por espécies lisas de *Brucella* é de ocorrência esporádica e resulta do contato estreito de cães, geralmente de zona rural, com bovinos, suínos e caprinos infectados. Os cães infectam-se por ingestão de produtos de origem animal *in natura*, contato ou ingestão de tecidos animais, restos placentários ou de fetos abortados contaminados (AZEVEDO et al., 2003; MIRANDA et al., 2005).

Brucelose suína

Brucella suis é considerada a segunda espécie de *Brucella* mais patogênica aos seres humanos (ACHA; SZYFRES, 2001).

Estudos referentes à prevalência da brucelose suína no país são escassos, sendo descrita sua prevalência de 2,19% em 1981 (GARCIA CARRILO, 1987) e o último relato de 0,34% em um levantamento feito em 2000. A redução da prevalência pode ser atribuída ao aumento do número de ganjas tecnificadas e produções intensivas (POESTER; GONÇALVES; LAGE, 2002). No estado do Mato Grosso, dados sobre a prevalência da brucelose suína são ausentes.

Brucelose bovina

A *Brucella abortus*, reconhecida primeiramente por Bang em 1897 (CARTER; CHENGAPPA, 1991), tem distribuição mundial, concentrando-se principalmente nos países em desenvolvimento da África, América do Sul, Oriente Médio e Ásia (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

De acordo com dados de notificações oficiais, a prevalência de brucelose bovina se manteve entre 4% e 5% no período de 1988 a 1998 (LAGE et al., 2006). No estado do Mato Grosso, o último inquérito sorológico indicou uma alta prevalência de brucelose bovina (10,2%) (NEGREIROS et al., 2009).

1.2.4 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos decorrentes da infecção por *Brucella* dependem tanto da espécie do patógeno como da espécie do hospedeiro acometido. Nas cadelas em fase reprodutiva, os principais sinais clínicos observados são o abortamento no terço final da gestação seguido por secreção vaginal, morte e reabsorção embrionária, altas taxas de natimortalidade ou falha de concepção. O abortamento pode ocorrer principalmente entre os dias 45 e 55 e a secreção vaginal subsequente podem persistir por até seis semanas, podendo apresentar-se mucóide, serosanguinolenta ou purulenta (CARMICHAEL; KENNEY, 1968, 1970; HUBBERT; BECH-NIELSEN; BARTA, 1980; CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992). Após um período de abortamento, estima-se que 85% das fêmeas infectadas podem ter

partos subsequentes normais, disseminando a doença (CARMICHAEL; KENNEY, 1970; CARMICHAEL; GREENE, 1990; KEID, 2006).

Os machos apresentam sinais e lesões em aparelho reprodutor como orquites, epididimites, dermatites da bolsa escrotal, atrofia testicular, prostatites e esterilidade (MOORE; KAKUK, 1969; CARMICHAEL; KENNEY, 1970; SCHOEB; MORTON, 1978; CARMICHAEL; GREENE, 1990; NIELSEN; DUNCAN, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; CARMICHAEL; SHIN, 1996).

Além das manifestações em tecidos reprodutivos, sinais e lesões em outros tecidos podem ser observados, como: linfadenopatia, esplenomegalia (CARMICHAEL; KENNEY, 1968; CURRIER et al., 1982), discoespondilite, osteomielite (SMEAK; OLMSTEAD; HOHN, 1987) e uveíte anterior (RIECKE; RHOADES, 1975; SAEGUSA et al., 1977, 1978). Febre não é um sinal frequente e em alguns casos há a ocorrência de animais infectados assintomáticos, atuando como importantes fontes de infecção (CARMICHAEL; KENNEY, 1968, 1970; CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; WANKE, 2004). Pelagem seca e sem brilho, perda do vigor, letargia, anorexia (RIECKE; RHOADES, 1975), perda de peso, depressão e intolerância ao exercício (CARMICHAEL; KENNEY, 1968) foram descritos, porém, estes sinais não se manifestam na maioria dos casos, (CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; WANKE, 2004).

Nos humanos, os principais sinais clínicos observados são: febre prolongada, fadiga, aumento do volume dos linfonodos (CARMICHAEL; GREENE, 1990), tosse, dores articulares (GODOY et al., 1979), perda de peso (CARMICHAEL; GREENE, 1990; MUNFORD et al., 1975), cefaléia, náuseas, sudorese noturna (CARMICHAEL, 1990; ROXO et al., 1990), mialgia e depressão (ROXO et al., 1990). Endocardite, meningite, artrite, hepatite e abscessos viscerais (CARMICHAEL; GREENE, 1990) são complicações mais raramente observadas (HARTIGAN, 1997).

1.2.5 Diagnóstico

A identificação dos cães doentes é importante, pois esses animais constituem fontes de infecção, uma vez que podem eliminar o agente no ambiente por secreções vaginais, por fetos abortados, por ejaculados, pela urina ou pelas fezes. A presença de sinais clínicos pode sugerir infecção por brucella. Contudo, é importante ressaltar que uma porcentagem considerável dos cães infectados é assintomática, o que torna o diagnóstico laboratorial essencial para a confirmação (FORBES, 1990).

O diagnóstico da brucelose se baseia na presença de sinais clínicos como relatos de abortamento no terço final da gestação, falhas na concepção, epididimite, atrofia testicular, dermatite escrotal, discoespondilite e uveíte, associados aos métodos laboratoriais indiretos e diretos para a confirmação da suspeita clínica (CARMICHAEL; GREENE, 1990; JOHNSON; WALKER, 1992; WANKE, 2004).

Os testes laboratoriais indiretos rotineiramente utilizados para o diagnóstico da brucelose animal no Brasil identificam anticorpos específicos presentes no soro sanguíneo dos animais infectados (ALTON et al., 1976) e são baseados principalmente em antígenos de superfície bacteriana, compostos por lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas de membrana externa (KEID, 2006). Reações inespecíficas podem ser observadas, decorrentes do compartilhamento de epítomos presentes na brucelas rugosas com outros gêneros bacterianos, como *Bordetella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Francisella*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Pasteurella* e *Yersinia* (CARMICHAEL et al., 1984; CORBEL et al., 1984). O teste sorológico disponível no Brasil para o diagnóstico da brucelose canina causada pela *B. canis* é o teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), caracterizado por elevada especificidade, mas baixa sensibilidade diagnóstica especialmente na fase inicial da infecção (KEID, 2006).

Para o sorodiagnóstico de infecção por brucelas lisas como a *B. abortus*, utiliza-se o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), que apresenta alta sensibilidade e é de fácil execução, constituindo o teste de triagem. O AAT pode apresentar baixa especificidade, de forma que os animais que reagirem a esse teste poderão ser submetidos a um teste confirmatório, o 2-mercaptoetanol (2-ME), de

elevada especificidade. Este é o esquema preconizado para o diagnóstico da brucelose bovina e bubalina no Brasil, pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (LAGE et al., 2006). O diagnóstico da brucelose suína causada pela *B. suis* no Brasil também é baseado nos testes de AAT e 2-ME. Estes testes podem ser utilizados para o diagnóstico da brucelose nos cães causada por brucelas lisas, contudo seus valores de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da brucelose nesta espécie animal não foram determinados.

Em razão dos problemas de sensibilidade e especificidade observados nos testes sorológicos aplicados ao diagnóstico da brucelose nos cães, o diagnóstico definitivo da infecção deve basear-se sempre na associação de métodos indiretos com métodos diretos de diagnóstico, como o isolamento bacteriano e a reação em cadeia pela polimerase (WOOLEY et al., 1978; MELO et al., 1997; KEID, 2001).

O cultivo bacteriológico permite a detecção específica do agente etiológico da brucelose, sendo considerado um método diagnóstico definitivo. Porém, o isolamento e a identificação bacteriana demandam tempo e impõem riscos decorrentes da manipulação bacteriana, além de apresentarem dificuldades pela contaminação das amostras por outros microrganismos (ALTON et al., 1976; GODOY et al., 1979; SEWELL, 1995).

A PCR vem sendo empregada como instrumento para o aprimoramento do diagnóstico da brucelose em diversas espécies animais e no homem, por apresentar maior sensibilidade em relação aos métodos bacteriológicos e alta especificidade pela utilização de *primers* específicos. Além disso, pode ser empregada para a detecção de *Brucella* em vários tipos de amostras biológicas provenientes de diversas espécies hospedeiras (MORATA et al., 1999, 2001; CORTEZ et al., 2001; KEID, 2001; TANTILLO et al., 2001; ZERVA et al., 2001). Considerando sua rapidez de execução em relação ao cultivo bacteriológico, a PCR tem sido uma alternativa promissora ao diagnóstico direto de organismos de crescimento lento (BRICKER, 2002; AL DAHOUK et al., 2003).

1.2.6 Controle

O objetivo das medidas de controle e erradicação é interromper a transmissão da doença com ações específicas dirigidas as fontes de infecção, as vias de transmissão e os animais susceptíveis e medidas inespecíficas aplicadas à movimentação de animais e eventualmente de reservatórios domésticos, sinantrópicos e/ou silvestres (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

Considerando o caráter zoonótico da brucelose canina associado à estreita relação entre cães e homens, torna-se importante tomar medidas preventivas para evitar a transmissão da doença para os seres humanos, assim como para outros animais. A transferência indevida de reprodutores ou a aquisição de animais com histórico clínico desconhecido pode representar um risco para os tratadores de animais de canis comerciais como também para os proprietários de animais. Além disso, o contato direto com produtos oriundos de abortamento deve ser evitado (HOLLETT, 2006).

O controle e profilaxia da *Brucella canis* em populações de cães envolve alguns procedimentos como a confirmação do diagnóstico através de testes sorológicos e bacteriológicos, quarentena, identificação e eliminação dos animais infectados além da implantação de práticas para a prevenção de futuros surtos (JONES; EMERSON, 1984; PICKERILL; CARMICHAEL, 1972; JOHNSON; WALKER, 1992).

2 JUSTIFICATIVA

No estado do Mato Grosso (MT), o primeiro relato de leishmaniose em humanos ocorreu em 1973 (BARUFFA; CURY, 1973), no entanto, a disseminação da doença para várias cidades do Estado foi observada em 1998 (MESTRE; FONTES, 2007). Em 2011, 330 casos de leishmaniose visceral humana foram registrados no Centro-Oeste, sendo 50 casos ocorridos no estado do Mato Grosso (BRASIL, 2011b).

O estado do Mato Grosso localiza-se na região Centro-Oeste do Brasil e a maior parte de seu território é ocupada pela Amazônia Legal. Abrange uma área de 903.366,192 km² e Cuiabá é a sua capital. Dos 141 municípios que o constitui, 66 (46,8%) possuem áreas indígenas que juntas ocupam uma extensão territorial de 20.116.036 hectares (MATO GROSSO, 2003). Algumas dessas áreas indígenas encontram-se em processo de regularização, em estudo ou em identificação. De acordo com o censo demográfico do IBGE (2010), a população indígena do Mato Grosso é de aproximadamente 42.525 índios, distribuída em 75 terras indígenas diferentes (MATO GROSSO, 2010). De acordo com os dados da Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado de Saúde (SES) do Mato Grosso, no período de 2006 a 2008 foram notificados oficialmente 9.570 casos de LT (4.916 em 2006, 2.590 em 2007 e 2.064 em 2008) e 106 casos de LV (21 em 2006, 32 em 2007 e 53 em 2008) no estado do Mato Grosso. Os casos indígenas de LT notificados foram 95 em 2006, 136 em 2007 e 86 em 2008, totalizando 317 casos, dos quais, três ocorreram no município de Confresa. Apenas um caso de LV indígena foi notificado no Estado e ocorreu no ano de 2006.

O estado do Tocantins (TO), localizado na região Norte do país, possui uma população estimada em 1.383.445 habitantes distribuídos em 139 municípios, onde, na maioria deles, a população não ultrapassa 10.000 habitantes em uma área de 277.720,520 km² (IBGE, 2010). Só em reservas indígenas, totalizam-se 2 milhões de hectares protegidos, onde uma população de 11.560 indígenas preserva suas tradições, seus costumes e crenças. No Tocantins existem sete etnias (Karajá, Xambioá, Javaé, Xerente, Krahô Canela, Apinajê e Pankararú), distribuídas em 82 aldeias. O Estado abriga a maior ilha fluvial do mundo, a Ilha do Bananal, um espaço

de 20 mil quilômetros quadrados de extensão, considerado um dos santuários ecológicos mais importantes do país, onde convivem os ecossistemas de cerrado e floresta Amazônica (TOCANTINS, 2011).

Nos últimos anos, o Tocantins tem apresentado elevados índices de LV, tendo sido notificada, entre os anos de 1999 e 2002, em 80 municípios, o que corresponde a quase 60% dos municípios do Estado, sendo a terceira doença vetorial com maior registro de casos em Tocantins, a primeira é a dengue e a segunda a LT (TOCANTINS, 2004). No período de 2004 a 2008, foram registrados 1.407 casos de LV e 2.433 casos de LT no Tocantins, o que corresponde a respectivamente 41% e 5% dos casos registrados na Região Norte. O Tocantins está entre os 10 estados com maior registro de casos de LV e a letalidade média neste período foi de 6,5% (BRASIL, 2009b). Em 2009, foram confirmados 428 casos novos de LV, distribuídos em 37% dos municípios e 591 casos novos de LT, distribuídos em 71% dos municípios (BRASIL, 2011c).

Em função do estreito convívio estabelecido entre os cães e o homem, a brucelose canina apresenta importância do ponto de vista da saúde pública já que humanos podem se infectar por *B. canis*, quando em contato com animais infectados. A identificação dos cães doentes é importante, pois esses animais constituem fontes de infecção, uma vez que podem eliminar o agente no ambiente por secreções vaginais, por fetos abortados, por ejaculados, pela urina ou pelas fezes.

Existem relatos recentes da ocorrência de brucelose canina nos estados do Mato Grosso (SILVA et al., 2012) e Tocantins (DORNELES et al., 2011), entretanto, são inexistentes os estudos em comunidades indígenas no Brasil.

Os índios da etnia Tapirapé possuem cães que são criados soltos nas aldeias e que em grande parte das vezes são empregados para auxiliá-los em atividades de caça. Da mesma maneira, os índios da etnia Karajá também criam cães como os tapirapés, porém não os utilizam em atividades de caça, pois a principal fonte alimentar da etnia Karajá provém de pescados. Nada se sabe a respeito das condições sanitárias destes animais, o que é particularmente preocupante, haja vista o estreito convívio registrado entre populações caninas e humanas neste meio. Como é sabido, cães podem desempenhar um papel importante na cadeia epidemiológica de infecções causadas por diversos agentes transmissíveis.

São escassas as informações a respeito dos possíveis agentes zoonóticos que afetam os animais em aldeias indígenas e nos sistemas de produção da agricultura familiar amazônica. Mesmo que determinadas afecções sejam bem conhecidas em outros ecossistemas, é bem provável que o ambiente amazônico possua especificidade etiológica e epidemiológica particulares. Portanto, acompanhar a evolução de determinadas enfermidades em regiões como fronteiras agrícolas amazônicas representa uma grande contribuição científica.

Apesar de existirem vários relatos sobre a ocorrência de agentes zoonóticos em cães de diversas regiões do Brasil, são poucos os trabalhos realizados em cães nos estados do Mato Grosso e do Tocantins e mais escassos ainda os registros de ocorrência de doenças em cães de aldeias indígenas brasileiras destes Estados. A falta de conhecimento dos profissionais de saúde para a possível existência destas zoonoses no país acaba negligenciando casos positivos.

Pelo exposto, entende-se que é particularmente importante e desejável a realização de inquéritos diagnósticos visando o conhecimento do estado sanitário e grau de exposição a agentes zoonóticos de cães residentes nas aldeias das etnias Tapirapé e Karajá, assim como o acometimento dos humanos das mesmas etnias, já que estudos desta magnitude são escassos ou ausentes em comunidades indígenas.

3 OBJETIVOS

- Determinar a frequência da infecção por *Leishmania* spp. na população indígena das aldeias da etnia Tapirapé;
- Determinar a frequência da infecção por *Brucella* spp. na população indígena das aldeias da etnia Tapirapé;
- Determinar a frequência da infecção por *Leishmania* spp. na população canina das aldeias indígenas das etnias Tapirapé e Karajá;
- Determinar a frequência da infecção por *Brucella* spp. na população canina das aldeias indígenas de etnias Tapirapé e Karajá;

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste item serão apresentadas características do local e das populações abordadas, período de realização das coletas e descritas as metodologias utilizadas para o desenvolvimento deste estudo.

4.1 POPULAÇÕES ABORDADAS E COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

4.1.1 Local do Estudo

O local do estudo compreende duas áreas indígenas distintas, a Terra Indígena Tapirapé e a Terra Indígena Karajá, ambas localizadas em reservas indígenas regularizadas (Figura 1).

A Terra Indígena Tapirapé, localizada no município de Confresa (S 10°38'57.0"/ W 51°34'12.6"), estado do Mato Grosso, abrange sete aldeias: Urubu Branco (S 10°40'16.1" /W 51°21'13.8"), Sapeva (S 10°48'12.2"/W 51°17'12.8"), Córrego da Onça (S 10°42'27.5"/W 51°18'49.0"), Buriti II (S 10°39'33.6"/W 51°17'41.2"), Codebra (S 10°52'09.6"/W 51°15'37.8"), Xexéu (S 10°51'20.6"/W 51°18'19.8") e Santa Laura (S 10°36'23.9"/W 51°10'47.9").

Na Terra Indígena Karajá foram contempladas as aldeias Majtyri (S 10°39'15.36"/ W 50°36'10.39"), Itxala (S 10°37'30.97"/ W 50°37'30.73") e Hawalora (S 10°38'26"/ W 50°37'20"), situadas no município de Santa Terezinha (S 17°32'00.00"/ W 56°53'00.00"), estado do Mato Grosso e a aldeia Macaúba (S 10°28'18"/ W 50°28'59"), situada na Ilha do Bananal, estado do Tocantins.

Figura 1 – Mapa de localização das aldeias pertencentes às terras indígenas Tapirapé (à esquerda) e Karajá (à direita)

4.1.2 Período de Realização das Coletas

A pesquisa foi conduzida em dois períodos distintos, compreendendo os meses de Setembro de 2010 e Maio de 2011. Na primeira campanha foram abordados todos os cães da Terra Indígena Tapirapé e uma parte dos cães da Terra Indígena Karajá, na qual foram obtidas amostras de soro desses animais para realização de provas sorológicas. Na segunda campanha, o restante dos cães da Terra Indígena Karajá foi abordado para coleta de sangue e para realização de punção de linfonodo poplíteo. Além disso, os cães amostrados na primeira campanha que apresentaram sorologia positiva para algum dos agentes estudados também tiveram seus linfonodos poplíteos puncionados para diagnóstico direto. Ainda na segunda campanha foram coletadas amostras de sangue de todos os humanos habitantes da Terra Indígena Tapirapé para realização de provas sorológicas.

4.1.3 População Humana

A etnia Tapirapé conta com uma população de 655 indivíduos (IBGE, 2010) habitando os municípios de Confresa e Santa Terezinha, ambos no estado do Mato Grosso. Neste estudo foram investigados 470 indivíduos, número que representa todos os humanos com idade superior a três anos, habitantes da Terra Indígena Tapirapé em Confresa, presentes nas aldeias durante as campanhas.

4.1.4 População Canina

Foram analisados 114 cães residentes nas aldeias da Terra Indígena Tapirapé e 213 cães das aldeias da Terra Indígena Karajá, totalizando 327 animais. Este número representa todos os cães, entre jovens e adultos de ambos os sexos, habitantes e presentes nas aldeias durante as campanhas.

4.1.5 Colheita de Sangue

As amostras de sangue foram colhidas através de punção intravenosa dos humanos e dos cães, sendo estes identificados através de microchips implantados na região dorsal entre as escápulas. Tanto para os humanos quanto para os cães foi aplicado um questionário com informações sobre idade, sexo e hábitos de caça. A colheita foi realizada de forma asséptica em duas alíquotas, utilizando tubos de ensaio estéreis, sendo um com adição e outro sem adição de anticoagulante (EDTA). Em seguida, o soro foi obtido a partir da alíquota de sangue sem anticoagulante, por meio de centrifugação a 5000 rpm durante 10 minutos, e alíquotado em microtubos de polipropileno (tipo eppendorf) previamente identificados e mantidos congelados a 20°C negativos até as análises. O sangue total dos cães, colhido com anticoagulante, foi estocado a 20°C negativos e empregado para o diagnóstico de brucelose por técnicas moleculares.

A colheita de sangue dos humanos foi realizada com a colaboração de técnicos em enfermagem da Secretaria de Saúde do Município de Confresa.

4.2 PESQUISA DE LEISHMANIOSE

Os métodos diagnósticos utilizados para pesquisa de ocorrência de leishmanioses serão descritos nos itens a seguir.

4.2.1 Diagnóstico Sorológico

Para o sorodiagnóstico das amostras dos humanos, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foi realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), utilizando como antígeno formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* fixados em lâmina.

Para as amostras dos cães, foram realizadas as seguintes provas:

- a) Reação Imunoenzimática (ELISA), realizada no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina (FM) da USP, onde utilizou-se antígeno total de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis*;
- b) ELISA, realizado no Laboratório de Immunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), onde foi utilizado antígeno solúvel de *Leishmania (L.) chagasi*;
- c) RIFI, realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias do VPS, FMVZ, USP, utilizando como antígeno formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* fixadas em lâmina;

- d) RIFI, realizada no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV, UNESP, onde foram utilizadas formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* fixadas em lâmina.

Os métodos realizados serão citados no decorrer do texto de acordo com o local da realização dos mesmos. Assim, temos: ELISA FM-USP, ELISA FCAV-UNESP, RIFI FMVZ-USP e RIFI FCAV-UNESP.

4.2.1.1 ELISA FM-USP

L. (L.) chagasi, cepa MHOM/BR/72/cepa46 foi isolada de caso humano e caracterizada por anticorpos monoclonais (SHAW et al., 1989) e isoenzimas (MILES et al., 1980) no Instituto Evandro Chagas e mantida em hamsters com repiques a cada 2-3 meses. Para a produção de antígenos, os parasitas foram isolados em meio de cultura Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2% de urina humana, 10 µg/mL de gentamicina e 100 UI/mL de penicilina, a partir de baço de hamster cronicamente infectado. Após duas a três passagens em cultura, as formas promastigotas em fase estacionária de cultivo foram então lavadas três vezes em solução salina tamponada (PBS) estéril, através de centrifugação a 3.000 rpm à 4°C, em centrífuga refrigerada (Eppendorf, Modelo 5804R, USA) durante 10 minutos e estocadas em freezer a 80°C negativos na forma de precipitado no fundo do tubo.

Para a preparação do antígeno, o precipitado contendo as formas promastigotas foi congelado em nitrogênio líquido e descongelado em temperatura ambiente por três vezes consecutivas e em seguida sonicado em potência 4 em 1 ciclo de 1 minuto (Sonic Desmembrator, Fisher Scientific, USA). Uma alíquota do produto total foi utilizado para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*, Hercules, USA). Após a dosagem de proteínas, foram feitas alíquotas para que se evitassem congelamentos e descongelamentos sucessivos do antígeno, evitando possível ação de proteases.

A mesma técnica foi empregada com o agente *L. (L.) amazonensis*, cepa MHOM/BR/73/M2269, isolada de caso humano e caracterizada por anticorpos

monoclonais (SHAW et al., 1989) e isoenzimas (MILES et al., 1980) no Instituto Evandro Chagas.

Após os antígenos serem obtidos realizou-se a técnica de ELISA, segundo descrito por Colombo et al. (2011).

1. Microplacas de poliestireno de fundo plano de 96 poços foram sensibilizadas com um volume de 100 µL de antígeno total de promastigotas de *L. (L.) chagasi* nas concentrações de 10 µg/mL de proteína, em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,5, e incubadas em câmara úmida durante a noite a 4°C;
2. As placas foram lavadas três vezes com 200 µL por poço de solução tampão fosfato 0,15M pH 7,2 contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T);
3. O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com solução de leite em pó desnatado a 10% em PBS-T (200 µL por poço) e as placas incubadas em câmara úmida durante 2 horas a 37°C;
4. As placas foram lavadas novamente três vezes com PBS-T;
5. Amostras dos soros teste, assim como dos soros sabidamente positivos e negativos foram adicionadas à placa, em duplicata, no volume de 100 µL por poço, na diluição de 1:400 em PBS-T e incubadas a 37°C durante 1 hora em câmara úmida;
6. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T;
7. Conjugado anti-IgG (A40-123P – Bethyl, USA) de cão ligado à peroxidase foi adicionado no volume de 100 µL por poço, nas diluições de 1:80000 em PBS-T, sendo as placas incubadas a 37°C, durante 45 minutos em câmara úmida;
8. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T;
9. O revelador contendo o substrato e o cromógeno (TMB 555214 - BD) foi adicionado no volume de 100 µL por poço e incubado a 37°C por 30 minutos no escuro;
10. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2N – 50 µL por poço, sendo a leitura da absorbância feita em filtro de 450 nm.

O mesmo procedimento foi realizado para testar as amostras para o antígeno *L. (L.) amazonensis*.

Os resultados foram expressos pela densidade óptica (D.O.) média obtida das amostras testadas em duplicata e aquelas que apresentaram D.O. média maior ou igual ao ponto de corte foram consideradas positivas. O ponto de corte foi estabelecido pela D.O. média dos soros controles negativos somada a três desvios-padrão.

4.2.1.2 ELISA FCAV-UNESP

O teste de ELISA indireto para *L. (L.) chagasi* foi realizado de acordo com técnica descrita por Machado et al. (1997) para *Babesia bovis*, com pequenas modificações descritas por Oliveira et al. (2008).

A amostra de *L. (L.) chagasi* foi isolada de aspirado de medula óssea de cão naturalmente infectado, e caracterizada através de métodos moleculares (CORTES et al., 2004; ANDRADE et al., 2006). Os parasitas foram cultivados em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor e após duas a três passagens, as formas promastigotas em fase estacionária de cultivo, foram centrifugadas a 735 x g, por dez minutos, e o sobrenadante, descartado. Posteriormente, os parasitas foram submetidos a duas lavagens com meio RPMI incompleto e uma lavagem com tampão de homogeneização (Sacarose 0,25 M, EDTA 1 mM, Tris-HCl 5mM) e contados em câmara de Neubauer para atingirem a concentração de 2×10^6 promastigotas/mL. Após a contagem, foram ressuspensos em tampão de homogeneização e armazenados a 70° C negativos.

A suspensão de parasitas armazenada foi então submetida a sete ciclos de congelamento à 70° C negativos, seguidos de descongelamento à 37° C. A suspensão resultante foi centrifugada a 12.000 x g, durante 30 minutos à 4° C e alíquotas de 500µL do sobrenadante foram congeladas a 70° C negativos até o momento do uso. O conteúdo protéico do antígeno solúvel foi determinado pelo método do ácido bicinônico, utilizando-se o “Kit” de reagentes BCA (BCA Reagents Kit-Pierce Chemical Company), de acordo com as recomendações do fabricante.

Após obtenção do antígeno, prosseguiu-se da seguinte maneira:

1. Microplacas de fundo plano (Nuncclon TM Surface, Nunc. Denmark) foram sensibilizadas com 100µL do antígeno solúvel de *L. (L.) chagasi*, diluído na concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6 e incubadas por 8 a 10 horas em câmara úmida à 4°C;
2. Após incubação das microplacas, o excesso de antígeno foi removido por três lavagens consecutivas, com tampão PBS 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween 20);
3. As microplacas foram bloqueadas com PBS-Tween 20, acrescido de 6% de leite em pó, em câmara úmida, a 37°C por 90 minutos;
4. Após o bloqueio, as microplacas foram novamente lavadas três vezes com PBS-Tween 20;
5. Foram adicionados em cada cavidade das placas, 100 µL dos soros a serem testados e dos soros controle positivo e negativo na diluição 1: 400 em PBS-Tween 20, com 5% de leite em pó desnatado;
6. As microplacas foram novamente incubadas a 37°C por 90 minutos;
7. As microplacas foram lavadas três vezes, como descrito anteriormente;
8. 100 µL do conjugado canino acoplado a fosfatase alcalina (IgG de coelho anti-IgG de cão, Sigma A-0793), diluído 1:4000 em PBS-Tween 20, acrescido de 5% de soro de coelho, foram adicionados a cada cavidade das placas;
9. As placas foram incubadas por 90 minutos à 37°C;
10. Prosseguiu-se com três lavagens como descrito anteriormente;
11. Adicionou-se em cada cavidade das placas 100 µL do substrato da enzima fosfatase alcalina (paranitrofenilfosfato diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8; Sigma N-9389);
12. A reação foi incubada por 45 minutos no escuro à temperatura ambiente;
13. Decorrido esse período, a leitura da reação foi realizada em um leitor de microplacas de ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex Technology), a um comprimento de onda de 405 nm.

Os resultados foram expressos pela densidade óptica (D.O.) obtida das amostras testadas e aquelas que apresentaram D.O. maior ou igual ao ponto de corte foram consideradas positivas. O ponto de corte foi calculado multiplicando a D.O. média dos soros controles negativos por 2,5.

4.2.1.3 RIFI FMVZ-USP

A partir de linfonodo poplíteo de cão naturalmente infectado, foi isolada *L. (L.) chagasi*, cepa CBT 20, caracterizada por sequenciamento genético no laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ da USP. O isolamento foi feito em meio de cultura bifásico composto por uma base de ágar-sangue com 15% de sangue de carneiro desfibrinado e meio líquido LIT (Liver infusion Tryptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2% de urina humana, 10 µg/mL de gentamicina e 100 UI/mL de penicilina. Após duas a três passagens em cultura, as formas promastigotas em fase estacionária de cultivo foram então lavadas três vezes em PBS estéril, através de centrifugação a 3.000 rpm à 4°C. O precipitado no fundo do tubo foi ressuspensionado em solução de formalina tamponada 2% e mantido à 4°C por 24 horas. Após a fixação das formas promastigotas, estas foram novamente lavadas em PBS estéril, e então contadas em câmara de Neubauer. A concentração de parasitas foi ajustada para 2×10^6 promastigotas/mL e aplicou-se 20 µL por poço nas lâminas de imunofluorescência. Estas lâminas foram secas à temperatura ambiente e então armazenadas a 20°C negativos.

A mesma metodologia foi utilizada com as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa IFLA/BR/1967/PH8, cedida pelo Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose da Fundação Oswaldo Cruz, pertencente à Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), para produção do antígeno.

Após a obtenção do antígeno a técnica foi realizada conforme descrito por Zanette et al. (2013):

1. As lâminas previamente sensibilizadas para *L. (L.) chagasi* foram descongeladas à temperatura ambiente;
2. Preparou-se as diluições dos soros a serem testados e dos soros controle positivo e negativo de origem canina, previamente conhecidos e utilizados na rotina do Laboratório, em PBS 7,2, considerando-se a diluição de 1:40 como ponto de corte;
3. Com as lâminas já secas, foram adicionados em cada poço das mesmas, 20µL dos soros a serem testados diluídos, assim como controles positivo e negativo;

4. O material foi incubado por 30 min a 37°C em câmara úmida;
5. Em seguida as lâminas foram lavadas com PBS 7,2, durante 5 minutos, por três vezes consecutivas em uma cuba de vidro;
6. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e em cada poço foram acrescentados 20µL do conjugado (anti-IgG canino marcado com isotiocianato de fluoresceína – Sigma F7884), utilizado na diluição de 1:200 em solução de PBS 7,2 contendo Azul de Evan 0,04%;
7. O material foi novamente incubado por 30 min, a 37°C;
8. As lâminas foram novamente lavadas com PBS 7,2 como descrito anteriormente;
9. Após a secagem à temperatura ambiente, realizou-se a montagem com lamínula utilizando-se glicerina tamponada (pH 8,0) e as lâminas foram lidas imediatamente em microscópio equipado para fluorescência no aumento de 40X.

O mesmo procedimento foi realizado para testar as amostras para *L. (L.) amazonensis*, assim como para análises das amostras de soro de origem humana, substituindo o conjugado por um anti-IgG humano marcado com isotiocianato de fluoresceína (Invitrogen LH10101).

O resultado foi considerado positivo quando houve fluorescência em todo o contorno do parasita. As amostras séricas positivas na diluição de 1:40 foram novamente testadas em diluições sucessivas. A titulação dos soros positivos foi realizada a partir da diluição de 1:40, base 2, até apresentarem perda de fluorescência.

4.2.1.4 RIFI FCAV-UNESP

O protocolo utilizado para o preparo de antígeno total de promastigotas de *L. (L.) chagasi* para a RIFI foi descrito por Oliveira et al. (2008).

As formas promastigotas foram mantidas em meio de cultura RPMI, pH 6,8, à 26°C, até atingirem a fase estacionária de cultivo, quando então passaram por três lavagens com PBS. Após a terceira lavagem, o precipitado no fundo do tubo foi

ressuspendido em uma solução de paraformaldeído a 4%, por 30 minutos, para a fixação dos parasitas. Após a fixação, os parasitas foram novamente lavados por três vezes com PBS, e o sedimento contendo parasitas foi ressuspendido nesta mesma solução até a concentração de 3×10^6 parasitos por mL. Adicionou-se 10 μ L por poço nas lâminas de imunofluorescência. Estas lâminas foram secas à temperatura ambiente e então armazenadas a 20°C negativos até o momento do uso.

1. As lâminas previamente sensibilizadas foram retiradas do freezer e descongeladas à temperatura ambiente;
2. Em cada pocinho contendo o antígeno, adicionou-se 10 μ L de cada soro teste diluído na concentração de 1:40, assim como os controles positivo e negativo;
3. As lâminas foram então incubadas em câmara úmida a 37°C, por 30 minutos;
4. Após incubação, as lâminas foram submetidas a lavagens em PBS por imersão, durante cinco minutos, por três vezes consecutivas;
5. Após secagem à temperatura ambiente, foram adicionados 10 μ L do anticorpo anti-IgG de cão conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (Sigma F7884), diluído a 1:32, em solução de PBS, contendo azul de Evans 0,01%.
6. As lâminas foram novamente incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos;
7. Em seguida, lavadas conforme descrito anteriormente;
8. Após a secagem à temperatura ambiente, realizou-se a montagem com lamínula utilizando-se glicerina tamponada a uma relação de 9:1 de glicerina/tampão carbonato-bicarbonato 0,5M pH 9,6 e então as lâminas foram lidas imediatamente em microscópio equipado para fluorescência no aumento de 40X.

Após a leitura das lâminas, foram consideradas positivas as reações com fluorescência em todo o contorno da forma promastigota do parasita, a partir da diluição 1:40. As amostras séricas positivas na diluição de 1:40 foram novamente testadas em diluições sucessivas. A titulação dos soros positivos foi realizada a partir da diluição de 1:40, base 2, até apresentarem perda de fluorescência.

4.2.2 Diagnóstico Parasitológico

4.2.2.1 Esfregaço em lâmina

O diagnóstico parasitológico direto foi feito através de punção aspirativa por agulha fina (20 X 5,5mm) de linfonodo poplíteo, coloração do aspirado pelo panótico rápido e observação de formas amastigotas em microscopia óptica comum com objetiva de 100X. Este método foi empregado apenas nos animais abordados durante a primeira campanha que se revelaram positivos pelo ELISA da FM-USP e ainda se encontravam nas aldeias durante a segunda campanha deste experimento.

4.2.2.2 Isolamento do agente

Os animais abordados na primeira campanha que apresentaram resultado reagente pela técnica de ELISA da FM-USP, bem como todos os outros animais amostrados na segunda campanha tiveram o material do linfonodo poplíteo puncionado por agulha fina (20 X 5,5mm) e semeado em meio de cultura bifásico composto por uma base de ágar-sangue (15% de soro de carneiro desfibrinado) mergulhada em meio líquido LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor e adição de 10 µg/mL de gentamicina e 100 UI/mL de penicilina para tentativa de isolamento do agente. O material semeado foi analisado por microscopia óptica comum com objetiva de 40X a cada três dias durante 30 dias.

A fim de evitar contaminação do meio de cultura, a punção de linfonodo foi realizada de forma asséptica com uso de álcool 70% para adequada esterilização da área a ser coletada.

4.3 PESQUISA DE BRUCELOSE

As metodologias utilizadas para o diagnóstico de brucelose serão descritas nos itens abaixo.

4.3.1 Diagnóstico Sorológico

Para o sorodiagnóstico em humanos, foi realizada a prova do antígeno acidificado tamponado (AAT) para detecção de anticorpos anti-*Brucella* lisa. O antígeno utilizado na prova de soroaglutinação com AAT consiste de uma suspensão celular inativada da estirpe 1119-3 de *B. abortus*, na concentração de 8,0% e pH 3,65, corada pelo Rosa Bengala (ALTON et al., 1976). O antígeno para realização do teste do AAT foi produzido pelo Instituto Biológico de São Paulo (Instituto Biológico, São Paulo, Brasil).

Para o sorodiagnóstico em cães, duas provas foram realizadas: a prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) para detecção de anticorpos anti-*Brucella* rugosa e o teste do AAT para detecção de anticorpos anti-*Brucella* lisa.

O antígeno a ser empregado na prova de IDGA (MYERS; VARELA-DÍAZ; COLTORTI, 1974) consistiu de proteínas e lipopolissacarídeos solúveis, extraídos da amostra Reo 198 de *Brucella ovis*, sendo produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar, Curitiba, Brasil). A prova foi realizada e interpretada de acordo com as recomendações do laboratório produtor.

4.3.2 Reação em Cadeia pela Polimerase

A PCR foi realizada em todas as amostras de sangue total colhidas. A extração de DNA de sangue foi realizada utilizando-se o protocolo de lise enzimática seguida de purificação com solventes orgânicos (fenol/clorofórmio).

A amplificação de ácidos nucleicos foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores ITS66 e ITS279, direcionados à região interespaçadora (ITS) do gene codificador do RNA ribossomal de *Brucella*, os quais são capazes de amplificar fragmentos de DNA de 214 pb de qualquer componente do gênero *Brucella*. A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores pode ser visualizada na tabela 1.

Tabela 1 - Sequência dos primers empregados para o diagnóstico de brucelose canina, direcionados à região interespaçadora (ITS) do gene codificador do RNA ribossomal de *Brucella* spp.

PRIMERS	SEQUÊNCIA
ITS66	5´ACA TAG ATC GCA GGC CAG TCA 3´
ITS279	5´AGA TAC CGA CGC AAA CGC TAC 3´

A extração de ácidos nucleicos foi realizada nas 327 amostras de sangue canino colhidas, empregando-se o protocolo descrito por Keid et al. (2007c), baseado em lise enzimática com proteinase K e purificação com solventes orgânicos (fenol/clorofórmio), conforme descrito abaixo:

- Misturar 500 µL de sangue total com 500 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0);
- Agitar em vórtex durante 10 segundos;
- Centrifugar 12.000 x g durante 5 minutos;
- Descartar o sobrenadante;
- Adicionar 1000 µL de TE pH 8,0;
- Agitar em vórtex durante 10 segundos;
- Centrifugar 12.000 x g durante 5 minutos;
- Descartar o sobrenadante;
- Repetir o procedimento até que o sobrenadante e o sedimento apresentem coloração clara;
- Ressuspender o sedimento obtido em solução de lise (Tris-HCl pH 8,0 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM, pH 8,0; dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%; 10µL

proteínase K a 20mg/mL) completando-se o volume para 500 µL utilizando-se água ultrapura;

- Incubar em termobloco (Thermo-mixer Comfort 5355 Eppendorf, Germany) a 37°C por 24 horas sob agitação por 15 segundos a 1400 rpm, a cada 15 minutos;
- Adicionar 70 µL de NaCl 5M;
- Agitar em vórtex durante 10 segundos;
- Adicionar 65 µL de solução de 10% CTAb/ 0,7M NaCl;
- Incubar a 65°C durante 15 minutos;
- Adicionar 635 µL de clorofórmio;
- Agitar em vórtex durante 10 segundos;
- Centrifugar 12.000 x g durante 10 minutos;
- Transferir a fase aquosa (400 µL) para um novo microtubo com capacidade de 1500µL, tomando-se o cuidado de não aspirar a interfase orgânica;
- Adicionar 400 µL de fenol-clorofórmio;
- Agitar por 10 segundos em vórtex;
- Centrifugar 12.000 x g durante 5 minutos;
- Transferir a fase aquosa (300 µL) para um novo microtubo com capacidade de e 1500µL, tomando-se o cuidado de não aspirar a interfase orgânica;
- Adicionar 300 µL de clorofórmio;
- Agitar por 10 segundos em vórtex;
- Centrifugar 13.000 x g durante 5 minutos;
- Transferir a fase aquosa (200 µL) para um novo microtubo com capacidade de 1500µL, tomando-se o cuidado de não aspirar a interfase orgânica;
- Adicionar 200 µL de propanol
- Homogeneizar por inversão e manter a –20°C *overnight*;
- Centrifugar a 13.000 x g durante 30 minutos;
- Descartar o sobrenadante por inversão e adicionar 1000µL de etanol 70% a 5°C;
- Agitar durante 10 segundos em vórtex;
- Centrifugar a 12.000 x g durante 30 minutos;
- Descartar o sobrenadante por inversão;
- Secar o sedimento em termobloco sem agitação a 56°C durante 15 minutos;

- Adicionar 30µL de tampão TE pH 8,0;
- Incubar em termobloco sem agitação a 56°C durante 30 minutos;
- Estocar as amostras a -20°C até a realização da reação de amplificação de ácidos nucleicos

As condições de amplificação foram as seguintes: as reações de amplificação foram realizadas no volume de 50 µL, contendo 200 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1,5 mM de cada *primer*, 1,5 U de *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 5 µL de DNA extraído.

O ciclo utilizado na reação de amplificação de DNA de *Brucella* spp. utilizando-se os *primers* ITS66 e ITS279 foi o seguinte: desnaturação inicial a 95° C durante 2 minutos; 40 ciclos consistindo de desnaturação a 95° C durante 30 segundos, *annealing* a 62° C durante 30 segundos e extensão a 72° C durante 30 segundos; extensão final a 72° C durante 5 minutos.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificar associação entre as variáveis com a soropositividade foi utilizado o teste Qui-quadrado (χ^2), considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O teste exato de Fisher foi aplicado quando os valores esperados foram inferiores a 5 e os resultados apresentando valor de $p < 0,05$ foram considerados significativos. A fim de avaliar o índice de concordância entre os métodos de diagnóstico, foi empregado o teste Kappa (COHEN, 1960) de acordo com os critérios sugeridos por Landis e Koch (1977), no qual 0 (zero) indica ausência de concordância e 1 (um), uma concordância total.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo serão apresentados de acordo com o tipo de diagnóstico realizado (sorológico, molecular e parasitológico).

5.1 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

5.1.1 Sorodiagnóstico Humano

Dos 470 habitantes indígenas das seis aldeias investigadas, 227 (48,3%) são do sexo masculino e 243 (51,7%) são mulheres. Apenas uma mulher participa de atividades de caça, ao contrário do grupo masculino que possui 99 caçadores. Ao serem analisados pela RIFI FMVZ-USP, apenas dois (0,4%) indivíduos apresentaram resultado reagente quando testados para o antígeno *L. (L.) amazonensis* na diluição 1:40, sendo ambas mulheres de idades diferentes (5 e 25 anos), que não estão envolvidas com as atividades de caça, habitantes de aldeias distintas (Urubu Branco e Santa Laura) e distantes uma da outra. Nenhum dos indivíduos amostrados apresentou fluorescência positiva quando testados para o antígeno *L. (L.) chagasi*.

A tabela 2 apresenta os valores de prevalência de anticorpos anti-*Leishmania (L.) chagasi* e anti-*Leishmania (L.) amazonensis* nos humanos da etnia Tapirapé pela técnica da RIFI FMVZ-USP.

Tabela 2 - Prevalência de anticorpos anti-*L. (L.) chagasi* e anti-*L. (L.) amazonensis* nos humanos das aldeias Tapirapé examinados por aldeia pela RIFI FMVZ-USP (1:40)

Aldeia	Nº de indivíduos amostrados	RIFI			
		<i>L. (L.) chagasi</i>		<i>L. (L.) amazonensis</i>	
		Reagentes	%	Reagentes	%
Urubu Branco	313	0	0	1	0,3
Buriti II	1	0	0	0	0
Santa Laura	63	0	0	1	1,6
Córrego da Onça	44	0	0	0	0
Sapeva	32	0	0	0	0
Xexeu	0	0	0	0	0
Codebra	17	0	0	0	0
Total	470	0	0	2	0,4

Em relação ao sorodiagnóstico para a brucelose, apenas quatro (0,9%) indivíduos foram reagentes a prova AAT, sendo dois (0,6%) indivíduos habitantes da aldeia Urubu Branco e dois (4,5%) da aldeia Córrego da Onça. Nenhum dos indivíduos que apresentaram resultado positivo participam de atividades de caça. A tabela 3 apresenta os valores de prevalência de anticorpos anti-*Brucella* lisa.

Tabela 3 - Prevalência de anticorpos anti-*Brucella* lisa nos humanos das aldeias Tapirapé examinados por aldeia pela AAT

Aldeia	Nº de indivíduos amostrados	<i>Brucella</i> lisa	
		Reagentes	%
Urubu Branco	313	2	0,6
Buriti II	1	0	0,0
Santa Laura	63	0	0,0
Córrego da Onça	44	2	4,5
Sapeva	32	0	0,0
Xexeu	0	0	0,0
Codebra	17	0	0,0
Total	470	4	0,9

5.1.2 Sorodiagnóstico Canino

Dos 114 cães habitantes da Terra Indígena Tapirapé analisados, 78 (68,4%) são machos e 36 (31,6%), fêmeas. Destes animais, 93 (81,6%) são adultos e apenas 21 (18,4%) tem idade inferior a um ano. Entre machos e fêmeas, jovens e adultos, 73 (64,6%) cães participam das atividades de caça.

Do total, cinco (4,4%) animais apresentaram resultado reagente para *L. (L.) chagasi* quando testados pela técnica de ELISA FM-USP, contra três (2,6%) animais que apresentaram D.O maior que o ponto de corte quando testados pela técnica de ELISA FCAV-UNESP. Apenas um destes animais apresentou resultado reagente em ambos os laboratórios.

A RIFI FCAV-UNESP revelou cinco (4,4%) animais reagentes para *L. (L.) chagasi* ao título 40. Dois (1,8%) destes animais também apresentaram fluorescência positiva quando testados pela RIFI FMVZ-USP.

Das amostras testadas para *L. (L.) amazonensis* pela técnica de ELISA FM-USP, três (2,7%) apresentaram resultado reagente. Já na RIFI FMVZ-USP, duas (1,8%) amostras apresentaram fluorescência positiva ao título 40, sendo uma delas reagente também pelo ELISA FM-USP.

A tabela 4 apresenta os valores de prevalência de anticorpos contra *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* nos cães habitantes das aldeias da etnia Tapirapé pelos quatro métodos sorológicos realizados neste estudo.

Tabela 4 - Prevalência de anticorpos anti-*L. (L.) chagasi* e anti-*L. (L.) amazonensis* em cães da Terra Indígena Tapirapé examinados por aldeia pelos métodos ELISA e RIFI (1:40) realizados nos diferentes laboratórios

Aldeia	Nº de cães amostrados	<i>L. (L.) chagasi</i>								<i>L. (L.) amazonensis</i>			
		ELISA FM-USP		ELISA FCAV-UNESP		RIFI FMVZ-USP		RIFI FCAV-UNESP		ELISA FM-USP		RIFI FMVZ-USP	
		Reagentes	%	Reagentes	%	Reagentes	%	Reagentes	%	Reagentes	%	Reagentes	%
Urubu Branco	43	3	7,0	1	2,3	0	0	1	2,3	3	7,0	0	0
Buriti II	8	1	12,5	0	0	0	0	1	12,5	0	0	0	0
Santa Laura	17	0	0	0	0	1	5,9	1	5,9	0	0	1	5,9
Córrego da Onça	22	1	4,5	2	9,1	1	4,5	2	9,1	1	4,5	1	4,5
Sapeva	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Xexeu	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Codebra	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	114	5	4,4	3	2,6	2	1,8	5	4,4	4	3,5	2	1,8

Em relação à brucelose canina, das 114 amostras de soros sanguíneos submetidas ao teste de AAT, sete (6,1%) apresentaram resultado positivo, indicando a presença de anticorpos anti-*Brucella* lisa. As 114 amostras de soros sanguíneos dos cães submetidas ao teste de IDGA apresentaram resultado negativo. Os resultados obtidos pelos testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-*Brucella* spp. nos cães das aldeias da etnia Tapirapé estão expressos na tabela 5.

Tabela 5 - Detecção de anticorpos anti-*Brucella* spp. em cães das aldeias de etnia Tapirapé, pelo teste AAT e IDGA

Aldeia	Nº de cães amostrados	<i>Brucella</i> lisa		<i>Brucella</i> rugosa	
		AAT	%	IDGA	%
Urubu Branco	43	3	7,0	0	0
Buriti II	8	0	0	0	0
Santa Laura	17	2	11,8	0	0
Córrego da onça	22	0	0	0	0
Sapeva	8	0	0	0	0
Xexeu	4	0	0,0	0	0
Codebra	12	2	16,7	0	0
Total	114	7	6,1	0	0

Nas aldeias da etnia Karajá, 213 animais foram amostrados, sendo 124 (58,2%) machos e 89 (41,8%) fêmeas entre 171 (80,3%) adultos e 42 (19,7%) jovens. De todos os cães amostrados nesta terra indígena, 120 (56,3%) possuem o hábito de caçar.

Na investigação de leishmaniose para estas amostras, o teste ELISA FM-USP revelou 23 (10,8%) animais reagentes para *L. (L.) chagasi*, enquanto que o ELISA FCAV-UNESP revelou apenas dois (0,9%) animais reagentes. A RIFI FMVZ-USP e a RIFI FCAV-UNESP apresentaram resultados concordantes, nos quais todas as amostras revelaram resultados negativos.

Ao testar as amostras para *L. (L.) amazonensis*, o ELISA FM-USP revelou 16 (7,5%) amostras com a D.O. superior ao ponto de corte. Das 213 amostras, duas (0,9%), que estavam entre as amostras reagentes pelo ELISA FM-USP, apresentaram fluorescência positiva quando testadas pela RIFI FMVZ-USP.

Tabela 6 - Prevalência de anticorpos anti-*L. (L.) chagasi* e anti-*L. (L.) amazonensis* dos cães da Terra Indígena Karajá, examinados por aldeia pelos métodos ELISA e RIFI (1:40), realizados nos diferentes laboratórios

Aldeia	Nº de cães amostrados	<i>L. (L.) chagasi</i>								<i>L. (L.) amazonensis</i>			
		ELISA FM-USP		ELISA FCAV-UNESP		RIFI FMVZ-USP		RIFI FCAV-UNESP		ELISA FM-USP		RIFI FMVZ-USP	
		Reagentes	%	Reagentes	%	Reagentes	%	Reagentes	%	Reagentes	%	Reagentes	%
Majtyri	17	1	5,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Itxala	62	4	6,5	0	0	0	0	0	0	3	4,8	1	1,6
Hawalora	36	3	8,3	1	2,8	0	0	0	0	3	8,3	1	2,8
Macaúba	98	15	15,3	1	1,02	0	0	0	0	10	10,2	0	0
Total	213	23	10,8	2	0,9	0	0,0	0	0,0	16	7,5	2	0,9

Na página anterior, a tabela 6 apresenta os valores de prevalência de anticorpos anti-*L. (L.) chagasi* e anti-*L. (L.) amazonensis* nos cães habitantes da Terra Indígena Karajá pelos métodos sorológicos testados nos diferentes laboratórios.

Na investigação de brucelose canina, das 213 amostras de soro canino submetidas ao teste AAT, cinco (2,3%) apresentaram resultado positivo, indicando a presença de anticorpos anti-*Brucella* lisa. Quando as amostras de soro foram submetidas ao teste IDGA, três (1,4%) apresentaram resultado positivo, indicando a presença de anticorpos anti-*Brucella* rugosa.

A tabela 7 apresenta os resultados obtidos pelos testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-*Brucella* spp. nos cães das aldeias da etnia Karajá.

Tabela 7 - Detecção de anticorpos anti-*Brucella* spp. nos cães das aldeias da Terra Indígena Karajá pelos testes AAT e IDGA

Aldeia	Nº de cães amostrados	<i>Brucella</i> lisa		<i>Brucella</i> rugosa	
		AAT	%	IDGA	%
Majtyri	17	1	5,9	0	0
Itxala	62	3	4,8	3	4,8
Hawalora	36	1	2,8	0	0
Macaúba	98	0	0	0	0
Total	213	5	2,3	3	1,4

Para a pesquisa de leishmaniose visceral, das 28 amostras positivas ao teste ELISA FM-USP, três (C56, C128 e C307) foram positivas também ao teste ELISA FCAV-UNESP, três (C13, C56 e C71) foram reagentes à RIFI FCAV-UNESP e apenas uma amostra (C56) foi reagente à RIFI FMVZ-USP. Das cinco amostras positivas ao ELISA FCAV-UNESP, duas (C50 e C56) foram reagentes à RIFI FCAV-UNESP e apenas uma (C56) foi reagente à RIFI FMVZ-USP. As duas amostras reagentes à RIFI FMVZ-USP também reagiram à RIFI FCAV-UNESP. Apenas a amostra C56 foi reagente a todos os testes sorológicos realizados.

Ao utilizar *L. (L.) amazonensis* como antígeno, das 20 amostras positivas ao ELISA FM-USP, apenas 3 (C56, C128 e C225) foram positivas ao serem testadas pela RIFI FMVZ-USP.

A tabela 8 apresenta todos os animais reagentes a pelo menos um dos testes realizados, quando testados para os antígenos *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis*.

Tabela 8 - Animais reagentes a pelo menos um dos testes realizados, quando testados para *L. (L.) chagasi* e *L.(L.) amazonensis*

ANIMAL	EXAMES REALIZADOS					
	<i>Leishmania (L.) Chagasi</i>				<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	
	ELISA FM-USP	ELISA FCAV-UNESP	RIFI FMVZ-USP	RIFI FCAV-UNESP	ELISA FM-USP	RIFI FMVZ-USP
C13	P	-	-	P	P	-
C38	-	P	-	-	-	-
C50	-	P	-	P	-	-
C56	P	P	P	P	P	P
C71	P	-	-	P	-	-
C72	P	-	-	-	P	-
C103	-	-	P	P	-	P
C111	-	-	-	-	P	-
C122	P	-	-	-	-	-
C128	P	P	-	-	P	P
C130	P	-	-	-	P	-
C146	P	-	-	-	-	-
C182	P	-	-	-	P	-
C221	P	-	-	-	-	-
C222	P	-	-	-	P	-
C225	P	-	-	-	P	P
C228	P	-	-	-	P	-
C232	P	-	-	-	-	-
C233	P	-	-	-	-	-
C234	P	-	-	-	P	-
C274	P	-	-	-	-	-
C289	P	-	-	-	-	-
C297	P	-	-	-	P	-
C298	P	-	-	-	P	-
C299	P	-	-	-	P	-
C302	P	-	-	-	P	-
C306	P	-	-	-	-	-
C307	P	P	-	-	P	-
C309	P	-	-	-	P	-
C311	P	-	-	-	P	-
C315	P	-	-	-	-	-
C317	P	-	-	-	P	-
C323	-	-	-	-	P	-

Para análise da ocorrência de LVC deste estudo, adotou-se os resultados obtidos pelos métodos ELISA FCAV-UNESP e RIFI FCAV-UNESP em virtude do fato que a mesma cepa do parasito é empregada em ambas as plataformas e porque foi feito pela mesma equipe técnica. Considerando a recomendação preconizada pelo PVC-LV vigente até dezembro de 2011, foram determinados como positivos os animais reagentes a ambas as provas sorológicas.

Dos 114 cães habitantes da Terra Indígena Tapirapé, apenas dois (1,8%) apresentaram resultado positivo em ambas as técnicas, sendo ambos machos (2,6%), adultos (2,2%), com hábito de caça (2,7%) e residentes de uma mesma aldeia, a Córrego da Onça (9,1%). Nenhum dos cães habitantes da Terra Indígena Karajá apresentou resultado positivo considerando a plataforma diagnóstica adotada neste estudo.

5.2 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

Todas as 114 amostras de sangue total dos cães habitantes das aldeias de etnia Tapirapé submetidas à PCR para detecção de DNA de *Brucella* spp. apresentaram resultado negativo.

Na Terra Indígena Karajá, das 213 amostras de sangue total canino submetidas à PCR, três (1,4%) apresentaram resultado positivo, com amplificação de fragmento de 214bp. A tabela 9 apresenta os resultados obtidos pela PCR para detecção de DNA de *Brucella* spp. nas amostras de sangue total dos cães das aldeias da etnia Karajá.

Tabela 9 - Detecção de DNA de *Brucella* spp. pela PCR nas amostras de sangue total dos cães das aldeias da etnia Karajá

Aldeia	Nº de cães amostrados	<i>Brucella</i> spp.	
		PCR	%
Majtyri	17	0	0
Itxala	62	2	3,2
Hawalora	36	0	0
Macaúba	98	1	1,0
Total	213	3	1,4

Os doze animais que apresentaram resultado positivo pelo teste de AAT foram negativos nas provas de IDGA e PCR. Os três cães positivos pela IDGA também foram negativos nos demais testes laboratoriais empregados para o diagnóstico de brucelose. Os três cães que foram positivos na PCR em amostras de sangue, apresentaram resultado negativo nos testes sorológicos utilizados. A tabela 10 apresenta todos animais reagentes a pelo menos um dos testes empregados para o diagnóstico de brucelose.

Tabela 10 - Animais reagentes a pelo menos um dos testes realizados, quando testados para *Brucella* spp.

ANIMAIS REAGENTES	Exames realizados		
	<i>Brucella</i> lisa	<i>Brucella</i> rugosa	<i>Brucella</i> spp.
	AAT	IDGA	PCR
C12	P	-	-
C22	P	-	-
C28	P	-	-
C85	P	-	-
C88	P	-	-
C101	P	-	-
C104	P	-	-
C114	P	-	-
C150	P	-	-
C173	-	-	P
C174	P	-	-
C177	P	-	-
C179	-	P	-
C 189	-	P	-
C192	-	P	-
C222	P	-	-
C225	-	-	P
C231	-	-	P

5.3 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

5.3.1 Esfregaço em Lâmina

Dos cães da Terra Indígena Tapirapé abordados na primeira campanha, cinco apresentaram sorologia positiva quando testados pelo ELISA FM-USP, no entanto, apenas dois animais ainda se encontravam nas aldeias no período da segunda campanha e tiveram material de linfonodo puncionado para observação de formas amastigotas de *Leishmania* spp. Na Terra Indígena Karajá, apenas um dos cinco animais que apresentaram sorologia positiva foi encontrado na ocasião da segunda campanha. Os três animais examinados estão apresentados na Tabela 8 com as identificações C56, C71 e C111 e apresentaram resultado negativo.

5.3.2 Isolamento do Agente

Além dos três animais reexaminados, todos os cães abordados na ocasião da segunda campanha deste experimento tiveram seus linfonodos puncionados e semeados em tubos de cultura para isolamento de *Leishmania* spp. No total, 150 cães foram amostrados e todos apresentaram resultado negativo.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com os resultados obtidos pelos testes sorológicos para diagnóstico de leishmaniose nos cães e nos humanos e para o diagnóstico de brucelose nos humanos, as variáveis sexo, idade e hábito de caça foram analisadas pelo teste exato de Fischer, porém não foi observada associação estatística significativa entre as variáveis e os resultados positivos para os agentes estudados.

O teste Qui-quadrado foi utilizado para avaliar associação entre as variáveis e os resultados positivos para *Brucella* spp. nos cães. Não houve associação estatística significativa entre as variáveis quando os resultados foram analisados separados por etnias, porém, quando considerado todos os 327 animais, o hábito de caça apresentou associação estatística significativa com os resultados positivos para *Brucella* lisa ($\chi^2=4,54$ e $p=0,0331$).

A concordância entre os testes realizados nos diferentes laboratórios para verificar a presença de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* foi avaliada por meio da determinação do coeficiente Kappa. Dentre os métodos avaliados, o ELISA FM-USP realizado com antígeno total apresentou uma concordância ruim com o ELISA FCAV-UNESP. O coeficiente Kappa também foi aplicado para avaliar os resultados entre as RIFI's realizadas na FMVZ-USP e FCAV-UNESP e revelou uma concordância moderada entre os laboratórios. Por fim, a determinação do coeficiente Kappa entre os métodos ELISA FCAV-UNESP e RIFI FCAV-UNESP revelou uma fraca concordância entre eles. Os valores estão expressos na tabela 11.

Tabela 11 - Grau de concordância entre os testes realizados nos diferentes laboratórios

Testes avaliados	Kappa	Concordância
ELISA FCAV-UNESP X ELISA FM-USP	0,16	Ruim
RIFI FCAV-UNESP X RIFI FMVZ-USP	0,568	Moderada
ELISA FCAV-UNESP X RIFI FCAV-UNESP	0,391	Fraca

6 DISCUSSÃO

O escopo deste estudo consiste em conhecer a situação sanitária das aldeias das Terras Indígenas Tapirapé e Karajá, concernentes à infecção por *Leishmania* spp. e *Brucella* spp..

Até dezembro de 2011, o PVC-LV preconizava a utilização das provas sorológicas ELISA, para triagem dos cães suspeitos, e RIFI, como teste confirmatório para o diagnóstico de cães e eliminação dos animais soropositivos. Este cenário foi substituído pelo protocolo utilizando o teste rápido imunocromatográfico, como teste de triagem, e o teste ELISA, como confirmatório. De fato, os métodos sorológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral apresentam eficácia controversa, podendo muitas vezes revelar resultados falso-positivos, ocasionando a eutanásia de animais saudáveis, ou falso-negativos, contribuindo com a permanência dos reservatórios em áreas endêmicas (FERRER et al., 1995; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). Além disso, diversos estudos demonstraram que a eliminação destes animais possui impacto limitado no controle da doença tanto em humanos quanto em cães, pois a reintrodução de cães susceptíveis na população contribui para a manutenção da doença (COURTENAY et al., 2002). Ademais, esta medida de controle, além de onerosa, encontra resistência ética e emocional, causando muita polêmica entre profissionais e proprietários que muitas vezes tem o cão como parte integrante da família (ASHFORD et al., 1995; MORENO; ALVAR, 2002).

As plataformas para o sorodiagnóstico da infecção por *Leishmania* spp. empregadas neste inquérito dependem muito de padronizações e adaptações a serem adotadas em cada laboratório, sendo bastante artesanais e isto pode acarretar resultados discordantes entre diferentes laboratórios. Quando realizado o ELISA como prova sorológica, o presente estudo revelou resultados significativamente conflitantes ao utilizar preparações de antígenos diferentes. Nas amostras de soros de cães da Terra Indígena Karajá, os resultados dos ensaios imunoenzimáticos foram ainda mais discrepantes entre si.

Os antígenos usados no método ELISA FM-USP empregados neste inquérito correspondem ao produto total de formas promastigotas de *Leishmania* spp. Já o antígeno usado no ELISA FCAV-UNESP, corresponde à fração solúvel em água de extratos antigênicos totais de formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*. De um modo geral, o uso de frações totais de antígenos desfavorece o desempenho de um método sorodiagnóstico, uma vez que estas frações são constituídas por inúmeros componentes antigênicos do parasita que compartilham epítomos com outros patógenos comprometendo assim sua especificidade. Por outro lado, a constituição antigênica de diferentes preparados de antígenos solúveis pode variar consideravelmente, ainda que o mesmo protocolo de preparo seja empregado, pois a solubilidade de proteínas e de outros constituintes antigênicos do parasita dependem de condições como temperatura de solubilização, pH das soluções, tempo de dissolução, intensidade de agitação do mesmo. O uso de diferentes preparações de antígenos pode explicar a sofrível concordância entre os métodos de ELISA empregados no presente estudo. Mais ainda, o uso de diferentes cepas de *Leishmania* pode ser determinante para as diferentes performances. Com efeito, a técnica de ELISA-FCAV e a ELISA-FMUSP não empregam a mesma cepa de *L. (L.) chagasi*.

Por esses motivos, a técnica para preparação de antígenos solúveis totais para sorodiagnóstico de *Leishmania* é feita por alguns autores por meio da utilização de ultracentrifugação e diálise, o que permite selecionar peptídeos de baixo peso molecular, altamente antigênicos e específicos para *Leishmania* sp. (MANCIANTI et al., 1995; BADARÓ et al., 1996; RYAN et al., 2002; KUMAR et al., 2012).

Além do uso de diferentes frações e diferentes cepas, as técnicas de ELISA utilizadas neste estudo apresentam ainda, diversidades no protocolo de preparação do antígeno como: (i) o meio de cultura utilizado na manutenção das formas promastigotas; (ii) a solução utilizada para a lavagem dos parasitas; (iii) o método utilizado para a homogeneização (quebra de células) das amostras de promastigotas. O meio de cultura parece estar mais ligado a fatores de crescimento como velocidade e resistência dos microorganismos, entretanto, há a possibilidade de um meio estimular o parasita a produzir proteínas que possam modificar sua antigenicidade. A solução de lavagem é usada para eliminar os resíduos de meio de cultura e parece não influenciar na antigenicidade. O método de homogeneização

pode estar relacionado às diferenças observadas nos resultados, em virtude de que os diferentes meios para quebrar os parasitas podem produzir preparações antigênicas com maior ou menor diversidade. No que se refere ao método sorológico, as técnicas realizadas neste estudo diferiram principalmente no tempo de incubação das etapas e nas soluções de diluição dos soros e do conjugado, as quais foram acrescidas de 5% de leite desnatado no ELISA FCAV-UNESP. O uso do leite nestas etapas pode ter contribuído na redução de reações inespecíficas, eliminando os resultados falso-positivos.

Mancianti et al. (1995) analisaram amostras de soro de 290 cães, sendo 186 infectados com *L. infantum* e 104 animais como controle negativo, através do teste ELISA, utilizando antígeno total solúvel, para detectar a presença de anticorpos específicos para o agente na Toscana, Itália. O teste apresentou elevada sensibilidade e especificidade (99,5% e 97,1%, respectivamente). Ryan et al. (2002), utilizando o método ELISA com antígeno total solúvel, obtiveram 100% de sensibilidade ao testar soros de 42 cães provenientes do Brasil que apresentavam diagnóstico clínico para LVC. Ao testar amostras de soro de humanos com LV e LT, houve redução da sensibilidade (95,1%), porém, assim como Martin et al. (1998), não foi observada reação cruzada quando este ensaio foi realizado em pacientes com outras doenças parasitárias como malária, tripanossomíase e filariose. Kumar et al. (2012), ao aplicar o teste em diferentes grupos controle negativo, encontraram especificidades de 100%, 96% e 97,4% em indivíduos de área não endêmica, indivíduos de área endêmica e pacientes acometidos por outras doenças, respectivamente. Este último utilizou como antígeno uma proteína específica de 70kDa. O uso de um antígeno mais purificado pode justificar a elevada especificidade encontrada neste estudo.

A RIFI realizada nos diferentes laboratórios apresentou uma concordância moderada (Kappa = 0,568), com prevalências de 1,8% e 4,4% para os cães da Terra Indígena Tapirapé. Por ser uma técnica com leitura subjetiva, frequentemente pode-se observar diferenças nos resultados em decorrência do treinamento e da capacitação do leitor, principalmente nas amostras de títulos baixos. Porém, os resultados entre os protocolos de RIFI pareceram mais concordantes que entre os protocolos de ELISA. Isto porque o uso do parasito íntegro na plataforma diagnóstica de certa forma restringe o contingente de antígenos aos quais os soros são expostos

e isso deve explicar a maior concordância. Entretanto, assim como no caso do ELISA, cepas diferentes foram empregadas em ambos os protocolos de sorodiagnóstico baseado em reação imunofluorescente.

Em relação ao diagnóstico em paralelo, em alguns casos, soros positivos por RIFI foram negativos por ELISA. Isto é um fato não esperado, pois os ensaios imunoenzimáticos tendem a ser mais sensíveis que os métodos baseados em reação de imunofluorescência indireta, particularmente no caso do sorodiagnóstico de leishmanioses (GONTIJO; MELO, 2004). Esta ocorrência corrobora com o fato de que as técnicas normalmente empregadas para o sorodiagnóstico da leishmaniose apresentam baixa confiabilidade e acurácia e por esta razão as autoridades sanitárias no país adotaram um protocolo diagnóstico diferente, utilizando como triagem o teste imunocromatográfico rápido que utiliza uma mistura de proteínas recombinantes (k26 e k39) como antígeno, e o ELISA como teste confirmatório. Este novo protocolo vem sendo amplamente empregado em inquéritos censitários de programas municipais de controle de LV.

Para análise da ocorrência de LVC deste estudo, adotou-se os resultados obtidos pelos métodos ELISA FCAV-UNESP e RIFI FCAV-UNESP em virtude do fato que a mesma cepa do parasito é empregada em ambas as plataformas e porque foi feito pela mesma equipe técnica. Considerando a recomendação preconizada pelo PVC-LV vigente até dezembro de 2011, foram determinados como positivos os animais reagentes a ambas as provas sorológicas.

No estado do Mato Grosso, apesar de haver distribuição das espécies de flebotomíneos *Lu. Longipalpis* e *Lu. flaviscutellata*, mais frequentemente relacionadas às espécies de *Leishmania* investigadas neste estudo (BRASIL, 2007), observou-se baixa disseminação das doenças entre os índios da etnia Tapirapé. No presente trabalho, a RIFI realizada nas amostras de soro dos humanos revelou apenas dois indivíduos sororreagentes ao antígeno *L. (L.) amazonensis*. Nenhuma amostra apresentou reatividade quando testadas para *L. (L.) chagasi*. Estes resultados corroboram com os dados fornecidos pelo Programa de Vigilância Epidemiológica/SES/MT, no período de 2006 a 2008, em que foram notificados apenas três casos de LTA indígena no município de Confresa-MT, onde está localizada a Terra Indígena Tapirapé. Em 1990, Coimbra et al. (1996) realizaram um

estudo epidemiológico da leishmaniose tegumentar em três grupos indígenas habitantes do atual corredor etnoambiental Tupi Mondé, localizado na divisa dos estados Mato Grosso e Rondônia e, em 233 indivíduos investigados pela RIFI, observaram soroprevalência de 4% e 1,3% para os títulos 45 e 90, respectivamente. Guerra et al. (2004), ao realizar um estudo retrospectivo baseado na ocorrência de casos de leishmaniose visceral entre índios no período de 1989 a 1993 no estado de Roraima, observaram 82 casos, sendo a maioria pertencente à Nação Macuxi, com 55 (67,1%) casos, seguidos dos Yanomami, com 14 (17,1%) casos e o menor número entre os índios Ingarió, com dois (2,4%) casos.

A baixa prevalência observada neste estudo pode ser atribuída a diversos fatores, entre ambientais e ecológicos. Pouco se sabe a respeito dos animais silvestres daquela região que podem desempenhar o papel de reservatórios para as leishmanioses. Além disso, os habitantes da Terra Indígena Tapirapé não possuem o hábito de criar animais de produção como galinhas, suínos ou pequenos ruminantes, que além de atraentes para os flebotomíneos, favorecem o acúmulo de matéria orgânica, contribuindo para a manutenção do vetor no local.

Concordando com o inquérito sorológico humano, o inquérito canino revelou baixa prevalência de LVC (1,8%) nos animais habitantes da Terra Indígena Tapirapé e ausência de ocorrência da infecção nos cães da Terra Indígena Karajá. Na Terra Indígena Krenak, localizada no município de Esplendor, Minas Gerais, Antônio et al. (2011) encontraram uma alta prevalência de LVC (46%) ao investigar 94% da população canina estimada. Estes resultados são coerentes com a situação geral da LV em ambos os Estados mencionados, visto que em 2011 Minas gerais foi o Estado que concentrou o maior número de casos notificados de LV (45%) nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, enquanto que o Mato Grosso foi responsável por apenas 5% dos casos notificados nas regiões supracitadas (BRASIL, 2011b). Almeida et al. (2012) realizaram um estudo transversal em áreas endêmicas de Cuiabá-MT e encontraram 22,1% de cães sororreagentes para leishmaniose utilizando a RIFI. Já em Roraima, Guerra et al. (2004) encontraram 10,4% de positividade pela RIFI em um estudo retrospectivo, no qual investigaram 3.773 cães em todo o Estado no período de 1989 a 1993.

No que diz respeito à infecção por *L. (L.) amazonensis* nos cães, o presente trabalho encontrou soroprevalência de 0,9% para as duas Terras Indígenas analisadas. Todavia, estes resultados são pouco relevantes em virtude dos cães não desempenharem um papel importante na epidemiologia da LT (BRANDÃO-FILHO et al., 2003).

A brucelose é importante do ponto de vista de saúde pública, em função do seu caráter zoonótico. A ocorrência de brucelose nos humanos pode ter um caráter ocupacional acometendo preferencialmente indivíduos que desenvolvem atividades com maior risco de exposição a animais domésticos infectados, como veterinários, criadores de animais, tratadores, magarefes, laboratoristas. A infecção humana também pode ser decorrente da ingestão de leite *in natura* e de produtos lácteos fabricados com leite contaminado e não pasteurizado ou carne mal cozida oriunda de animais infectados. A brucelose humana tem distribuição mundial, ocorrendo com maior frequência em países em desenvolvimento (USDA, 2006). Os sinais clínicos mais comuns no homem são aqueles observados nos quadros de infecção aguda generalizada, como: febre contínua e intermitente, respiração acelerada, calafrios, sudorese noturna profusa de odor característico, fadiga, insônia, cefaléia, artralgia, entre outros (ACHA; SZYFRES, 2001). O curso da doença tende à cronicidade, com recidivas de intensidade e sintomatologia variadas na dependência dos locais acometidos no organismo dos indivíduos infectados (PAULIN, 2006). Dentre as espécies de *Brucella*, aquelas consideradas mais patogênicas para humanos é a *B. melitensis*, seguida pela *B. suis*, *B. abortus* e *B. canis*. Além dessas, a *B. pinnipedialis* e a *B. ceti* também foram relacionadas a infecções humanas.

A ocorrência de resultados positivos pelo teste do AAT em quatro humanos residentes nas aldeias Tapirapé pode ser um indicativo de reações inespecíficas detectadas pelo teste, gerando resultados falsos positivos ou que os mesmos tenham realmente sido expostos à infecção por brucelas lisas. Existindo a possibilidade de infecção por brucelas lisas, pode-se sugerir que as mesmas tenham sido adquiridas pelo contato com cães infectados, já que resultados positivos pelo teste de AAT foram detectados em sete cães da mesma Terra Indígena, ou ainda pelo contato com potenciais hospedeiros silvestres, durante o hábito da caça ou manipulação da carne crua.

Uma investigação epidemiológica mais acurada nestes indivíduos, bem como a realização de monitoramento utilizando-se outros métodos de diagnóstico de maior especificidade poderia confirmar a hipótese de infecção. Além disso, este monitoramento seria desejável, já que a brucelose em humanos pode acarretar sinais clínicos severos e incapacitantes.

Em relação à brucelose canina, os doze animais que apresentaram resultado positivo pelo teste de AAT foram negativos nas provas de IDGA e PCR. Os três cães positivos pela IDGA também foram negativos nos demais testes laboratoriais empregados para o diagnóstico de brucelose. Os três cães que foram positivos na PCR em amostras de sangue, apresentaram resultado negativo nos testes sorológicos utilizados.

Considerando-se que todos os cães residentes nas aldeias de ambas as etnias foram amostrados, a prevalência de anticorpos anti-*Brucella* spp. na população canina das aldeias Tapirapé foi de 6,1% determinado pelo teste AAT. Nas aldeias da etnia Karajá, os valores de prevalência de infecção por *Brucella* spp. foram de 2,3%, determinado pelo teste AAT, e 1,4% quando empregados os testes IDGA e PCR. Considerando-se a soma dos resultados positivos obtidos em todos os exames laboratoriais empregados, pode-se verificar uma prevalência de infecção por *Brucella* spp. de 5,16% (11/213) na população canina desta etnia.

O teste de IDGA é considerado um teste de alta especificidade para o diagnóstico da brucelose canina, de forma que resultados positivos no teste sugerem a ocorrência de infecção por *Brucella* rugosa (KEID et al., 2009). Das dez espécies de *Brucella* atualmente reconhecidas, duas são consideradas naturalmente rugosas, a *B. canis* e a *B. ovis*. A *B. ovis* é o agente etiológico da brucelose nos ovinos, provocando infecções restritas a esta espécie de hospedeiro com quadros de epididimite e menos frequentemente abortamentos. A *B. canis* é o principal agente causador da brucelose nos cães e a principal causa de problemas reprodutivos nos cães, como abortamentos, infertilidade, orquite e epididimite, apresentando ampla distribuição no Brasil, especialmente nos centros urbanos (MEGID et al., 1999; KEID et al., 2002, 2004; MORAES, C. C. G. et al., 2002; MORAES, I. A. et al., 2002; ALVES et al., 2003; AZEVEDO et al., 2003; MARASSI; MORAES; LILENBAUM, 2003; ALMEIDA et al., 2004; AGUIAR et al., 2005;

CAVALCANTI et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2008; DORNELES et al., 2011). Assim, os resultados positivos pela IDGA nos cães da aldeia são provavelmente decorrentes de infecções por *B. canis*.

A ocorrência cães reagentes pelo teste de AAT pode ser decorrência de dois cenários distintos: (i) a ocorrência de resultados positivos verdadeiros, indicando infecções por espécies lisas de *Brucella* nos cães; (ii) a ocorrência de resultados falsos-positivos, indicando reações inespecíficas nos cães.

O teste de AAT é considerado um teste de triagem para o diagnóstico da brucelose nos bovinos e bubalinos. De acordo com as normas do PNCEBT, animais positivos no teste de AAT devem ser testados pela prova do 2ME, já que nestas espécies, resultados positivos no AAT podem ser decorrentes de reações inespecíficas. Assim, o critério para classificação de bovinos e bubalinos como infectados é a ocorrência de resultados positivos pelo teste de 2ME. Animais reagentes no teste de AAT, mas não reagentes no teste do 2ME podem ser considerados não infectados ou suspeitos, de acordo com os títulos de anticorpos observados no teste de SAL. É importante ressaltar que o teste de 2ME não foi padronizado e validado para o diagnóstico para a brucelose canina causada por brucelas lisas, portanto, optou-se por utilizar apenas o teste de AAT.

A ocorrência de cães positivos pela PCR em amostras de sangue pode ser um indicativo de infecção ativa por *Brucella* nestes animais. Entre 1 e 4 semanas pós infecção por *Brucella* inicia-se o período de bacteremia nos cães. Nas infecções caninas por *B. canis*, o período de bacteremia pode ser prolongado, com duração média de 6 meses a 1 ano, mas podendo atingir 64 meses de duração. Já nas infecções caninas por *B. abortus*, a bacteremia tende a ser transiente (PIDGEON et al., 1987). Uma vez que o período de multiplicação bacteriana na circulação sanguínea cessa, as brucelas alojam-se em tecidos reprodutivos ou linfóides, caracterizando uma infecção persistente (CARMICHAEL, 1990).

A ocorrência de cães com resultados positivos pela PCR, mas negativos pelos testes sorológicos pode indicar a presença de infecções em fase inicial, em que os anticorpos aglutinantes ou precipitantes ainda não se apresentam em níveis detectáveis, apesar da presença de bacteremia (KEID et al., 2007b). Nas infecções

por *Brucella* em cães, os testes sorológicos geralmente apresentam resultados negativos durante as primeiras 4 a 8 semanas pós-infecção (CARMICHAEL, 1990).

Cães não são considerados hospedeiros principais de espécies lisas de *Brucella*, mas podem adquirir estas infecções pelo contato com outras espécies animais. No território brasileiro, as seguintes espécies de *Brucella* lisa já foram isoladas: *B. abortus* (biovars 1, 2, 3, 4 e 6) (MINHARRO et al., 2009) que é a principal espécie causadora da brucelose nos bovinos e bubalinos e *B. suis* (biovar 1), responsável pela brucelose em suínos domésticos e selvagens (POESTER; GONÇALVES; LAGE, 2002). Infecções caninas por *B. abortus* e *B. suis* já foram relatadas na literatura científica, como resultado do contato de cães com bovinos ou suínos infectados em regiões rurais (AZEVEDO et al., 2003; BAEK et al., 2003; MIRANDA et al., 2005; MEGID et al., 2007; CADMUS et al., 2011; DORNELES et al., 2011; RAMAMOORTHY et al., 2011; TRUONG et al., 2011).

Os índios das etnias Tapirapé e Karajá costumam criar cães, gatos, galinhas e alguns animais silvestres, como macaco-prego (*Cebus* sp.), cateto (*Dicotyles tayassu*), arara azul grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*), arara-vermelha (*Ara choloropterus*), ema (*Rhea americana*), tartaruga (*Podocnemis expansa*) (MALHEIROS, 2011). Nas aldeias indígenas Tapirapé e Karajá, alvos do presente estudo, animais domésticos de produção, (bovinos, bubalinos, suínos, caprinos e ovinos) não foram observados. Neste caso, uma explicação para as possíveis infecções caninas causadas por brucelas lisas seria o contato com hospedeiros silvestres. Não foi possível realizar a caracterização molecular das três amostras de sangue que apresentaram resultados positivos na PCR com os *primers* genéricos (ITS66 e ITS279), na tentativa de identificar a espécie de *Brucella*, o que poderia auxiliar a elucidar qual a origem das infecções caninas.

Dentre as atividades de subsistência dos índios habitantes da aldeia, temos a coleta de mel, coco e ovos de quelônios e a pesca. Porém, a principal atividade é a caça de diversas espécies animais, como *Dicotyles albirostris* (queixada), *Coelogenys* sp. (paca), *Drasypocata* sp. (cotia), *Myrmecophaga jurbata* (tamanduá-bandeira), *Testudo tabulata* (jabuti), *Nasua narica* (quati), *Podocnemis unifilio* (tracajá), *Dorcephalus bezoarticus* (veado-campeiro), *Tapirus americanus* (anta),

Mazama americana (veado-mateiro), *Euphrarctus sexintus* (tatu), *Alouatta* sp. (guariba), *Alopochen discolor* (pato do mato) (MALHEIROS, 2011).

Espécies de *Brucella* vêm sendo identificadas acometendo várias espécies de hospedeiros silvestres, como a *B. neotomae* em roedores da espécie *Neotoma lepida* (STOENNER; LACKMAN, 1957); os *biovar* 2, 4 e 5 de *B. suis* que têm como reservatórios respectivamente a lebre europeia (*Lepus capensis*), renas e caribus (*Rangifer tarandus* e suas subespécies) e várias espécies de roedores, como *Apodemus agrarius*, *A. sylvaticus*, *Mus musculus*, *Microtus arvalis*, e *Cricetulus migratorius* (TARAN; ZAMAKHAEVA, 1971; VERSHILOVA et al., 1983); a *B. ceti* e *B. pinnipedialis* isoladas de mamíferos marinhos da ordem dos cetáceos e pinípedes (FOSTER et al., 2007); *Brucella microti*, isolada do roedor *Microtus arvalis* na República Tcheca (SCHOLZ et al., 2008) e de raposas da espécie *Vulpes vulpes* na Áustria (SCHOLZ et al., 2009). Recentemente, foi relatado o isolamento de estirpes de *Brucella* de anfíbios da espécie *Pyxicephalus edulis* oriundos da Tanzânia, as quais apresentaram características genotípicas e fenotípicas distintas das espécies de *Brucella* até então reconhecidas, indicando tratar-se, possivelmente de uma nova espécie dentro do gênero (EISENBERG et al., 2012).

Animais silvestres também podem se infectar por espécies de brucelas naturalmente mantidas por hospedeiros domésticos (COOK; CAMPBELL; BARROW, 1966; TARAN; ZAMAKHAEVA, 1971; VERSHILOVA et al., 1983; LUCERO et al., 2008). No Brasil há escassos relatos sobre a frequência de ocorrência de infecções por *Brucella* spp. em espécies silvestres: foram verificadas evidências sorológicas de infecção por *Brucella* em raposas do campo (*Pseudalopex vetulus*), no semiárido paraibano, Nordeste do Brasil (AZEVEDO et al., 2010) e em onça pintada (*Panthera onca*) na região do Pontal do Paranapanema, São Paulo (NAVA, 2008). Evidências moleculares foram verificadas em veado-campeiro (*Dorcephalus bezoarticus*) no Pantanal sul-matogrossense (ELISEI et al., 2010).

Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem a ocorrência de infecção por *Brucella* em cães das aldeias das etnias Tapirapé e Karajá. A possibilidade de ocorrência de cães infectados por brucelas lisas pode sugerir que os mesmos atuem como animais sentinelas de infecções existentes em outras

espécies de animais na região. Vale ressaltar ainda que estes cães podem atuar como fontes de infecção para a população indígena local.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

1. Os resultados do presente trabalho revelam uma baixa ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. e ocorrência moderada de infecção por *Brucella* spp. nas terras indígenas Tapirapé e Karajá;
2. O número reduzido de animais de produção nas aldeias pesquisadas pode estar relacionado à baixa ocorrência destas infecções;
3. As provas sorológicas comumente empregadas para o diagnóstico da leishmaniose apresentam baixa confiabilidade e acurácia, apontando para a necessidade de padronização das técnicas e associação entre testes laboratoriais diretos e indiretos para um diagnóstico mais seguro;
4. Embora estas doenças encontrem-se pouco disseminadas nestas áreas, a ocorrência delas requer atenção das autoridades sanitárias locais para a tomada de medidas que objetivem o controle destas zoonoses;
5. Os resultados obtidos no presente estudo indicam a necessidade de pesquisas com maior abrangência da fauna local, visando a identificação de outras fontes de infecção para mais esclarecimentos sobre os aspectos ecológicos e epidemiológicos das leishmanioses e da brucelose nas terras indígenas estudadas.

REFERÊNCIAS

ACHA, P.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: O.P.S., 2001. p. 398

AGUIAR, D. M. DE; CAVALCANTE, G. T.; VASCONCELLOS, S. A.; MEGID, J.; SALGADO, V. R.; CRUZ, T. F.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; SILVA, J. C. R. DA; MORAES, Z. M.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M. Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella abortus* e anti-*Brucella canis* em cães rurais e urbanos do Município de Monte Negro, Rondônia, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1216-1219, 2005.

AL DAHOUK, S.; TOMASO, H.; NÖCKLER, K.; NEUBAUER, H.; FRANGOULIDIS, D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. **Clinical laboratory**, v. 49, n. 9-10, p. 487-505, 2003.

ALENCAR, J. E.; NEVES, J.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: VERONESI, R. (Ed.). **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 706-717.

ALEXANDER, B.; DE CARVALHO, R. L.; MCCALLUM, H.; PEREIRA, M. H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 12, p. 1480-1485, 2002.

ALMEIDA, A. C.; SANTORELLI, A.; BRUZADELLI, R. M. Z.; OLIVEIRA, M. M. N. F. Soroepidemiologia da brucelose canina causada por *Brucella canis* e *Brucella abortus* na cidade de Alfenas, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 2, p. 275-276, 2004.

ALMEIDA, A. DO B. P. F. DE; SOUSA, V. R. F.; CRUZ, F. A. C. S. D; DAHROUG, M. A. A.; FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA, M. DE F. Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 4, p. 359-365, 2012.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: INRA, 1976. p. 109

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. 12, 2012.

ALVES, C. J.; ALVES, F. A. L.; GOMES, A. A. B.; AZEVEDO, S. S.; ANDRADE, J. S. L.; SANTOS, F. A. Aspectos Epidemiológicos de *Brucella canis* em Patos, Paraíba. **Ciência Animal**, v. 13, n. 1, p. 45-49, 2003.

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**, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

ANDRADE, H. M.; DE TOLEDO, V. D. P. C. P.; MARQUES, M. J.; FRANÇA SILVA, J. C.; TAFURI, W. L.; MAYRINK, W.; GENARO, O. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. **Veterinary parasitology**, v. 103, n. 1-2, p. 71-81, 2002.

ANDRADE, H. M. DE; REIS, A. B.; DOS SANTOS, S. L.; VOLPINI, A. C.; MARQUES, M. J.; ROMANHA, A. J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary parasitology**, v. 140, n. 3-4, p. 231-238, 2006.

ANGEL, M. O.; RISTOW, P.; KO, A. I.; DI-LORENZO, C. Serological trail of *Brucella* infection in an urban slum population in Brazil. **Journal of infection in developing countries**, v. 6, n. 9, p. 675-679, 2012.

ANTÔNIO, E. G.; MALACCO, M. A. F.; GONTIJO, C. M. F.; MOREIRA, E. F.; CALDAS, I. S.; PENA, J. L.; MACHADO-COELHO, G. L. L. Canine visceral leishmaniasis in the Krenak indigenous community, Resplendor, Minas Gerais State, Brazil, 2007. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 3, p. 603-607, 2011.

ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J. C.; SHERLOCK, I.; EULALIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER, R. H. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 53, n. 3, p. 251-255, 1995.

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 523-532, 1996.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.

AZEVEDO, S. S. DE; SILVA, M. L. C. R.; BATISTA, C. DE S. A.; GOMES, A. A. DE B.; VASCONCELLOS, S. A.; ALVES, C. J. Anticorpos anti-*Brucella abortus*, anti-*Brucella canis* e anti-*Leptospira* spp. em raposas (*Pseudalopex vetulus*) do semiárido paraibano, Nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 190-192, 2010.

AZEVEDO, S. S.; VASCONCELLOS, S. A.; ALVES, C. J.; KEID, L. B.; LÍLIA, M. P.; GRASSO, S.; MASCOLLI, R.; PINHEIRO, S. R. Inquérito sorológico e fatores de risco para a brucelose por *Brucella canis* em cães do município de Santana de Parnaíba, Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 156-160, 2003.

BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULÁLIO, M. C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E. M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J. M.; HOUGHTON, R. L.;

DAVID, J. R.; REED, S. G. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 173, n. 3, p. 758-761, 1996.

BADARÓ, R.; JONES, T. C.; LORENÇO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 154, n. 4, p. 639-649, 1986.

BADARÓ, R.; REED, S. G.; BARRAL, A.; ORGE, G.; JONES, T. C. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 1, p. 72-78, 1986.

BAEK, B. K.; LIM, C. W.; RAHMAN, M. S.; KIM, C.-H.; OLUOCH, A.; KAKOMA, I. *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. **Canadian journal of veterinary research**, v. 67, n. 4, p. 312-314, 2003.

BARUFFA, G.; CURY, P. Contribuição ao estudo do calazar em Mato Grosso. **Revista Patologia Tropical**, v. 2, p. 345-361, 1973.

BATES, P.; ROGERS, M. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 6, p. 601-609, 2004.

BLANKENSHIP, R. M.; SANFORD, J. P. *Brucella canis*. A cause of undulant fever. **The American journal of medicine**, v. 59, n. 3, p. 424-426, 1975.

BOSCH, R. J.; RODRIGO, A. B.; SÁNCHEZ, P.; DE GÁLVEZ, M. V; HERRERA, E. Presence of *Leishmania* organisms in specific and non-specific skin lesions in HIV-infected individuals with visceral leishmaniasis. **International journal of dermatology**, v. 41, n. 10, p. 670-675, 2002.

BRAGA, M. D. M.; COELHO, I. C. B.; POMPEU, M. M. L.; EVANS, T. G.; MACAULLIFE, I. T.; TEIXEIRA, M. J.; LIMA, J. W. DE O. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel . **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 5, p. 419-424, 1998.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; BRITO, M. E.; CARVALHO, F. G.; ISHIKAW, E. A.; CUPOLILLO, E.; FLOETER-WINTER, L.; SHAW, J. J. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.

BRASIL. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Disponível em: <<http://www.censo2010.ibge.gov.br/index.php>>. Acesso em: 10 fev. 2011

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009a. (Caderno 11) Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_lv.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2012

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde. **Relatório de situação: Tocantins**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Relatório de gestão 2010**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Casos confirmados de leishmaniose visceral, Brasil, grandes regiões e unidades federadas**. 2011b. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_casos_de_lv_entre_1990_e_2011_final.pdf>. Acesso em: 13 jan 2013

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde. **Relatório de situação: Tocantins**. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011c.

BREW, S. D.; PERRETT, L. L.; STACK, J. A.; MACMILLAN, A. P.; STAUNTON, N. J. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. **The Veterinary record**, v. 144, n. 17, p. 483, 1999.

BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 435-446, 2002.

CADMUS, S. I. B.; ADESOKAN, H. K.; AJALA, O. O.; ODETOKUN, W. O.; PERRETT, L. L.; STACK, J. A. Seroprevalence of *Brucella abortus* and *B. canis* in household dogs in southwestern Nigeria: a preliminary report. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 82, n. 1, p. 56-57, 2011.

CARDOSO, L.; CABRAL, M. *Leishmania* and canine Leishmaniasis. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, n. 527, p. 122-141, 1998.

CARMICHAEL, L. E. Canine brucellosis: An annotated review with selected cautionary comments. **Theriogenology**, v. 6, n. 2-3, p. 105-116, 1976.

CARMICHAEL, L. E. *Brucella canis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. (Ed.). **Animal**

Brucellosis. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1990. p. 335-350.

CARMICHAEL, L. E.; GREENE, C. E. Canine brucellosis. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat.** Philadelphia: W. B. SAUNDERS, 1990. p. 573- 584.

CARMICHAEL, L. E.; KENNEY, R. M. Canine abortion caused by *Brucella canis*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 152, n. 6, p. 605-616, 1968.

CARMICHAEL, L. E.; KENNEY, R. M. Canine brucellosis: the clinical disease, pathogenesis, and immune response. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 156, n. 12, p. 1726-1734, 1970.

CARMICHAEL, L. E.; SHIN, S. J. Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. **Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)**, v. 11, n. 3, p. 161-165, 1996.

CARMICHAEL, L. E.; ZOHA, S. J.; FLORES-CASTRO, R. Problems in the serodiagnosis of canine brucellosis: dog responses to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. **Developments in biological standardization**, v. 56, p. 371-383, 1984.

CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology.** Filadelfia: Lea & Febiger, 1991. p. 196-200

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; COSTA, J. M.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 56, n. 4, p. 315-325, 1994.

CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; AUGUR, C.; LUZ, E. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). **Experimental parasitology**, v. 117, n. 1, p. 13-21, 2007.

CAVALCANTI, L. A.; DASSO, M. G.; OLIVEIRA, F. C. S.; VIEGAS, S. A. R. A.; ALMEIDA, M. G. A. R.; ANUNCIAÇÃO, A. V. M.; ALCÂNTARA, A. C. DE; BITTENCOURT, D. V. V.; OLIVEIRA, E. M. DE D. Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella canis* em cães provenientes da região metropolitana de Salvador. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 7, n. 2, p. 176-180, 2006.

CLAVAREAU, C.; WELLEMANS, V.; WALRAVENS, K.; TRYLAND, M.; VERGER, J. M.; GRAYON, M.; CLOECKAERT, A.; LETESSON, J. J.; GODFROID, J. Phenotypic and molecular characterization of a *Brucella* strain isolated from a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). **Microbiology (Reading, England)**, v. 144, p. 3267-3273, 1998.

COHEN, J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. **Educational and Psychological Measurement**, v. 20, n. 1, p. 37-46, 1960.

COIMBRA JÚNIOR, C. E.; SANTOS, R. V; DO VALLE, A C. Cutaneous

leishmaniasis in Tupí-Mondé Amerindians from the Brazilian Amazonia. **Acta tropica**, v. 61, n. 3, p. 201-211, 1996.

COLOMBO, F. A.; ODORIZZI, R. M. F. N.; LAURENTI, M. D.; GALATI, E. A. B.; CANAVEZ, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology research**, v. 109, n. 2, p. 267-274, 2011.

CONVIT, J.; PINARDI, M. E.; RONDÓN, A. J. Diffuse cutaneous leishmaniasis: A disease due to an immunological defect of the host. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 4, p. 603-610, 1972.

COOK, I.; CAMPBELL, R. W.; BARROW, G. Brucellosis in North Queensland rodents. **Australian veterinary journal**, v. 42, n. 1, p. 5-8, 1966.

CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. **Emerging infectious diseases**, v. 3, n. 2, p. 213-221, 1997.

CORBEL, M. J.; STUART, F. A.; BREWER, R. A. Observations on serological cross-reactions between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. **Developments in biological standardization**, v. 56, p. 341-348, 1984.

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 12-17, 2004.

CORTEZ, A.; SCARCELLI, E.; SOARES, R. M.; HEINEMANN, M. B.; SAKAMOTO, S. M.; GENOVEZ, M. E.; FERREIRA, F.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine foetuses by polymerase chain reaction. **Australian veterinary journal**, v. 79, n. 7, p. 500-501, 2001.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314-1320, 2002.

CURRIER, R. W.; RAITHEL, W. F.; MARTIN, R. J.; POTTER, M. E. Canine brucellosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 2, p. 132-133, 1982.

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

DE FREITAS, E.; MELO, M. N.; DA COSTA-VAL, A. P.; MICHALICK, M. S. M. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary parasitology**, v. 137, n. 1-2, p. 159-167, 2006.

DE OLIVEIRA-NETO, M. P.; MATTOS, M. S.; PEREZ, M. A.; DA-CRUZ, A. M.; FERNANDES, O.; MOREIRA, J.; GONÇALVES-COSTA, S. C.; BRAHIN, L. R.; MENEZES, C. R.; PIRMEZ, C. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. **International Journal of Dermatology**, v. 39, n. 7, p. 506-514, 2000.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 198-212, 1962.

DORNELES, E. M. S.; SANTOS, H.; MINHARRO, S.; NASCIMENTO-ROCHA, J. M. DO; MATHIAS, L. A.; DASSO, M. G.; TIENSOLI, C. D.; HEINNEMAN, M. B.; LAGE, A. P. Anticorpos anti-*Brucella canis* e anti-*Brucella abortus* em cães de Araguaína, Tocantins. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 2, p. 167-171, 2011.

DOS SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; DE PAIVA HOFFMANN, M.; DE FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and veterinary entomology**, v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.

DUBEY, J. P.; ROSYPAL, A. C.; PIERCE, V.; SCHEINBERG, S. N.; LINDSAY, D. S. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 8, p. 1266-1269, 2005.

EISENBERG, T.; HAMANN, H.-P.; KAIM, U.; SCHLEZ, K.; SEEGER, H.; SCHAUERTE, N.; MELZER, F.; TOMASO, H.; SCHOLZ, H. C.; KOYLASS, M. S.; WHATMORE, A. M.; ZSCHÖCK, M. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 10, p. 3753-3755, 2012.

ELISEI, C.; PELLEGRIN, A.; TOMAS, W. M.; SOARES, C. O.; ARAÚJO, F. R.; FUNES-HUACCA, M. E.; ROSINHA, G. M. S. Evidência molecular de *Brucella* sp. em *Ozotoceros bezoarticus* (veado campeiro) do Pantanal Sul-Mato-Grossense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 503-509, 2010.

FENECH, F. F. Leishmaniasis in Malta and the Mediterranean basin. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 91, n. 7, p. 747-753, 1997.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2001. p. 262

FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, v. 136, n. 20, p. 514-516, 1995.

FERRER, L. M. **Clinical aspects of canine leishmaniasis**. In: International Canine Leishmaniasis Forum, 1999, Barcelona. **Anais...Barcelona:1999**. Disponível em: <<http://www.paraband.com.tr/descargas/sumarios/1st-proc-intcanlforum-1999.pdf#page=6>>. Acesso em: 18 abr. 2013

FORBES, L. B. *Brucella abortus* infection in 14 farm dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 6, p. 911-916, 1990.

FOSTER, G.; OSTERMAN, B. S.; GODFROID, J.; JACQUES, I.; CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, n. 11, p. 2688-2693, 2007.

FURTADO, T. A. Leishmaniose tegumentar americana. In: MACHADO-PINTO, J. (Ed.). **Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas**. Rio de Janeiro: Medsi, 1994. p. 319-329.

GARCIA CARRILO, C. **La brucellosis de los animales en America y su relacion con la infección humana**. Paris: Office international des épizooties, 1987. p. 303

GASKIN, A. A.; SCHANTZ, P.; JACKSON, J.; BIRKENHEUER, A.; TOMLINSON, L.; GRAMICCIA, M.; LEVY, M.; STEURER, F.; KOLLMAR, E.; HEGARTY, B. C.; AHN, A.; BREITSCHWERDT, E. B. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 1, p. 34-44, 2002.

GENARO, O. **Leishmaniose canina experimental**. 1993. 202f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

GODOY, A. M.; NEVES, J.; PERES, J. N.; BARG, L. Human Laboratory Infection with *Brucella canis*. **Arquivo da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 31, n. 1, p. 31-34, 1979.

GOMES, A. DE C.; OTTATI, S. M.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; YAMAMOTO, Y. I. Active transmission of *Leishmania braziliensis braziliensis* in the Serra de Mar forest, São Paulo, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 193, 1989.

GONTIJO, C. M. F.; DA SILVA, E. S.; DE FUCCIO, M. B.; DE SOUSA, M. C. A.; PACHECO, R. S.; DIAS, E. S.; ANDRADE FILHO, J. D.; BRAZIL, R. P.; MELO, M. N. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta tropica**, v. 81, n. 2, p. 143-150, 2002.

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.

GONZÁLEZ, J. L.; FERMIN, M. L.; GARCIA, P.; ROLLAN, E.; CASTAÑO, M. Erosive Colitis in Experimental Canine Leishmaniasis. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 37, n. 1-10, p. 377-382, 1990.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-

250, 1993.

GUERRA, J. A. O.; BARROS, M. L. B.; FÉ, N. F.; GUERRA, M. V. F.; CASTELLON, E.; PAES, M. G.; SHERLOCK, Í. A. Leishmaniose visceral entre índios no Estado de Roraima, Brasil: aspectos clínicoepidemiológicos de casos observados no período de 1989 a 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 4, p. 305-311, 2004.

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011.

HIPOLITO, O.; FREITAS, M. G.; FIGUEIREDO, J. B. **Doenças Infecto-contagiosas dos Animais Domésticos**. 4. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1965. p. 596

HOLLETT, R. B. Canine brucellosis: outbreaks and compliance. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 575-587, 2006.

HUBBERT, N. L.; BECH-NIELSEN, S.; BARTA, O. Canine brucellosis: comparison of clinical manifestations with serologic test results. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 177, n. 2, p. 168-171, 1980.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; GORGOU LIS, V. G. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary parasitology**, v. 113, n. 2, p. 99-113, 2003.

JOHNSON, C. A.; WALKER, R. D. Clinical Signs and Diagnosis of *Brucella canis* Infection. **The Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarian. Small Animal**, v. 16, n. 6, p. 763-772, 1992.

JONES, R. L.; EMERSON, J. K. Canine brucellosis in a commercial breeding kennel. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 184, n. 7, p. 834-835, 1984.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.

KEID, L. B. **Diagnóstico da brucelose canina por *Brucella canis*. Correlação entre exames clínicos e laboratoriais: imunodifusão em gel de ágar, imunodifusão em gel de ágar com emprego do 2-mercaptoetanol, cultivo e reação em cadeia pela polimerase**. 2001. 96f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

KEID, L. B. **Avaliação de métodos diretos e indiretos de diagnóstico da brucelose em cães naturalmente infectados**. 2006. 134f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

KEID, L. B.; MORAES, Z. M.; MELVILLE, P. A.; VASCONCELLOS, S. A. Ocorrência da brucelose canina causada por *Brucella canis* em canis do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, p. 42, 2002.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; MORAIS, Z. M.; RICHTZENHAIN, L. J.; VASCONCELLOS, S. A.; PAULO, U. D. S.; PAULO, S. BRUCELLA SPP . Isolation from dogs from commercial breeding kennels in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 161-166, 2004.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CHIEBAO, D. P.; MEGID, J.; SALGADO, V. R.; RICHTZENHAIN, L. J. A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. **Theriogenology**, v. 67, n. 7, p. 1203-1210, 2007a.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CHIEBAO, D. P.; SALGADO, V. R.; MEGID, J.; RICHTZENHAIN, L. J. A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. **Theriogenology**, v. 68, n. 9, p. 1260-1270, 2007b.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VIEIRA, N. R.; MEGID, J.; SALGADO, V. R.; VASCONCELLOS, S. A.; DA COSTA, M.; GREGORI, F.; RICHTZENHAIN, L. J. Diagnosis of canine brucellosis: comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer. **Veterinary research communications**, v. 31, n. 8, p. 951-965, 2007c.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; MEGID, J.; SALGADO, V. R.; RICHTZENHAIN, L. J. Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. **Research in veterinary science**, v. 86, n. 1, p. 22-26, 2009.

KUMAR, S.; KUMAR, D.; CHAKRAVARTY, J.; RAI, M.; SUNDAR, S. Identification and characterization of a novel *Leishmania donovani* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 4, p. 601-605, 2012.

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

LAGE, A. P.; ROXO, E.; MÜLLER, E.; POESTER, F.; CAVALLÉRO, J C M FERREIRA NETO, J S MOTA, P M P C GONÇALVES, V. S. P. **Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal (PNCEBT)**. Brasília - DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. p. 188

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

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memórias do**

Instituto Oswaldo Cruz, v. 82, n. 3, p. 421-424, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis of the New World: Taxonomic problema. **British Medical Bulletin**, v. 28, n. 1, p. 44-48, 1972.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The leishmaniasis in biology and medicine. Volume I. Biology and epidemiology**. London: Academic Press, 1987. p. 120.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; FRAIHA, H. Leishmaniasis in Brazil. XIX: Visceral leishmaniasis in the Amazon Region, and the presence of *Lutzomyia longipalpis* on the Island of Marajo, Para State. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 3, p. 323-330, 1983.

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. *Leishmania* in Phlebotomid Sandflies: VI. Importance of Hindgut Development in Distinguishing between Parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* Complexes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 199, n. 1135, p. 309-320, 1977.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

LANE, R. P. Sandflies (Phlebotominae). In: LANE, R.; CROSSKEY, R. (Ed.). **Medical Insects and Arachnids**. [s.l.] Springer Netherlands, 1993. p. 78-119.

LAURENTI, M. **Patologia e patogenia das leishmanioses**. 2010. 84f. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 67, n. 6, p. 13-23, 2009.

LONGSTAFFE, J. A.; GUY, M. W. Canine leishmaniasis—United Kingdom update. **Journal of Small Animal Practice**, v. 27, n. 10, p. 663-671, 1986.

LÓPEZ-GOÑI, I.; MORIYÓN, I. **Brucella: molecular and cellular biology**. Wymondham, England: Horizon Bioscience, 2004. p. 432

LOW, G.; COOKE, W. E. A CONGENITAL CASE OF KALA-AZAR. **The Lancet**, v. 208, n. 5389, p. 1209-1211, 1926.

LUCERO, N. E.; AYALA, S. M.; ESCOBAR, G. I.; JACOB, N. R. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. **Epidemiology and infection**, v. 136, n. 4, p. 496-503, 2008.

LUCERO, N. E.; CORAZZA, R.; ALMUZARA, M. N.; REYNES, E.; ESCOBAR, G. I.; BOERI, E.; AYALA, S. M. Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs.

Epidemiology and infection, v. 138, n. 2, p. 280-285, 2010.

LUCERO, N. E.; ESCOBAR, G. I.; AYALA, S. M.; JACOB, N. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. **Journal of medical microbiology**, v. 54, n. 5, p. 457-461, 2005a.

LUCERO, N. E.; JACOB, N. O.; AYALA, S. M.; ESCOBAR, G. I.; TUCCILLO, P.; JACQUES, I. Unusual clinical presentation of brucellosis caused by *Brucella canis*. **Journal of medical microbiology**, v. 54, n. 5, p. 505-508, 2005b.

MACHADO, R. Z.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A.; LEMOS, E. G.; MACHADO, M. R.; VALADÃO, I. F.; BARCI, L. G.; MALHEIROS, E. B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary parasitology**, v. 71, n. 1, p. 17-26, 1997.

MADEIRA, M. DE F.; UCHÔA, C. M. A.; LEAL, C. A.; SILVA, R. M. M.; DUARTE, R.; MAGALHÃES, C. M.; SERRA, C. M. B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 551-555, 2003.

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T. M. P.; PACHECO, R. S.; OLIVEIRA, F. S.; PEREIRA, S. A.; FIGUEIREDO, F. B.; BAPTISTA, C.; MARZOCHI, M. C. A. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 5, p. 442-445, 2006.

MAGALHÃES, A. V. DE; MORAES, M. A. P.; RAICK, A. N.; LLANOS-CUENTAS, A.; COSTA, J. M. L.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*: 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 253-262, 1986.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L. DE; SENA, J. M. DE; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MALHEIROS, A. F. **Ocorrência de patógenos intestinais e fatores de risco associados à infecção entre os índios Tapirapé habitantes da Amazônia Matogrossense, Brasil**. 2011. 165f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MANCIANTI, F.; FALCONE, M. L.; GIANNELLI, C.; POLI, A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 59, n. 1, p. 13-21, 1995.

MARASSI, C. D.; MORAES, I. A.; LILENBAUM, W. Soroprevalência de brucelose canina no Município do Rio de Janeiro-RJ pelo método de imunodifusão em gel agarose. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v. 10, p. 63-64, 2003.

MARGONARI, C.; FREITAS, C. R.; RIBEIRO, R. C.; MOURA, A. C. M.; TIMBÓ, M.; GRIPP, A. H.; PESSANHA, J. E.; DIAS, E. S. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 31-38, 2006.

MARSELLA, R.; DE GOPEGUI, R. R. Leishmaniasis: a re-emerging zoonosis. **International Journal of Dermatology**, v. 37, n. 11, p. 801-814, 1998.

MARTIN, S. K.; THUITA-HARUN, L.; ADOYO-ADOYO, M.; WASUNNA, K. M. A diagnostic ELISA for visceral leishmaniasis, based on antigen from media conditioned by *Leishmania donovani* promastigotes. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 92, n. 5, p. 571-577, 1998.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 63, p. 82-104, 1992.

MARZOCHI, M. C.; MARZOCHI, K. B.; CARVALHO, R. W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 10, n. 1, p. 37-40, 1994.

MASSUNARI, G. K.; VOLTARELLI, E. M.; SANTOS, D. R. DOS; SANTOS, A. R. DOS; POIANI, L. P.; OLIVEIRA, O. DE; VIOLATO, R. J.; MATSUO, R.; TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V. A serological and molecular investigation of American cutaneous leishmaniasis in dogs, three years after an outbreak in the Northwest of Paraná State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 1, p. 97-104, 2009.

MASUCCI, M.; DE MAJO, M.; CONTARINO, R. B.; BORRUTO, G.; VITALE, F.; PENNISI, M. G. Canine leishmaniasis in the newborn puppy. **Veterinary research communications**, v. 27 Suppl 1, p. 771-774, 2003.

MATO GROSSO. Secretaria de Planejamento do Estado de Mato Grosso. **Áreas indígenas, extensão, etnia, população total, município e situação juridical em Mato Grosso, 2003**. Disponível em: <<http://www.seplan.mt.gov.br/anuario2004/1.4.1.htm>>. Acesso em: 27 jan. 2012

MATO GROSSO. Secretaria de Planejamento do Estado de Mato Grosso. **Anuário Estatístico de Mato Grosso, 2010**. Disponível em: <<http://www.seplan.mt.gov.br/sitios/anuario/2010/Index.htm>>. Acesso em: 13 jan. 2013

MAUËL, J. Macrophage-parasite interactions in *Leishmania* infections. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 47, n. 2, p. 187-193, 1990.

MCDONALD, W. L.; JAMALUDIN, R.; MACKERETH, G.; HANSEN, M.; HUMPHREY, S.; SHORT, P.; TAYLOR, T.; SWINGLER, J.; DAWSON, C. E.; WHATMORE, A. M.; STUBBERFIELD, E.; PERRETT, L. L.; SIMMONS, G. Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4363-4370, 2006.

MEGID, J.; BRITO, A. F.; MORAES, C. C. G.; FAVA, N.; AGOTTANI, J. Epidemiological assessment of canine brucellosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 5, p. 439-440, 1999.

MEGID, J.; SALGADO, V. R.; KEID, L. B.; SIQUEIRA, A. K.; CRUZ, T. F. DA; GRINSPAN, J.; LISTONI, F. J. P.; PAES, A. C. ABORTAMENTO CANINO POR *Brucella canis*: RELATO DE CASO. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 445-448, 2008.

MEGID, J.; SALGADO, V. R.; KEID, L. B.; SIQUEIRA, A. K.; MEIRELLES, C. E.; MORETTI, D. M. Infecção em cão por *Brucella abortus*: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1583-1585, 2007.

MEINECKE, C. K.; SCHOTTELIUS, J.; OSKAM, L.; FLEISCHER, B. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. **Pediatrics**, v. 104, n. 5, p. 65, 1999.

MELO, M. N. LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL: DESAFIOS E PERSPECTIVAS. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v. 23, n. 1, p. 41-45, 2004.

MELO, S. M. B.; NASCIMENTO, R. M.; AGUIAR, P. H. P.; FREIRE, S. M. F. Avaliação sorológica em gel de agarose para diagnóstico de *Brucella canis* em cães no distrito de Monte Gordo – Camaçari – Bahia. **Arquivo da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, v. 19, n. 1, p. 119-127, 1997.

MESTRE, G. L. DA C.; FONTES, C. J. F. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 42-48, 2007.

METCALF, H. E.; LUCHSINGER, D. W.; RAY, W. C. Brucellosis. In: BERAN, G. W.; STEELE, J. H. (Ed.). **Handbook series in zoonoses: section A, bacterial, rickettsial, chlamydial, and mycotic**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 9-39.

MICHALSKY, É. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; DIAS, E. S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p. 255-259, 2002.

MILES, M. A.; PÓVOA, M. M.; DE SOUZA, A. A.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 2, p. 243-252, 1980.

MILES, M. A.; VEXENAT, J. A.; CAMPOS, J. H. F.; CASTRO, J. A. F. **Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis**. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, **Anais...** Barcelona: Hoeschst Roussel Vet., 1999

MINHARRO, S.; DA SILVA, J. P.; PAULETTI, R. B.; DORNELES, E. S.; POESTER, F. P.; DASSO, M. G.; SCARCELLI, E.; SOARES FILHO, P. M. HEINEMMAN, M. B.; SANTOS, R. L.; LAGE, A. P. Biovariedades de *Brucella abortus* isoladas de bovinos no Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, p. 442, 2009. Suplemento 1.

MIRANDA, K. L.; COTTORELLO, A. C. P.; POESTER, F. P.; LAGE, A. P. Brucelose canina. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, n. 47, p. 66-82, 2005.

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 365-368, 2008.

MOORE, J. A.; KAKUK, T. J. Male dogs naturally infected with *Brucella canis*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 155, n. 8, p. 1352-1358, 1969.

MORAES, C. C. G.; MEGID, J.; SOUZA, L. C.; CROCCI, A. J. Prevalência da brucelose canina na microrregião da serra de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 7-10, 2002.

MORAES, I. A. DE; LARANJA, H. F.; VIEIRA, D. K.; LOPES, S. P.; FREAZA, A.; MELO, G.; PENCHEL, V. Identificação de cães potencialmente transmissores de brucelose na Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v. 9, n. 3, p. 154-157, 2002.

MORATA, P.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; REGUERA, J. M.; GARCÍA-ORDOÑEZ, M. A.; PICHARDO, C.; COLMENERO, J. D. Posttreatment follow-Up of brucellosis by PCR assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 12, p. 4163-4166, 1999.

MORATA, P.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; REGUERA, J. M.; MIRALLES, F.; LOPEZ-GONZALEZ, J. J.; COLMENERO, J. D. Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3743-3746, 2001.

MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; GARCIA, J. F.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 245-252, 2007.

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

MORISSET, R.; SPINK, W. W. Epidemic canine brucellosis due to a new species, *Brucella canis*. **Lancet**, v. 2, n. 7628, p. 1000-1002, 1969.

MYERS, D. M.; VARELA-DÍAZ, V. M.; COLTORTI, E. A. Comparative sensitivity of gel-diffusion and tube agglutination tests for the detection of *Brucella canis* antibodies in experimentally infected dogs. **Applied microbiology**, v. 28, n. 1, p. 1-4, 1974.

NAVA, A. F. D. **Espécies sentinelas para a Mata Atlântica: as consequências epidemiológicas da fragmentação florestal no Pontal do Paranapanema, São Paulo**. 2008. 147f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

NEGREIROS, R. L.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; GONÇALVES, V. S. P.; SILVA, M. C. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; FREITAS, J.; AMAKU, M. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 56-65, 2009.

NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. **Animal Brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 453

OLIVEIRA, C. D.; ASSUNÇÃO, R. M.; REIS, I. A.; PROIETTI, F. A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. **Cadernos de saude publica Ministerio da Saude Fundacao Oswaldo Cruz Escola Nacional de Saude Publica**, v. 17, n. 5, p. 1231-1239, 2001.

OLIVEIRA, T. M. F. DE S.; FURUTA, P. I.; DE CARVALHO, D.; MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.

OTERO, A. C.; DA SILVA, V. O.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; PALATNIK DE SOUSA, C. B. Short report: occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 1, p. 128-131, 2000.

OWENS, S. D.; OAKLEY, D. A.; MARRYOTT, K.; HATCHETT, W.; WALTON, R.; NOLAN, T. J.; NEWTON, A.; STEURER, F.; SCHANTZ, P.; GIGER, U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 8, p. 1076-1083, 2001.

PAES, M. G.; BARROS, M. L. B.; FERREIRA, L. C. L.; TALHARI, S. Leishmaniose tegumentar americana. In: TONELLI, E.; FREIRE, L. M. S. (Ed.). **Doenças infecciosas na infância e adolescência**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. p. 1251-1270.

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J. S. **O combate à brucelose bovina**. 1. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2003. p. 154

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 22, n. 1, p. 1-13, 1996.

PICKERILL, P. A.; CARMICHAEL, L. E. Canine brucellosis: control programs in commercial kennels and effect on reproduction. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 160, n. 12, p. 1607-1615, 1972.

PIDGEON, G. L.; SCANLAN, C. M.; MILLER, W. R.; MAYER, T. W. Experimental infection of dogs with *Brucella abortus*. **The Cornell veterinarian**, v. 77, n. 4, p. 339-347, 1987.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 55-62, 2002.

POLT, S. S.; DISMUKES, W. E.; FLINT, A.; SCHAEFER, J. Human brucellosis caused by *Brucella canis*: clinical features and immune response. **Annals of internal medicine**, v. 97, n. 5, p. 717-719, 1982.

PROBERT, W. S.; SCHRADER, K. N.; KHUONG, N. Y.; BYSTROM, S. L.; GRAVES, M. H. Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1290-1293, 2004.

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 2, p. 141-146, 2004.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe Publishing, 1994. p. 648

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1915-1934, 2009.

RACHAMIM, N.; JAFFE, C. L.; ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C.; SCHNUR, L. F.; JACOBSON, R. L. Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 85, n. 5, p. 503-508, 1991.

RAMAMOORTHY, S.; WOLDEMESKEL, M.; LIGETT, A.; SNIDER, R.; COBB, R.; RAJEEV, S. *Brucella suis* infection in dogs, Georgia, USA. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 12, p. 2386-2387, 2011.

REDKAR, R.; ROSE, S.; BRICKER, B.; DELVECCHIO, V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **Molecular and cellular probes**, v. 15, n. 1, p. 43-52, 2001.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 61, n. 4, p. 530-541, 1999.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R. J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C. R. Rapid Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs: Comparative Study Using an Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and

PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, 2002.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 856

RIECKE, J. A.; RHOADES, H. E. *Brucella canis* isolated from the eye of a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 166, n. 6, p. 583-584, 1975.

ROSS, R. FURTHER NOTES ON LEISHMAN'S BODIES. **British medical journal**, v. 2, n. 2239, p. 1401, 1903.

ROSPAL, A. C.; TROY, G. C.; ZAJAC, A. M.; FRANK, G.; LINDSAY, D. S. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **The Journal of parasitology**, v. 91, n. 4, p. 970-972, 2005.

ROUSSEAU, P. *Brucella canis* infection in a woman with fever of unknown origin. **Postgraduate medicine**, v. 78, n. 5, p. 249, 253-254, 257, 1985.

RYAN, J. R.; SMITHYMAN, A. M.; RAJASEKARIAH, G.; HOCHBERG, L.; STITELER, J. M.; MARTIN, S. K. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Soluble Promastigote Antigen Detects Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies in Sera from Cases of Visceral and Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 1037-1043, 2002.

RYAN, P. R.; ARANA, B. A.; RYAN, J. R.; WIRTZ, R. A.; WORTMANN, G. W.; RIZZO, N. R. The domestic dog, a potential reservoir for *Leishmania* in the Peten region of Guatemala. **Veterinary parasitology**, v. 115, n. 1, p. 1-7, 2003.

SAEGUSA, J.; UEDA, K.; GOTO, Y.; FUJIWARA, K. Ocular lesions in experimental canine brucellosis. **Nihon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science**, v. 39, n. 2, p. 181-185, 1977.

SAEGUSA, J.; UEDA, K.; GOTO, Y.; FUJIWARA, K. A survey of *Brucella canis* infection in dogs from Tokyo area. **Nihon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science**, v. 40, n. 1, p. 75-80, 1978.

SALDARRIAGA, O. A.; OSSA, J. E. Respuesta inmune y estrategias de evasión durante la infección con *Brucella* spp. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 15, n. 38, p. 180-187, 2002.

SANTA ROSA, I. C. A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.

SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R. R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A. R.; FRANK, G. R.; GRADONI, L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology**, v. 104, n. 4, p. 275-285, 2002.

SCHLEIN, Y.; WARBURG, A.; SCHNUR, L. F.; SHLOMAI, J. Vector compatibility of *Phlebotomus papatasi* dependent on differentially induced digestion. **Acta tropica**, v. 40, n. 1, p. 65-70, 1983.

SCHOEB, T. R.; MORTON, R. Scrotal and testical changes in canine brucellosis: a case report. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 172, n. 5, p. 598-600, 1978.

SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; MELZER, F.; KÄMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; FALSEN, E.; BAHN, P.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, n. 2, p. 375-382, 2008.

SCHOLZ, H. C.; HOFER, E.; VERGNAUD, G.; LE FLECHE, P.; WHATMORE, A. M.; AL DAHOUK, S.; PFEFFER, M.; KRÜGER, M.; CLOECKAERT, A.; TOMASO, H. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 9, n. 2, p. 153-156, 2009.

SCHOLZ, H. C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KÄMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H.-J.; DE, B. K. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 60, n. Pt 4, p. 801-808, 2010.

SEWELL, D. L. Laboratory-associated infections and biosafety. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 3, p. 389-405, 1995.

SHAW, J. J.; ISHIKAWA, E. A.; LAINSON, R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 6, p. 783-784, 1989.

SHAW, J. The leishmaniasis--survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 541-547, 2007.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671-683, 1996.

SHERLOCK, Í. A.; MIRANDA, J. C.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI JÚNIOR, G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 511, 1984.

SILVA, C. P. A. E.; ALMEIDA, A. DO B. P. F. DE; GODOY, I. DE; ARAÚJO, A. C. P. DE; AGUIAR, D. M. DE; SOUSA, V. R. F.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V. Detecção

molecular de *Brucella canis* em cães do Município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Ciência Rural**, v. 42, n. 6, p. 1051-1056, 2012.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 49, n. 1, p. 55-60, 2003.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. **The Veterinary quarterly**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 1988.

SMEAK, D. D.; OLMSTEAD, M. L.; HOHN, R. B. *Brucella canis* osteomyelitis in two dogs with total hip replacements. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 191, n. 8, p. 986-990, 1987.

SOHN, A. H.; PROBERT, W. S.; GLASER, C. A.; GUPTA, N.; BOLLEN, A. W.; WONG, J. D.; GRACE, E. M.; MCDONALD, W. C. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 4, p. 485-488, 2003.

STOENNER, H. G.; LACKMAN, D. B. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. **American journal of veterinary research**, v. 18, n. 69, p. 947-951, 1957.

SYMMERS, W. S. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. **Lance**, v. 1, n. 7116, p. 127-132, 1960.

TAFURI, W. L. **Leishmaniose visceral em cães natural e experimentalmente histopatologia e infectados: estudo imunocitoquímico dos receptores do tipo 3 (CR3 - CD11b/D18) e 4 (CR4 - CD11c/CD18) do complemento e dos antígenos de histocompatibilidade da classe II no fígado**. 1995. 207f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1995.

TANTILLO, G.; DI PINTO, A.; VERGARA, A.; BUONAVOGLIA, C. Polymerase chain reaction for the direct detection of *Brucella* spp. in milk and cheese. **Journal of food protection**, v. 64, n. 2, p. 164-167, 2001.

TARAN, I. F.; ZAMAKHAEVA, E. I. Comparative study of *Br. suis* strains isolated from animals of different species. **Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii**, v. 48, n. 7, p. 140-143, 1971.

TOCANTINS, Secretaria de Estado da Saúde. **Plano Estadual para o fortalecimento das ações de monitoramento e avaliação da atenção básica no Estado do Tocantins**, 2004. Disponível em: <http://www.atencao_primaria.to.gov.br/downloads/familia_formularios/Plano_de_Monitoramento.pdf>. Acesso 13 jan. 2013

TOCANTINS. Governo do Estado do Tocantins. **Portal de Informações e Serviços**, 2011. Disponível em: <<http://portal.to.gov.br/tocantins/2>>. Acesso em 13 jan. 2013

TRAVI, B. L.; TABARES, C. J.; CADENA, H. *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in two Colombian dogs: a note on infectivity for sand flies and response to

treatment. **Biomédica : revista del Instituto Nacional de Salud**, v. 26 Suppl 1, p. 249-253, 2006.

TRUONG, L. Q.; KIM, J. T.; YOON, B.-I.; HER, M.; JUNG, S. C.; HAHN, T.-W. Epidemiological survey for *Brucella* in wildlife and stray dogs, a cat and rodents captured on farms. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 73, n. 12, p. 1597-1601, 2011.

USDA. Unites States Department of Agriculture. National Center for Animal Health Programs. **Brucellosis Facts about brucellosis**. Disponível em: <<http://www.aphis.usda.gov>>. Acesso em 25 fev. 2011

VALE, E. C. S. DO; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 421-428, 2005.

VASCONCELOS, R. T. J.; ALVES, C. J.; CLEMENTINO, I. J.; ARAÚJO NETO, J. O.; ALVES, F. A. L.; BATISTA, C. S. A.; BERNARDI, F.; SOTO, F. R. M.; OLIVEIRA, R. M.; AZEVEDO, S. S. Soroprevalência e fatores de risco associados à infecção por *Brucella canis* em cães da cidade de Campina Grande, estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, p. 436-442, 2008.

VASSÍLIOS, J. K. Old World canine leishmaniasis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 15, p. 941-949, 1993.

VERSHILOVA, P. A.; LIAMKIN, G. I.; MALIKOV, V. E.; DRANOVSKAYA, E. A.; TARAN, I. F. *Brucella* Strains from Mouselike Rodents in Southwestern USSR. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 33, n. 2, p. 399-400, 1983.

VIZCAÍNO, N.; CLOECKAERT, A.; VERGER, J.; GRAYON, M.; FERNÁNDEZ-LAGO, L. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 2, n. 9, p. 1089-1100, 2000.

WALLACH, J. C.; GIAMBARTOLOMEI, G. H.; BALDI, P. C.; FOSSATI, C. A. Human infection with M- strain of *Brucella canis*. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 1, p. 146-148, 2004.

WANKE, M. M. Canine brucellosis. **Animal reproduction science**, v. 82-83, p. 195-207, 2004.

WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p. 644-645, 2010.

WOOLEY, R. E.; HITCHCOCK, P. L.; BLUE, J. L.; NEUMAN, M. A.; BROWN, J.; SHOTTS, E. B. Isolation of *Brucella canis* from a dog seronegative for brucellosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 173, n. 4, p. 387-388, 1978.

WHO. **Leishmaniasis: background information**, 2010. Disponível em: <www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 18 jun. 2012

ZANETTE, M. F. **Comparação entre os métodos de ELISA , imunofluorescência leishmaniose visceral canina**. 2006. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.

ZANETTE, M.F.; LIMA, V.M.F.; LAURENTI, M.D.; ROSSI, C.N.; VIDES, J.P.; VIEIRA, R.F.C.; BIONDO, A.W.; MARCONDES, M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2013 (in press).

ZERVA, L.; BOURANTAS, K.; MITKA, S.; KANSOUZIDOU, A.; LEGAKIS, N. J. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1661-1664, 2001.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Annual review of microbiology**, v. 48, p. 449-470, 1994.

ANEXOS

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS
Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis
Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública
Setor Comercial Sul; Quadra 04; Bloco A; Ed. Principal; Unidade VI - MS
70.304-000 - Brasília/DF
Telefone/Fax: (61) 3213-3294/3213-8316

NOTA TÉCNICA CONJUNTA Nº 04 /2011 - CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS

Assunto: Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC)

1. O Ministério da Saúde vem por meio desta Nota esclarecer e divulgar a substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC).

2. Os métodos diagnósticos sorológicos da LVC recomendados pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) para os órgãos de saúde pública no Brasil são o Ensaio Imunoenzimático (Elisa) como método de triagem e a Reação de Imunofluorescência Indireta (Rifi) - (titulação $\geq 1:40$) como confirmatório, utilizados na rotina e nos inquéritos caninos em municípios onde já houve registro da doença.

3. Os conjuntos diagnósticos utilizados para a realização dos testes sorológicos possuem registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e são produzidos pelo laboratório Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz - RJ (Fiocruz-RJ).

4. Nos últimos anos houve uma melhora significativa na qualidade do diagnóstico laboratorial da LVC realizado na rede pública. Esse fato se dá pela preocupação do Ministério da Saúde (MS) em aprimorar as ferramentas utilizadas. Esses testes são avaliados sob todos os parâmetros para definição de um teste sorológico a ser utilizado em saúde pública, tais como: sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo, valor preditivo positivo, reprodutibilidade, multiplicidade, facilidade e exequibilidade.

5. Com intuito de aperfeiçoar a técnica de diagnóstico da LVC, o MS encomendou um estudo à Fiocruz/RJ, cuja metodologia considerou os pontos abordados no parágrafo anterior. O estudo tinha como objetivo construir um painel sorológico de 1.600 cães oriundos de quatro municípios endêmicos de diferentes regiões administrativas do país, visando utilizá-lo para validar os testes sorológicos da LVC atualmente adotados na Rede Pública e do teste rápido imunocromatográfico - uma inovadora plataforma tecnológica de imunoensaio cromatográfico de duplo percurso, composta por uma mistura de proteínas recombinantes (k26 e k39) representativas de regiões antigênicas da *Leishmania chagasi* - que a Bio-Manguinhos pretendia também produzir.

6. O relatório final do estudo foi elaborado no mês de maio de 2011 em uma reunião onde participaram representantes da Fiocruz/RJ, Fundação Ezequiel Dias de Minas Gerais, Instituto Aldofo Lutz de São Paulo, Laboratório do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande/MS, Grupo Técnico das Leishmanioses/MS e Coordenação Geral de Laboratórios/MS. Com base nos resultados do estudo as principais considerações e recomendações contidas no relatório foram:

7. O cenário utilizado atualmente no Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, realizando a triagem com o Elisa e o confirmatório com a Rifi (titulação $\geq 1:40$), apresentou sensibilidade e especificidade dentro do esperado, entretanto, nessa avaliação, o cenário que utilizou o teste rápido imunocromatográfico como triagem e o Elisa como confirmatório demonstrou melhor acurácia que os demais. Adicionalmente, estes dois testes apresentaram uma melhor reprodutibilidade entre laboratórios em relação à Rifi.

8. É importante considerar a operacionalização dos testes e a oportunidade nos resultados. O teste rápido imunocromatográfico como teste de triagem apresenta vantagens e facilidades, tais como: a rapidez, simplicidade, praticidade, realização a partir de uma pequena amostra de sangue total, soro ou plasma, além de não exigir equipamentos laboratoriais específicos e especialização tecnológica. O Elisa, por sua vez, permite a realização de um número maior de amostras e fornece resultados automatizados, eliminando a subjetividade na leitura.

9. Em virtude disso ficou estabelecido a substituição do cenário utilizado atualmente (triagem com Elisa e confirmação com Rifi – titulação 1:40) pelo cenário utilizando o teste rápido imunocromatográfico como teste de triagem e o Elisa como teste confirmatório.

10. A realização do teste rápido imunocromatográfico poderá ser feita a partir de amostras de sangue total, soro ou plasma. Enquanto para a realização do Elisa está indicado apenas o soro sanguíneo obtido de coleta de punção venosa, não sendo recomendado mais o uso do papel filtro.

11. Espera-se com a implantação do teste rápido imunocromatográfico solucionar ou minimizar alguns problemas atualmente enfrentados, tais como: reduzir o número de animais falso positivos e falso negativos, agilizar a retirada dos animais infectados, diminuir a sobrecarga dos laboratórios de saúde pública e assim como minimizar ou eliminar a intermitência no fornecimento de kits de Elisa por parte do laboratório produtor.

12. O protocolo recomendado no relatório final do estudo supracitado, utilizando o teste rápido imunocromatográfico como triagem e o Elisa como confirmatório, será adotado pelo PVC-LV e implantado gradativamente à medida que o fornecimento dos insumos produza um estoque suficiente para tal. A implantação iniciou-se no mês novembro de 2011 em dois municípios e espera-se que até o final de 2012 todos os estados brasileiros estejam adotando o novo protocolo. Cabe ressaltar que antes da adoção do novo protocolo, as equipes das Secretarias Estaduais de Saúde serão treinadas pelo laboratório produtor, quanto aos procedimentos de execução e interpretação dos resultados do teste rápido imunocromatográfico.

13. Desta forma, é fundamental que as secretarias estaduais e municipais de saúde se preparem para as mudanças operacionais que ocorrerão com a implantação do novo protocolo diagnóstico da LVC.

14. Maiores detalhes deste processo de implantação serão tratados com os responsáveis pelas Vigilâncias Epidemiológicas e de Laboratórios das Leishmanioses das Secretarias Estaduais de Saúde.

Brasília, 2ª de dezembro de 2011.

MARCIA LOPES DE CARVALHO
 Coordenadora Geral de Doenças
 Transmissíveis
 Substituta

LEANDRO QUEIROZ SANTI
 Coordenador Geral de Laboratórios de Saúde
 Pública

De acordo,

MARIANA PASTORELEO VEROTTI
 Diretora de Vigilância das Doenças Transmissíveis
 Substituta

Mariana P. Verotti
 Diretora do Departamento de Vigilância das
 Doenças Transmissíveis
 Substituta