

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Estudo da Leishmaniose Tegumentar na Terra Indígena Xakriabá:
o parasito, os hospedeiros e os vetores

por

Patrícia Flávia Quaresma

Belo Horizonte
Fevereiro / 2011

TESE DDIP-CPqRR P. F. QUARESMA 2011

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Estudo da Leishmaniose Tegumentar na Terra Indígena Xakriabá:
o parasito, os hospedeiros e os vetores

por

Patrícia Flávia Quaresma

Tese apresentada com vistas à obtenção do Título
Doutor em Ciências na área de concentração
Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo

Coorientação: Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito

Belo Horizonte
Fevereiro / 2011

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

Q1e
2011

Quaresma, Patrícia Flávia.

Estudo da Leishmaniose Tegumentar na Terra Indígena Xakriabá: o parasito, os hospedeiros e os vetores / Patrícia Flávia Quaresma. – Belo Horizonte, 2011.

xviii, 149 f: il.; 210 x 297mm

Bibliografia: f. 157 - 167

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose Tegumentar Difusa/diagnóstico
2. *Leishmania*/parasitologia 3. População Indígena
I. Título. II. Gontijo, Célia Maria Ferreira (Orientação). Iii. Brito, Cristiana Ferreira Alves de (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Estudo da Leishmaniose Tegumentar na Terra Indígena Xakriabá:
o parasito, os hospedeiros e os vetores

por

Patrícia Flávia Quaresma

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo (Presidente)

Profa. Dra. Silvane Maria Fonseca Murta

Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho

Profa. Dra. Marilene Susan Marques Michalick

Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil

Suplente: Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

Tese defendida e aprovada em: 28/02/2011.

Este trabalho é dedicado à população da Terra Indígena Xakriabá.

Dedico também ao Igor e aos meus pais, Geraldo e Lúcia, por todo o amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por fortalecer minha fé, por encher minha vida de bênçãos e por permitir que eu recebesse todo o amparo necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Célia Gontijo, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação impecável, pelos ensinamentos compartilhados e, principalmente, pela amizade e exemplo de ética e profissionalismo.

À Dra. Cristiana Brito pela coorientação imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho, pela convivência agradável e igualmente, pela postura ética e profissional em todos os momentos.

Aos colegas dos laboratórios de Leishmanioses, Malária e do Centro de Referência Nacional e Internacional para Identificação de Flebotomíneos, pela convivência amigável.

Aos amigos Helbert Botelho, Felipe Dutra e Raquel Carvalho pela valiosa colaboração durante a parte experimental deste estudo.

À Janaína de Moura Freire, também por sua contribuição imprescindível, mas acima de tudo pela grande amizade e apoio constantes.

À Elizabeth Moreno, por todo empenho na construção e análise dos dados, mas também pelo companheirismo, profissionalismo e boa vontade sempre.

À Shara R. da Silva, por colaborar com tanta dedicação para a realização do estudo de cães domésticos e, especialmente, pela amizade e pelo carinho.

À equipe envolvida no estudo dos pequenos mamíferos, Adriano Paglia, Airton de Moura, Rafael Gonçalves, Filipe Madeira, Maria Beatriz Carvalho e Helbert Botelho.

Ao Dr. Edelberto Santos Dias e Dr. Ricardo Andrade Barata, pela colaboração no estudo dos vetores flebotomíneos.

À Professora Maria Norma Melo, pelo apoio e incentivo constantes, e também por contribuir sempre com valiosas sugestões.

Ao Professor Jeffrey Shaw pela contribuição importantíssima durante a qualificação. À Dra. Daniella Bartholomeu, igualmente, pela participação e sugestões na qualificação.

Aos amigos que dividiram comigo as experiências do Doutorado, especialmente, Gina Pontes, Fernanda Freire, Fernando Braga, por tornar a caminhada mais agradável e amena.

À toda a equipe de saúde do município de São João das Missões e da FUNASA, pelas contribuições e por permitir que este trabalho fosse desenvolvido na Terra Xakriabá. Agradeço, especialmente, ao Dr. Joaquim Diniz, que contribuiu diretamente para a realização das atividades do projeto na Terra Indígena.

Aos índios Xakriabás, a quem espero ter deixado minha singela contribuição para amenizar as difíceis condições de vida. Agradeço por me ensinarem tanto sobre persistência, superação e como a esperança pode ser mantida apesar das limitações impostas por uma sociedade tão desigual.

À minha família, papai e mamãe: Geraldo e Lúcia, pelo amor que me mantém firme e amparada. À minha irmã Carla, pelo amor e amizade, e a todos os familiares e amigos que alegam minha vida!

Ao meu marido, Igor, pela presença serena, pela compreensão diária, pelo apoio, pela amizade, pelos carinhos e, acima de tudo, por me amar!

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, pela infraestrutura, especialmente, dos Laboratórios de Leishmanioses e Malária.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou pela oportunidade e incentivo recebido.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

Às instituições que financiaram este projeto: FAPEMIG (processo N°: CBB - APQ-00289-10), CNPq (processo N°: 479408/2010-6), FIOCRUZ (processo N°: 403562/2008-2), Comunidade Européia (Control Strategies for visceral leishmaniasis and mucocutaneous leishmaniasis in South America: applications of molecular epidemiology).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana	19
1.2 Transmissão, vetores e reservatórios	23
1.3 Complexidade da LTA: fatores determinados pelos hospedeiros e pelo parasito (<i>L. braziliensis</i>).....	31
1.4 Diagnóstico, tratamento e controle da LTA.....	34
1.5 LTA e a Terra Indígena Xakriabá.....	36
2 JUSTIFICATIVA	38
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos Específicos.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1. Área de estudo	40
4.2 Procedimentos éticos.....	42
4.3 Delineamento do estudo	43
4.4 Estudo dos humanos	45
4.4.1 <i>Inquérito Populacional</i>	45
4.4.2 <i>Busca ativa de pacientes com LTA</i>	46
4.5 Diagnóstico	47
4.5.1 <i>Diagnóstico Imunológico</i>	47
4.5.2 <i>Diagnóstico Parasitológico</i>	48
4.6 Definições de caso	51
4.7 Estudo dos hospedeiros silvestres e domésticos	52
4.7.1 <i>Captura e coleta de amostras dos animais silvestres</i>	52
4.7.2 <i>Coleta das amostras e diagnóstico dos animais domésticos</i>	54
4.8 Estudo dos flebotomíneos	57
4.8.1 <i>Métodos de captura</i>	57
4.8.2 <i>Preparação e montagem dos espécimes</i>	57

4.9 Métodos bioquímicos e moleculares para detecção e identificação de <i>Leishmania</i>	59
4.9.1 Eletroforese de Multilocus Isoenzimas (MLEE – Multilocus Enzyme Electrophoresis)	59
4.9.2 PCR-RFLP do <i>hsp70</i>	59
4.9.3 PCR-RFLP do <i>ITS1</i>	60
4.10 Estudo da variabilidade genética de <i>L. braziliensis</i> proveniente de diferentes hospedeiros vertebrados	61
4.11 Análise Estatística	63
5 RESULTADOS	64
5.1 Inquérito Populacional	64
5.2 Busca ativa de pacientes com LTA.....	65
5.3 Caracterização dos casos clínicos.....	66
5.4 Diagnóstico de pacientes com LTA	67
5.5 Identificação da espécie de <i>Leishmania</i> presente nos casos clínicos de LTA.....	70
5.6 Caracterização dos casos clínicos.....	73
5.7 Detecção de <i>Leishmania</i> em pequenos mamíferos silvestres	79
5.8 Detecção de <i>Leishmania</i> em cães domésticos.....	85
5.9 Distribuição dos casos humanos de LTA e dos hospedeiros silvestres e domésticos nas aldeias Imbaúbas.....	87
5.10 Levantamento das espécies de flebotomíneos nas aldeias Imbaúbas I e II ..	89
5.11 Estudo do polimorfismo genético de <i>L. braziliensis</i>	90
6 DISCUSSÃO	95
6.1 A caracterização dos portadores de LTA.....	96
6.2 A questão da identificação da LTA e da <i>Leishmania</i>	101
6.3 A presença de outros hospedeiros de <i>Leishmania</i>	105
6.4 O polimorfismo genético nos isolados de <i>L. braziliensis</i>	109
7 CONCLUSÕES	112
8 ANEXOS	113
8.1 Anexo 1: MS/CNS/CONEP PARECER N.º 355/2008.....	113
8.2 Anexo 2: MJ/FUNAI AUTORIZAÇÃO PARA INGRESSO EM TERRA INDÍGENA N.º 149/CGEP/08	117
8.3 Anexo 3: MMA/IBAMA/SISBIO LICENÇA PERMANENTE PARA COLETA DE MATERIAL ZOOLOGICO N.º 12989-1 DATA DE EMISSÃO: 21/11/2007 17:46..	119

8.4 Anexo 4: MS/FIOCRUZ/VPPLR PTOTOCOLO N.º 32/10-3 CEUA	121
8.5 Anexo 5: MS/FIOCRUZ/CPqRR ESTUDO: Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Reserva Indígena Xacriabá, Minas Gerais, Brasil – CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO VOLUNTÁRIO	123
8.6 Anexo 6: MS/FIOCRUZ/CPqRR MS/FUNASA/DSEI MG-ES UFMG/ICB Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na Reserva Indígena Xacriabá, Minas Gerais - Entrevista Individual	126
8.7 Anexo 7: MS/FIOCRUZ/CPqRR MS/FUNASA/DSEI MG-ES CEE UFMG/ICB Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na Reserva Indígena Xacriabá, Minas Gerais - Ficha clínica.....	135
8.8 Anexo 8: MS/FIOCRUZ/CPqRR/LALEI Ficha clínica cães	146
8.9 Anexo 9: Artigo publicado: Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, da Silva SR, Moura Júnior AJ, Teixeira Neto RG, Madeira FM, Carvalho MB, Paglia AP, Melo MN, Gontijo CM. Wild, synanthropic and domestic hosts of Leishmania in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2011 Oct;105(10):579-85. Epub 2011 Sep 3. PubMed PMID: 21890159.....	149
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização do município de São João das Missões, onde está situada a Reserva Indígena Xakriabá.....	40
Figura 2: Visão geral da vegetação e das residências na Reserva Indígena Xakriabá.....	41
Figura 3: Delineamento do estudo na Reserva Indígena Xakriabá.	44
Figura 4: Aplicação do antígeno e aferição de resultado da intradermoreação de Montenegro, em paciente com teste positivo.	47
Figura 5: Realização de aspirado em lesão tipo úlcera típica localizada na perna direita (A) e lesão atípica tipo placa no tronco (B) de pacientes da Reserva Indígena Xakriabá.....	48
Figura 6: Realização de biopsia em lesão tipo pápula em braço de paciente da Reserva Indígena Xakriabá.....	49
Figura 7: Aspecto panorâmico das trilhas onde foram montadas as estações de captura de pequenos mamíferos nas aldeias Imbaúbas da Reserva Xakriabá.....	53
Figura 8: Coleta de amostras clínicas de roedor capturado na Reserva Indígena Xakriabá.....	54
Figura 9: Lesões de pacientes portadores de lesões típicas (A - C) e atípicas (D - I) de LTA residentes na Reserva Indígena Xakriabá.....	67
Figura 10: Resultado representativo do perfil da digestão com <i>HaeIII</i> do gene <i>hsp70</i> amplificado a partir de DNA do parasito obido das amostras isoladas em cultura...	71
Figura 11: Resultado representativo do perfil da digestão com <i>HaeIII</i> do gene <i>hsp70</i> amplificado a partir de DNA extraído dos fragmentos de lesão.....	72
Figura 12: Número de exemplares de pequenos mamíferos por espécie e por campanha capturados nas aldeias Imbaúbas I e II, Terra Indígena Xakriabá.....	80
Figura 13: Proporção de pequenos mamíferos infectados por diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	82
Figura 14: Porcentagem de amostras clínicas positivas na PCR para <i>Leishmania</i> em relação a espécie de pequenos mamíferos.....	83
Figura 15: Resultado representativo do perfil da digestão com <i>HaeIII</i> do gene <i>hsp70</i> amplificado a partir de DNA extraído das amostras provenientes de pequenos mamíferos.	85
Figura 16: Cão portador de lesão tegumentar na parte inferior do focinho, a partir de um fragmento da qual foi detectado DNA de <i>L. braziliensis</i>	87

Figura 17: Distribuição dos casos de LTA e de pequenos mamíferos e cães infectados por <i>Leishmania</i> sp. nas aldeias Imbaúbas I e II, Reserva Indígena Xakriabá.....	88
Figura 18: Resultado representativo do perfil da digestão com <i>TaqI</i> do gene <i>Cpb</i> amplificado a partir de DNA do parasito obtido das amostras isoladas em cultura..	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos indivíduos participantes do inquérito populacional realizado no período de julho a novembro de 2008, nas aldeias Imbaúbas I e II da Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais ⁽¹⁾	64
Tabela 2: Distribuição proporcional de casos de LTA por sexo e idade nas aldeias Imbaúbas I e II, no período de junho a novembro de 2008.	65
Tabela 3: Resultados dos métodos de diagnóstico realizados em 92 indivíduos com lesão suspeita de LTA, residentes na Terra Indígena Xakriabá, no período de junho de 2008 a agosto de 2010.....	68
Tabela 4: Comparação dos resultados dos testes diagnósticos entre os 75 pacientes que realizaram pelo menos um teste convencional (cultura de aspirado e de fragmento de pele, leitura de impressão de biopsia em lâmina) e PCR a partir de fragmentos de lesão para confirmação da infecção por <i>Leishmania</i>	69
Tabela 5: Comparação entre resultados da PCR e cada um dos testes convencionais.....	70
Tabela 6: Resultados da identificação das amostras provenientes de pacientes com LTA residentes na Terra Indígena Xakriabá, MG.	73
Tabela 7: Comparação entre casos confirmados e não confirmados parasitologicamente: distribuição das variáveis selecionadas na análise univariada*	74
Tabela 8: Comparação entre casos de úlceras típicas e casos de lesões atípicas: distribuição das variáveis selecionadas na análise univariada*	76
Tabela 9: Comparação entre casos com perfil de <i>L. braziliensis</i> e casos com perfil diferente: distribuição das variáveis selecionadas na análise univariada*	78
Tabela 10: Lista dos roedores e marsupiais capturados no peridomicílio e em trilhas no período de maio de 2008 a junho de 2009 nas aldeias Imbaúbas I e II na Terra Indígena Xakriabá, MG.	79
Tabela 11: Resultados da PCR-RFLP do <i>hsp 70</i> para detecção de DNA de <i>Leishmania</i> dos pequenos mamíferos capturados na Reserva Indígena Xakriabá no período de maio de 2008 a junho de 2009.....	81
Tabela 12: Positividade da PCR-RFLP <i>hsp 70</i> em amostras clínicas de pequenos mamíferos capturados na Reserva Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil, no período de maio de 2008 a fevereiro de 2010.....	84

Tabela 13: Resultados de testes sorológicos, PCR-RFLP e cultura de medula dos cães soropositivos provenientes das aldeias Imbaúbas I e II, Terra Indígena Xakriabás, realizados em fevereiro e julho de 2009 e fevereiro de 2010.	86
Tabela 14: Distribuição de flebotomíneos capturados com armadilha luminosa HP, segundo espécie e mês de captura na Terra Indígena Xakriabá, MG.	90
Tabela 15: Resultados do seqüenciamento do gene <i>hsp70</i> das amostras de <i>L. braziliensis</i> mostrando os polimorfismos encontrados na posição 904 que corresponde a um sítio de restrição da <i>HaeIII</i>	91
Tabela 16: Resultados do seqüenciamento do gene <i>hsp70</i> mostrando vários SNPs encontrados em diferentes posições das amostras de <i>L. braziliensis</i>	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

COBEA	Colégio Brasileiro de Animais de Experimentação
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
dNTP	Desoxirribonucleotídeos 5' fosfato
ELISA	Enzyme-linked immunossorbent assay - (Ensaio Imunoenzimático)
hsp 70	Proteína de choque térmico de 70KDa
ITS 1	Internal Transcribed Spacer 1
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MS	Ministério da Saúde
ng	nanogramas
NNN	Meio de cultura de Novy, McNeal e Nicolle
PBS	Phosphate Buffer Solution - (Tampão salina fosfato)
Pb	pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction - (Reação em cadeia da polimerase)
pmol	pico mols
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
U	unidades
μL	microlitros

RESUMO

Neste trabalho foi realizado um estudo multidisciplinar sobre a leishmaniose tegumentar relacionado ao parasito, aos hospedeiros e aos vetores na Reserva Indígena Xakriabá, norte de Minas Gerais, Brasil. Uma amostra populacional das aldeias Imbaúbas I e II foi caracterizada para a identificação dos casos clínicos e assintomáticos. Os casos de LTA provenientes das outras aldeias da Reserva Xakriabá também foram identificados. Todos foram caracterizados quanto às variáveis demográficas, infecções passadas, presença de co-morbidades, características das lesões e aspectos relacionados ao tratamento. Além deste estudo com os humanos, foi desenvolvido um estudo para verificar a infecção por *Leishmania* em pequenos mamíferos silvestres e cães domésticos, estimando a proporção de infectados. As espécies de flebotomíneos vetores foram determinadas na área. Por fim, foi realizado um estudo sobre a variabilidade genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* proveniente de diferentes hospedeiros vertebrados. A prevalência da doença nas aldeias Imbaúbas foi estimada em 8,6%. A partir de 92 casos suspeitos foram detectados 87 casos de LTA em toda a Reserva. Destes, 72 foram confirmados por algum exame parasitológico e/ou PCR. A maioria dos pacientes (70,0%) eram portadores de lesões atípicas, somente 27,6% apresentaram úlceras típicas e 2 pacientes eram portadores tanto de úlcera típica quanto de lesões atípicas. Foram identificadas três espécies de *Leishmania* circulando entre os roedores, marsupiais e cães domésticos: *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. guyanensis*. Um total de 1327 espécimes de flebotomíneos foi obtido. As espécies mais capturadas foram *Lutzomyia longipalpis* (756 exemplares – 57%) e *Lu. intermedia* (297 exemplares – 22%). Cabe ressaltar que foi coletado um número considerável de fêmeas de *Lu. intermedia* (244), principal vetor de LTA causada por *L. braziliensis* em Minas Gerais. Foi verificada a presença, em número bastante reduzido (3 exemplares), de *Lu. whitmani*, espécie considerada vetora em importantes focos de LTA no Brasil. O estudo do polimorfismo genético de *L. braziliensis* mostrou que existem duas populações deste parasito circulando entre os hospedeiros vertebrados. Uma forte associação foi verificada entre as duas populações de *L. braziliensis* e o tipo de manifestação clínica. Os parasitos que apresentaram um perfil idêntico às cepas referência de *L. braziliensis* estavam relacionados a lesões do tipo úlcera típica, enquanto os parasitos que apresentaram perfil variante parecem induzir lesões atípicas. A chance de ter lesão típica é cerca de cinco vezes maior entre os pacientes portadores de parasitos com perfil idêntico a *L. braziliensis*.

ABSTRACT

A multidisciplinary study related to cutaneous leishmaniasis investigated the parasites, the hosts and vectors in Xakriabá Indian Reservation, north of Minas Gerais, Brazil. A sample population of the villages Imbaúba I and II was characterized for the identification of clinical cases and asymptomatic individuals. The cases of LTA from the other villages of the Reserve Xakriabá were also identified. All were analyzed for demographic variables, past infections, presence of comorbidities, lesion characteristics and aspects related to treatment. In addition to this study with humans, a study was developed to verify the *Leishmania* infection in small wild mammals and domestic dogs, estimating the proportion of infected. The species of sandfly vectors were determined in the area. Finally, a study was conducted on the genetic variability of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different vertebrate hosts. The prevalence of the disease in Imbaúbas villages was estimated at 8.6%. Eighty-seven cases of ACL were detected from 92 suspected cases throughout the Reserve. Among the 87 diagnosed cases, 72 were confirmed by a parasitological examination and/or PCR. Most patients (70.0%) had atypical lesions, only 27.6% had typical ulcer and 2 patients had both typical ulcer and atypical lesions. We identified three *Leishmania* species circulating among rodents, marsupials and domestic dogs: *L. braziliensis*, *L. infantum* and *L. guyanensis*. A total of 1,327 specimens of sandflies were obtained. The most captured species were *Lutzomyia longipalpis* (756 copies - 57%) and *Lu. intermedia* (297 copies - 22%). It is noteworthy that was collected a considerable number of females of *Lu. intermedia* (244), the main vector of ACL caused by *L. braziliensis* in Minas Gerais. The presence of *Lu. whitmani* was found in very small number (3 copies), this specie is considered important vector in foci of leishmaniasis in Brazil..The study of genetic polymorphism of *L. braziliensis* showed that there are two populations of this parasite circulating among vertebrate hosts. A strong association was found between the two populations of *L. braziliensis* and the type of clinical manifestation. The parasites that showed a profile identical to reference strains of *L. braziliensis* were related to injuries of the type typical ulcer, while the parasites that appear to induce variant profile showed atypical lesions. The chance of having a typical lesion is about five times higher among patients with parasites with identical profile to *L. braziliensis*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma zoonose causada por parasitos do gênero *Leishmania* Ross 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), transmitidos ao homem e outros mamíferos domésticos e silvestres pela picada de fêmeas de insetos dípteros conhecidos como flebotomíneos (Psychodidae: Phlebotominae). No novo mundo, a LTA pode ser causada por várias espécies de *Leishmania*, sendo esta doença caracterizada por apresentar uma heterogeneidade epidemiológica e clínica, que pode ser atribuída, além dos fatores do hospedeiro, à diversidade de espécies do parasito e de seus vetores e hospedeiros vertebrados.

A LTA é endêmica em mais de 70 países e o número global de casos vem aumentando mundialmente desde a década passada. Este aumento pode ser explicado em parte pela melhoria nos métodos de diagnóstico e de notificação de casos, mas também é resultado do controle inadequado de vetores e reservatórios, do aumento de leishmaniose cutânea associada a infecções oportunistas (HIV/AIDS) e o aumento de resistência dos parasitos a drogas anti-*Leishmania* (Reithinger et al., 2007). Devido ao fato de muitas infecções serem assintomáticas ou erroneamente diagnosticadas como outros agravos, o número global de casos de leishmanioses cutâneas é provavelmente subestimado. Nas Américas, a LTA distribui-se desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Uruguai e do Chile. No Brasil a LTA é encontrada em todos os estados e a análise de sua evolução mostra uma expansão geográfica no início da década de 80, quando foram registrados casos em 19 unidades federadas, e em 2003 todos os estados registraram autoctonia (Brasil, 2006). Este processo de expansão geográfica vem modificando a epidemiologia e os padrões de transmissão da LTA, e atualmente sua ocorrência não mais se restringe a pessoas que entram em contato com matas e animais silvestres, ocorrendo também em áreas rurais desmatadas e regiões periurbanas (Camara Coelho et al., 2010; Kawa et al., 2010; Shimabukuro et al., 2010; Bacha et al., 2011).

Até o momento, sete espécies do gênero *Leishmania* foram identificadas no Brasil como causadoras de LTA. Seis espécies pertencem ao subgênero *Viannia* e uma ao subgênero *Leishmania*. As espécies mais importantes são a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, ambas de ampla

distribuição no Brasil e a *L. (V.) guyanensis*, que ocorre na região Norte. As outras espécies, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindenberg* contribuem para um número menor de notificações e são restritas aos estados do Norte e Nordeste (Lainson, 2010). *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a espécie do subgênero *Viannia* mais prevalente no Brasil, já no subgênero *Leishmania*, *L. (Leishmania) amazonensis* é primariamente observada na região da floresta amazônica, no entanto, sua distribuição tem aumentado, com casos autóctones sendo descritos na região sudeste. Casos de LTA causados por *L. (L.) amazonensis* já foram relatados em São Paulo (Medeiros et al. 2008), Rio de Janeiro (Azeredo-Coutinho et al., 2007) e Minas Gerais (Gontijo, 2000). Porém, a grande maioria dos casos de leishmanioses cutâneas no Brasil é causada principalmente por duas espécies: *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* (Romero et al. 2001, 2009).

Desde a década de 80, as taxas de incidência da LTA em todo o país vêm apresentando tendência de crescimento, com coeficientes de detecção que oscilam entre 3,83 a 22,94 por 100.000 habitantes. Nos últimos anos todas as unidades federadas registraram casos autóctones da doença. Em 1994 ocorreram casos autóctones em 1.861 municípios, o que representa 36,9% dos municípios do país e em 2002 houve uma expansão da doença para 2.302 municípios (41,1%) (Brasil, 2006).

O maior número de casos ocorre nas regiões Nordeste e Norte (cerca de 36,9% e 36,2% respectivamente). As maiores taxas de incidência ocorrem na região Norte (99,85/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (41,85/100.000 habitantes) e Nordeste (26,50/100.000 habitantes) (Brasil, 2006).

Devido à diversidade de espécies de *Leishmania*, diferentes reservatórios e espécies vetoras, a LTA pode se manifestar sob diferentes formas clínico-epidemiológicas. As manifestações clínicas e o curso da infecção dependem de fatores como a espécie de *Leishmania* envolvida, sua virulência e a relação com o hospedeiro. Resumidamente, as diferentes formas clínicas da LTA podem ser classificadas como: lesões de pele ulceradas desenvolvidas no sítio da picada do flebotomíneo – leishmaniose cutânea localizada (LCL); inflamação mucosa destrutiva – leishmaniose mucosa (LM) e nódulos múltiplos não-ulcerados – leishmaniose cutânea difusa (LCD) (Reithinger et al., 2007). Considerando as formas de resposta do hospedeiro a partir do local da picada do vetor, a localização das lesões e a evolução clínica, Marzochi & Marzochi (1994) propõem uma classificação clínica da LTA, envolvendo as diferentes formas e apresentações da doença e seus

respectivos agentes etiológicos. Estes autores consideram uma subdivisão da leishmaniose cutânea em: forma cutânea localizada única, quando existe apenas uma lesão em forma de úlcera bem delimitada com as bordas elevadas; forma cutânea localizada múltipla, quando são encontradas mais de uma úlcera localizadas num mesmo membro; forma cutânea disseminada, quando são encontradas úlceras localizadas em diferentes partes do corpo e forma cutânea difusa (caracterizada acima). Segundo Turetz et al., 2002, a leishmaniose disseminada (LD) é caracterizada pela presença de dez ou mais pápulas acneiformes e lesões de pele ulceradas em pelo menos duas partes do corpo. Esta forma clínica da LTA vem ocorrendo em áreas endêmicas e o número de casos registrados aumentou mais de 10 vezes nos últimos anos (Turetz et al., 2002).

Além destas manifestações clínicas da LTA, alguns trabalhos (Lescure et al., 2002; Guimarães et al., 2009; Baptista et al., 2009) relatam casos de leishmaniose cutânea que não se enquadram em nenhuma das formas clínicas bem caracterizadas da doença, cuja denominação adotada tem sido LTA atípica. A presença de lesões incomuns em vez da úlcera típica caracteriza esta forma na qual os pacientes podem ser portadores de lesões verrucosas, crostosas, vegetativas e lesões lupóides. Guimarães et al. (2009) demonstraram que a histopatologia das lesões atípicas é similar à observada na LTA clássica e, a partir disso, concluíram que estas manifestações não são provocadas por uma ineficiência da resposta imune do hospedeiro. As interações vetor/parasito/hospedeiro podem influenciar o curso da infecção por *Leishmania* (Bates, 2008; Gomez et al., 2009) e, nos casos de LTA atípica, diferenças intraespecíficas entre amostras de *Leishmania* e a influência de espécies dos vetores devem ser também consideradas. Devido à sintomatologia não específica da LTA atípica, a sua identificação e diagnóstico são mais difíceis e requerem uma atenção maior por parte do clínico e também a confirmação diagnóstica por métodos parasitológicos diretos. A identificação desta forma distinta e emergente da leishmaniose cutânea é crítica para que se consiga tratar apropriadamente estes pacientes, visto que, em geral, eles têm uma resposta ruim ao tratamento com antimonial. Por este motivo, alguns autores recomendam a anfotericina B como droga de escolha para pacientes diagnosticados com LTA atípica (Calvopina et al., 2005; Campos-Ponce et al., 2005; Guimarães et al., 2009).

Com relação ao prognóstico das lesões causadas por espécies de *Leishmania* dermatrópicas, existe uma tendência das lesões cutâneas localizadas (LCL) causadas por *L. braziliensis*, evoluírem para auto-cura dentro de 6 a 15

meses, aproximadamente (David & Craft, 2009). A forma difusa (LCD), raramente encontrada, é causada por *L. amazonensis* e caracterizada pela presença de nódulos não-ulcerados distribuídos pelo corpo a partir do sítio inicial da infecção. Comparada com a LCL, a LCD é mais difícil de tratar e não progride para auto-cura (Silveira et al, 2004). A leishmaniose mucosa está mais comumente associada a *L. braziliensis*, portanto, salvo exceções, a LM é principalmente encontrada na América do Sul (Reithinger et al., 2007). Esta forma pode também ser causada por *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* (Aliaga et al, 2003). É caracterizada pela habilidade do parasito de se disseminar (metástase) para tecidos da mucosa oral e/ou nasal por vias linfáticas ou hematogênicas. Tipicamente, a LM inicia-se com suave inflamação nasal seguida por ulceração da mucosa e perfuração do septo. Em alguns casos o palato, a laringe e a faringe podem ser afetados, levando a um quadro de LM grave. Ao contrário da LC, a LM nunca evolui para cura espontaneamente, apresenta dificuldades de responder ao tratamento e é potencialmente fatal (Marsden, 1986; Goto & Lindoso, 2010).

1.2 Transmissão, vetores e reservatórios

Infecções por *Leishmania* se originam através da picada de fêmeas de insetos da ordem Diptera (Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae) do gênero *Phlebotomus* (na Europa, África e Ásia) e *Lutzomyia* (do sudeste dos EUA ao norte da Argentina) (Killick-Kendrick, 1999). A transmissão da LTA nas Américas ainda está mais associada aos ambientes de matas e florestas. Contudo, nas últimas décadas a transmissão vem ocorrendo também em áreas periurbanas, onde vegetações de mata primária têm sido substituídas por ocupações humanas de forma desordenada. Neste contexto, a adaptação do principal vetor, *Lutzomyia intermedia*, aos ambientes peridomiciliar e domiciliar tem sido observada, assim como a presença de humanos, cães e outros animais infectados (Aguilar et al., 1987; Marzochi e Marzochi, 1994; Baptista et al., 2009).

No Brasil, a transmissão do agente causal de LTA envolve diferentes espécies de flebotomíneos em associações estreitas com parasitos e reservatórios, compondo os elos de diversos ciclos de transmissão que ocorrem no território nacional. Visto que as leishmanioses cutâneas são consideradas doenças metaxênicas, causadas por parasitos multihospedeiros, interagindo em complexas relações em diferentes ambientes, o conhecimento dos insetos vetores e dos hospedeiros mamíferos envolvidos nos ciclos zoonóticos é fundamental para conhecer a epidemiologia da LTA e estabelecer medidas de controle adequadas para cada região (Ashford, 2000; Rangel & Lainson, 2009).

Os focos de LTA no Brasil apresentam ampla variação ecológica. Flebotomíneos vetores podem ser encontrados em diferentes microhabitats úmidos, frescos e sombreados. Estes insetos costumam abrigar-se em troncos de árvores, tocas de animais, folhas caídas no solo, copa das árvores e frestas em rochas (Alexander et al. 1992, Azevedo et al. 1993). Com a destruição das matas nativas, os habitats naturais destes insetos foram alterados, havendo então, uma restrição de ambientes por eles utilizáveis. Desse modo, as espécies que de alguma forma resistem às condições adversas conseguem explorar novos ambientes, aproximando-se cada vez mais do peridomicílio (Lainson & Shaw, 1998). Embora a transmissão da maioria das espécies de *Leishmania* que causam leishmanioses cutâneas seja zoonótica, modificações ambientais causadas pelo homem têm contribuído para o estabelecimento da doença em vários outros cenários ecológicos, incluindo povoados estabelecidos em áreas adjacentes a florestas primárias, áreas

agrícolas de larga escala e áreas marginais de médias e grandes cidades (Desjeux, 2001).

Dados de observações epidemiológicas e/ou experimentais têm sugerido ou incriminado algumas espécies de flebotomíneos como transmissoras de LTA, em associação com leishmânias dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. Entretanto, apenas algumas espécies têm sido consideradas como importantes vetores, com base em evidências tais como grau de antropofilia, infecção natural por *Leishmania* e distribuição espacial coincidente com a da doença. Aproximadamente 30 espécies ou subespécies de flebotomíneos são vetores comprovados de parasitos do gênero *Leishmania*. Além destas, mais de 40 espécies estão provavelmente envolvidas no ciclo de transmissão (Rangel & Lainson, 2009). Flebotomíneos, comumente, se alimentam do sangue de vários hospedeiros, porém, com a perda da biodiversidade de mamíferos devido ao desmatamento, práticas agrícolas e urbanização, a transmissão de *Leishmania* vem se acentuando, uma vez que os vetores são obrigados a se alimentar mais em seres humanos e menos em reservatórios sinantrópicos (Campbell-Lendrum et al., 2000).

A principal espécie de flebotomíneo vetora de LTA no Brasil é a *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* Lutz & Neiva (1912), cuja distribuição geográfica envolve os estados do Pará, Piauí, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Bahia, Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás e Tocantins. É uma espécie que ocorre em florestas e matas secundárias, sobretudo em área cujo desmatamento vem modificando gradativamente o perfil ecológico, observado claramente em áreas de colonização antiga. Em 1922, *Lu. intermedia* foi incriminada como vetor potencial de *L. braziliensis* na cidade do Rio de Janeiro, e a partir então, evidências epidemiológicas acumuladas ao longo dos anos têm sugerido que esta espécie é o principal transmissor do agente etiológico de LTA em áreas endêmicas no sudeste do Brasil (Rangel & Lainson, 2009). Os estudos apontam-na como o principal vetor em São Paulo e Rio de Janeiro. Entretanto, nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo compartilha seu papel vetorial com *Lu. whitmani* (Mayrink et al., 1979; Falqueto, 1995). Estudos em Mesquita, estado do Rio de Janeiro, resultaram na coleta de *Lu. intermedia* sobre humanos e animais silvestres e domésticos em uma variedade de habitats, incluindo interior de residências, o extradomicílio (180 metros distante das residências) e a floresta (800 metros distantes das residências) (Rangel et al., 1999).

Quanto à sazonalidade de *Lu. intermedia*, Forattini (1973) assinala um comportamento irregular desse flebotomíneo, indicando maior densidade nos meses frios do ano. Nos estudos de Rangel et al. (1990), no Rio de Janeiro, é registrada a presença da espécie durante todo o ano, ressaltando junho, agosto e outubro como os meses de maior densidade e estudos recentes de Souza et al. (2003) apontaram que a população de *Lu. intermedia* teve sua densidade máxima nos períodos mais quentes do ano (Rangel & Lainson, 2009).

Alterações do meio ambiente, em várias regiões do Brasil, vêm modificando o perfil epidemiológico das leishmanioses, permitindo a invasão de áreas peridomiciliares por mamíferos silvestres reservatórios de *Leishmania*, onde podem ocorrer espécies de flebotomíneos adaptadas ao ambiente modificado pelo homem. A manutenção da LTA nessas áreas ecologicamente alteradas, na sua maioria áreas rurais na periferia de grandes cidades, indicam claramente a evolução de um ciclo de transmissão secundário ocorrendo no ambiente peridoméstico (Lainson & Shaw, 1998). Nesse modelo, encontra-se *Lu. intermedia* como transmissora de *L. braziliensis*, e os cães e eqüinos estariam, possivelmente, participando como reservatórios domésticos de um ciclo de transmissão domiciliar e/ou peridomiciliar (Rangel et al., 1990). Recentemente, em uma área com casas construídas em uma faixa intermediária entre a comunidade e o resíduo de Mata Atlântica, observou-se a freqüente visita de preguiças (*Bradypus variegatus*) que foram sugeridas como reservatório primário de *L. braziliensis* (Pirmez et al., 1998).

É comum observar *Lu. intermedia* sendo atraída por uma variedade de animais domésticos, sendo esta espécie considerada altamente antropofílica e abundante no interior das residências, bem como nos ambientes peridomiciliares, inclusive em abrigos de animais domésticos (Rangel & Lainson, 2009).

Alguns autores apontam a *Lu. (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) como o mais importante vetor da LTA no Brasil, tendo sido encontrada em um grande número de áreas endêmicas (Costa et al., 2007) e em associação com uma ampla diversidade vegetacional. Inicialmente, dependente de áreas de vegetação primária, mas podendo também ser coletada, em vários meses do ano, dentro das residências, em áreas cuja mata se encontra mais preservada (Forattini, 1960). Todavia, o autor assinala criadouros desse flebotomíneo no peridomicílio em chiqueiros e em plantações de banana, o que é, sem dúvida, prova de que a espécie se cria em ambiente doméstico. Souza et al. (2001) registraram a presença deste flebotomíneo em áreas da floresta Atlântica e também em áreas residenciais

próximas a florestas. Os mesmos autores notaram que em áreas recentemente invadidas pelo homem *Lu. whitmani* coexiste com *Lu. intermedia*, predominando a segunda espécie à medida que progride a alteração do meio ambiente (Rangel & Lainson, 2009).

Em áreas que sofreram alguma mudança ambiental devido a atividades humanas, é comum encontrar *Lu. whitmani*, sugerindo que esta espécie seja um importante vetor de *L. braziliensis* nesses ambientes (Galati et al., 1996; Dorval et al., 2009). As alterações na ecologia, em associação com mudanças climáticas, provavelmente são fatores importantes para a dispersão da LTA no Brasil nos anos recentes (Shaw, 2007) e, a esse respeito, *Lu. whitmani* parece ser uma espécie que se adapta rapidamente a novos ambientes, tais como áreas degradadas, em associação com animais domésticos e humanos no meio rural e áreas periurbanas (Costa et al., 2007; Shaw 2008). Utilizando análises através de modelagem do nicho ecológico na distribuição potencial dos vetores da LTA, um estudo conduzido por Peterson e Shaw (2003) previu que com as mudanças climáticas, *Lu. whitmani* continuará se adaptando a novas condições e eventualmente expandindo sua distribuição ainda mais pelo território brasileiro.

Recentemente, em estudos realizados em áreas de transmissão de LTA, foi observado hábito antropofílico de *Lu. intermedia* e *Lu. whitmani* no peridomicílio e em matas próximas às residências. No peridomicílio predomina a primeira espécie, enquanto na mata, prevalece a segunda. Observações sobre a sazonalidade revelaram a alta densidade de *Lu. whitmani* no inverno, inversamente ao que ocorre com *Lu. intermedia*, que é abundante nos meses quentes do ano (Souza et al., 2002). Estudos realizados em Minas Gerais evidenciaram o mesmo comportamento de *Lu. whitmani*, enfatizando a tendência à domiciliação (Mayrink et al., 1979; Passos et al., 1991).

Com relação à sazonalidade, pesquisas mais sistemáticas na região sudeste demonstraram que a espécie pode estar presente em todos os meses do ano. Além de evidências epidemiológicas, o achado de infecções naturais por *L. braziliensis* tem indicado a participação de *Lu. whitmani* na transmissão da LTA (Gontijo et al., 2005; Carvalho et al., 2008; Margonari et al., 2010; Paiva et al., 2010) . Dados da literatura sugerem a participação de *Lu. whitmani* no ciclo de transmissão de LTA em Minas Gerais, no foco de Caratinga (Mayrink et al., 1979) e mais recentemente, o encontro desta espécie infectada por uma *Leishmania* do subgênero *Viannia* em uma região próxima a Belo Horizonte, MG, sugere que este flebotomíneo possa ser

o vetor da leishmaniose cutânea nesta área (Carvalho et al., 2008). Desta maneira, esta espécie tem sido considerada vetor secundário da LTA em regiões endêmicas do estado onde pode ser, frequentemente, encontrada.

Lutzomyia migonei (França, 1920) é considerada um vetor secundário da LTA em algumas regiões endêmicas de Minas Gerais. Dados da literatura indicam que esta espécie pode ser encontrada dentro da mata, em geral em áreas com farta vegetação, e em menor abundância, em matas de formação secundária e em capoeiras. Entretanto, é comum observar a espécie freqüentando o domicílio e abrigos de animais domésticos (Forattini, 1973; Araújo Filho, 1979; Rangel et al., 1986). *Lu. migonei* já foi registrada em Minas Gerais onde casos de LTA estavam ocorrendo (Alexander et al., 2002).

Outras espécies de flebotomíneos que ocorrem na região sudeste do Brasil, incluindo Minas Gerais, já foram encontradas infectadas por *L. braziliensis*. Porém, não puderam ainda ser consideradas vetores comprovados, uma vez que é necessário mais que o achado de uma fêmea infectada para atestar sua capacidade vetorial.

Um número considerável de hospedeiros mamíferos não-humanos, principalmente marsupiais, roedores, edentados e carnívoros, pode ser encontrado infectado por alguma espécie de *Leishmania*. A identificação dos hospedeiros vertebrados de espécies de *Leishmania* que causam leishmanioses cutâneas é objeto de intensa investigação e poucos animais foram incontestavelmente incriminados como reservatórios. De fato, os reservatórios naturais (isto é, primários) de *L. braziliensis*, o mais difundido agente etiológico da LTA no Brasil, não são bem conhecidos (Reithinger et al., 2007). Visto que o ciclo de transmissão desta espécie é primariamente silvestre, frequentemente associado à penetração do homem em florestas ou áreas com alguma vegetação, existe uma forte suspeita de que mamíferos silvestres possam ser os reservatórios naturais de *L. braziliensis* (Grimaldi & Tesh, 1993; Gramiccia & Gradoni, 2005). O relato de pequenos roedores e marsupiais infectados por *L. braziliensis* e o encontro de DNA do parasito nos tecidos destes mamíferos sugere que eles possam estar envolvidos na manutenção desta espécie em ambientes naturais (Brandão-Filho et al., 2003; Oliveira et al., 2005b).

Outra discussão relevante é sobre o recente processo de modificação do ciclo epidemiológico da LTA. Com o estabelecimento da doença em áreas rurais e urbanizadas, o ciclo de transmissão nestes locais parece ser mantido com a

participação de reservatórios sinantrópicos ou até mesmo domésticos. Diversas espécies da ordem Marsupialia foram encontradas naturalmente infectadas nas Américas por espécies dermatrópicas de *Leishmania*, como *L. braziliensis* em *D. albiventris*, *D. marsupialis*, *Marmosa* sp. e *Micoureus demerarae* (Sherlock et al., 1988; Alexander et al., 1998; Brandão-Filho et al., 2003); *L. guyanensis* em *D. marsupialis* (Arias & Naiff, 1981; Arias et al., 1981; Lainson, 1981; Dedet et al., 1989) e *L. amazonensis* em *Philander opossum* e *Metachirus nudicaudatus* (Lainson, 1981), *Marmosa mexicana* (Van Winsberghe et al., 2009), *D. albiventris* (Sherlock et al., 1988), *D. marsupialis* e *M. cinerea* (Arias et al., 1981).

No Brasil, existem relatos de infecção natural por *Leishmania* spp. em marsupiais (*Didelphis* spp.) em áreas urbanas, porém seu papel na epidemiologia das leishmanioses cutâneas ainda não é bem entendido. A presença de *Leishmania* spp. nestes animais tem sido observada em várias cidades como Amaraji, Pernambuco (Brandão-Filho et al., 2003); Barra de Guarituba, Rio de Janeiro (Cabrera et al., 2003); Manaus, Amazonas (Guerra et al., 2007); Belo Horizonte, Minas Gerais (Schallig et al., 2007) e Bauru, São Paulo (Santiago et al., 2007). Segundo Cabrera e colaboradores (2003) a presença de *Didelphis marsupialis* constitui um importante fator de risco para a transmissão da leishmaniose.

Além dos marsupiais, os roedores também são apontados como possíveis reservatórios de *L. braziliensis*. Em estudos realizados por Lainson e Shaw em área endêmica para leishmaniose cutânea e mucosa no Mato Grosso, foram observados esfregaços de lesões de pele positivos para *Leishmania* provenientes dos roedores: *Oryzomys* sp., *O. capito*, *O. concolor*, *Neacomys spinosus*, *Nectomys squamipes*. As características de comportamento dos parasitos em cultura e em hamster levaram-nos a denominar a espécie como *L. braziliensis* sensu lato, indicando a existência de um complexo de espécies (Lainson e Shaw, 1969; 1970).

Vários isolados de *Leishmania* spp. foram obtidos de roedores., com relatos destes animais naturalmente infectados em áreas endêmicas para LTA no Brasil. Algumas espécies dos gêneros *Akodon*, *Oryzomys*, *Proechimys*, *Bolomys* e *Rattus* têm sido incriminadas como reservatórios naturais de *Leishmania* (Alencar et al., 1960; Lainson & Shaw, 1968, 1970; Forattini et al., 1972; Lainson et al., 1981; Magalhães-Rocha et al., 1988; Vasconcelos et al., 1994; Brandão-Filho et al., 2003; Oliveira et al., 2005).

Atualmente, com a possibilidade de detectar o DNA do parasito através de métodos moleculares de diagnóstico, outros roedores silvestres e sinantrópicos

foram encontrados naturalmente infectados por *L. braziliensis* em regiões brasileiras: *R. rattus* no Ceará (Vasconcelos et al., 1994), *R. rattus*, *Necromys squamipes*, *Bolomys lasiurus*, *Holochilus scieurus* e *A. arviculoides* em Pernambuco (Brandão-Filho et al., 2003) e *O. subflavus* e *R. rattus* em Minas Gerais (Oliveira et al., 2005). No estudo de Brandão-Filho e colaboradores (2003) foram isoladas amostras de *L. braziliensis* do zimodema IOC/Z74 em roedores silvestres (*B. lasiurus* = *Necromys lasiurus*) e sinantrópicos (*R. rattus*) e o mesmo zimodema foi detectado em infecções humanas da localidade, enfatizando a hipótese de que estes animais sejam reservatórios primários de *L. braziliensis*.

Estudos que integram observações ecológicas e parasitológicas mostram que informações sobre a dinâmica das populações de mamíferos silvestres e sinantrópicos são essenciais para se compreender a transmissão de *Leishmania* entre os hospedeiros vertebrados que circulam em ambientes naturais e modificados (Travi et al., 1998).

Existem evidências epidemiológicas e experimentais que apontam os cães como os principais hospedeiros reservatórios de *L. (Leishmania) infantum* em ambientes urbanos (Dantas-Torres 2007). Porém, não existem achados incontestáveis para considerar estes animais como reservatórios domésticos de *L. braziliensis* e outras espécies dermatrópicas. Contudo, parece haver uma tendência em considerar os cães como os principais reservatórios domésticos de *L. braziliensis* (Falqueto et al., 1991; Reithinger and Davies, 1999; Davies et al., 2000; Reithinger et al., 2000, 2003; Padilla et al., 2002; Gomes et al., 2007). Falqueto e colaboradores (1986) realizaram um trabalho de busca de *Leishmania* spp. em hospedeiros silvestres em área endêmica no Espírito Santo, onde não conseguiram, naquele momento, encontrar animais infectados pelo parasito. Estes autores, concluíram, então, que havia possibilidade de um ciclo entre animais domésticos e flebotomíneos com hábitos peridomiciliares. Nas últimas décadas, muitos relatos de infecção natural de cães por *L. braziliensis* já foram descritos (Fenech 1997; Reithinger and Davies, 1999; Gontijo et al., 2002; Madeira et al., 2003, 2006; Ryan et al., 2003; Castro et al., 2007; Massunari et al., 2009), contudo a capacidade de infectar flebotomíneos parece ser baixa (Travi et al., 2006). Considerando que os cães domésticos não sejam os principais hospedeiros reservatórios dos agentes etiológicos das leishmanioses cutâneas (Ashford 1996; Alvar et al., 2004; Desjeux, 2004; Gramiccia and Gradoni, 2005), quais mamíferos fariam este papel nos ambientes rurais e urbanos? Esta é uma questão que se encontra aberta para

discussões entre pesquisadores da área e que carece de estudos que possam contribuir para sua elucidação.

A implicação de um hospedeiro como reservatório é difícil devido ao contexto epidemiológico específico de cada local e também porque depende de muitas variáveis, como abundância e distribuição do hospedeiro e o potencial de infectar o vetor flebotomíneo, fatores que são raramente investigados (Chaves et al, 2007). Mesmo assim, vários estudos têm sido feitos para investigar o papel do cão como mantenedor do ciclo dos parasitos causadores da LTA em focos de transmissão peridomésticos (Dias et al. 1977; Gontijo et al. 2002; Falqueto et al. 2003). Apesar do encontro de animais naturalmente infectados por espécies dermatrópicas de *Leishmania* não existe um consenso quanto ao seu papel como reservatório do parasito (Falqueto et al. 1991; Madeira et al. 2005). Em revisão de mais de 90 estudos sobre a LTA em cães, Reithinger & Davies (1999) concluíram que existem apenas evidências circunstanciais para suportar a hipótese de que os cães atuem como reservatórios de *L. braziliensis*, sendo necessários maiores estudos.

Segundo Dantas-Torres (2007), para *L. braziliensis* os cães são provavelmente hospedeiros incidentais e seu papel no ciclo zoonótico de transmissão é, insignificante. Entretanto, existem situações onde não apenas os cães, mas outros animais domésticos e sinantrópicos parecem ter um papel na epidemiologia da LTA não atuando necessariamente como reservatórios da infecção, mas atraindo os vetores para as habitações humanas.

1.3 Complexidade da LTA: fatores determinados pelos hospedeiros e pelo parasito (*L. braziliensis*)

No novo mundo, a espécie *L. (V.) braziliensis*, dentre as que causam LTA, é a mais freqüentemente encontrada parasitando o homem, causando neste hospedeiro, lesões que podem ser simples ou múltiplas, com caráter extensivo e tendência a produzir metástases nasobucofaríngeas (Lainson & Shaw, 1998). Em sua epidemiologia primária o ciclo de transmissão de *L. braziliensis* é zoonótico, envolvendo mamíferos silvestres em florestas virgens como descrito por Lainson et al. (1994) na Amazônia. Porém, as modificações dos ecótopos naturais pelo homem induziram alterações na ecoepidemiologia da LTA com o surgimento de novas situações epidemiológicas. A devastação das áreas de mata no sudeste brasileiro propiciou o aparecimento de transmissão peridoméstica da *L. braziliensis*, com a invasão do peri e intradomicílio por espécies vetoras silvestres, principalmente a *L. intermedia* e *L. whitmani* (Grimaldi Jr. & Tesh, 1993; Marzochi & Marzochi, 1994). Desta forma, *L. braziliensis* é a espécie causadora de LTA mais importante no sudeste do Brasil.

Este parasito pode causar diferentes formas de leishmaniose cutânea, contudo o envolvimento das mucosas é a complicação mais séria das infecções, podendo ocorrer lesões desfigurantes que, dependendo da gravidade e da área afetada, comprometem o trato digesto-respiratório severamente. Na maioria das áreas endêmicas, 1 a 10% de infecções cutâneas localizadas resultam na forma mucosa um a cinco anos após a cura (Marsden, 1986).

Nos últimos anos, as relações parasito-hospedeiro vêm sendo intensivamente investigadas, especialmente a resposta imune dos hospedeiros frente a infecções por *Leishmania* spp. Este foco na imunidade reflete, em parte, o importante papel do sistema imune na patogênese das leishmanioses cutâneas, contudo, este não é o único fator determinante do complexo painel clínico e epidemiológico da LTA no Brasil.

É importante mencionar que os fatores associados ao hospedeiro (má nutrição, imunossupressão e “background” genético) influenciam marcadamente a susceptibilidade do indivíduo ao parasito. Estudos comparativos que investigaram diferentes grupos étnicos, nativos e imigrantes ou agrupamentos familiares

(Castellucci et al., 2005) mostram que componentes genéticos humanos controlam a susceptibilidade e resistência às leishmânias cutâneas.

Além dos fatores intrínsecos do hospedeiro vertebrado, tornou-se claro que a saliva dos flebotomíneos é crucial no estabelecimento da infecção e patogênese da doença (Sacks & Kamhawi, 2001). A saliva dos flebótomos é vasodilatadora, aumenta o tamanho da lesão e a carga parasitária, mas também existem indícios de que as proteínas presentes na saliva podem mudar a resposta imune do hospedeiro para o tipo Th2 e mediar um efeito protetor (Belkaid et al., 2000). Este fenômeno pode explicar porque a susceptibilidade dos indivíduos com LC declina com a idade, como observado em pessoas residentes em áreas endêmicas.

As manifestações clínicas da LTA e a resposta ao tratamento são influenciadas, pelo menos em parte, pela espécie de *Leishmania* envolvida. A contribuição do parasito para a variação das leishmanioses cutâneas tem sido suportada há anos. É sabido que a forma mucosa ocorre preferencialmente em indivíduos infectados pela *L. braziliensis* bem como a forma difusa em pacientes com *L. amazonensis*.

Estudos mais recentes demonstram uma correlação entre as variações genéticas do parasito e as formas clínicas, como por exemplo, a observação de que determinados zimodemas de *L. infantum* estão associados à doença cutânea ou visceral (Guerbouj et al., 2001; Schriefer et al., 2004). No entanto, outros trabalhos (Schonian et al., 2000) ressaltam o papel complementar do hospedeiro e de outros fatores na evolução clínica. De toda forma, a diversidade genética é a maior vantagem do parasito, e parece que espécies de *Leishmania* diferem na sua abordagem para modular a resposta imune do hospedeiro.

A diversidade observada dentro do subgênero *L. (Viannia)* é considerada alta e em algumas regiões está acima do esperado (Rotureau et al., 2006; Nolder et al., 2007). O conceito de que a reprodução de *Leishmania* é estritamente clonal tem sido questionado por vários relatos de ocorrência de híbridos naturais, especialmente no Novo Mundo. Com base em marcadores fenotípicos e genotípicos tem sido descritos híbridos entre *L. braziliensis* e *L. panamensis* na Nicarágua (Belli et al., 1994), *L. braziliensis* e *L. guyanensis* na Venezuela, Equador e Peru (Dujardin et al., 1995; Delgado et al., 1997; Banuls et al., 1999). Em localidades onde espécies do subgênero *L. (Viannia)* são simpátricas, a possível emergência de híbridos infectivos para humanos com potencial de gerar doença severa deve ser considerada. Por isso, abordagens mais eficazes estão sendo cada vez mais pesquisadas para

auxiliar no entendimento da complexa epidemiologia molecular e genética de populações de *L. (Viannia)* e também para investigações mais profundas da extensão de trocas genéticas em populações experimentais e naturais.

Dentre os fatores responsáveis pela diversidade e complexidade de formas da LTA, aqueles ligados ao parasito necessitam de maiores investigações para que se alcancem ponderações mais conclusivas. O estudo da variabilidade genética de *Leishmania* é muito importante para esclarecer se existe associação entre parasitos geneticamente distintos com determinados fenótipos, tais como diferentes manifestações clínicas da doença, ou presença de determinados parasitos em reativações e reinfecções. Além disso, o estudo de genética de populações de parasitos provenientes de diferentes regiões é de grande importância para o entendimento da epidemiologia da doença. Por se tratar da principal espécie causadora de LTA em Minas Gerais, a caracterização genotípica de *L. braziliensis* é essencial para um melhor conhecimento sobre os focos de transmissão nesta e em outras regiões. Portanto, um melhor entendimento da LTA requer abordagens adicionais, especialmente investigações direcionadas ao parasito e na influência dos fatores genéticos no prognóstico clínico (Schriefer et al. 2009).

Entretanto, existe pouco conhecimento sobre a importância da variabilidade biológica intraespecífica de *L. braziliensis* na patogênese da infecção. Neste contexto, epidemiologistas moleculares devem considerar marcadores neutros para genotipagem de populações naturais e dar ênfase ao polimorfismo dos determinantes de virulência (Dujardin et al., 2002).

1.4 Diagnóstico, tratamento e controle da LTA

O espectro clínico amplo das leishmanioses cutâneas dificulta um pouco o diagnóstico tanto dos casos ativos quanto dos casos passados. O diagnóstico diferencial é extremamente importante por causa de outras doenças com manifestações clínicas semelhantes tais como: micoses cutâneas, câncer de pele, hanseníase e tuberculose, que são comuns na população em geral.

O diagnóstico da LTA é baseado na apresentação de clínica sugestiva associada ao resultado positivo da Intradermorreação de Montenegro (IDRM). O diagnóstico parasitológico continua sendo o padrão ouro devido à sua alta especificidade. A verificação microscópica de lâminas contendo a impressão de material de biópsia de lesão para a busca de formas amastigotas de *Leishmania* é o método parasitológico direto de primeira linha recomendado pelo Ministério da Saúde no Brasil. Mas existem outros tais como: isolamento e cultivo do parasito em meios artificiais e inoculação em animais experimentais (hamster) (Brasil, 2006). Contudo, testes parasitológicos não são freqüentemente utilizados devido à sensibilidade ser altamente variável, dependente da quantidade e distribuição dos parasitos nas amostras de biópsias, do procedimento de coleta das amostras e da habilidade técnica dos profissionais envolvidos.

Devido à falta de um método imunológico ou parasitológico, com alta sensibilidade e especificidade, muitos pesquisadores têm se dedicado a encontrar um teste que melhore a qualidade do diagnóstico da LTA. Nas últimas décadas, várias ferramentas moleculares têm sido desenvolvidas com o intuito de aumentar a sensibilidade do diagnóstico. Diferentes abordagens têm sido empregadas, especialmente a amplificação do DNA do parasito através da reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual é especialmente útil em casos com baixa carga parasitária (como leishmaniose mucosa) (Reithinger & Dujardin, 2007). O diagnóstico parasitológico molecular permite a identificação da espécie do parasito envolvido na infecção, muito útil para caracterização dos novos focos de transmissão e em áreas onde ocorre mais de uma espécie de *Leishmania*.

O diagnóstico sorológico é raramente utilizado em leishmanioses cutâneas devido às baixas sensibilidade e especificidade e a impossibilidade de diferenciar infecções passadas e presentes. O teste imunológico de hipersensibilidade tardia, IDRM, apresenta altas sensibilidade e especificidade, além de facilidade de

execução, por isso é utilizado em áreas endêmicas onde há carência de técnicos bem treinados em realizar o diagnóstico parasitológico e ocasionalmente em levantamentos epidemiológicos.

Desde a década de 40, os antimoniais pentavalentes permanecem como drogas de primeira escolha no tratamento da LTA. No Brasil, o Ministério da Saúde distribui gratuitamente o Glucantime® na rede pública de saúde, adotando o esquema terapêutico preconizado pela Organização Mundial de Saúde: 10 a 20 mg/Kg/dia por 20 a 30 dias consecutivos (Brasil, 2006).

Os antimoniais pentavalentes apresentam potencial de toxicidade cardíaca, hepática, pancreática e renal, devendo ser utilizados com cautela e sob monitoramento clínico e laboratorial, principalmente em pacientes com cardiopatia e hepatopatia. Em pacientes que não respondem bem a terapia com antimoniais, em nefropatas e em gestantes, a anfotericina B é a droga de primeira escolha para a realização do tratamento (Brasil, 2006).

A diversidade de agentes etiológicos, reservatórios e vetores aliada ao conhecimento ainda insuficiente sobre vários desses aspectos, tornam complexo o controle da LTA. As estratégias de controle devem ser específicas, conforme a situação epidemiológica de cada local. A identificação do agente etiológico circulante na área, o conhecimento das áreas de transmissão e dos hábitos e atitudes que favorecem a transmissão, são fatores importantes para definição de medidas profiláticas adequadas para a redução da incidência da doença. Além disso, as medidas de prevenção e de controle estão diretamente relacionadas com o diagnóstico precoce e com o tratamento adequado dos pacientes, bem como a redução do contato homem-vetor, com medidas de proteção individual, controle de reservatórios e aplicação de inseticida, quando possível.

1.5 LTA e a Terra Indígena Xakriabá

Desde a metade do século passado, quando a doença foi descrita em Minas Gerais, têm sido registrados no estado, surtos de LTA relacionados com atividades de desmatamento (Martins et al. 1956; Dias et al. 1977; Gontijo et al. 2002). A partir da última década, porém, a epidemiologia da doença tem sofrido alterações, sendo descritos casos autóctones em áreas periurbanas de cidades de médio e grande porte (Passos et al. 1993; Carvalho et al. 2006; Silva et al. 2006) além das áreas de colonização antiga (Gontijo et al. 1995).

A ocorrência da LTA, assim como de outras doenças parasitárias endêmicas, tem sido relacionada a áreas de pobreza e escassos recursos humanos e econômicos para o seu controle e profilaxia. Entretanto, não existe um padrão de transmissão, e cada foco possui particularidades que devem ser conhecidas para que se estabeleçam medidas profiláticas efetivas.

A ocorrência de focos de leishmaniose cutânea em tribos indígenas no Brasil tem sido pouco estudada. Os primeiros relatos sobre sua ocorrência datam também das décadas de 50-60 e referem-se a estudos em tribos do estado do Mato Grosso (Forattini & dos Santos, 1956; De Carneri et al. 1963).

O estilo de vida dos povos indígenas e as condições sociais a que estão submetidos (má nutrição, falta de higiene e saneamento, convívio estreito com animais no ambiente doméstico e pericomiliar) favorecem a transmissão de parasitoses, entre elas, a LTA.

As condições sanitárias, de saúde e habitação da comunidade indígena Xakriabá, localizada no norte de Minas Gerais, não são satisfatórias. Elevada prevalência de doenças endêmicas como verminoses, altas taxas de incidência de diarreia e doenças infecciosas de pele e acentuadas taxas de mortalidade infantil, fazem parte do cotidiano deste povo.

Desde 2001 têm sido registrados casos autóctones de LTA na reserva indígena Xakriabá. Somente em 2006 foram diagnosticados 48 casos entre os habitantes da reserva (Brasil, 2007). Desde então, o número de casos continua alto: no período de 2001 a 2008 foram registrados 224 casos. Existe uma carência de conhecimento relacionado a este foco de transmissão, o que dificulta as ações de controle e, de fato, as únicas medidas adotadas são o diagnóstico e tratamento dos casos humanos, que freqüentemente são realizados tardia e inadequadamente. Fica

evidente, portanto, a necessidade de promover meios para esclarecer melhor a situação epidemiológica da LTA nesta região, com a caracterização das espécies de *Leishmania* que circulam entre vetores, reservatórios e o homem e quais espécies de flebotomíenos vetores e potenciais hospedeiros reservatórios estão presentes na reserva.

2 JUSTIFICATIVA

A importância da LTA como problema de saúde pública entre os índios da reserva Xakriabá reside não apenas na sua elevada incidência, como também nos transtornos que ela vem ocasionando à vida dos indivíduos afetados. Devido ao risco da ocorrência da forma mucosa, a qual pode produzir deformidades, acarretando também implicações no campo psicológico e social, a LTA merece maior atenção no campo de estudos das doenças endêmicas que acometem a população indígena Xakriabá..

Não existe um conhecimento prévio sobre este foco de transmissão, nem a extensão do problema, já que nenhum estudo anterior sobre a epidemiologia da LTA foi desenvolvido nesta área. A caracterização das espécies de *Leishmania* que circulam entre os diferentes hospedeiros, a identificação dos reservatórios e das espécies de vetores são de extrema relevância para a definição de medidas de controle adequadas.

Dessa forma, enfatiza-se a importância de uma investigação científica que aborde os aspectos citados. Além disso, o estudo na reserva indígena Xakriabá é especialmente interessante devido à possível diversidade de reservatórios e potenciais vetores, conseqüentemente favorecendo a circulação de várias espécies e/ou populações de *Leishmania* na área.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo multidisciplinar sobre a leishmaniose tegumentar relacionados ao parasito, aos hospedeiros e aos vetores na terra indígena Xakriabá, Minas Gerais.

3.2 Objetivos Específicos

Caracterizar uma amostra populacional das aldeias Imbaúbas I e II situadas na Reserva Indígena Xakriabá, identificando os casos clínicos e assintomáticos de LTA através de um inquérito populacional.

Identificar casos clínicos de LTA provenientes de todas as aldeias da Reserva Xakriabá no período de julho de 2008 a agosto de 2010.

Caracterizar os casos clínicos de LTA quanto às variáveis demográficas, infecções passadas, presença de co-morbidades, características das lesões e aspectos relacionados ao tratamento.

Verificar a infecção por *Leishmania* nos animais silvestres e domésticos estimando a proporção de infectados.

Identificar (a)s espécie(s) de *Leishmania* que ocorre(m) nos casos humanos, nos animais domésticos e silvestres infectados.

Apresentar a distribuição espacial dos casos humanos com a presença de espécies de pequenos mamíferos e cães infectados.

Estudar a variabilidade genética de *L. braziliensis* proveniente de diferentes hospedeiros vertebrados.

Determinar as espécies de flebotomíneos da área de estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

A reserva indígena Xakriabá, demarcada pela FUNAI em 1979, está localizada no município de São João das Missões (14°53'01"de latitude Sul e 44°05'26"de longitude Oeste), na região norte do estado de Minas Gerais. Situado na zona do alto Médio São Francisco, micro região do Vale do Peruaçu, limita-se com os municípios de Miravânia, Manga e Itacarambi (Figura 1). A região é banhada pelo rio Itacarambi e está sujeita a um clima tropical úmido de savanas com inverno seco, em transição para um clima quente e seco, com chuvas de verão. O tipo de vegetação predominante é o cerrado com áreas mescladas de caatinga ao centro-oeste. Possui duas estações bem definidas durante o ano, a chuvosa que vai de outubro a março, e a estação seca, de abril a setembro (IBGE, 2011) (Figura 2).

O município de São João das Missões possui uma população de 11.715 habitantes, destes, 9.269 (79.13%) residem em zona rural (IBGE, 2011). A reserva Xacriabá ocupa uma área de 530,74Km², que corresponde a 78,07% da superfície total do município e uma população total estimada de 6.500 habitantes (IBGE, 2006, FUNASA, 2007).

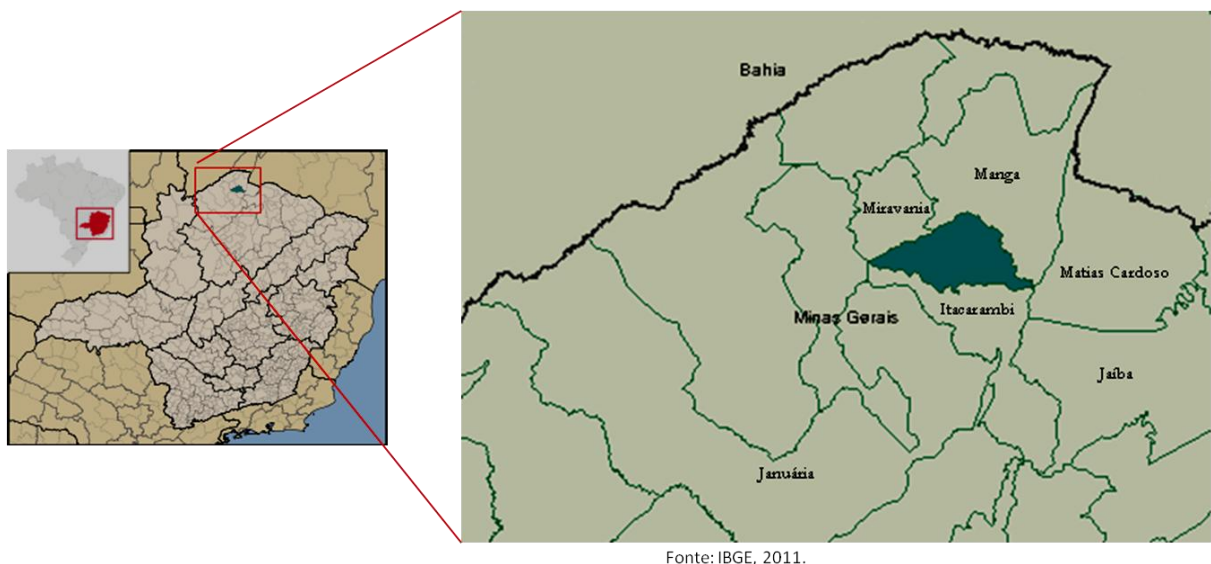


Figura 1: Localização do município de São João das Missões, onde está situada a Reserva Indígena Xakriabá.

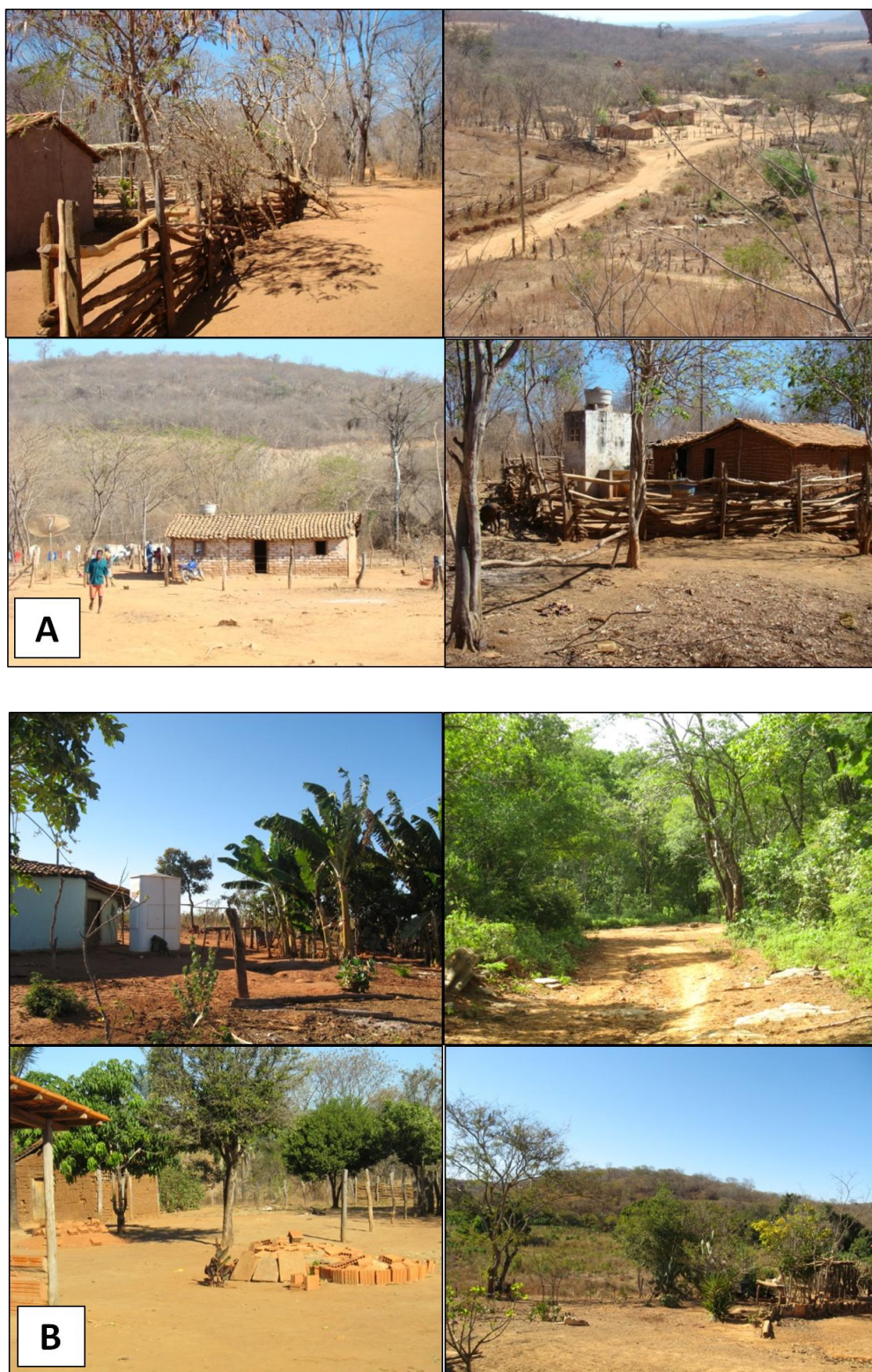


Figura 2: Visão geral da vegetação e das residências na Reserva Indígena Xakriabá. A - durante a estação seca e B - na estação chuvosa.

4.2 Procedimentos éticos

A participação no estudo foi condicionada à assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos participantes e/ou seus responsáveis legais, no caso de crianças e menores de 18 anos. O trabalho foi realizado em concordância com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, que regulamenta a pesquisa em seres humanos, mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do Centro de Pesquisas René Rachou e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, parecer 355/2008 – Anexo 1), autorização para ingresso em terra indígena fornecida pela FUNAI (149/CGEP/08 – Anexo 2) e aprovação da pesquisa pela FUNASA.

Todos os casos de LTA diagnosticados na reserva pela equipe deste projeto foram encaminhados para receber tratamento e acompanhamento adequados, independente de terem sido incluídos na presente investigação.

O estudo de reservatórios silvestres (pequenos mamíferos) foi autorizado pelo IBAMA (12989-1 – Anexo 3) e dos cães domésticos foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ (protocolo nº 71/09-1 – Anexo 4).

4.3 Delineamento do estudo

Esta pesquisa foi conduzida em várias etapas. A primeira etapa consistiu na realização de um inquérito populacional nas duas aldeias (Imbaúbas I e Imbaúbas II) que apresentavam o maior número de casos de LTA dentro da reserva. Este inquérito, realizado de junho a novembro de 2008, foi feito para estimar a prevalência dos casos clínicos e dos assintomáticos de LTA, e para caracterizar a população exposta. Na mesma área onde foi feito o inquérito populacional, foram dispostas armadilhas para captura de pequenos mamíferos no período de maio de 2008 a junho de 2009 e de flebotomíneos, de julho de 2008 a março de 2009. Um inquérito canino, para a busca de cães infectados por *Leishmania* também foi conduzido nas residências das duas aldeias citadas acima, de janeiro de 2009 a fevereiro de 2010.

A etapa seguinte do trabalho foi o estudo detalhado dos casos clínicos de LTA. A partir da presença da equipe do projeto na Terra Xakriabá a leishmaniose passou a integrar as questões de saúde da comunidade. Houve a percepção de que muitos casos ocorriam também em outras aldeias dentro da Terra Indígena. A população, os agentes de saúde e a equipe do projeto começaram a etapa de busca ativa de pessoas com lesões de pele sugestivas de leishmaniose cutânea. Esta etapa ocorreu de junho de 2008 a agosto de 2010. A figura 3 descreve o delineamento do estudo.

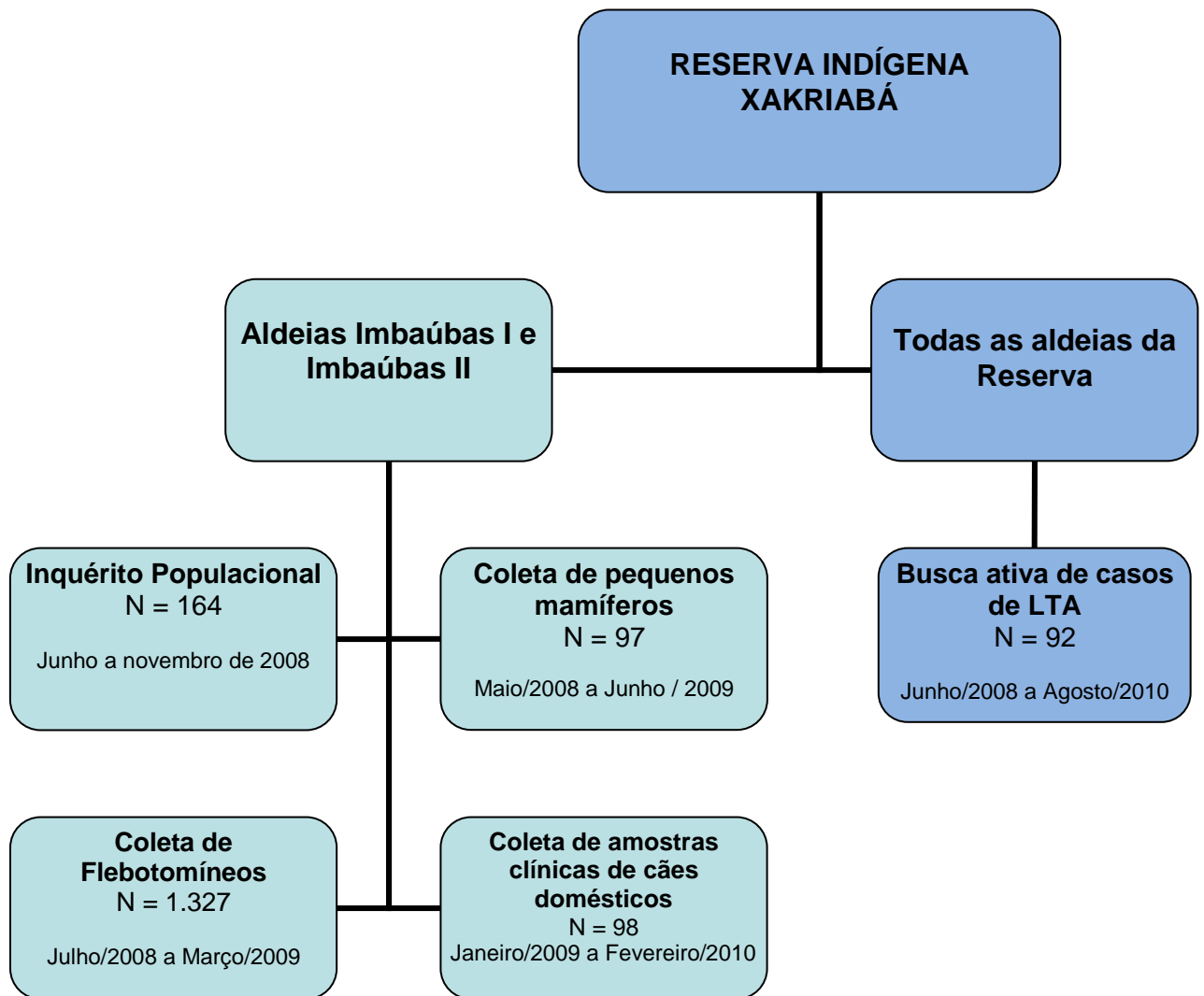


Figura 3: Delineamento do estudo na Reserva Indígena Xakriabá.

4.4 Estudo dos humanos

4.4.1 Inquérito Populacional

Inicialmente foi realizado um estudo seccional de base populacional, utilizando-se um inquérito em uma amostra representativa de duas aldeias da reserva, consistindo de entrevistas individuais, exame clínico e diagnóstico laboratorial (reação intradérmica de Montenegro, métodos parasitológicos e moleculares).

O inquérito populacional foi conduzido em duas aldeias do Pólo Brejo Mata Fome, Imbaúbas I e Imbaúbas II, por concentrarem o maior número de casos humanos recentes e alta prevalência de cães soropositivos na época do início do estudo (Brasil, 2007).

A população total das duas aldeias era de 438 habitantes. O inquérito foi realizado em amostra representativa dessa população (n=164). Para o cálculo da amostra considerou-se uma estimativa da prevalência da doença na área de 3%, nível de significância de 0,05, e precisão da estimativa variando de 1 a 5%, e população elegível (5 a 80 anos) de 318 habitantes. O tamanho da amostra necessária para o inquérito foi estimado em 149 indivíduos. Considerando-se a possibilidade de perdas e recusas (5%), o estudo foi planejado para uma amostra de 170 pessoas.

A seleção dos participantes do estudo se deu da seguinte forma: todas as pessoas com idade entre cinco e oitenta anos, sorteadas aleatoriamente entre a população das duas aldeias foram convocadas para a entrevista individual. Mediante o conhecimento do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – Anexo 5) os sorteados foram convidados a participar do estudo, com exceção de mulheres gestantes e nutrizes. Todos que assinaram o TCLE participaram da entrevista individual (Anexo 6) e foram convidados para realização do exame clínico e preenchimento de uma ficha com todas as informações desta avaliação (Anexo 7), IDR e coleta de sangue. As pessoas que apresentaram quadro clínico suspeito de LTA foram convocadas para realização dos procedimentos de biópsia e/ou aspirado de lesão para o diagnóstico parasitológico e molecular.

4.4.2 Busca ativa de pacientes com LTA

Além dos casos de LTA detectados durante o inquérito populacional, foi realizada a busca ativa de pessoas com lesões suspeitas em toda a reserva Xakriabá. Estas pessoas foram convocadas para a realização dos mesmos procedimentos feitos no inquérito: entrevista individual, exame clínico, IDRM e coleta de sangue. No caso de permanência da suspeita clínica, os indivíduos foram submetidos à realização de biopsia e/ou aspirado para confirmação do diagnóstico. Os casos confirmados foram, como os pacientes do inquérito, encaminhados para receber tratamento adequado.

4.5 Diagnóstico

4.5.1 Diagnóstico Imunológico

- Intradermorreação de Montenegro (IDRM): foi realizada a IDRM nos indivíduos selecionados para o inquérito populacional e em todos os casos suspeitos provenientes da busca ativa. Foi utilizado o antígeno produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), Piraquara, Paraná. O antígeno de Montenegro contém suspensão de *L. amazonensis* (cepa referência da OMS - MHOM/BR/73/M2269), na concentração de 40µg/mL de nitrogênio protéico. Inoculou-se 0,1 mL intradermicamente entre o terço médio e superior da face anterior do antebraço esquerdo, preferencialmente. Os participantes foram convocados para leitura do teste 48 horas após a inoculação do antígeno. A endureção foi aferida através de sua delimitação com caneta esferográfica e aposição em papel embebido em álcool (Sokal, 1975), onde então, o diâmetro foi medido em milímetros. O teste foi considerado positivo quando o indivíduo apresentou uma endureção igual ou maior que 5 mm na área onde o antígeno de *Leishmania* foi inoculado (Figura 4); uma endureção menor que 5 mm significa que o indivíduo foi não reator.



Figura 4: Aplicação do antígeno e aferição de resultado da intradermorreação de Montenegro, em paciente com teste positivo.

4.5.2 Diagnóstico Parasitológico

- Coleta de aspirado e biopsia de lesão: Anestesiou-se o local com lidocaína 2% sem vasoconstritor, aplicada por infiltração exclusivamente no local onde foram realizados o aspirado e a biopsia. A coleta do aspirado foi realizada com o sistema de aspiração a vácuo. A agulha do sistema foi introduzida na pele em ângulo de 45 graus na borda da úlcera, em região próxima ao local da biópsia com movimento rotatório. Após o posicionamento da agulha, introduziu-se o tubo de vácuo (contendo meio NNN e solução de PBS com 0,9% de antibióticos estreptomicina e penicilina) até o fundo do canhão do vacutainer do sistema de coleta, de forma que toda agulha interna penetrasse no tubo. Foi retirado todo o conjunto de uma única vez, de modo que o material no interior da agulha fosse aspirado para o interior do tubo pelo vácuo (Figura 5). O aspirado foi misturado à fase líquida do meio de cultura para que o líquido alcance o meio sólido. Foram coletados, pelo menos, dois tubos de aspirado para cada paciente, os quais foram identificados com o nome, número e a data.



Figura 5: Realização de aspirado em lesão tipo úlcera típica localizada na perna direita (A) e lesão atípica tipo placa no tronco (B) de pacientes da Reserva Indígena Xakriabá.

A biópsia da lesão foi realizada retirando-se um fragmento da borda com um “punch” o qual foi depositado sobre um cartão de papel filtro para retirar o excesso

de sangue (Figura 6). Dividiu-se o fragmento em dois: o primeiro foi armazenado em microtubo de 1,5 mL estéril contendo salina com antibióticos (estreptomicina 100µg/mL e penicilina 500U/mL) para posterior inoculação em meio de cultivo para *Leishmania*. O segundo fragmento foi utilizado para impregnar duas ou três lâminas para pesquisa de amastigotas através de microscopia óptica (diagnóstico parasitológico direto). Em seguida, armazenou-se este fragmento em criotubos contendo salina com antibióticos para serem utilizados como fonte de DNA em procedimentos moleculares. Estes fragmentos foram mantidos a -20°C até sua utilização no Laboratório de Leishmanioses, Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ, Belo Horizonte.



Figura 6: Realização de biópsia em lesão tipo pápula em braço de paciente da Reserva Indígena Xakriabá.

- Exame direto de lâminas: as lâminas contendo a impressão dos fragmentos de lesão foram fixadas com metanol e coradas pelo Giemsa, para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania*. As leituras foram realizadas em microscópio ótico, considerando-se positivos os resultados em que foram visualizadas formas amastigotas do parasito.

- Isolamento do parasito em meio de cultura: fragmentos de lesão foram armazenados em geladeira (4°C) durante 24 horas em solução salina com antibióticos (estreptomicina 100µg/mL e penicilina 500U/mL) e, em seguida adicionados a tubos contendo meio de cultura NNN (Novy e Mc Nel, 1903; Nicolle, 1908) enriquecido com meio líquido Schneider, mantidos à 25° C ± 1°C. O exame da cultura foi realizado semanalmente e considerado positivo quando observou-se a

presença de formas promastigotas de *Leishmania*. Quando não ocorreu o aparecimento de formas flageladas depois de seis semanas, a cultura foi considerada negativa. As amostras isoladas foram criopreservadas e depositadas no banco de cepas do Laboratório de Leishmanioses do CPqRR, para posterior caracterização através de eletroforese de isoenzimas (MLEE – Multilocus Enzyme Electrophoresis) e métodos moleculares.

- Diagnóstico parasitológico molecular: A presença do parasito também foi investigada através da amplificação do DNA isolado diretamente dos fragmentos de biopsia. Reações de PCR que amplificam um fragmento do gene *hsp70* de *Leishmania* foram utilizadas para detectar e identificar o parasito nestas amostras (Garcia et al., 2004).

4.6 Definições de caso

Caso suspeito: foram considerados casos suspeitos os indivíduos que apresentavam feridas de pele sugestivas de leishmaniose cutânea. Por se tratar de área endêmica onde ocorrem lesões típicas (úlceras cutâneas, com fundo granuloso e bordas infiltradas em moldura) e também feridas atípicas (nódulos, pápulas, lesões verrucosas, lesões vegetantes) todos os indivíduos que apresentavam uma destas feridas foram considerados casos suspeitos.

Caso clínico: aqueles indivíduos que apresentaram suspeita clínica (lesão típica ou atípica) associada a pelo menos um exame (IDRM, parasitológico ou molecular) positivo.

Caso clínico confirmado parasitologicamente: indivíduos que apresentaram lesão suspeita e confirmação parasitológica (exame de lâmina por aposição ou cultura). Neste grupo, a PCR positiva também foi utilizada como método de confirmação da presença do parasito.

Caso clínico não confirmado parasitologicamente: indivíduos que apresentaram lesão suspeita e IDRM positiva. Nestes casos não houve confirmação parasitológica.

Forma assintomática: são considerados portadores da forma assintomática, os indivíduos que apresentaram IDRM positiva e ausência de lesões ou cicatrizes características de LTA.

Não infectados: aqueles indivíduos que não apresentam lesões sugestivas de LTA e IDRM negativa.

4.7 Estudo dos hospedeiros silvestres e domésticos

Todos os procedimentos de captura e coleta de amostras dos animais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.7.1 Captura e coleta de amostras dos animais silvestres

Foram montados transectos para a distribuição das armadilhas de coleta, seguindo a metodologia de campo padrão para captura de pequenos mamíferos (Lacher *et al.*, 1989; Paglia *et al.*, 1995; Fonseca, 1996). Foram definidas quatro estações (trilhas) de coleta entre as casas das aldeias Imbaúbas I e II (Figura 7) e 21 casas selecionadas de forma a amostrar toda a área das duas aldeias. Em cada trilha foram dispostas 30 armadilhas, duas em cada ponto de coleta distanciados aproximadamente 20m um do outro. No peridomicílio de cada residência selecionada foram expostas duas armadilhas, totalizando 42 armadilhas nas casas e 120 nas trilhas. As armadilhas do tipo Tomahock foram abastecidas com iscas atrativas para mamíferos de pequeno porte (abacaxi e emulsão Scott) e ficaram expostas durante quatro dias e noites seguidos, sendo que a cada manhã eram trocadas as iscas e retirados os animais porventura coletados. As estações de coleta foram estabelecidas de modo a amostrar os diferentes ambientes relacionados aos padrões de atividade humana.

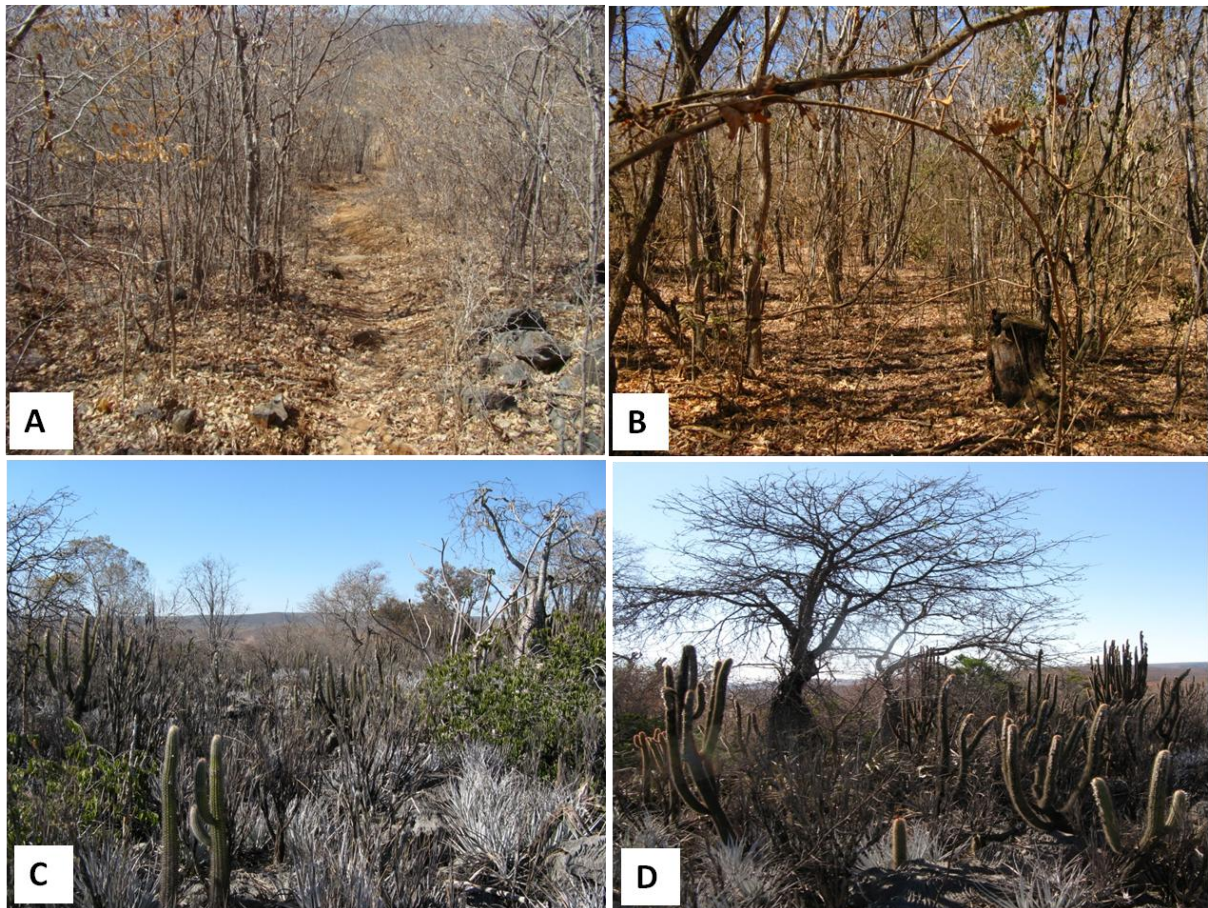


Figura 7: Aspecto panorâmico das trilhas onde foram montadas as estações de captura de pequenos mamíferos nas aldeias Imbaúbas da Reserva Xakriabá. A – Trilha 1 de Imbaúbas 1, B – Trilha 2 de Imbaúbas 2, C – Trilha 1 de Imbaúbas 2 e D – Trilha 2 de Imbaúbas 2.

Amostras de sangue, medula, pele de cauda, pele de orelha, baço e fígado de todos os pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) capturados foram coletadas para realização de testes moleculares para detecção de *Leishmania*. Para a coleta das amostras os animais foram sedados com acepromazina (Aceprom - 0,05mg/Kg de peso), para garantir a ausência de dor e desconforto, e posteriormente eutanasiados. A identificação das espécies foi feita analisando caracteres morfológicos e por comparação com exemplares depositados na Coleção de Mastozoologia da UFMG.

Foram recolhidos todos os roedores e marsupiais capturados por armadilhas expostas na área de estudo durante um ano, de maio de 2008 a junho de 2009. Estes exemplares foram sacrificados para coleta de amostras clínicas e investigação da presença de *Leishmania* em seus tecidos (Figura 8).



Figura 8: Coleta de amostras clínicas de roedor capturado na Reserva Indígena Xakriabá.

4.7.2 Coleta das amostras e diagnóstico dos animais domésticos

Todos os cães residentes nos domicílios das aldeias Imbaúbas I e II foram incluídos na população de estudo de animais domésticos.

Alíquotas de sangue periférico, nas veias cefálica ou jugular, foram coletadas para realização de diagnóstico sorológico através da RIFI e ELISA. Todos os animais amostrados foram examinados e posteriormente foram preenchidas as fichas clínicas (Anexo 8). Daqueles animais que apresentaram lesão de pele foi coletado fragmento da ferida para o diagnóstico parasitológico e molecular. Os cães com resultado sorológico positivo foram recolhidos pela equipe local responsável pelo controle de zoonoses para eutanásia.

- Eutanásia, necrópsia e coleta de amostras biológicas de cães soropositivos: Após sedar e anestésiar o animal, foi realizada a punção de medula óssea na região da crista da tíbia, e o material coletado foi inoculado imediatamente em meio de cultura NNN/PBS 1x com antibióticos (estreptomicina 100µg/mL e penicilina 500U/mL). Para completar a eutanásia foram injetados 20 ml de solução de cloreto de potássio saturada (20%) no momento da apnéia e, após confirmar o óbito, foram coletados

dois fragmentos, de aproximadamente 1,0cm, de cada um dos tecidos (pele de borda de orelha, borda de baço, fígado e linfonodo mesentérico), sendo um para exame parasitológico direto (impressão em lâmina) e outro para diagnóstico por técnicas moleculares. Em seguida coletou-se aspirado de linfonodo mesentérico ou poplíteo, para inoculação em meio de cultura.

- Diagnóstico sorológico da leishmaniose canina

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) foram realizados utilizando antígeno constituído por formas íntegras de promastigotas de *L. infantum*, cepa MHOM/BR/1967/BH46, empregando protocolos padronizados pelo Laboratório de Sorologia de *Leishmania* (UFMG), como descrito abaixo:

Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI

Para a obtenção do título desejado, os soros a serem testados foram diluídos na razão dois, a partir de 1:40, em solução tampão fosfato (PBS) constituída de 850mg de NaCl (Merck, Alemanha), 132mg de NaHPO₄ (Merck, Alemanha), 15,6mg de NaH₂PO₄.H₂O (Merck, Alemanha), dissolvidos em 100mL de água destilada e pH ajustado para 7.4.

Foram transferidos 25 µL desta solução sobre cada região demarcada de uma lâmina de vidro, na qual foi previamente fixado o antígeno, constituído por formas íntegras de promastigotas de *L. infantum*, cepa MHOM/BR/1967/BH46, rotineiramente utilizada pelo Laboratório de Sorologia de *Leishmania*. As lâminas foram submetidas à incubação em câmara úmida por 30min em estufa a 37°C e, a seguir foram lavadas com PBS e cobertas com a solução tampão por 5min, seguido de lavagem em água destilada e secagem sob ventilação artificial (Ventilador Britânia B20, Brasil). Em cada região demarcada da lâmina foi acrescentado 25 µl do conjugado diluído a seu título em PBS, com Tween 2% (v/v) (Tween[®] 20, Merck, Alemanha), acrescido de Azul de Evans 1% (Evans Blue[®], Sigma Aldrich Inc., EUA). O conjugado, constituído por anti IgG de cão, marcado com Isotiocianato de Fluoresceína (Bethyl Lab. Inc., EUA) foi diluído na proporção de 1:1500. Após a adição do conjugado foi realizada nova incubação, lavagem com PBS e secagem. A lâmina foi então coberta com glicerina (Merck, Alemanha) tamponada e lamínula, e a

leitura foi realizada em microscópio de luz ultravioleta (Olympus BX 41[®], Olympus Optical Co., Japão). Para cada soro foi determinada a diluição reativa final, ou seja, a maior diluição que apresentar reatividade. Todas as reações foram realizadas em duplicata, e amostras de soros sabidamente positivos e negativos foram usados na mesma lâmina como controles da reação.

Ensaio Imunoenzimático - ELISA

A dosagem de IgG total foi determinada através da técnica de ELISA, de acordo com VOLLER et al. (1979) com modificações. Os antígenos utilizados foram obtidos a partir de formas promastigotas de *L. infatum* MHOM/BR/1967/BH46, após ruptura por ultrassom (Branson 1510[®], Branson Ultrasonics Co., EUA) e centrifugação (Centrífuga Excelsa Baby II[®], FANEM, Brasil) a 1360 x g por 10min. A quantidade de proteína foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al. 1951), e ajustada para 20µg/mL em PBS e armazenado em freezer a -20°C em alíquotas, até o momento de uso.

As reações de ELISA foram realizadas em microplacas de polietileno (BD Falcon, Becton, Dickison and Company, EUA) de 96 orifícios e fundo plano, de acordo com Silva & Cunha (2007). Cada orifício da placa foi sensibilizado com 2 µg do antígeno diluído em 100 µL de tampão carbonato, constituído por 0,159% p/v de Na₂CO₃ (Merck, Alemanha) e 0,293% p/v NAHCO₃ (Merck, Alemanha), diluídos em água destilada. As placas foram incubadas a 4°C por 24h para sensibilização. A seguir, o excesso de antígeno foi removido com cinco lavagens sucessivas, utilizando uma solução de 0,9% p/v NaCl e 0,05 mL v/v Tween[®] 20, diluídos em água destilada. Após as lavagens, as placas foram secas por inversão sobre papel absorvente, e foram adicionados 150 µL por orifício da solução de bloqueio de sítios inespecíficos, constituída por caseína 2% p/v (Sigma Aldrich, EUA) diluída em PBS com pH ajustado para 7.6. Seguiu-se incubação a 37°C por 30min. Para retirar o excesso de solução de bloqueio foram realizadas duas lavagens sucessivas, com secagem das placas por inversão sobre papel absorvente. Os soros a serem testados foram diluídos em tampão de incubação, composto de caseína 0,25% p/v e 0,05% Tween[®] 20 diluídos com PBS em pH 7.6, e foram aplicados 100 µL dessa solução por orifício da placa, em duplicata. Seguem-se nova incubação a 37°C por 45min, e retirada de excesso da solução por uma série de cinco lavagens. Após a secagem das placas, uma alíquota de 100 µL do conjugado diluído a seu título foi acrescentada em cada orifício. Para a realização da técnica de ELISA foi utilizado o

conjugado anti-IgG de cão no título de 1/10000 marcado com Peroxidase VI (Bethyl Lab. Inc., EUA Após nova incubação a 37°C por 45min, o excesso de conjugado foi retirado por nova série de cinco lavagens. Após as lavagens foi acrescentado em cada orifício 100 µL de solução do substrato, composta por 10 mg de cromógeno *orthophenylenediamine* (OPD, Sigma Aldrich, EUA) mais 4µL de H₂O₂ 30v (Merck, Alemanha) diluídos em 10 mL de solução tampão do substrato, composta por 0,719 % p/v de Na₂HPO₄ e 0,519% ácido cítrico (Merck, Alemanha) diluídos em água destilada. Após a reação transcorrer por 10 min em temperatura ambiente e no escuro, esta foi interrompida pela adição de 25 µL de H₂SO₄ 4N (Merck, Alemanha) por orifício. As reações foram lidas em leitor de ELISA (BioRad modelo 550, Brasil) a 495nm e os resultados expressos em valores de absorbância.

Para cada placa, o ponto de corte ou “cut off” foi estabelecido a partir da média das leituras de absorbância de oito soros de cães não infectados procedentes de região não endêmica para a doença, mais duas vezes o desvio padrão.

4.8 Estudo dos flebotomíneos

4.8.1 Métodos de captura

O estudo dos flebotomíneos foi realizado com a colaboração dos pesquisadores Dr. Edelberto Santos Dias e Dr. Ricardo Andrade Barata, do Laboratório de Leishmanioses, Centro de Pesquisas René Rachou.

As capturas sistemáticas foram realizadas com armadilhas luminosas do tipo HP (Pugedo et al., 2005) durante o período de junho de 2008 a março de 2009. Vinte e uma armadilhas foram distribuídas no peridomicílio das residências selecionadas para o estudo da população humana e dos reservatórios. Todas as armadilhas foram expostas das 18:00 às 8:00 horas da manhã seguinte, durante dois dias consecutivos em cada mês. O acondicionamento dos espécimes capturados nas armadilhas foi feito em tubos de hemólise contendo álcool 70% (para estudo da fauna) e DMSO 6% (para técnicas moleculares).

4.8.2 Preparação e montagem dos espécimes

Os flebotomíneos foram preparados e montados entre lâmina e lamínula, utilizando-se bálsamo do Canadá para os machos e líquido de Berlese para as fêmeas de acordo com a técnica de Langeron (1949), modificada. A utilização do

bálsamo para montagem dos machos se justifica pela durabilidade da preparação, enquanto o líquido de Berlese para fêmeas possibilita o exame das estruturas internas com maior nitidez, que é imprescindível para as identificações. A identificação dos exemplares foi feita de acordo com a classificação proposta por Young & Duncan (1994).

4.9 Métodos bioquímicos e moleculares para detecção e identificação de *Leishmania*

4.9.1 Eletroforese de Multilocus Isoenzimas (MLEE – Multilocus Enzyme Electrophoresis)

A identificação das promastigotas isoladas em cultura por MLEE foi realizada pelo Serviço de isolamento, cultivo e tipagem de *Leishmania* da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), de acordo com protocolo descrito por Cupolillo et al. (1994). Foram utilizados 4 sistemas enzimáticos:

1. G6PDH – Glicose-6-fosfato-desidrogenase (Enzyme Commission Number 4.2.1.3)
2. 6PGDH – 6-fosfo-glico-desidrogenase (E.C. 1.1.1.43)
3. PGM – Fosfo-gluco-mutase (E.C. 1.4.1.9)
4. IDH – Isocitrato desidrogenase (E.C. 1.1.1.42)

4.9.2 PCR-RFLP do *hsp70*

Os genes codificadores de proteínas de choque térmico de 70kD de *Leishmania* (*hsp70*) são arranjados *in tandem*, compreendendo uma família de genes cujas sequências codificadoras em diferentes organismos são altamente conservadas (Folgueira et al., 2007). Alíquotas de 2,0 µL de DNA foram amplificadas utilizando iniciadores que estendem um fragmento de 1300pb do *hsp70*. A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µL utilizando 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP mix (New england), 5,0% DMSO (Invitrogen), 2,5 unidades de Taq DNA polimerase platinum® (Invitrogen), 0,4 pmol de iniciador senso e 0,4 pmol de iniciador anti-senso (IDT, prodimol). Os iniciadores utilizados foram: HSP70 for - 5'GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3' e HSP70 rev 'CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3' (Garcia et al., 2004). A amplificação do DNA molde foi processada em termociclador automático de DNA (marca) alternando 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 61°C por 1 min e extensão a 72°C por 3 min., seguido por um passo de extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 2% corado por brometo de etídeo (10 mg/ml). As amostras que apresentaram a banda específica de 1300 pb foram submetidas à digestão utilizando a enzima *HaeIII* para análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP). A reação de

digestão foi preparada para um volume final de 15 μL , contendo 1 μL de *HaeIII* (New england) (10 U/ μL), 1,5 μL de tampão da enzima e 10,0 μL de produto de PCR. A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas. Os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 2% e comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR de cepas referência de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

4.9.3 PCR-RFLP do ITS1

Os iniciadores LITSR 5' CTGGATCATTTTCCGATG 3' e L5.8S 5' TGATACCACTTATCGCACTT 3' (Schonian et al., 2003) amplificam um fragmento de aproximadamente 350pb através da seguinte reação: solução tampão 1x (200 mM Tris-HCl pH8,4, 500 mM KCl), 1,5mM de MgCl_2 , 0,2mM de mistura de dNTPs, 0,5 pmol do iniciador LITSR, 0,5 pmol do iniciador L5.8S, 1 U de Taq DNA polimerase platinum® (Invitrogen), 2 μL de DNA molde em um volume final de 25 μL . A amplificação foi realizada alternando 33 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento a 53 ° C por 1 min e extensão a 72 ° C por 1 min em equipamento termociclador automático de DNA. A RFLP subsequente pode distinguir as seguintes espécies: *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamanensis*. A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 μL , contendo 1 μL de *HaeIII* (10 U/ μL), 1,5 μL de tampão da enzima e 10,0 μL de produto de PCR. A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas, os perfis de restrição analisados em gel de agarose 2% e comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR de cepas referência (indicadas no item anterior).

4.10 Estudo da variabilidade genética de *L. braziliensis* proveniente de diferentes hospedeiros vertebrados

As amostras provenientes de pacientes, de pequenos mamíferos e de cães infectadas por *L. braziliensis* foram utilizadas no estudo da variabilidade genética desta espécie. Para avaliar a existência de polimorfismos no DNA de *L. braziliensis*, métodos variados foram utilizados, principalmente baseados na análise de polimorfismos de restrição através de RFLP e seqüenciamento. Os dados foram analisados com o objetivo de elucidar a estrutura populacional do parasito na área de estudo, bem como as relações existentes entre cepas provenientes de diferentes hospedeiros.

- PCR-RFLP do hsp70: Ao contrário de outras regiões do genoma (como ITS1) os genes *hsp70* codificam proteínas antigênicas importantes e, portanto, permitem investigar a variabilidade genética de moléculas possivelmente envolvidas na imunopatologia. As reações de digestão dos produtos de PCR do *hsp70* foram realizadas utilizando a endonuclease de restrição *HaeIII*, conforme descrito no item 4.9.2.

- PCR-RFLP do Cpb: os genes que codificam a proteinase cisteína b estão presentes como multicópias de repetições in tandem no genoma de *Leishmania*. O perfil gerado após a digestão do produto de PCR do Cpb distingue muito bem as espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana*. Os iniciadores Cpb FOR – 5' TGTGCTATTCGAGGAGTTCAA 3' e Cpb REV–5' TTACCCTCAGGAATCACTTTGT 3' amplificam um fragmento de 1050 pb utilizando o seguinte protocolo: 3,0 mM MgCl₂, 200 µM dNTP mix (New england Biolabs), 1,25 unidades de Taq *platinum* DNA polimerase (Invitrogen), 0,4 pmol de cada iniciador (IDT, prodimol), 2 µL de DNA molde completando para um volume final de 50 µL. A amplificação foi processada em termociclador automático de DNA (Eppendorff) alternando 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 seg, anelamento a 53°C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min., seguido por um passo de extensão final a 72°C por 8 min. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 2% corado pelo brometo de etídeo (10mg/mL). As amostras que apresentaram a banda específica de 1050 pb foram submetidas à digestão utilizando a enzima *TaqI* para análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP). A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 µL, contendo 1 µL de *TaqI* (New

england Biolabs)(10 U/ μ L), 1,5 μ L de tampão da enzima e 10,0 μ L de produto de PCR. A mistura foi incubada a 65°C por 2 horas. Os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 2% e comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR de cepas referência de *Leishmania* (descritas na seção 4.9.2).

- Sequenciamento do gene *hsp70*: o fragmento de 1300pb do gene *hsp70* foi sequenciado para identificar possíveis polimorfismos de base única (SNPs) para confirmação do diagnóstico específico e análise da estrutura populacional de *L. braziliensis*. As amostras a serem sequenciadas foram preparadas da seguinte forma: os produtos de PCR obtidos a partir da amplificação com os iniciadores HSP70for e HSP70rev foram purificados com o kit QIAquick PCR purification kit (Qiagen) segundo instruções do fabricante. Em seguida foi preparada uma mistura contendo 5,0 μ L dos produtos purificados, 1 pmol de cada iniciador, senso ou anti-senso, em tubos separados, e 4 mL de ET kit para sequenciamento (DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit - MegaBACE™, GE Healthcare) empregando o programa que alterna 35 ciclos de 95° C por 20 seg e 61° C por 3 min. Após a precipitação dos produtos da reação de sequenciamento utilizando acetato de amônio (1M) e etanol absoluto (PA) as sequências foram determinadas pelo seqüenciador automático de DNA MegaBace 1000 e analisadas por meio do programa Clustal W e CAP3 implementados no pacote BioEdit Sequence Alignment Editor.

4.11 Análise Estatística

As informações sobre os casos clínicos de LTA (identificação, caracterização demográfica, avaliação clínica e resultados dos testes laboratoriais) foram registradas em fichas estruturadas, posteriormente codificadas e digitadas em banco de dados, utilizando-se o programa Epi-Data. Foi feita dupla entrada de dados com posterior correção das divergências detectadas e verificação da consistência interna. As análises foram realizadas utilizando o programa Stata v.10.

A descrição dos casos clínicos foi realizada inicialmente através da frequência das variáveis investigadas e tabelas cruzadas. Posteriormente, realizou-se a análise univariada utilizando-se o qui-quadrado, teste t e cálculo da *odds* relativa bruta para comparações entre indivíduos com diagnóstico parasitológico confirmado e não confirmado, indivíduos com lesões ulceradas clássicas e lesões atípicas, e indivíduos com diferentes perfis de restrição do fragmento do *hsp70* de *L. braziliensis*. As variáveis que apresentaram um p significativo na análise univariada (utilizando-se nível significância de 0,20) foram selecionadas para compor modelos multivariados. Utilizando a regressão logística com nível de significância de 5%, foram calculadas as *odds* ajustadas para avaliar o efeito independente de cada uma das variáveis investigadas nos diferentes desfechos observados (comprovação parasitológica, tipo de lesão e perfil de restrição do *hsp70* de *L. braziliensis*).

5 RESULTADOS

5.1 Inquérito Populacional

A população total das aldeias Imbaúbas I e Imbaúbas II em 2008 era de 438 moradores, sendo 218 (49,8%) do sexo masculino e 220 (50,2%) do sexo feminino (Brasil, 2007). Um total de 164 pessoas participou do inquérito populacional nas duas aldeias, 65 do sexo masculino (39,6%) e 99 do sexo feminino (60,4%). Destes, 151 indivíduos realizaram todas as etapas do estudo: entrevista individual, exame clínico, leitura da IDRМ, coleta de amostras (sangue e biópsia, quando necessário).

Foram identificados 13 casos clínicos, o que representa uma prevalência de 8,6% (IC 95% = 4,9- 13,9). Três casos não foram confirmados parasitologicamente, mas apresentaram lesão e IDRМ positiva. O denominador utilizado para o cálculo da taxa de prevalência foi o número de pessoas que realizaram a leitura do teste de Montenegro (n=151). Um caso apresentou IDRМ negativa, contudo a PCR foi positiva.

Vinte e nove indivíduos foram reativos para IDRМ, porém não apresentavam lesões suspeitas de LTA, sendo classificados como assintomáticos. Portanto, a prevalência de casos assintomáticos foi igual a 19,2% (IC 95% = 13,5 – 26,1). A tabela 1 apresenta o resumo dos resultados do inquérito populacional.

Tabela 1: Classificação dos indivíduos participantes do inquérito populacional realizado no período de julho a novembro de 2008, nas aldeias Imbaúbas I e II da Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais.

Categorias	IDRM positiva	IDRM negativa	Total
Caso clínico	12/151 (7,9%)	1* /151 (0,7%)	13 (8,6%)
Assintomático	29/151 (19,2%)	0	29 (19,2%)
Não infectado	0	109 (72,2 %)	109 (72,2%)
Total	41 (27,2%)	110 (72,8%)	151 (100%)

^(*) Indivíduo com PCR positiva.

A média de idade dos casos identificados no inquérito foi de 23,7 ± 20,3 anos, com mínimo de 7, máximo de 72 anos e mediana de 12 anos. Foram

identificados 7 casos do sexo masculino e 6 do sexo feminino. Não foi observada associação entre casos e sexo ou faixa etária ($p > 0,05$, tabela 2).

Tabela 2: Distribuição proporcional de casos de LTA por sexo e idade nas aldeias Imbaúbas I e II, no período de junho a novembro de 2008.

	Caso de LTA	Não Caso	Total	p
	N(%)	N(%)		
Sexo				
Masculino	7 (53,9)	56 (40,6)	63	
Feminino	6 (46,2)	82 (59,4)	88	0,354
Faixa etária				
≤20 anos	7 (53,9)	83 (60,1)	90	
>20 anos	6 (46,1)	55 (39,9)	61	
Total	13	138	151*	0,658

* fizeram leitura de IDRMM

5.2 Busca ativa de pacientes com LTA

No período de junho de 2008 a agosto de 2010, foi realizada a busca ativa de pessoas com lesões sugestivas de LTA em toda a Reserva Xakriabá. Neste período, foram identificados 79 indivíduos com lesão suspeita de LTA (úlceras típicas ou lesões atípicas). Destes, 74 apresentaram pelo menos um método diagnóstico (IDRM, parasitológico ou molecular) positivo e foram classificados como casos clínicos. Um total de 87 casos foi diagnosticado no período do estudo (13 do inquérito + 74 da busca ativa).

5.3 Caracterização dos casos clínicos

Para a maioria dos casos, houve confirmação da infecção através de exames parasitológicos e/ou moleculares positivos, totalizando 72 casos clínicos confirmados parasitologicamente e 15 casos clínicos sem confirmação parasitológica. É importante ressaltar que desses 15 casos com clínica sugestiva e somente IDRМ positiva, 6 já tinham tido LTA no passado.

Entre os 87 casos clínicos, 45 (51,7%) eram do sexo masculino e 42 (48,3%) do sexo feminino ($p=0,719$), com idades entre 1 e 72 anos (média = 21,9 ; mediana = 18 anos). Quando foi avaliada a presença de lesões e cicatriz, 65 (74,7%) indivíduos apresentaram somente ferida ativa e 22 (25,3%) eram portadores de lesão e cicatriz. Cinquenta e dois pacientes (59,8%) apresentavam somente uma lesão ativa, enquanto 35 (40,2%) apresentavam duas ou mais. A maioria dos casos consistia de indivíduos portadores de lesões atípicas 61 (70,0%), somente 24 (27,6%) apresentaram úlceras típicas e 2 pacientes eram portadores tanto de úlcera típica quanto de lesões atípicas (Figura 9).

Entre os 87 casos, 36,8% dos indivíduos relataram ser trabalhadores rurais, 33,3% eram estudantes e os demais eram aposentados ou pensionistas (1,09%), donas de casa (6,9%), trabalhadores de nível médio ou especializado (6,9%), desempregados (1,1%) ou exerciam outras profissões (10,3%). Quanto à presença de co-morbidades, cinco casos eram também portadores de doença de Chagas e outros cinco eram hipertensos (sendo um também diabético).

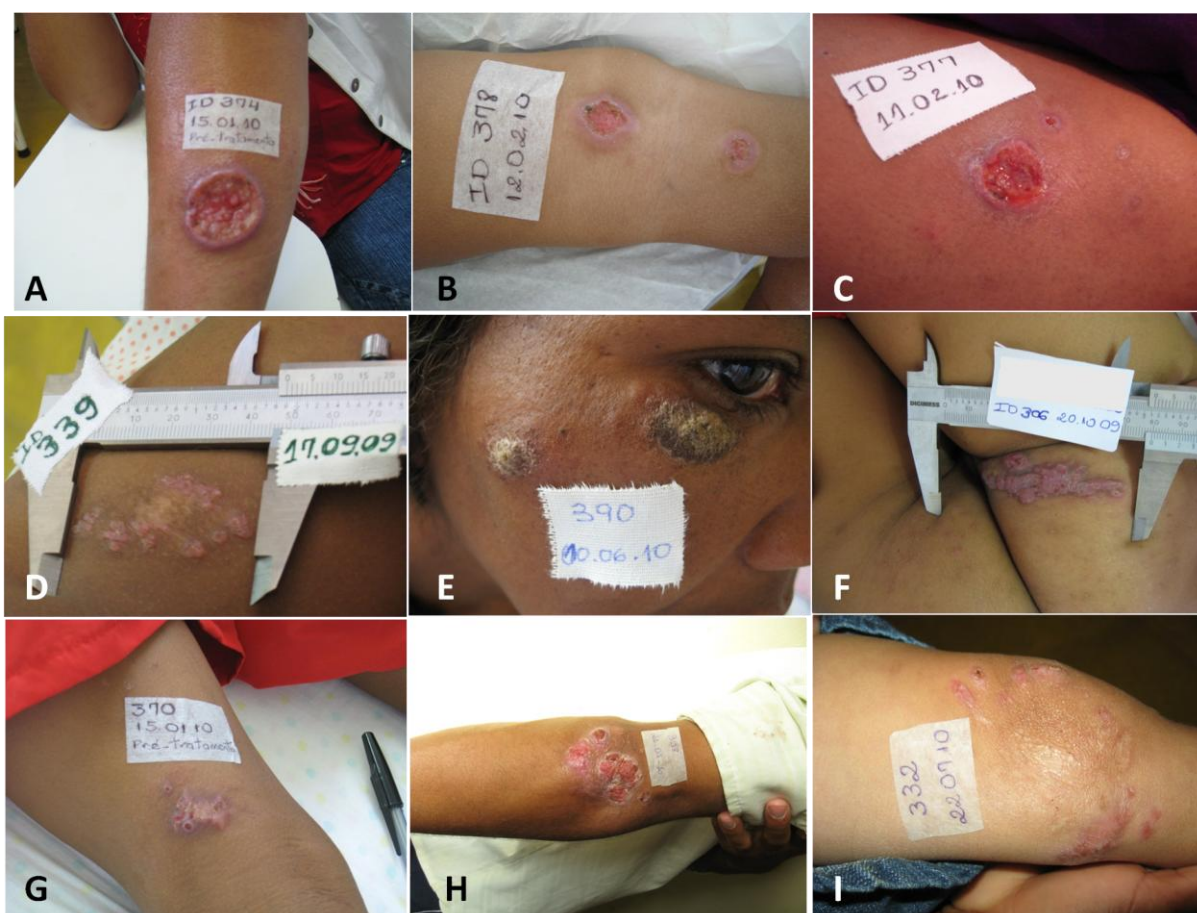


Figura 9: Lesões de pacientes portadores de feridas típicas (A - C) e atípicas (D – I) de LTA residentes na Reserva Indígena Xakriabá. A, B e C representam lesões típicas: úlcera arredondada ou ovalada de base eritematosa, infiltrada e de consistência firme, fundo avermelhado e com granulações e as bordas bem delimitadas e elevadas. As figuras D a I representam lesões atípicas de vários tipos: D - placa, E - lesões vegetantes, F - placa verrucosa, G e H - placas ulceradas e I – pápulas.

5.4 Diagnóstico de pacientes com LTA

Entre os 87 casos clínicos de LTA detectados na Reserva Xakriabá no período de 26 meses de estudo, 78 (89,7%) apresentaram resultado positivo para IDRM e 5 foram negativos, totalizando 83 leituras. Entretanto os 4 pacientes que não realizaram a leitura, foram confirmados com algum exame direto ou indireto.

Fragmentos de lesão de 80 indivíduos com clínica sugestiva de LTA foram coletados para a realização de diagnóstico parasitológico direto e molecular. Os resultados de cada teste são apresentados na tabela 3.

Setenta laminas contendo esfregaço de fragmento de biopsia foram examinadas ao microscópio óptico, sendo que 28 (40,0%) foram consideradas negativas e 37 (52,9%) positivas, nas quais foi possível a visualização de formas

amastigotas de *Leishmania*. Cinco lâminas foram consideradas impróprias para leitura, devido à baixa qualidade do esfregaço.

Um total de 77 tentativas de isolamento do parasito em meio de cultura a partir de fragmento de lesões suspeitas de pacientes foi realizado durante este estudo. Houve crescimento de formas promastigotas em 31 (40,3%) destes inóculos, os outros 46 (59,7%) foram considerados negativos, após acompanhamento das culturas durante seis semanas e sem visualização de promastigotas. Já a cultura dos aspirados de lesão foi realizada a partir de amostras de 87 indivíduos, das quais, 28 (32,2%) foram positivas e 59 (67,8%) negativas.

Fragmentos de biopsia provenientes de 75 pacientes foram pesquisados quanto à presença de DNA do parasito através da PCR, dos quais, 56 (74,7%) apresentaram o produto de PCR esperado para o gênero *Leishmania* e 19 (25,3%) foram negativos (tabela 3).

Tabela 3: Resultados dos métodos de diagnóstico realizados em 92 indivíduos com lesão suspeita de LTA, residentes na Terra Indígena Xakriabá, no período de junho de 2008 a agosto de 2010.

Método diagnóstico	Realizados	Positivos	Negativos	Sem resultado
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)
IDRM	88	78 (88,6)	8 (9,1)	2 (2,3)
Impressão em lâmina	70	37 (52,9)	28 (40,0)	5 (7,1)
Cultura de aspirado	87	28 (32,2)	59 (67,8)	0
Cultura de fragmento	77	31 (40,3)	46 (59,7)	0
PCR	75	56 (74,7)	19 (25,3)	0

Entre os 87 casos confirmados, isso é, positivos em pelo menos um teste (convencional ou PCR), 72 foram confirmados parasitologicamente e 15 apresentaram apenas a IDRM positiva. Para avaliar a capacidade de cada um dos métodos na identificação dos casos, os resultados dos testes foram comparados entre aqueles pacientes que realizaram pelo menos um exame convencional e também PCR a partir de fragmentos de lesão (n=75). Os resultados são apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Comparação dos resultados dos testes diagnósticos entre parasitológicos (cultura de aspirado e de fragmento de pele, leitura de impressão de biopsia em lâmina) e PCR de para confirmação da infecção por *Leishmania*.

Exames parasitológicos convencionais	PCR de fragmentos de lesão		Total
	Neg	Pos	
Neg	7 (9,3%)	10 (13,3%)	17
Pos	12 (16,0%)	46 (61,3%)	58
Total	19	56	75

Cinquenta e oito (77,3%) pacientes foram positivos em pelo menos um teste parasitológico convencional, enquanto 56 (74,7%) foram positivos na PCR. A PCR identificou 10 amostras negativas nos métodos convencionais, mas por outro lado, os convencionais identificaram 12 amostras negativas na PCR.

Entretanto, quando se compara cada um dos testes convencionais com a PCR, observa-se que a proporção de casos identificados somente pela PCR é sempre maior do que cada um dos testes convencionais (apesar da associação entre os testes convencionais identificar 12 casos que não foram identificados pela PCR) (tabela 5).

Tabela 5: Comparação entre resultados da PCR e cada um dos testes convencionais.

PCR x imprint (n=60)	Nº (%)	p
Positivos em ambos	24 (40,0%)	
Negativos em ambos	4 (6,7%)	
Positivos só na PCR	22 (36,7%)	0,203 ⁽¹⁾
Positivos só na lamina	10 (16,7%)	
PCR x cultura fragmento (n=73)		
Positivos em ambos	28 (38,4%)	
Negativos em ambos	16 (21,9%)	
Positivos só na PCR	28 (38,4%)	0,001⁽¹⁾
Positivos só na cultura	1(1,4%)	
PCR x cultura aspirado (n=71)		
Positivos em ambos	24 (33,8%)	
Negativos em ambos	16 (22,5%)	
Positivos só na PCR	29 (40,8%)	0,009⁽¹⁾
Positivos só na cultura	2 (2,8%)	

(1) Qui-quadrado

5.5 Identificação da espécie de *Leishmania* presente nos casos clínicos de LTA

Os parasitos isolados em cultura foram identificados pela PCR-RFLP do *hsp70* e algumas amostras foram também caracterizadas através de eletroforese de isoenzimas (MLEE). Além disso, foi realizado o diagnóstico através da PCR de fragmentos de lesão e todas as amostras positivas também foram submetidas à identificação por PCR-RFLP do *hsp70*.

As doze amostras identificadas por MLEE no laboratório da Dra. Elisa Cupollilo no IOC foram caracterizadas como *L. braziliensis* utilizando uma combinação de quatro isoenzimas.

Quando o DNA extraído a partir dos parasitos isolados em cultura foi submetido à PCR-RFLP do *hsp70*, o perfil de restrição obtido para a maioria das amostras foi diferente do esperado para *L. braziliensis* e também para as outras espécies de *Leishmania* testadas (figura 10). Das 38 amostras testadas, uma (2,6%)

apresentou resultado que corresponde à *L. braziliensis* (Lb) e 37 um perfil diferente de *L. braziliensis* (\neq Lb).

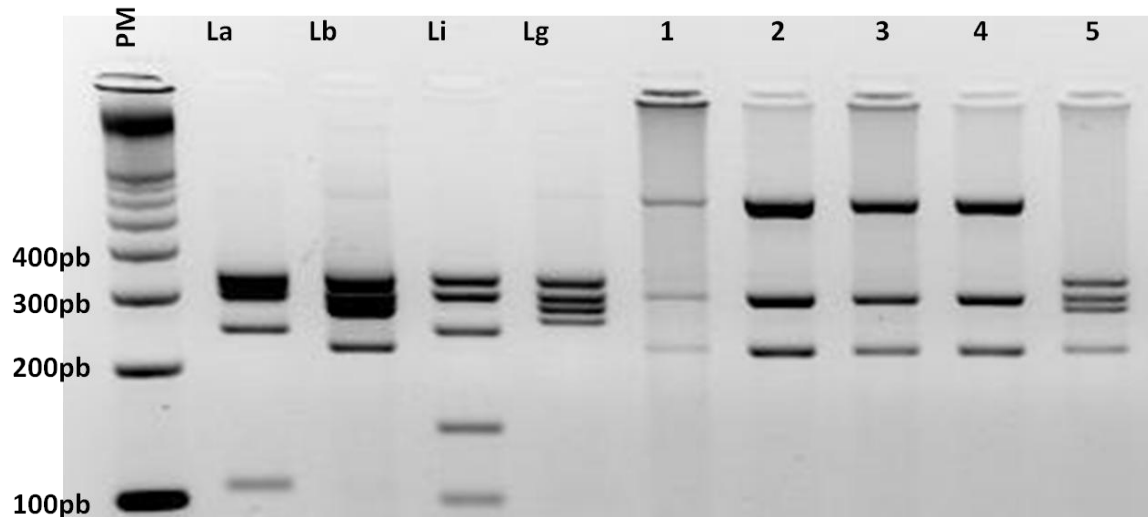


Figura 10: Resultado representativo do perfil da digestão com *HaeIII* do gene *hsp70* amplificado a partir de DNA do parasito obtido das amostras isoladas em cultura. PM – 100pb, La – cepa padrão *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), Lb – cepa padrão *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Li – cepa padrão *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e Lg – cepa padrão *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). 1 a 5 – amostras de DNA provenientes de promastigotas isoladas de lesões dos pacientes residentes na Terra Indígena Xakriabá, MG.

Já a PCR-RFLP realizada a partir de DNA extraído diretamente dos fragmentos de lesões (55 amostras), resultou em 9 (16,3%) amostras com perfil idêntico ao de *L. braziliensis* e 46 com perfil diferente de *L. braziliensis* (figura 11).

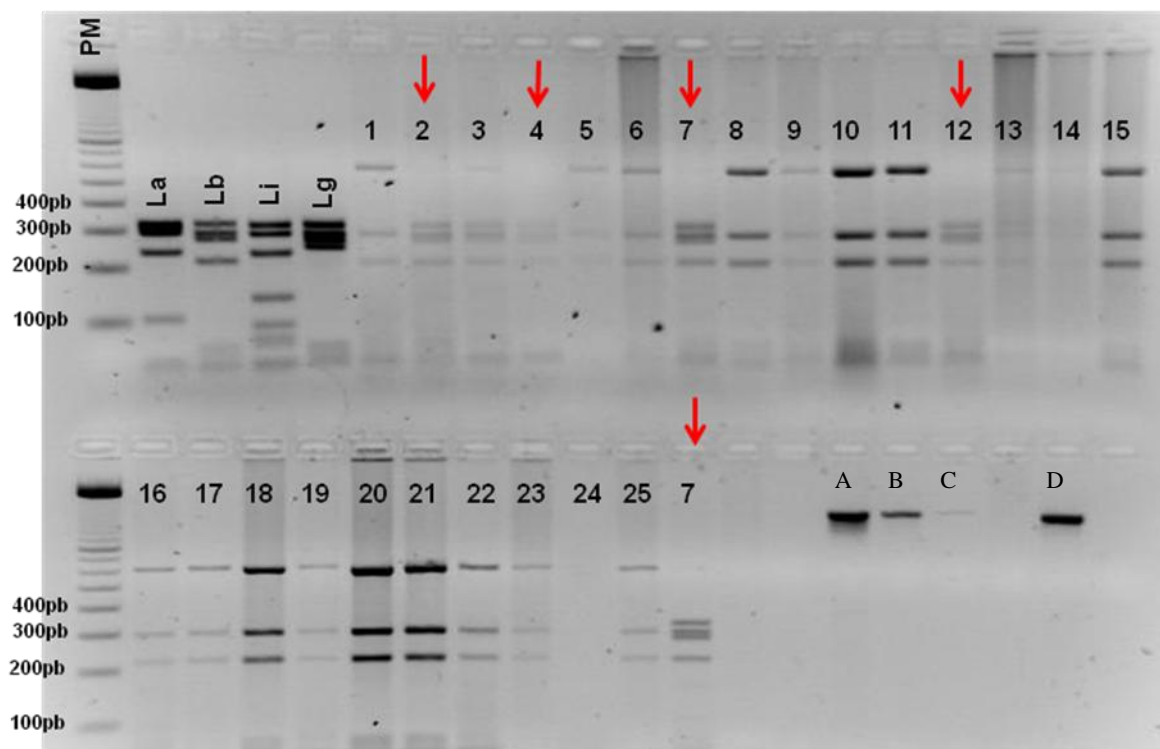


Figura 11: Resultado representativo do perfil da digestão com *HaeIII* do gene *hsp70* amplificado a partir de DNA extraído dos fragmentos de lesão. PM – 100pb, La – cepa padrão *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), Lb – cepa padrão *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Li – cepa padrão *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e Lg – cepa padrão *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). 1 a 25 – amostras de DNA provenientes de fragmentos de lesões dos pacientes da Terra Indígena Xakriabá, MG. As setas indicam as amostras que apresentaram o perfil de *L. braziliensis*. A a D – produto de PCR do *hsp70* antes da digestão.

Entre as amostras que foram submetidas à PCR-RFLP a partir de DNA extraído dos fragmentos de lesões e de parasitos de cultura, 3 apresentaram lesões nas quais foram encontrados os dois perfis de parasitos (Lb e ≠Lb). Nestes indivíduos, amostras submetidas a PCR-RFLP do *hsp70* produziram um padrão de bandas diferente de *L. braziliensis* quando foi utilizado DNA extraído das promastigotas isoladas em cultura e um padrão idêntico de *L. braziliensis* quando utilizou-se DNA extraído diretamente do fragmento de lesão. Dois destes pacientes apresentavam úlceras típicas e um deles era portador de uma lesão atípica.

O fragmento de 1300pb do *hsp70* foi seqüenciado para auxiliar na identificação do parasito. Todas as seqüências obtidas alinharam com a seqüência das cepas referência de *L. braziliensis* (*L. braziliensis* M2904 e M2903), porém alguns polimorfismos de base foram detectados em alguns sítios (ver item 5.8).

A tabela 6 resume os resultados de identificação das amostras de *Leishmania* provenientes dos pacientes com LTA.

Tabela 6: Resultados da identificação das amostras provenientes de pacientes com LTA residentes na Terra Indígena Xakriabá, MG.

Método de identificação	No. de amostras avaliadas	Padrão observado	
		<i>L. braziliensis</i>	≠ <i>L. braziliensis</i>
MLEE	12	12	0
PCR-RFLP <i>hsp70</i> (cultura)	39	1	37
PCR-RFLP <i>hsp70</i> (biópsia)	55	9	46

5.6 Caracterização dos casos clínicos

Os 87 casos de LTA foram analisados quanto às variáveis demográficas, infecções passadas, presença de co-morbidades, características das lesões e aspectos relacionados a tratamento, com o objetivo de avaliar quais variáveis estão relacionadas com as diferentes características dos casos.

Pacientes com confirmação parasitológica (n=72) e pacientes que tiveram apenas a IDRМ positiva (n=15) foram comparados em relação a todas as características investigadas: variáveis demográficas, variáveis relacionadas a infecções passadas (se já teve LTA, abandono do tratamento, número e descrição das lesões, tratamento caseiro, tempo de cicatrização), presença de co-morbidades, e características das lesões atuais (tipo, número, aspecto, tamanho e fatores como automedicação, infecção secundária, tempo de lesão). Foram observadas diferenças nas proporções de pacientes entre os dois grupos (confirmados e não confirmados), utilizando o nível de significância de 0,20 na análise univariada. As variáveis associadas à confirmação dos casos foram: nunca ter tido LTA, tipo de lesão (úlcerа clássica), não ter doença de Chagas, presença de lesão não epitelizada, característica da lesão sem bordas infiltradas, menor número de lesões ativas e maior diâmetro da lesão (Tabela 7). Não foram observadas diferenças significativas na distribuição das frequências das demais variáveis investigadas.

Tabela 7: Comparação entre casos confirmados e não confirmados parasitologicamente: distribuição das variáveis selecionadas na análise univariada*

Características	Confirmados (n=72)		Não confirmados (n=15)		OR bruta IC95%	p
	N	%	N	%		
Variáveis categóricas⁽¹⁾:						
Já teve LTA^(**)						
Sim	12	16,7	7	46,7	0,23 (0,07-0,75)	0,02
Não	60	83,3	8	53,3		
Úlcera clássica⁽⁴⁾						
Sim	23	32,9	1	6,7	6,85 (0,85-55,34)	0,06
Não	47	67,1	14	93,3		
Doença de Chagas						
Sim	3	4,2	2	13,3	0,28 (0,04-1,87)	0,20
Não	69	95,8	13	86,7		
Lesão epitelizada						
Sim	31	43,1	9	69,2	0,34 (0,09-1,19)	0,08
Não	41	56,9	4	30,8		
Lesão epitelizada com bordas infiltrativas						
Sim	8	11,1	4	30,8	0,28 (0,07-1,53)	0,08
Não	64	88,9	9	69,2		
Variáveis contínuas:						
Numero de lesões ativas						
Min-Max	1-9		1-13			
X ± DP	1,9 ± 1,5		3,5 ± 3,7		0,76 (0,60-0,96)	0,117 ⁽²⁾
M (1ºQ/3ºQ)	1(1/2)		2(1/5)			
Diâmetro da lesão (cm)						
Min-Max	0,3 – 20,0		0,4 – 3,5			
X ± DP	2,8 ± 2,8		1,5 ± 1,2		1,70 (0,83-3,44)	0,06 ⁽³⁾
M (1ºQ/3ºQ)	2,1 (1,3/2)		1,0 (0,7/2,5)			

(1) Teste exato de Fisher

(2) Wilcoxon ranksum

(3) Teste t da variável normalizada (log)

(4) Excluídos 2 pacientes com úlceras clássicas e lesões atípicas

*excluídas as “não respostas”

(**) presença de cicatriz e relato de infecção no passado

As variáveis que apresentaram nível de significância menor ou igual a 0,20 na análise univariada foram selecionadas para a análise multivariada, juntamente com sexo e idade, por sua importância na literatura. Após ajustamento utilizando a regressão logística, a única variável associada à confirmação parasitológica foi a co-infecção com doença de Chagas (OR=0,12, IC95%=0,02-0,89). Pacientes com doença de Chagas têm menor chance de serem diagnosticados, através dos métodos parasitológicos utilizados neste estudo, quando comparados aos pacientes não chagásicos. O ajustamento do modelo sugere também uma interação entre tamanho da lesão e já ter tido LTA, entretanto o pequeno número de pacientes com diagnóstico parasitológico negativo não permite conclusões a respeito.

Para avaliar os fatores associados ao tipo de lesão, pacientes com úlcera típica e pacientes com feridas atípicas foram comparados quanto a todas as características investigadas. Essas comparações foram feitas apenas para os pacientes com confirmação parasitológica, sendo excluídos 2 pacientes que apresentavam lesões típicas e atípicas, totalizando portanto 70 pacientes.

Entre os casos confirmados, 23 (32,9%) apresentavam lesões típicas enquanto 47 (67,1%) apresentavam lesões atípicas.

As variáveis que se apresentaram associadas ($p \leq 0,20$) a lesão típica na análise univariada foram: se está tratando por conta própria (com remédio caseiro ou comercial), diâmetro médio da lesão, tamanho da endureção da IDRM, cultura positiva e perfil de *L. braziliensis* na PCR-RFLP do *hsp70* (tabela 8).

Tabela 8: Comparação entre casos de úlceras típicas e casos de lesões atípicas: distribuição das variáveis selecionadas na análise univariada*

Características	Úlcera típica (n=23)		Lesão atípica (n=47)		OR bruta IC95%	p
	N	%	N	%		
Usando remédio						
comercial						
Sim	16	76,2	24	55,8	2,5 (0,79-8,17)	0.11 ⁽¹⁾
Não	5	23,8	19	44,2		
Usando remédio caseiro						
Sim	11	52,4	32	76,2	2,91(0,96-8,85)	0.05 ⁽¹⁾
Não	10	47,6	10	55,8		
Diâmetro médio						
≤2cm	15	65,2	18	41,9	0,38 (0,13-1,10)	0,07 ⁽²⁾
>2cm	8	34,8	25	58,1		
Perfil do parasito						
Perfil Lb	6	31,58	3	8,83	4,8 (1,0-22,0)	0,06 ⁽¹⁾
Perfil ≠Lb	13	68,42	31	91,17		
Enduração						
Min-Max	6-20		5-14		1,18 (0,976-1,43)	0,08 ⁽²⁾
X ± DP	12,2 ± 3,4		10,3 ± 3,4			
M (1ºQ/3º Q)	12 (10-14)		10 (8-12)			

⁽¹⁾ Qui-quadrado⁽²⁾ ttest

Após o ajustamento utilizando a regressão logística multivariada verificou-se que a única característica independentemente associada ao tipo de lesão úlcera clássica foi o perfil do fragmento (Lb) (OR=4,8, IC95%=1,0-22,0), confirmando os resultados do modelo anterior. Ou seja, a chance de ter lesão típica é quase cinco vezes maior entre os pacientes portadores de parasitos com perfil Lb no PCR-RFLP do *hsp70* do que entre quem tem perfil ≠ Lb.

Para avaliar se existe alguma associação entre o perfil do parasito obtido na PCR-RFLP do *hsp70*, realizada diretamente em amostras de fragmento de lesão, e as características dos casos confirmados, os 9 pacientes com perfil idêntico ao *L. braziliensis* foram comparadas aos 46 com perfil diferente de *L. braziliensis*.

A análise univariada mostrou que não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa entre o perfil do parasito e as características demográficas, presença de co-morbidades ou presença de casos de LTA na família ($p>0,20$).

A tabela 9 apresenta as características associadas aos perfis, utilizando o nível de significância de 0,20. Em relação às características da lesão atual, observou-se que a proporção de pessoas com perfil igual a *L. braziliensis* foi maior entre aqueles que estavam tratando da ferida com remédios caseiros, enquanto o perfil diferente de *L. braziliensis* está associado aos casos que não estavam usando remédios caseiros ($p=0.04$).

A proporção de pacientes com úlcera típica foi maior entre os que apresentavam perfil Lb, enquanto a proporção de pessoas com perfil \neq Lb foi maior entre aqueles com lesão atípica.

O tempo médio de lesão foi maior (20,6 meses) entre aqueles pacientes que apresentaram perfil Lb em comparação aos que apresentaram perfil \neq Lb (8,2 meses) ($p=0,08$).

Tabela 9: Comparação entre casos com perfil de *L. braziliensis* e casos com perfil diferente: distribuição das variáveis selecionadas na análise univariada*

Características	Perfil Lb (n=9)		Perfil ≠Lb (n=46)		OR bruta IC95%	P
	N	%	N	%		
	Usando remédio caseiro					
Sim	5	55,6	8	20,0	5 (1,1-23,0)	0.04 ⁽¹⁾
Não	4	44,4	32	80,0		
Usando remédio comercial						
Sim	8	100,0	24	58,5	-	0.04 ⁽¹⁾
Não	0	0	17	41,5		
Tipo de lesão						
Úlcera clássica	6	66,7	13	29,6		
Lesão atípica	3	33,3	31	70,5	4,8 (1,0-22,0)	0,06 ⁽¹⁾
Tempo médio de lesão (meses)						
Min-Max	1-72		<1-48			
X ± DP	20.6 ± 23.5		8.2 ± 9.6		1,1 (1,0-1,1)	0.08 ⁽²⁾
M (1ºQ/3º Q)	12 (3-36)		4 (3-12)			

⁽¹⁾ Teste exato de Fisher⁽²⁾ teste t, variável normalizada

No modelo multivariado observou-se que a única variável que apresentou alguma associação com o perfil de *L. braziliensis*, após ajustamento pelas demais variáveis, foi o tipo de lesão (OR = 4.8, IC95% = 1,0-22,0). A chance de um caso apresentar parasitos com o perfil de *L. braziliensis* é quase 5 vezes maior entre quem tem lesão típica do que entre quem tem lesão atípica.

5.7 Detecção de *Leishmania* em pequenos mamíferos silvestres

Foram realizadas oito campanhas de captura de pequenos roedores e marsupiais de maio de 2008 a junho de 2009. Um total de 97 espécimes foi coletado, sendo 72 roedores e 25 marsupiais. Três espécies de roedores (*Trychomys apereoides*, *Rhipidomys mastacalis* e *Rattus rattus*) e três de marsupiais (*Didelphis albiventris*, *Gracilinanus agilis* e *Marmosops incanus*) representaram a fauna dominante de pequenos mamíferos silvestres na área e no período do estudo. A maioria dos exemplares foi capturada em armadilhas dispostas nas áreas de trilhas entre as casas e somente sete foram recolhidos no peridomicílio de residências (tabela 10).

Tabela 10: Lista dos roedores e marsupiais capturados no peridomicílio e em trilhas no período de maio de 2008 a junho de 2009 nas aldeias Imbaúbas I e II na Terra Indígena Xakriabá, MG.

	Espécie	Número de exemplares	Capturados em casas	Capturados em trilhas
	<i>Trychomys apereoides</i>	64	1	63
Roedores	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	7	0	7
	<i>Rattus rattus</i>	1	1	0
	<i>Didelphis albiventris</i>	19	5	14
Marsupiais	<i>Gracilinanus agilis</i>	4	0	4
	<i>Marmosops incanus</i>	2	0	2
	Total	6	7	90

O roedor *Trychomys apereoides* foi a espécie mais amostrada (67%) seguida pelo marsupial *Didelphis albiventris* (19%). *Rhipidomys mastacalis* foi o segundo roedor mais amostrado (7%). As outras espécies, *Gracilinanus agilis*, *Marmosops incanus* e *Rattus rattus*, contribuíram com apenas 7% da fauna de pequenos mamíferos capturada nas aldeias Imbaúbas no período estudado (figura 12).

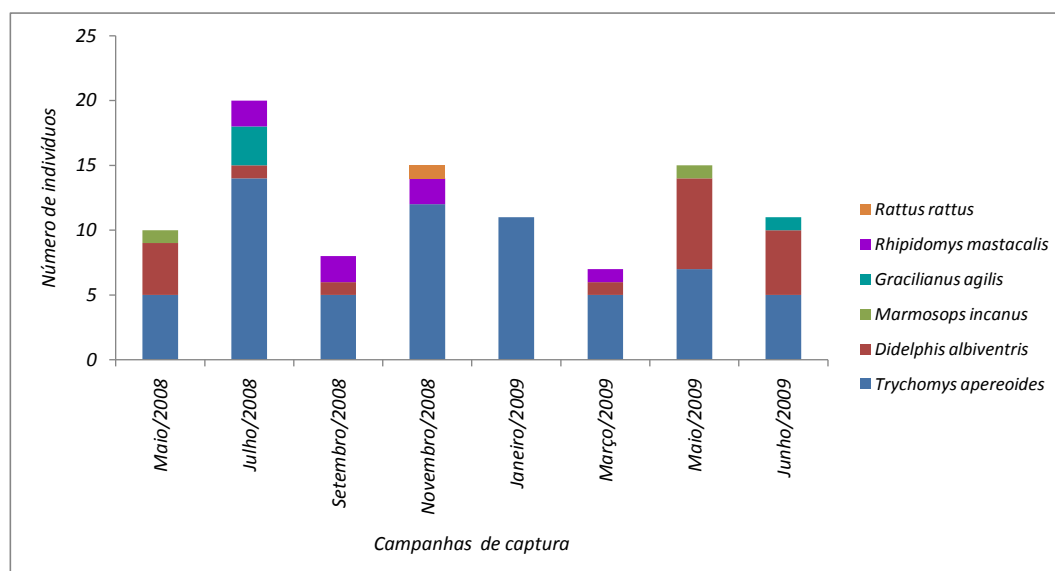


Figura 12: Número de exemplares de pequenos mamíferos por espécie e por campanha capturados nas aldeias Imbaúbas I e II, Terra Indígena Xakriabá no período de maio de 2008 a junho de 2009.

O mamífero mais amostrado no peridomicílio das casas foi *Didelphis albiventris*, marsupial importante por sua aproximação comum a habitações humanas, freqüentemente relacionado à predação de aves domésticas, especialmente galinhas. Além disso, dentre as espécies amostradas nas casas, encontra-se um exemplar de *Rattus rattus*, o rato de telhado, que foi capturado em uma casa de Imbaúbas II.

A tabela 11 mostra os resultados da detecção de *Leishmania* por PCR-RFLP nos pequenos mamíferos capturados. Pelo menos um representante de cada espécie foi encontrado positivo para o DNA de *Leishmania*. Dezesesseis roedores e oito marsupiais apresentaram resultado positivo na PCR do *hsp70* em pelo menos um tipo de amostra biológica, o que representa 24,75% do total de 97 pequenos mamíferos. Entre os positivos, 22 (91,67%) espécimes foram capturados nas trilhas entre as casas e 2 (8,33%) foram recolhidos por armadilhas dispostas no peridomicílio destas residências.

Tabela 11: Resultados da PCR-RFLP do *hsp 70* para detecção de DNA de *Leishmania* dos pequenos mamíferos capturados na Reserva Indígena Xakriabá no período de maio de 2008 a junho de 2009.

Espécie	Capturados (%)	PCR positivos <i>hsp70</i> / total		Identificação específica*		
		Peridomicílio	Trilhas	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. infantum</i>
<i>Trychomys apereoides</i>	64 (65,99%)	0/1	13/63	10	2	1
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	7 (7,21%)	0/0	2/7	0	0	2
<i>Rattus rattus</i>	1 (1,04%)	1/1	0/0	0	0	1
<i>Didelphis albiventris</i>	19 (19,58%)	1/5	3/14	4	0	0
<i>Gracilinanus agilis</i>	4 (4,12%)	0/0	3/4	3	0	0
<i>Marmosops incanus</i>	2 (2,06%)	0/0	1/2	0	1	0
Total	97 (100%)	2/7	22/90	17	3	4
			24/97		24	

* PCR-RFLP *HaeIII*

Três espécies de *Leishmania* foram encontradas infectando os pequenos mamíferos na região das aldeias Imbaúbas I e II. Na tabela 11, é possível verificar que 17 animais estavam infectados por *L. braziliensis*, 4 por *L. infantum* e 3 por *L. guyanensis*.

Quando a análise dos resultados da PCR é feita em relação ao número de exemplares capturados por espécie pode ser observado que 100% dos exemplares de *R. rattus* e de *R. mastacalis*, 75% e 50% dos exemplares de *G. agilis* e *M. incanus*, respectivamente, foram positivos. Entretanto, deve ser considerado o pequeno número de animais coletado destas espécies. A figura 13 mostra um gráfico com as espécies de pequenos mamíferos e as porcentagens de infecção para as diferentes espécies de *Leishmania*.

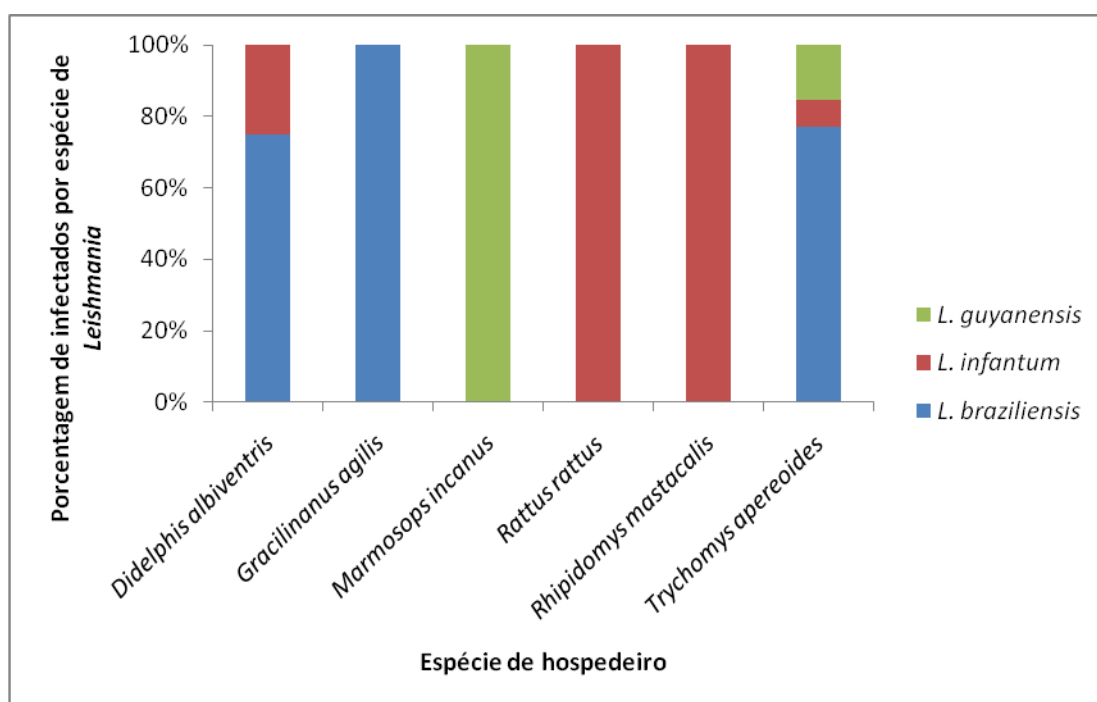


Figura 13: Proporção de pequenos mamíferos infectados por diferentes espécies de *Leishmania*.

T. apereoides foi o pequeno mamífero que apresentou o maior número de indivíduos PCR-positivos com 13 exemplares infectados por *Leishmania* sp. Além disso, foi a única espécie em que foram observadas infecções pelas três espécies de *Leishmania* detectadas nos seguintes tecidos: *L. braziliensis* em 9 amostras de pele de cauda e 2 de fígado e *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. guyanensis* em pele de orelha (tabela 12 e figura 14).

O marsupial que apresentou maior índice de positividade na PCR foi *D. albiventris* com 4 espécimes encontrados infectados por *L. braziliensis* em 3 amostras de pele de cauda e uma de baço (tabelas 11 e 12).

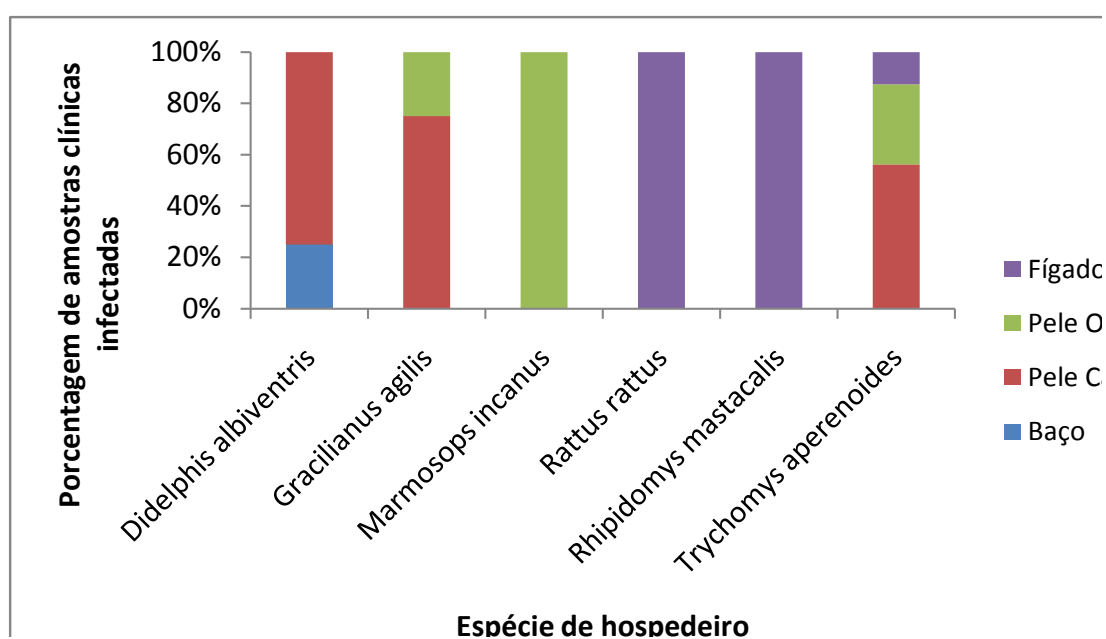


Figura 14: Porcentagem de amostras clínicas positivas na PCR para *Leishmania* em relação a espécie de pequenos mamíferos.

A tabela 12 mostra a relação dos diferentes tecidos encontrados infectados nos pequenos mamíferos, bem como as espécies de *Leishmania* identificadas em cada um deles. A amostra clínica que apresentou o maior índice de positividade foi pele de cauda, totalizando 15 (55,6%) amostras positivas. Além desta, seis amostras de pele de orelha (22,2%), cinco de fígado (18,5%) e uma de baço (3,7%) apresentaram resultados positivos para DNA de *Leishmania* (tabela 12 e figura 14).

Tabela 12: Positividade da PCR-RFLP hsp 70 em amostras clínicas de pequenos mamíferos capturados na Reserva Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil, no período de maio de 2008 a fevereiro de 2010.

Espécie	Nº de amostras positivas				Total
	Baço	Pele de cauda	Pele de orelha	Fígado	
<i>Trychomys apereoides</i>	0	9 ^a	4 ^{a,b,c}	2 ^a	15 (55,6%)
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	0	0	0	2 ^c	2 (7,4%)
<i>Rattus rattus</i>	0	0	0	1 ^c	1 (3,7%)
<i>Didelphis albiventris</i>	1 ^a	3 ^a	0	0	4 (14,8%)
<i>Gracilinanus agilis</i>	0	3 ^a	1 ^a	0	4 (14,8%)
<i>Marmosops incanus</i>	0	0	1 ^b	0	1 (3,7%)
Total	1(3,7%)	15(55,6%)	6(22,2%)	5(18,5%)	27

^a *L. braziliensis*, ^b *L. guyanensis*, ^c *L. infantum*

Trychomys apereoides foi a espécie que apresentou o maior número de amostras positivas (55,6%) na PCR, seguido de *Didelphis albiventris* (14,8%) e *Gracilinanus agilis* (14,8%).

A figura 15 mostra os perfis de bandas encontrados após a PCR-RFLP do *hsp70* para amostras de DNA de cepas padrão de *Leishmania* e de representantes de pequenos mamíferos infectados por *L. braziliensis* (PC 03), *L. infantum* (F 30) e *L. guyanensis* (PO 25).

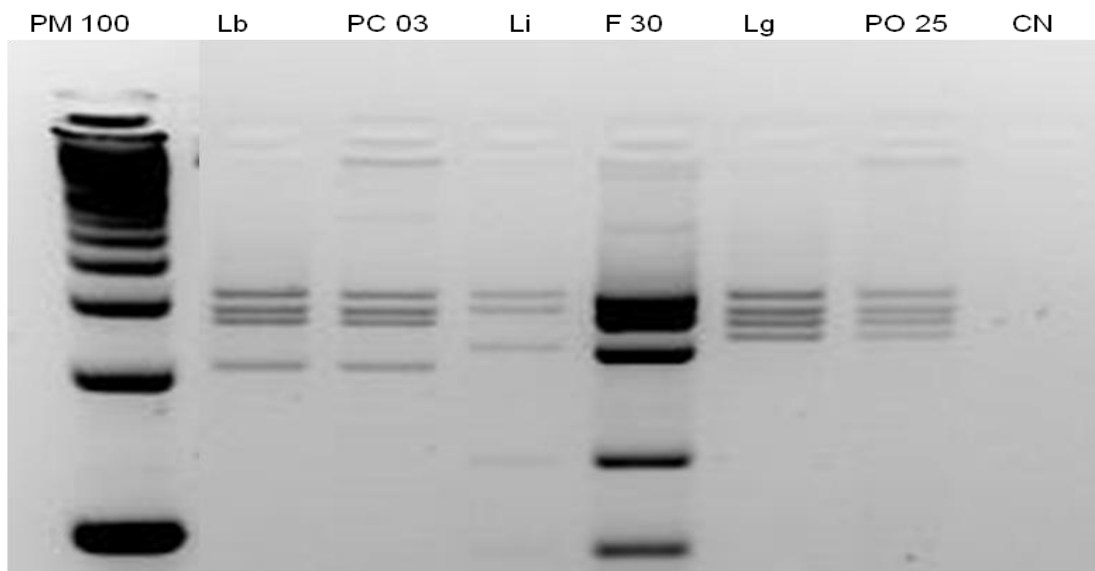


Figura 15: Resultado representativo do perfil da digestão com *HaeIII* do gene *hsp70* amplificado a partir de DNA extraído das amostras provenientes de pequenos mamíferos. PM – 100pb, Lb – cepa padrão *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Li – cepa padrão *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e Lg – cepa padrão *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). PC 03 – amostra de DNA proveniente de pele de cauda de um *Didelphis albiventris*, F 30 - DNA proveniente de fígado de *Rhipidomys mastacalis*, PO 25 – DNA extraído de pele de orelha de *Trychomys apereoides*.

5.8 Detecção de *Leishmania* em cães domésticos

Todos os cães domésticos encontrados nas casas das aldeias Imbaúbas nos meses de fevereiro e julho de 2009 e fevereiro de 2010 foram examinados quanto à presença de sinais clínicos de leishmaniose. Amostras de sangue de um total de 98 cães foram coletadas para realização de diagnóstico sorológico. Dezesseis cães foram positivos na RIFI e 22 no ELISA sendo que oito cães (8,16%) foram positivos em apenas um dos testes e 15 (15,30%) foram positivos na RIFI e ELISA, totalizando 23 cães soropositivos (23,46%). Para a eutanásia foram considerados apenas os cães soropositivos para os dois métodos conforme preconizado pelo Ministério da Saúde.

A maioria dos cães estudados era assintomática, 89 (90,8%) e somente 9 (9,2%) animais apresentavam pelo menos um sinal clínico de leishmaniose tegumentar e/ou leishmaniose visceral canina, sendo classificados como sintomáticos.

Onze cães foram eutanasiados para realização do diagnóstico molecular, nove (73%) destes apresentaram pelo menos uma amostra positiva para as reações de PCR que amplificam genes de *Leishmania* (ITS1 ou *hsp70*).

Foi possível isolar promastigotas em cultura a partir da medula de dois cães. A caracterização isoenzimática e a PCR-RFLP do *hsp70* renderam resultados que possibilitaram identificar estes parasitos como *L. infantum*. Desta forma, sete animais estavam infectados somente por *L. infantum* e dois apresentaram infecção mista por *L. infantum* e *L. braziliensis*. A tabela 13 resume os resultados da sorologia, pesquisa de DNA de *Leishmania* e cultura de medula dos cães domésticos das aldeias Imbaúbas.

Tabela 13: Resultados de testes sorológicos, PCR-RFLP e cultura de medula dos cães soropositivos provenientes das aldeias Imbaúbas I e II, Terra Indígena Xakriabás, realizados em fevereiro e julho de 2009 e fevereiro de 2010.

Cão	Estado clínico	RIFI	ELISA	PCR ITS 1	PCR <i>hsp70</i>	Amostras clínicas positivas	PCR-RFLP	Cultura (medula óssea)
13	Assintomático	Pos (1/2560)	Pos (0,427)	Pos	NR	baço/ pele orelha	<i>L. infantum</i>	Neg
20	Assintomático	Pos (1/1.280)	Pos (0,615)	Pos	NR	pele orelha	<i>L. infantum</i>	Neg
23	Assintomático	Pos (1/320)	Pos (0,360)	Pos	NR	pele orelha/fígado/ linfonodo	<i>L. infantum</i>	Neg
40	Sintomático	Pos (1/320)	Pos (0,520)	Pos	NR	baço/pele orelha/ pele nariz	<i>L. infantum</i>	Neg
46	Assintomático	Pos (1/160)	Pos (0,347)	Pos	NR	fígado	<i>L. infantum</i>	Neg
48	Assintomático	Pos (1/160)	Pos (0,257)	NR	Pos	pele de orelha/ baço	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. infantum</i>
49	Assintomático	Pos (1/160)	Pos (0,227)	Pos	NR	baço/fígado/ linfonodo	<i>L. infantum</i>	Neg
50	Assintomático	Pos (1/40)	Pos (0,124)	Pos	NR	fígado/baço	<i>L. infantum</i>	Neg
78	Assintomático	Pos (1/160)	Pos (0,819)	NR	Pos	pele nariz/ linfonodo	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. infantum</i>

RIFI: positivo \geq 1:40; ELISA: positivo $>$ 0,100.
NR: não realizado

Um dos cães que apresentavam infecção mista por *L. braziliensis* e *L. infantum*, era portador de uma lesão no focinho (figura 16). A partir de um pequeno fragmento coletado desta ferida foi feita a extração de DNA e a PCR-RFLP do *hsp70* mostrou a infecção por *L. braziliensis* nesta amostra. Este cão também apresentou

infecção na medula por *L. infantum*, confirmada pelo isolamento de promastigotas a partir da cultura deste tecido (tabela 13). O outro cão portador de infecção mista apresentou promastigotas isoladas em cultura identificadas como *L. infantum* por MLEE e PCR-RFLP. Porém, foi detectado DNA de *L. braziliensis* infectando pele íntegra de orelha deste animal.



Figura 16: Cão portador de lesão tegumentar na parte inferior do focinho, a partir de um fragmento da qual foi detectado DNA de *L. braziliensis*.

5.9 Distribuição dos casos humanos de LTA e dos hospedeiros silvestres e domésticos nas aldeias Imbaúbas

A figura 17 mostra a distribuição de casos de LTA diagnosticados nas aldeias Imbaúbas I e II durante o inquérito populacional. Os pequenos mamíferos e cães domésticos infectados por *Leishmania* sp. também estão representados no mapa.

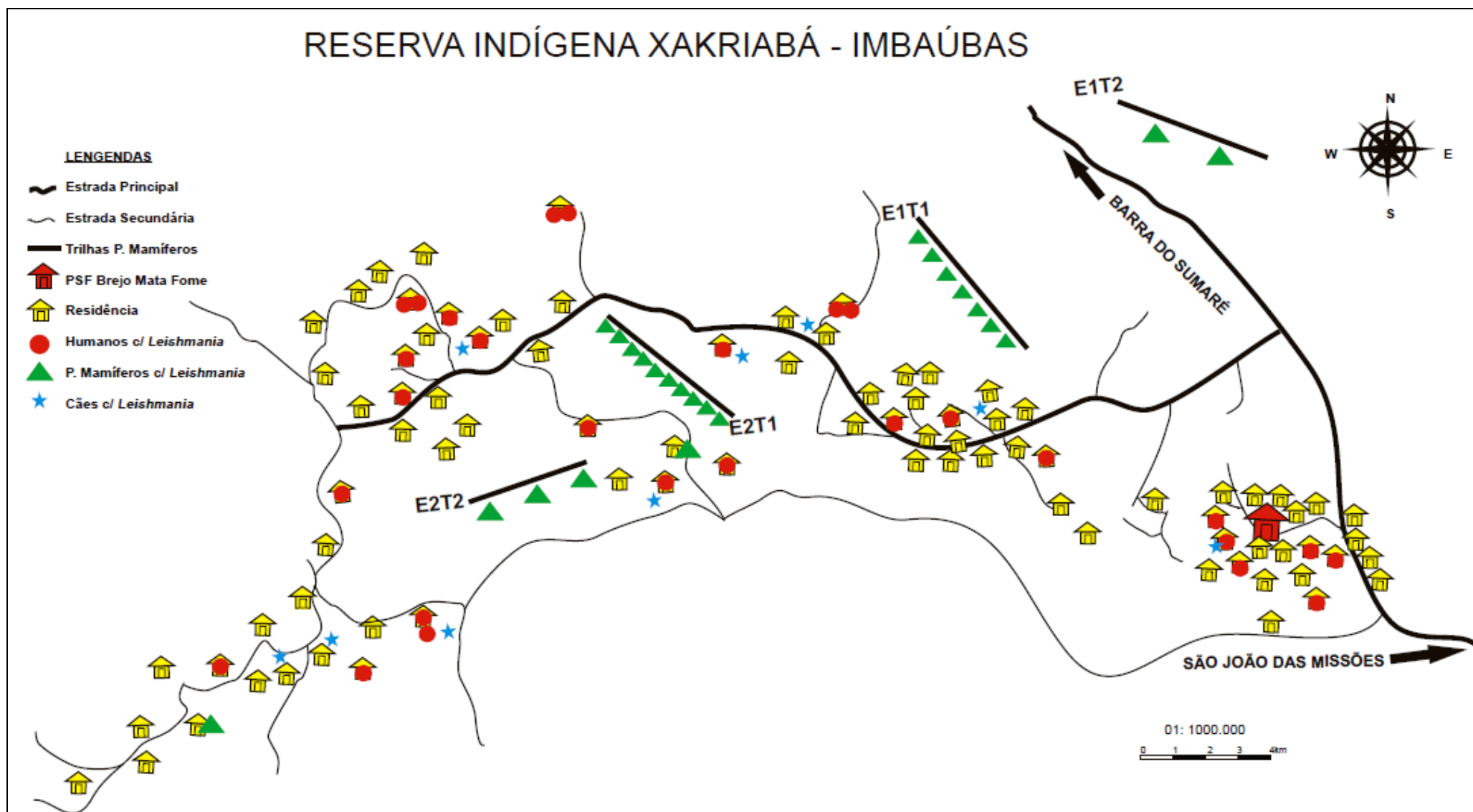


Figura 17: Distribuição dos casos de LTA e de pequenos mamíferos e cães infectados por *Leishmania* sp. nas aldeias Imbaúbas I e II, Reserva Indígena Xakriabá.

5.10 Levantamento das espécies de flebotomíneos nas aldeias Imbaúbas I e II

No período de julho de 2008 a março de 2009 foram realizadas cinco campanhas de coleta de flebotomíneos no peridomicílio das mesmas residências onde foram colocadas armadilhas para a captura dos pequenos mamíferos. Um total de 1327 espécimes foi obtido. As espécies mais capturadas foram *Lutzomyia longipalpis* (756 exemplares – 57%) e *Lu. intermedia* (297 exemplares – 22%). Cabe ressaltar que foi coletado um número considerável de fêmeas de *Lu. intermedia* (244), principal vetor de LTA causada por *L. braziliensis* em Minas Gerais. Foi verificada a presença, em número bastante reduzido (3 exemplares), de *Lu. whitmani*, espécie considerada vetora em importantes focos de LTA no Brasil (tabela 14).

Tabela 14: Distribuição de flebotomíneos capturados com armadilha luminosa HP, segundo espécie e mês de captura na Terra Indígena Xakriabá, MG.

Espécies	Período										N	(%)
	jul/08		Sep/08		nov/08		jan/09		mar/09			
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂		
<i>Brumptomyia avellari</i>	0	1	2	3	13	14	0	0	1	0	34	2.7
<i>Lutzomyia capixaba</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0.1
<i>L. cortelezzii</i>	0	0	0	0	0	3	0	0	0	1	4	0.3
<i>L. goiana</i>	0	2	6	2	16	19	2	0	1	1	49	3.7
<i>L. intermedia</i>	65	15	124	20	21	4	7	3	27	11	297	22.4
<i>L. ischnacantha</i>	0	0	1	2	7	2	0	0	0	3	15	1.1
<i>L. lenti</i>	1	4	4	7	8	6	0	0	1	2	33	2.5
<i>L. longipalpis</i>	4	39	42	60	161	295	31	54	16	54	756	57.0
<i>L. migonei</i>	1	5	1	7	1	5	1	1	0	1	23	1.8
<i>L. peresi</i>	1	0	0	0	3	1	2	0	1	0	8	0.6
<i>L. quinquefer</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0.1
<i>L. renei</i>	0	1	9	0	16	0	1	0	2	0	29	2.2
<i>L. sallesi</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0.1
<i>L. serrana</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	0.1
<i>L. sordellii</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0.1
<i>L. termitophila</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0.1
<i>L. whitmani</i>	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	3	0.2
Complexo <i>cortelezzii</i>	0	0	1	0	20	0	2	0	0	0	23	1.8
<i>Lutzomyia</i> spp.	1	0	0	6	15	5	0	1	11	2	41	3.1
Sub-total	73	67	193	108	281	356	49	62	62	76	1.327	
TOTAL	140		301		637		111		138			100

* Coletas realizadas no período de julho de 2008 a abril de 2009.

5.11 Estudo do polimorfismo genético de *L. braziliensis*

Os resultados da PCR-RFLP do *hsp70* revelaram a existência de dois perfis distintos de restrição quando amostras de promastigotas isoladas de lesões de pacientes e fragmentos retirados da lesão foram submetidas à digestão com a enzima *HaeIII* (figuras 10 e 11). Estes perfis, ao serem comparados ao perfil de restrição da cepa referência de *L. braziliensis*, foram identificados como: a) perfil típico – apresenta o padrão de bandas idêntico ao da referência, correspondente aos fragmentos: 338, 307, 287 e 224 bp; b) perfil atípico – apresenta o perfil diferente daquele encontrado para a cepa referência, correspondente aos fragmentos: 625, 307 e 224 bp. Todos os parasitos isolados em cultura apresentaram um padrão atípico de digestão da banda de 1300pb do *hsp70*, com exceção de uma amostra.

No entanto, a PCR-RFLP realizada a partir do DNA extraído diretamente dos fragmentos retirados das lesões revelou que algumas amostras possuíam o perfil atípico verificado nos parasitos cultivados, outras, porém, apresentaram o padrão idêntico ao da cepa referência de *L. braziliensis*.

O seqüenciamento do fragmento de 1300pb do gene *hsp70* foi também realizado para auxiliar no estudo do polimorfismo genético de *L. braziliensis* na área de estudo. Os resultados mostraram que em alguns sítios da seqüência existem polimorfismos de bases suficientes para separar dois grupos distintos do parasito. As cepas referência (*L. braziliensis* M2904 e M2903), amostras 03 e 04 (provenientes de 2 marsupiais da Terra Indígena Xakriabá) e amostras de pacientes com perfil Lb na PCR-RFLP do *hsp70* formam um grupo. Já as amostras isoladas de pacientes que apresentam perfil ≠Lb formam outro grupo (tabela 15). Estes dois grupos identificados através do seqüenciamento estão de acordo com os dois perfis gerados na PCR-RFLP e podem ser explicados pela mutação na posição 904, que extingue um sítio reconhecido pela enzima de restrição (338pb + 287pb = 600pb).

Tabela 15: Resultados do seqüenciamento do gene *hsp70* das amostras de *L. braziliensis* mostrando os polimorfismos encontrados na posição 904 que corresponde a um sítio de restrição da *HaeIII*.

Cepa ou isolado	Fragmentos na RFLP <i>hsp70</i> (pb)	Base na posição 904
<i>L. braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904*	338, 307, 287, 224	G
<i>L. braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2903 (566)	338, 307, 287, 224	G
Isolado 03 ⁽¹⁾	338, 307, 287, 224	G
Isolado 04 ⁽¹⁾	338, 307, 287, 224	G
Isolado 56 ⁽²⁾	625, 307, 224	A
Isolado 305 ⁽²⁾	625, 307, 224	A
Isolado 314 ⁽²⁾	625, 307, 224	A
Isolado 338 ⁽³⁾	338, 307, 287, 224	G
Isolado 338 ⁽²⁾	625, 307, 224	A
Isolado 339 ⁽²⁾	625, 307, 224	A
Isolado 374 ⁽²⁾	338, 307, 287, 224	G

* gi|154339392|ref|XM_001562338.1| *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904

⁽¹⁾ Amostras de pele de cauda de pequenos mamíferos.

⁽²⁾ Isolados de cultura de pacientes Xakriabás.

⁽³⁾ Amostra de fragmento de lesão de paciente Xakriabá.

O seqüenciamento do fragmento do gene *hsp70* também mostra que além do polimorfismo na posição 904, outros SNPs foram identificados nas amostras provenientes da Reserva Xakriabá (tabela 16).

Tabela 16: Resultados do seqüenciamento do gene *hsp70* mostrando vários SNPs encontrados em diferentes posições das amostras de *L. braziliensis*.

Amostra	Perfil do parasito na RFLP <i>hsp70</i>	706	796	797	800	804	809	810	904	1109	1120	1125	1138	1155	1156	1168	1724	1748	1751	1766	
		insT	delC	insT	G>A	C>T	G>C	G>C	G>A	A>T	C>A	C>G	C>G	T>A	C>A	C>T	T>A	G>A	G>A	G>A	A>T
03 ^a	Lb											X	X					X			X
04 ^b	Lb	NA			X	X	X	X									NA	NA	NA		NA
56 ^a	≠Lb								X	X		X	X				X				
305 ^a	≠Lb								X	X	X	X		X	X	X	X				
306 ^a	≠Lb								X								X				
314 ^a	≠Lb								X	X			X				X				
338 ^a	Lb e ≠Lb	X	X	X					#								X				
339 ^a	≠Lb	X							X		X					X	X				
374 ^a	Lb		X	X																	

a- Posição 540 a 1820 da seqüência da cepa referência de *L. braziliensis*

b- Posição 777 a 1206 da seqüência da cepa referência *L. braziliensis*

X – Mutação presente

- Mutação presente em amostra de cultura e ausente em amostra de fragmento de lesão

NA – não avaliado

A PCR-RFLP do *Cpb* realizada em amostras de DNA provenientes de promastigotas isoladas em cultura a partir de fragmentos de lesão de indivíduos com LTA apresentou um padrão de restrição diferente do esperado para *L. braziliensis* e muito semelhante ao controle utilizado de *L. guyanensis* (figura 18).

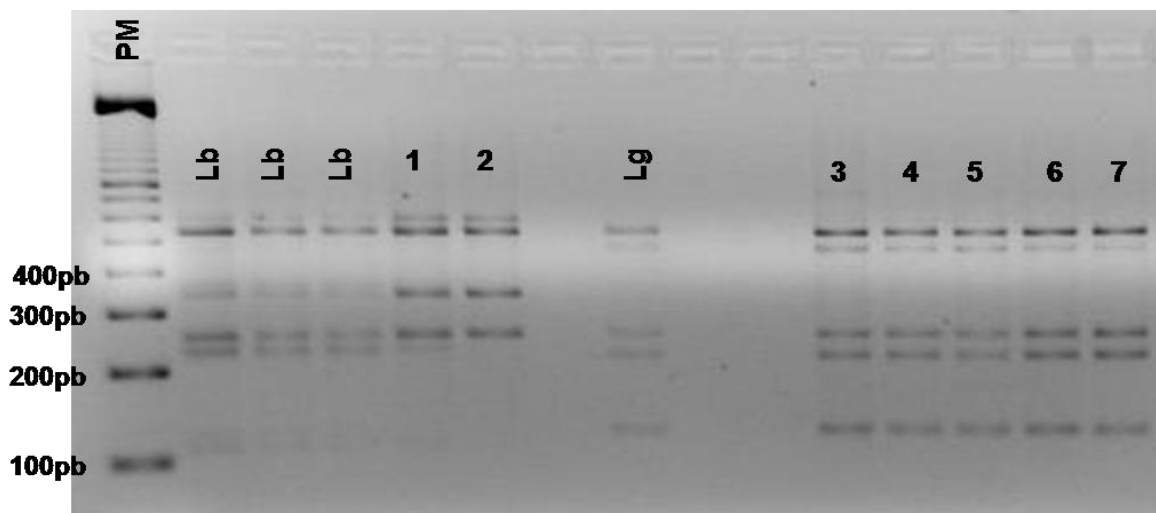


Figura 18: Resultado representativo do perfil da digestão com *TaqI* do gene *Cpb* amplificado a partir de DNA do parasito obtido das amostras isoladas em cultura. PM – 100pb, Lb – cepa padrão *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), Lg – cepa padrão *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147). 1 e 2 – amostras de *L. braziliensis* provenientes do banco de cepas do Laboratório de Leishmanioses; 3 a 7 – amostras de DNA provenientes de promastigotas isoladas de lesões dos pacientes residentes na Terra Indígena Xakriabá, MG.

Portanto, os resultados da PCR-RFLP do *hsp70*, PCR-RFLP do *Cpb* e do seqüenciamento apontam para a possibilidade de haver duas populações distintas de *L. braziliensis* circulando entre os pacientes com LTA na reserva Xakriabá.

6 DISCUSSÃO

Na Reserva Indígena Xakriabá, localizada na região do norte do estado Minas Gerais, desenvolvemos um estudo multifatorial que avaliou alguns aspectos clínicos e epidemiológicos da LTA, endêmica na região.

O surgimento de focos de LTA tem aumentado expressivamente no Brasil e no estado de Minas Gerais nos últimos anos. Um número crescente de casos vem acompanhando esta expansão geográfica, levando ao registro de números recordes de notificações no estado. Segundo dados do Ministério da Saúde na década de 80 ocorriam casos autóctones da doença em 19 estados brasileiros, sendo que a partir de 2003 foi verificado o registro de casos em todas as unidades federativas. A crescente adaptação dos vetores e de novos reservatórios ao ambiente peridomiciliar e a multiplicidade de fatores envolvidos na transmissão da doença tem dificultado a implementação de medidas profiláticas nos focos de LTA, o que tem contribuído para este quadro.

Na Reserva Indígena Xakriabá, têm sido registrados casos de leishmanioses cutâneas desde 2001. A partir de então, um aumento considerável na incidência da LTA vem ocorrendo, com notificação de casos da doença até o presente ano. As condições sociais da população Xakriabá tais como precárias condições sanitárias e de higiene, baixo nível de escolaridade e arrecadação financeira, pouco acesso a educação em saúde associadas às características ambientais certamente contribuem para manter o número alto de casos de LTA na área.

Este estudo descreve as características epidemiológicas deste foco de transmissão de LTA, quanto aos hospedeiros humanos e não humanos infectados, à presença de flebotomíneos vetores e às espécies de *Leishmania* que circulam na região.

6.1 A caracterização dos portadores de LTA

Embora a LTA esteja ocorrendo na Terra Xakriabá há pelo menos 10 anos nenhum estudo anterior havia sido feito na área e, portanto informações sobre as características da doença humana eram inexistentes. A partir das entrevistas individuais e das fichas clínicas foram montados bancos de dados que foram analisados através dos cruzamentos de inúmeras variáveis, aplicando-se análises uni e multivariada.

Na primeira etapa do estudo, foi conduzido um inquérito populacional nas aldeias Imbaúbas da Terra Xakriabá, onde a prevalência da doença foi estimada em 8,6%. Foi verificado também que a prevalência da infecção assintomática foi relativamente alta, em torno de 20%. O registro de indivíduos com intradermorreação positiva, porém ausência de feridas sugestivas de infecção presente ou de cicatrizes características de infecção passada, tem sido observado em outras áreas endêmicas de LTA (Souza et al., 1992; Nunes et al., 1995; Gontijo et al., 2005). A reação de Montenegro positiva em indivíduos residentes em áreas endêmicas sem história progressiva da doença e sem qualquer lesão suspeita aponta para a possibilidade de formas abortivas ou infecções assintomáticas. A presença permanente destes indivíduos em área de intensa transmissão, onde há o contato intermitente com flebotomíneos potencialmente infectados pode desencadear o surgimento dessas formas ou mesmo a detecção de indivíduos falso-positivos. Em relação à distribuição por sexo, verificou-se que 51,7% dos casos oriundos do inquérito eram do sexo masculino e 48,3% do sexo feminino, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Os 87 casos de LTA diagnosticados durante o período de estudo foram analisados quanto às variáveis demográficas, infecções passadas, presença de co-morbidades, características das lesões e aspectos relacionados ao tratamento, para avaliar a associação entre a doença e as características investigadas. Algumas características dos casos provenientes da busca ativa foram semelhantes aos achados do inquérito populacional, como a distribuição equitativa de casos clínicos entre os sexos e por faixa etária, sendo a média das idades similar à encontrada no primeiro estudo (22,2 anos).

Classicamente, a LTA caracterizava-se como uma doença relacionada às atividades laborais, como incursões nas florestas, o trabalho na lavoura e criação de animais com maior incidência de casos em adultos do sexo masculino e de forma epidêmica. Como este padrão não foi o observado em nosso estudo, a presença de casos igualmente distribuídos entre os dois sexos e faixas etárias pode significar que a transmissão na Terra Xakriabá esteja ocorrendo, principalmente, no ambiente peridomiciliar desvinculada de uma atividade

de trabalho específica. Além disso, as características ambientais do entorno das residências, como a presença de matas secundárias, favorecem a ocorrência da transmissão.

Quanto às características relacionadas às lesões, foi verificado que aproximadamente 60% dos portadores de LTA apresentavam somente uma lesão ativa enquanto 40,2% duas ou mais. É difícil concluir se a presença de mais de uma lesão se deve a disseminação metastática ou por mais de uma picada. Em áreas endêmicas, onde a pressão de transmissão é alta, provavelmente as múltiplas lesões se devem ao segundo fator, como sugerido por Gontijo e cols. (2002). A disseminação hematogênica e/ou linfática geralmente ocorre em trajeto linear determinando lesões do tipo esporotricóide ou linfangítico (Passos et al, 2001).

Quanto ao aspecto clínico das lesões, a maioria dos casos (70%) consistiu de indivíduos com lesões atípicas em vez da úlcera franca comumente relatada em pacientes com LTA causada pela *Leishmania braziliensis*. As feridas cutâneas atípicas observadas foram pápulas, placas, nódulos, vegetante, verrucosa e ulcero-crostosas. A classificação clínico-dermatológica das lesões leishmanióticas, embora bem definida pelo Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar (Brasil, 2010), está sujeita a interpretação pessoal do examinador, podendo ocorrer algum grau de subjetividade. Por isso, neste estudo além da transcrição das informações constantes na ficha clínica, cada lesão foi re-avaliada, através do registro fotográfico, por uma dupla de examinadoras, que incluía a infectologista responsável por acompanhar os pacientes. Assim, a classificação das feridas em úlcera típica e lesões atípicas seguiu uma padronização adotada para este trabalho, levando-se em consideração as características clínicas dos casos residentes neste foco de transmissão.

Outros trabalhos relatam a ocorrência de lesões atípicas de leishmaniose cutânea (Lescure et al., 2002; Convit et al., 2005; Baptista et al., 2009, Guimarães et al., 2009), porém, estas manifestações incomuns da LTA ocorrem em menor frequência nestas áreas, ao contrário dos achados em nosso estudo. A título de comparação, Guimarães e cols. (2009) observaram que apenas 2,5% dos pacientes estudados apresentaram lesões atípicas no município de Corte de Pedra, Bahia e Naiff e cols. (2009) observaram que 23,7% evoluíram com lesões atípicas no município de Rio Preto da Eva, no Amazonas. Outro resultado interessante foi o encontro de três pacientes portadores tanto de úlceras típicas quanto de lesões atípicas, sugerindo que a evolução clínica é bastante influenciada pelo genótipo do parasito e não só pelo status clínico do hospedeiro.

Para avaliar os fatores associados ao tipo de lesão, pacientes com úlcera típica e pacientes com feridas atípicas foram comparados quanto a todas as características

investigadas. Após o ajustamento utilizando a regressão logística multivariada verificou-se que a chance de ter lesão típica é cerca de cinco vezes maior entre os pacientes portadores de parasitos com perfil idêntico a *L. braziliensis*. Este resultado foi confirmado quando a análise multivariada foi feita utilizando como variável resposta o perfil do parasito obtido na PCR-RFLP do *hsp70*. Portanto, em nosso estudo uma forte associação foi verificada entre duas variantes de *L. braziliensis* e o tipo de manifestação clínica. Os parasitos que apresentaram um perfil idêntico às cepas referência de *L. braziliensis* estavam relacionados a lesões do tipo úlcera típica, enquanto os parasitos que apresentaram perfil variante parecem induzir lesões atípicas.

Existem poucos relatos sobre a associação entre variabilidade genética em *Leishmania* e diversidade de manifestações clínicas. A variabilidade na apresentação clínica da LTA com relação ao tipo, número, forma, tamanho e localização das lesões pode ser explicada por diferenças na virulência dos parasitos e pela variação individual relacionada à susceptibilidade do hospedeiro (Andrade-Narváez et al., 2001). Schrieffer e cols. (2009) estudaram a variabilidade genética de isolados de *L. braziliensis* provenientes de portadores das formas cutânea e disseminada para testar a hipótese de que os polimorfismos de *L. braziliensis* poderiam explicar estas diferentes manifestações. Eles observaram uma associação entre genótipos distintos de *L. braziliensis* e as diferentes formas clínicas da doença (cutânea e disseminada). O estudo realizado por Baptista e cols. (2009) identificou nove perfis genéticos a partir de 34 isolados provenientes de lesões de pacientes com lesões típicas e atípicas. Porém, ao contrário dos nossos resultados, não houve associação entre os diferentes genótipos e as características das lesões. Entretanto, dois diferentes genótipos foram identificados em lesões primárias e lesões reativadas de um mesmo paciente.

Considerando que a grande maioria das lesões observadas na Reserva Xakriabá é diferente da úlcera classicamente descrita para os casos de LTA, uma reflexão acerca da classificação de lesões em típica e atípica se faz necessária. Para a maior parte dos focos de LTA causados por *L. braziliensis* estudados no Brasil, a “úlcera de Bauru” é relatada como a manifestação clínica mais freqüente. Contudo, este não foi o caso dos pacientes deste estudo. A observação dos casos clínicos detectados na Reserva indica que, para este foco, as lesões mais comuns (ou mais freqüentes) são as diferentes da úlcera franca e, portanto, estas são as lesões “típicas” da região. O que os achados deste trabalho sugerem é que as particularidades de cada foco devem ser levadas em consideração, e nestes casos, se a equipe de saúde da área não estiver atenta para estas “variações clínicas”, muitos

casos de LTA poderão passar despercebidos e, portanto, sem o devido diagnóstico e tratamento.

O encontro de diferentes tipos de lesões causadas por variantes de *L. braziliensis* enfatiza a importância de aprofundar as investigações acerca desta associação. Variações inter e intra-específicas têm sido demonstradas para o gênero *Leishmania* e mais especificamente para o subgênero *Viannia* (Schriefer et al., 2004; Nolder et al., 2007; Pereira et al., 2009). No entanto, não se conhecem bem as consequências deste “novo” tipo de interação parasito variante-hospedeiro. Até que ponto estas diferenças encontradas no genótipo do parasito poderiam influenciar na sua virulência e patogenicidade e, portanto no prognóstico da doença e resposta ao tratamento? Seria necessária uma abordagem terapêutica diferenciada? Cepas variantes poderiam ser responsáveis por recidivas? Seriam estes parasitos mais resistentes à quimioterapia? Estas são questões que permanecem sem conclusões definitivas. Os resultados de nosso estudo apontam para a necessidade de maiores investigações acerca desta fascinante área da pesquisa em doenças parasitárias onde o conhecimento da estrutura da população do parasito e sua interação com os hospedeiros ajuda a compreender a doença no homem.

A análise feita para comparar os grupos de pacientes com confirmação parasitológica (n=72) e sem confirmação parasitológica (n=15) revelou que pacientes com doença de Chagas têm menor chance de serem diagnosticados, através dos métodos parasitológicos utilizados neste estudo, quando comparados aos pacientes não chagásicos. A Terra Xakriabá está localizada em uma região considerada endêmica para doença de Chagas e segundo a Secretaria Municipal de Saúde este é um problema antigo na comunidade Xakriabá. Com a implementação do programa de controle da doença de Chagas ocorreu a interrupção da transmissão e hoje são observados apenas casos crônicos. A presença de reações cruzadas entre *Leishmania* e *T. cruzi* em testes imunológicos mostra que a infecção por um destes parasitos poderia desencadear uma resposta imune, pelo menos em parte, protetora a presença do outro. Assim, um estímulo prévio do hospedeiro por antígenos de *T. cruzi* poderia estimular uma resposta imune mais efetiva destes indivíduos numa próxima infecção, neste caso, por *Leishmania*, levando a uma redução na carga parasitária nas lesões. Porém, não existem relatos na literatura acerca desta associação. Além disso, este resultado deve ser visto com ressalva, devido ao pequeno número de pacientes co-infectados (n=5) e também porque esta variável foi analisada a partir da resposta do indivíduo à pergunta se ele é portador de algum outro agravo. A realização de sorologia que comprove a condição de chagásico se faz necessária para que possamos tirar maiores

conclusões relacionadas à associação entre a não confirmação parasitológica e ser portador de doença de Chagas.

6.2 A questão da identificação da LTA e da *Leishmania*

Durante o desenvolvimento do nosso estudo 92 indivíduos foram identificados como casos suspeitos de LTA na Reserva Xakriabá e destes 87 foram classificados como casos clínicos porque apresentaram pelo menos um método diagnóstico positivo. Destes, 72 foram considerados casos confirmados por métodos parasitológicos e/ou PCR e 15 foram considerados casos, porém sem confirmação parasitológica. O estudo detectou um número alto de casos de LTA (94,6%) entre os suspeitos devido, principalmente, à associação de vários métodos de diagnóstico. Porém, tão importante quanto detectar os casos, é a confirmação da infecção através de um método direto. Neste trabalho, a cultura de amostras clínicas provenientes da lesão (fragmento de pele e aspirado) e o esfregaço em lâmina foram os métodos parasitológicos utilizados. Além destes, a PCR a partir de fragmento de lesão também foi considerada como meio de confirmação da presença do parasito. Segundo Prina et al. (2007) o DNA de *Leishmania* é rapidamente degradado após a morte das amastigotas. Neste estudo, os autores afirmam que um resultado positivo da PCR permite inferir a presença de parasitos viáveis, e que, portanto, realmente a infecção está presente.

Entre os 87 casos clínicos de LTA, 78 (90,7%) foram positivos no teste de Montenegro. Este número alto de pacientes com IDRMs positivos já foi relatado em outros trabalhos (Gontijo et al., 2002; Luz et al., 2009) indicando que este teste é bastante sensível. Contudo, a despeito da alta sensibilidade, a IDRMs apresenta a desvantagem de não distinguir entre uma infecção atual e infecção passada como também existem relatos de reação cruzada principalmente em indivíduos com doença de Chagas e curados de leishmaniose visceral (Shaw & Lainson, 1975). Para alguns autores estes fatos são agravantes, porém segundo as recomendações do Ministério da Saúde (Brasil, 2010), em área endêmica se o indivíduo apresentar clínica sugestiva associada a IDRMs ele pode ser notificado como caso. Esta foi a conduta adotada também por Ampuero e cols. (2009). Contudo a confirmação parasitológica deve ser realizada sempre que possível.

Este estudo não intenciona validar testes diagnósticos, mas chama a atenção para a importância da associação de vários métodos visando detectar um maior número de casos. Entre os métodos parasitológicos diretos, a leitura de lâminas contendo impressão de fragmento de lesão foi o que alcançou maior número de resultados positivos (52,9%) em comparação com a cultura de fragmento (40,3%) e de aspirado (32,2%). Levando-se em consideração que os métodos de diagnóstico direto são técnicas relativamente simples podendo ser realizadas em condições de campo, e que as ferramentas moleculares podem

ser executadas em laboratórios de referência, a associação de métodos poderia ser uma solução viável para melhorar o diagnóstico da LTA (Ampuero, 2009).

Um grande desafio para o estudo e validação de testes diagnósticos para leishmanioses é a falta de um padrão-ouro. A cultura de parasitos apresenta baixa sensibilidade e, quando usada como padrão-ouro, leva a uma baixa estimativa da especificidade devido a um grande número de falso-negativos. Nesse estudo, a PCR diagnosticou 10 (34,4%) casos que não haviam sido detectados por exames convencionais. Por outro lado, a PCR não é uma nova ferramenta que soluciona todas as limitações relacionadas ao diagnóstico, já que a associação entre os testes convencionais permitiu identificar 12 casos que não foram positivos na PCR. Entretanto, quando comparamos a PCR separadamente com cada um dos métodos convencionais foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às culturas de aspirado e fragmento de pele.

Estes resultados explicitam as dificuldades que podem ser encontradas no diagnóstico definitivo da LTA e apontam para a importância do conhecimento das manifestações clínicas predominantes em um determinado foco. A observação de aspectos clínico-epidemiológicos associada a utilização de métodos laboratoriais mais específicos eleva o índice de sucesso do diagnóstico da LTA. A busca por métodos mais sensíveis e principalmente mais específicos tem sido alvo de pesquisa de vários grupos na tentativa de melhorar o diagnóstico. Neste contexto a PCR tem um lugar de destaque, pois é um método que tem se mostrado bastante sensível, específico, que pode ser utilizado com diferentes amostras clínicas além de identificar a espécie de *Leishmania* presente no hospedeiro.

A capacidade da PCR em detectar DNA do parasito em amostras do hospedeiro é dependente de vários fatores, entre eles o número de cópias do gene alvo, a presença de polimorfismos nas seqüências complementares aos iniciadores e também a natureza da amostra clínica. Embora no contexto do diagnóstico, a grande preocupação seja a detecção do parasito, existe uma demanda crescente para realização do diagnóstico específico que permita identificar as espécies infectantes, já que o prognóstico da doença e a abordagem terapêutica podem ser espécie-dependente (Croft et al., 2002; Arévalo et al., 2007). Isto, geralmente, é mais relevante em estudos clínicos conduzidos em áreas onde circulam diferentes espécies de *Leishmania*, para os quais a identificação da espécie é crucial (Montalvo et al, 2010).

Ainda hoje, o padrão-ouro para a identificação de espécies de *Leishmania* é a eletroforese de *multilocus* isoenzimas (MLEE) (Cupolillo et al., 1994; Bañuls et al., 2007). Entretanto, as limitações da técnica, principalmente a necessidade de obtenção de grande quantidade de parasitos e de equipamentos apropriados, inviabilizam a sua aplicação em

larga escala. Como alternativa, a PCR possibilita a investigação a partir de pequenas quantidades de cultura e até mesmo de amostras clínicas. Várias ferramentas moleculares de identificação de espécies utilizam tanto a PCR que amplifica fragmentos de DNA de uma espécie ou grupo específico, quanto combinam etapas de análises pós-PCR baseadas nos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLPs). Nesta última abordagem, o padrão de bandas resultante da digestão do produto de PCR com enzimas de restrição indica qual espécie de *Leishmania* está presente na amostra (Marfurt et al., 2003; Volpini et al., 2004; Rotureau et al., 2006; Gadisa et al., 2007; Reithinger and Dujardin, 2007).

Neste trabalho, a metodologia inicialmente utilizada para a identificação da espécie de *Leishmania* responsável pelos casos de LTA nos pacientes da Reserva Xakriabá foi a PCR-RFLP do *hsp70*. No Novo Mundo, o gene codificador da proteína de choque térmico de 70KDa (*hsp70*) foi previamente utilizado como alvo para PCR-RFLP empregando a enzima de restrição *HaeIII* (Garcia et al., 2004). Este ensaio permitiu a discriminação entre *L. lainsoni*, *L. amazonensis*, *L. infantum*, e os complexos *L. braziliensis/L. peruviana* e *L. guyanensis/L. panamensis*. Além disso, esta metodologia mostrou ser aplicável em amostras clínicas provenientes de pacientes da Bolívia e Colômbia (Garcia et al., 2007; Montalvo Alvarez et al., 2010). Outro trabalho testou esta metodologia para identificação de espécies do Velho Mundo e melhorou a resolução dentro de algumas do Novo Mundo. Dessa forma, Montalvo et al. (2010) defendem a utilização da PCR-RFLP do *hsp70* como uma ferramenta universal de identificação, aplicável para todas as espécies do gênero *Leishmania*.

As promastigotas isoladas em culturas a partir de amostras de fragmentos e aspirados de lesões dos casos de LTA identificados entre a população Xakriabá foram utilizadas como fonte de DNA para a identificação específica através da PCR-RFLP do *hsp70*. Porém, o perfil de restrição produzido foi diferente de todas as cepas referência de *Leishmania* utilizadas como controles positivos, com exceção de uma amostra que apresentou o perfil idêntico ao de *L. braziliensis*. Ao utilizarmos o DNA extraído diretamente dos fragmentos de lesão para a realização da PCR-RFLP foram observadas 9 amostras com perfil idêntico ao de *L. braziliensis* e 44 com o mesmo perfil atípico encontrado anteriormente. Um estudo desenvolvido por da Silva e cols. (2010) que também utilizou a PCR-RFLP do *hsp70* para caracterizar vários isolados que representam a maioria das espécies do subgênero *L. (Viannia)* que circulam no Brasil, relatou que apesar dos baixos níveis de polimorfismo, é possível agrupar os isolados de acordo com a posição taxonômica inferida por MLEE. Porém, uma cepa de *L. guyanensis* produziu um padrão na RFLP diferente daquele descrito no trabalho de padronização da técnica (Garcia et al., 2004). Os

autores atribuíram esta diferença ao fato de que as cepas analisadas em cada estudo eram provenientes de diferentes regiões geográficas. Apesar de se referir a uma espécie diferente, o resultado de da Silva et al. (2010) se assemelha aos nossos achados, os quais indicam que a espécie isolada de pacientes da Terra Xakriabá realmente se trata de *L. braziliensis*, porém com algumas variações na sequência do gene do *hsp70*. Essa conclusão partiu da comparação dos dois perfis de restrição encontrados nos parasitos deste estudo: duas bandas visualizadas nos géis de agarose são encontradas em todas as amostras (224pb e 307pb); já as amostras que apresentaram um perfil atípico, perdem as bandas de 287pb e 338pb, e revelam um fragmento maior de aproximadamente 625pb. Foi realizada um análise *in silico* para mapeamento dos sítios para *HaeIII* na sequência amplificada da cepa referência de *L. braziliensis*. Foram identificados 11 sítios na seqüência, gerando 7 fragmentos com menos de 60pb (difíceis de visualizar no gel de agarose) e 4 fragmentos maiores (224, 286, 307 e 338pb). Estes fragmentos seriam característicos do perfil típico de digestão de Lb. Nosso perfil atípico apresentava dois fragmentos semelhantes 307 e 224 pb e um terceiro de 625 pb, que seria resultado da ausência de um sítio de restrição na posição 458 da seqüência que quebraria este fragmento maior nos dois esperados (338 e 287pb).

Para confirmar esta hipótese o próximo passo então foi seqüenciar o fragmento do *hsp70* das amostras de *L. braziliensis* para concluir a identificação da espécie. A análise do sequenciamento mostrou que as seqüências de DNA isolado de amostras clínicas dos casos de LTA deste estudo alinharam com as seqüências de cepas referência de *L. braziliensis*, com exceção de algumas posições que apresentaram polimorfismos de base única (SNPs). Foi possível confirmar a presença de uma mutação em um sítio de restrição da enzima *HaeIII*, que corresponde a seqüência CCGG. Assim, esta mutação correspondente à substituição de uma base G por A, alteraria o sítio que deixaria de ser reconhecido pela enzima de restrição, passando a produzir um perfil de restrição com uma banda adicional.

A partir do resultado inesperado na PCR-RFLP com as amostras de pacientes Xakriabás e para auxiliar na identificação do agente etiológico da LTA na área foi a MLEE. Assim, alguns isolados provenientes de culturas de amostras clínicas foram enviados para o Serviço de isolamento, cultivo e tipagem de *Leishmania* da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC). Os resultados obtidos mostram que todos os isolados analisados pertencem a espécie *L. braziliensis*.

6.3 A presença de outros hospedeiros de *Leishmania*

Um fator que limita o entendimento da epidemiologia da LTA é o conhecimento escasso em relação aos reservatórios em diferentes regiões endêmicas. A diversidade de espécies de *Leishmania* e de flebotomíneos vetores leva a uma grande variedade de hospedeiros vertebrados infectados, originando diferentes padrões epidemiológicos no Brasil. Os reservatórios naturais não são bem conhecidos, devido às dificuldades relacionadas à captura de um número suficiente de animais silvestres e sinantrópicos e às limitações de algumas técnicas utilizadas no isolamento e detecção dos parasitos.

Este trabalho investigou a participação de pequenos roedores, marsupiais e cães domésticos no ciclo de transmissão da LTA em uma área endêmica que apresenta números elevados de casos clínicos e assintomáticos. Diferentes métodos de detecção e identificação de *Leishmania* ou de fragmentos de DNA do parasito foram realizados e nossos achados apontam para a existência de mais de uma espécie de *Leishmania* parasitando diferentes mamíferos.

Os resultados sugerem que *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. guyanensis* estão circulando entre diferentes mamíferos silvestres, sinantrópicos e domésticos presentes na Reserva Xakriabá. Dentre estas espécies, *L. braziliensis* e *L. infantum* já foram registradas na região sudeste do país, porém a *L. guyanensis* tem sido reportada apenas nas regiões norte e nordeste. *Lutzomyia umbratilis* é a espécie até agora incriminada como responsável pela transmissão deste parasito ao homem. Contudo, na área onde encontramos os mamíferos infectados por *L. guyanensis* foram coletadas fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lu. whitmani*. De fato, a partir do isolamento *L. guyanensis* de *Lu. whitmani* na Amazônia, foi sugerido que esse flebotomíneo seria o responsável pela manutenção da enzootia entre animais silvestres (Arias & Freitas 1978; Lainson et al. 1979, 1981).

Além disso, a recente dispersão de espécies como *L. naiffi* (Pratlong et al., 2002; Kato et al., 2008), *L. lainsoni* (Tojal da Silva et al., 2006; Arevalo et al., 2007; van der Meide et al., 2008) e *L. shawi* (Felinto de Brito et al., 2009) indica uma mudança nos cenários das leishmanioses nas Américas. Estes achados sustentam a hipótese de que outras espécies poderiam se dispersar para regiões geográficas onde não eram encontradas.

A espécie de mamífero de pequeno porte mais amostrada foi *Trychomys apereoides*, um roedor conhecido popularmente na região como rato rabudo. Estes animais vivem em ambientes rochosos onde constroem ninhos permanentes ou em plantações. Sua distribuição abrange toda a região norte de Minas Gerais como também as regiões nordeste e oeste do Estado (Ministério da Saúde, 2002). *T. apereoides* também foi o pequeno

mamífero que apresentou o maior número de indivíduos infectados por *Leishmania*, sendo que dez estavam infectados por *L. braziliensis*, dois por *L. guyanensis* e um por *L. infantum* (tabela 1). Além dos nossos achados, Oliveira et al. (2005) apontaram o encontro deste roedor infectado por *Leishmania* do complexo *mexicana* em outra localidade do estado de Minas Gerais.

A segunda espécie mais capturada foi *Didelphis albiventris*, que também foi o segundo animal mais infectado por *L. braziliensis* na área. Este marsupial tem assumido grande importância nos focos de transmissão de LTA no Brasil por já ter sido encontrado infectado por *L. braziliensis* (Alexander et al., 1998; Brandão-Filho et al., 2003; Shallig et al., 2007) e por *L. guyanensis* (Arias et al., 1981).

Em dois indivíduos positivos de *Rhipidomys mastacalis*, o segundo roedor mais amostrado, foi identificada a *L. infantum*. Estes animais são arborícolas, de hábitos noturnos, solitários e formam ninhos nas árvores e sob pedras, povoando todas as altitudes das florestas, invadem não só as plantações, como também residências rurais em busca de alimentos. O gênero *Rhipidomys* tem sua distribuição ao longo de toda a região norte e nordeste do Brasil e quase todo território de Minas Gerais, com exceção do sul e triângulo (Ministério da Saúde, 2002).

A maioria dos espécimes (93%) foi capturada nas armadilhas dispostas nas trilhas entre as casas e somente sete animais foram capturados no peridomicílio de algumas residências. Porém, estas trilhas estavam localizadas no entorno das residências indígenas em áreas frequentadas pelos moradores. O mamífero mais amostrado no peridomicílio foi *D. albiventris*, marsupial que assume importância devido ao hábito de aproximar das habitações humanas, para a predação de aves domésticas, especialmente galinhas. Apresenta hábitos crepusculares e noturnos, buscando abrigo em ocos de árvores, entre suas raízes ou debaixo de troncos caídos (Reis et al. 2006). Quatro exemplares desta espécie estavam infectados por *L. braziliensis*, sendo que um foi capturado no peridomicílio.

Dentre as espécies capturadas nas casas, encontra-se um exemplar de *Rattus rattus*, o rato de telhado, que estava infectado por *L. infantum*. Este roedor, comumente encontrado nas propriedades rurais e pequenas e médias cidades do interior de grande parte do Brasil, já foi encontrado infectado por *L. braziliensis* em relatos anteriores (Alexander et al., 1998; Oliveira et al., 2005). Seu hábito intradomiciliar permite um contato mais estreito com o homem e isso tem sido um importante fator que associa a sua presença com o estabelecimento de diversos agravos à saúde, porém, seu possível papel como reservatório de *Leishmania* ainda é pouco estudado.

No período de 2001 a 2008 foram registrados 224 casos de LTA e apenas dois de LV na Terra Indígena Xakriabá. Estes dados contrastam com a elevada soroprevalência canina observada em associação ao encontro de *Leishmania infantum* infectando estes animais. Este fato tem grande relevância pois levanta a possibilidade de ocorrência de novos casos humanos de LV na Terra Indígena.

A presença de *L. braziliensis* nos cães ficou restrita a dois animais que também apresentaram infecção por *L. infantum* configurando um interessante achado de infecção mista. Promastigotas foram isoladas de amostras de medula óssea dos dois cães e identificadas por MLEE como *L. infantum*. Um destes animais apresentava lesão no focinho causada por *L. braziliensis*, e o outro apresentou DNA de *L. braziliensis* na pele íntegra de orelha.

Apesar da LTA ter sido originalmente associada a ambientes de florestas, o desflorestamento e a urbanização têm levado a adaptação do ciclo de transmissão aos ambientes peridomiciliares (Reithinger and Davies, 1999). Em áreas de LTA, tem se tornado comum encontrar cães infectados (Santos et al., 2005), sugerindo que eles possam atuar como reservatórios de *Leishmania*. Evidências circunstanciais sugerindo que os cães sejam reservatórios de espécies de *Leishmania* causadoras de LTA foram baseadas no fato de que as cepas isoladas de humanos e de cães são idênticas (Reithinger and Davies, 1999). No Brasil, infecções naturais de cães domésticos por *L. braziliensis* têm sido documentadas em focos de LTA localizados em áreas rurais (Gontijo et al., 2002) e peri-urbanas (Falqueto et al., 1986; Massunari et al., 2009). Considerando que uma das medidas de controle da LV no Brasil é a eutanásia de cães soropositivos, a confirmação da espécie infectante e o papel do cão como fonte de infecção para flebotomíneos vetores tornam-se aspectos importantes. A utilização de técnicas mais específicas e capazes de distinguir LV e LT são necessárias para evitar a eliminação desnecessária de cães (Falqueto et al., 1986; Reithinger et al., 2003; Ryan et al., 2003).

Em áreas endêmicas onde mais de uma espécie de *Leishmania* está presente, a caracterização dos parasitos é muito importante para o conhecimento da história natural das doenças. A metodologia empregada neste trabalho para detecção e identificação de *Leishmania* em hospedeiros silvestres, sinantrópicos e domésticos associou diferentes técnicas com o objetivo de aumentar a chance de encontrar animais infectados. Um dos métodos utilizados, a PCR-RFLP do *hsp70* foi empregada pela primeira vez em amostras provenientes de mamíferos silvestres e mostrou ser bastante eficiente na detecção de DNA de *Leishmania*, além de possibilitar a identificação das principais espécies deste parasito que ocorrem no Brasil.

A Reserva Xakriabá é uma área de intensa transmissão da LTA onde um grande número de casos humanos tem sido registrado nos últimos anos. A presença de um número significativo de roedores e marsupiais infectados por *L. braziliensis* corrobora com essa alta taxa de transmissão e sugere que estes animais sejam importantes na manutenção do parasito nesta área. Além disso, estes mamíferos parecem também ter um papel na manutenção de outras espécies de *Leishmania* encontradas na área. Este estudo destaca a diversidade epidemiológica da LTA na reserva indígena e aponta para a gravidade da situação. O encontro de hospedeiros silvestres, sinantrópicos e domésticos infectados por *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. guyanensis*, indica a coexistência de ciclos estabelecidos destas três espécies na região. Além disso, o convívio estreito da população Xakriabá com os hospedeiros mamíferos infectados por *L. infantum* enfatiza a possibilidade de ocorrência de casos humanos de LV, visto que já foi verificada a presença da espécie vetora *Lu. longipalpis*.

A análise integrada dos resultados obtidos neste estudo e de outros, ainda em andamento na Reserva Xakriabá, poderá auxiliar na escolha de medidas de prevenção e controle da transmissão das leishmanioses na área.

6.4 O polimorfismo genético nos isolados de *L. braziliensis*

A variabilidade genética isolados de campo de *L. braziliensis* apresentada neste trabalho foi observada através do perfil de restrição do gene *hsp70* de *L. braziliensis* (mutação eliminando um sítio de reconhecimento da enzima e alterando o perfil), por sequenciamento neste gene e também no gene *Cpb*. Assim, os resultados obtidos apontam para a possibilidade de haver duas populações geneticamente distintas deste parasito circulando entre os hospedeiros vertebrados infectados na reserva Xakriabá.

De fato, Tibayrenc (1998) acredita que exista uma grande diversidade genética em muitas espécies de parasitos, sendo esta a principal estratégia evolutiva de adaptação dos parasitos às variações ambientais e que, provavelmente, esta variabilidade genética tenha um profundo impacto nas características biológicas destes parasitos (Gontijo, 2000).

Parasitos do gênero *Leishmania* se multiplicam, predominantemente, por reprodução clonal, embora existam evidências crescentes de que ocorra troca gênica e recombinação (Maurício et al., 2006; Kuhls et al., 2008; Akopyants et al., 2009; Chargui et al., 2009). O fluxo genético entre microrganismos provavelmente contribui para a diversidade fenotípica em populações naturais, contudo, os mecanismos de recombinação genética em protozoários não são bem conhecidos. Um estudo de Akopyants e cols. (2009) demonstrou que *Leishmania* pode realizar troca genética durante o crescimento e desenvolvimento no tubo digestivo do vetor flebotomíneo e, então, transmitir progênies híbridas no estágio infeccioso para mamíferos hospedeiros. A análise destes descendentes híbridos poderia ser útil para a clonagem posicional de genes que controlam características como virulência, tropismo tecidual e resistência às drogas. Infecções mistas por *Leishmania* podem ocorrer em vetores e hospedeiros naturais e, em mamíferos reservatórios, podem se prolongar por décadas, fornecendo amplas oportunidades de interações entre genótipos distintos. A presença de híbridos entre espécies ou cepas, tem grandes implicações epidemiológicas relacionadas à dispersão destes variantes ou até mesmo o surgimento de resistência a drogas.

Poucos trabalhos sobre variabilidade genética intra-específica em *L. braziliensis* foram publicados (Nolder et al., 2007; Rougeron et al., 2008; Rougeron et al, 2009; Oddone et al., 2009). Em um deles, Nolder e cols. (2007) caracterizaram isolados de *L. (Viannia)* de um foco endêmico para leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM), onde foi encontrada relativa diversidade genotípica e fenotípica, com 12 zimodemas e 20 genótipos de microssatélites. Além disso, 26 dos 59 isolados foram híbridos fenotípicos *L. braziliensis/L. peruviana* que mostraram 7 genótipos diferentes de microssatélites. Em

alguns pacientes com LM, os híbridos foram os únicos organismos isolados, portanto podem ser incluídos como agentes causadores potenciais da LM. Outro estudo avaliou 30 cepas de *L. braziliensis*, 21 de *L. guyanensis* e 2 de *L. peruviana*. Todas as cepas, exceto duas de *L. guyanensis* apresentaram genótipos individuais de microssatélites. Uma análise baseada na distância genética identificou três principais grupos. Todas as cepas de *L. guyanensis*, exceto uma, foram agrupadas. Dois grupos consistiram de populações de *L. braziliensis* de acordo com a origem geográfica. As duas cepas de *L. peruviana* agruparam com as *L. braziliensis* originárias do Peru e do estado brasileiro adjacente, Acre.

Estes relatos, assim como o nosso, chamam a atenção para a utilização de técnicas que, além de identificar o parasito, sejam capazes de diferenciar populações geneticamente distintas da mesma espécie. Esta identificação torna-se especialmente importante se considerarmos a evidente mudança nos cenários das leishmanioses nas Américas, que tem como um dos fatores o aumento das interações entre pessoas por força das constantes migrações.

Com relação às duas populações de *L. braziliensis* identificadas neste estudo, há evidência de que uma delas (perfil ≠Lb) foi predominantemente encontrada nos hospedeiros humanos, enquanto que nos pequenos mamíferos e nos cães a população Lb foi mais freqüente. Aqui surgem perguntas acerca da dinâmica de transmissão entre os diferentes hospedeiros vertebrados na Terra Xakriabá. Qual a fonte dos parasitos com perfil ≠Lb para a infecção humana? Seria o homem uma fonte de infecção para o vetor e a transmissão estaria ocorrendo diretamente homem – vetor – homem? De fato alguns autores chamam a atenção para a possível mudança no perfil de transmissão da LTA em focos nas Américas que assumiria um caráter antroponótico (Hubalek, 2003; Rotureau, 2006). Entretanto, nossos resultados são insuficientes para uma afirmação desta natureza. Devemos considerar também que foram identificadas 17 amostras de *L. braziliensis* provenientes de quatro espécies diferentes de mamíferos (uma de roedor, duas de marsupial e cão) enquanto mais de 50 amostras foram analisadas dos hospedeiros humanos. Portanto, a chance de se observar polimorfismos entre os isolados de humanos foi bem maior.

Uma constatação importante foi o grande número de isolados contendo o genótipo ≠Lb, a partir de amostras clínicas inoculadas em cultura. Schonian et al., 2010 relataram que mudanças no perfil da RFLP foram observadas durante passagens *in vivo* e *in vitro* dos parasitos de *Leishmania*. De forma semelhante, a mutação no sítio de reconhecimento da enzima de restrição *HaeIII* das amostras deste estudo poderia ter surgido durante a utilização de meios axênicos para crescer o parasito. Isto fica bastante evidente nos três pacientes que apresentavam os dois perfis, sendo na cultura diferente de *L. braziliensis* e no

fragmento idêntico. No entanto, quando verificamos que existe também um número considerável de parasitos com o genótipo ≠Lb observados nas amostras de fragmentos de lesão esta possibilidade foi descartada. Assim, a diversidade encontrada em isolados de *L. braziliensis* provenientes da Reserva Xakriabá, parece estar realmente mais associada às interações com os hospedeiros. Trabalhos empregando outras metodologias e também outros alvos, tais como microssatélites, que não estão sujeitos às pressões da seleção natural do hospedeiro, para melhor caracterizar a variabilidade genética em *L. braziliensis* isolados de hospedeiros humanos devem ser realizados.

7 CONCLUSÕES

A prevalência da doença nas aldeias Imbaúbas foi estimada em 8,6%, através do Inquério Populacional realizado. Foi verificado também que a prevalência da infecção assintomática foi relativamente alta, em torno de 20%.

A partir de 92 casos suspeitos foram detectados 87 casos de LTA em toda a Reserva. Destes, 72 foram confirmados por algum exame parasitológico e/ou PCR.

A maioria dos pacientes (70,0%) eram portadores de lesões atípicas, somente 27,6% apresentaram úlceras típicas e 2 pacientes eram portadores tanto de úlcera típica quanto de lesões atípicas. As feridas cutâneas atípicas observadas foram pápulas, placas, nódulos, vegetante, verrucosa e ulcero-crostosas.

Foram identificadas três espécies de *Leishmania* circulando entre os roedores, marsupiais e cães domésticos presentes na Reserva Xakriabá: *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. guyanensis*.

Um total de 1327 espécimes de flebotomíneos foi obtido. As espécies mais capturadas foram *Lutzomyia longipalpis* (756 exemplares – 57%) e *Lu. intermedia* (297 exemplares – 22%). Cabe ressaltar que foi coletado um número considerável de fêmeas de *Lu. intermedia* (244), principal vetor de LTA causada por *L. braziliensis* em Minas Gerais. Foi verificada a presença, em número bastante reduzido (3 exemplares), de *Lu. whitmani*, espécie considerada vetora em importantes focos de LTA no Brasil.

O estudo do polimorfismo genético de *L. braziliensis* mostrou que existem duas populações deste parasito circulando entre os hospedeiros vertebrados. Foi observada uma associação entre o genótipo destas duas populações e a manifestação clínica nos casos de LTA.

Uma forte associação foi verificada entre as duas populações de *L. braziliensis* e o tipo de manifestação clínica. Os parasitos que apresentaram um perfil idêntico às cepas referência de *L. braziliensis* estavam relacionados a lesões do tipo úlcera típica, enquanto os parasitos que apresentaram perfil variante parecem induzir lesões atípicas. A chance de ter lesão típica é cerca de cinco vezes maior entre os pacientes portadores de parasitos com perfil idêntico a *L. braziliensis*.

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1: MS/CNS/CONEP PARECER N.º 355/2008



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 355/2008

Registro CONEP: 14689 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE - 0021.0.245.000-07

Processo nº 25000.037372/2008-88

Projeto de Pesquisa: "Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana na reserva indígena Xacriabá, Minas Gerais, Brasil"

Pesquisador Responsável: Célia Maria Ferreira Gontijo

Instituição: Centro de Pesquisa René Rachou - MG / Fundação Oswaldo Cruz

CEP de origem: Centro de pesquisa René Rachou / Fundação Oswaldo Cruz / CPqRR / FIOCRUZ

Área Temática Especial: Populações Indígenas

Patrocinador: não consta

Sumário geral do protocolo

O estilo de vida dos povos indígenas e as condições sociais a que estão submetidos favorecem a transmissão de parasitoses, entre elas, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Desde 2001 têm sido registrados casos autóctones de LTA e somente em 2006 foram diagnosticados 48 casos entre os habitantes da reserva. Não se conhece a extensão do problema, pois não existem estudos anteriores sobre a LTA na área e as únicas medidas de controle adotadas são o diagnóstico dos casos suspeitos e tratamento dos doentes.

O projeto propõe estudar diferentes aspectos da leishmaniose tegumentar relacionados à doença humana, aos vetores flebotomíneos e aos possíveis reservatórios na reserva indígena Xacriabá. Paralelamente ao estudo da infecção humana, será realizada captura de animais silvestres, coleta de amostras biológicas de animais domésticos e coleta de flebotomíneos, para a detecção e identificação das espécies de *Leishmania* sp.

O objetivo geral do projeto é estudar aspectos da leishmaniose tegumentar relacionados à doença humana, aos flebotomíneos e aos possíveis reservatórios, na reserva indígena Xacriabá, Minas Gerais.

Os objetivos específicos são: 1- Identificar os casos clínicos e subclínicos de LTA em uma amostra populacional da reserva Xacriabá, utilizando avaliação clínica, técnicas sorológicas e moleculares; 2- Estimar a prevalência e a incidência da doença, da forma subclínica, de recidivas e reinfecção na população; 3- Identificar fatores de risco para a doença clínica e subclínica; 4- Identificar biomarcadores celulares e moleculares da resposta imune de casos clínicos e da forma subclínica de LTA, visando caracterizar possíveis indicadores de resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania*; 5- Determinar as espécies de flebotomíneos e a(s) possível(is) espécie(s) vetor(a)s na área de estudo; 6- Estabelecer a flutuação sazonal das espécies de flebotomíneos e correlacioná-la com variáveis bioclimáticas; 7- Estudar o comportamento das espécies de flebotomíneos com relação à endofilia, exofilia e preferência alimentar; 8- Verificar a infecção natural por *Leishmania* spp. dos animais domésticos, silvestres e dos flebotomíneos capturados; 9- Identificar a(s) espécie(s) de *Leishmania* que ocorrem nos casos humanos, nos animais domésticos, silvestres e flebotomíneos infectados, utilizando métodos moleculares; 10- Correlacionar a distribuição espacial dos casos humanos com a presença de espécies de flebotomíneos vetoras e animais infectados; 11- Estudar a variabilidade genética de *L. braziliensis* de isolados provenientes dos diferentes hospedeiros; 12- Pesquisar a ocorrência de estruturação genética populacional nas diferentes espécies de Didelphidae capturadas na reserva a partir da análise de marcadores microsatélites e comparar os dados obtidos em subpopulações silvestres e urbanas.

A metodologia informa que será realizado um estudo seccional de base populacional, utilizando-se um inquérito em uma amostra representativa da população, consistindo de entrevistas familiares, exame clínico e diagnóstico laboratorial. Durante o período de coletas será realizado um estudo caso-controle e o seguimento de uma amostra de casos (clínicos e subclínicos) e de não infectados, para avaliação de fatores de risco para infecção e doença.

Assinatura

Cont. Parecer CÔNEP 355/2008

Os procedimentos a serem realizados são: 1. entrevistas familiares; 2. exame clínico; 3. diagnóstico laboratorial (reação intradérmica de Montenegro, ensaio imunoenzimático, métodos parasitológicos e moleculares); 4. estudo caso-controle e o seguimento de uma amostra de casos (clínicos e subclínicos) e de não infectados, para avaliação de fatores de risco para infecção e doença.

Os critérios de inclusão da 1ª Etapa são: (1) seleção dos domicílios: registro do número de domicílios de cada aldeia, cálculo do número de domicílios a serem trabalhados em cada aldeia, sendo que a representação de cada aldeia será proporcional ao número de domicílios existentes e seleção por amostragem sistemática dos domicílios participantes do estudo utilizando-se os croquis das aldeias; (2) seleção dos participantes do estudo: todas as pessoas com idade entre cinco e oitenta anos, nos domicílios selecionados serão elegíveis para o estudo. Serão excluídas do estudo mulheres gestantes e nutrizas; (3) todos os participantes da entrevista serão convocados para realização da IDR, sorologia e exame clínico. Os domicílios selecionados serão assinalados no mapa da reserva indígena disponível na FUNASA. Em caso de domicílio fechado, esse será substituído pelo vizinho mais próximo, à direita, esquerda ou em frente, nessa ordem. Caso o morador selecionado para o estudo esteja ausente do domicílio no momento da visita, será agendada nova visita a casa. Caso o morador selecionado não concorde ou não possa participar, a casa será substituída, utilizando os mesmos critérios descritos para o domicílio fechado.

Na 2ª Etapa os casos clínicos e subclínicos confirmados e uma amostra de participantes negativos identificados durante o inquérito serão selecionados para avaliação de fatores de risco relacionados à doença e infecção. Também serão incluídos no estudo caso-controle os casos procedentes de outras aldeias ou pólos, identificados pelo sistema de saúde local durante o período de coleta na área que será de 12 meses.

Local de realização

Trata-se de um estudo em populações indígenas e será conduzido em duas aldeias do Pólo Brejo Alta Fome (Embaúba I e Embaúba II) por concentrarem o maior número de casos humanos recentes e altas prevalências de cães soropositivos (MS/FUNASA, 2007).

O município de São João das Missões possui uma população de 12.489 habitantes. A reserva Xaçubá ocupa uma área de 530,74Km², que corresponde a 78,97% da superfície total do município. É constituída por 52 aldeias formando 5 pólos base com população total estimada de 6.500 habitantes (IBGE, 2006, FUNASA, 2006).

A reserva indígena foi selecionada para o estudo devido ao grande número de casos de LTA registrados nos últimos anos. No período de 2001 a 2006 foram registrados 161 casos.

A amostra para o estudo será de 220 sujeitos.

Apresentação do protocolo

A Folha de Rosto está preenchida e o protocolo devidamente instruído. O currículo da pesquisadora está anexado ao projeto. A planilha de orçamento financeiro está explicitada. O cronograma de atividades está descrito indicado para o período de 2 anos. O plano de divulgação dos resultados está descrito no projeto.

Comentários

É um projeto de grande relevância, pois os resultados poderão trazer contribuições importantes, já que as manifestações clínicas e a sensibilidade do parasito às drogas podem variar dependendo da espécie de *Leishmania* como também das condições imunológicas do hospedeiro. Nesse contexto, diversos estudos têm chamado a atenção para a importância dos padrões de resposta imune celular e humoral no estabelecimento das diferentes manifestações clínicas da LTA. O estudo de tais padrões permitirá não apenas identificar possíveis mecanismos associados ao estabelecimento de casos ativos e de formas subclínicas da LTA, mas também eleger biomarcadores visando caracterizar possíveis indicadores de resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania*. Por ser uma parasitose que apresenta grande diversidade clínico-epidemiológica e constantes mudanças nos padrões epidemiológicos de transmissão, a LTA é considerada uma doença de difícil controle. As estratégias para o seu controle devem ser específicas, conforme a situação epidemiológica de cada local e região. A detecção de casos suspeitos, a confirmação do diagnóstico e tratamento precoce, a identificação do agente etiológico circulante na área, o conhecimento das áreas de transmissão e dos hábitos e atitudes que

Cont. Parecer CONEP 389/2008

favorecem a transmissão, bem como a caracterização da resposta imune dos hospedeiros humanos são fatores importantes para definição de medidas profiláticas específicas para cada local e redução da incidência da doença.

O plano amostral, os procedimentos de coleta de dados estão definidos e a análise estatística indicada e considerada compatível com o delineamento do estudo.

Os participantes incluídos no estudo receberão benefícios imediatos e a comunidade e médico a longo prazo.

O estudo inclui crianças ou menores de 18 anos, mas nesses casos os responsáveis responderão à entrevista e fornecerão o consentimento para sua inclusão.

Cientificamente, o projeto está muito bem instruído. A equipe técnica é composta por 12 pesquisadores do Instituto René Rachou, 9 pesquisadores da UFMG (Faculdade de Medicina e de Biologia) e mais 2 integrantes da FUNASA.

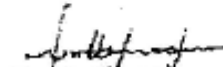
Recomendações

1. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE utiliza vários termos técnicos para uma população indígena. Por exemplo: "exames clínicos, sorológicos e moleculares", "teste de Montenegro para diagnosticar leishmaniose tegumentar", biópsia de um pequeno fragmento de leishmania", entre outros. Solicita-se que o TCLE seja revisado e que os membros da equipe que pertencem à FUNASA colaborem com os pesquisadores no sentido de adequar o TCLE.
2. Que seja obtida anuência das lideranças indígenas, que deverá ser obtida antes da abordagem dos participantes, conforme item III.2.4 da Resolução CNS 304/00.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento das questões acima e encaminhar à CONEP as recomendações cumpridas antes do início do estudo.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

Brasília, 19 de junho de 2008.


Gyselle Sáadi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS





Em 23/06/2008 -

A' Dr. Celso Zanchi

Para ciência e pendências.

Favor encaminhar ao CEP/UFMG, TCC logo disponível, o TCLE modificado e o documento de anuência (item 2 do CP acima), para avaliação e registro no seu projeto.

8.2 Anexo 2: MJ/FUNAI AUTORIZAÇÃO PARA INGRESSO EM TERRA INDÍGENA N.º 149/CGEP/08

 MINISTÉRIO DA JUSTIÇA FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO		
AUTORIZAÇÃO PARA INGRESSO EM TERRA INDÍGENA		Nº: 149/CGEP/08
IDENTIFICAÇÃO		
Nome: Célia Maria Ferreira Gontijo		Processo: n°.2098/08
Nacionalidade: brasileira	Identidade: RG n°.M-663908 SSP MG	
Instituição/Entidade: Laboratório de Leishmanioses – Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ		
Patrocinador:		
OBJETIVO DO INGRESSO		
Desenvolver o projeto de pesquisa científica intitulada “Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil”.		
EQUIPE DE TRABALHO		
Nome	Nacionalidade	Identidade
Elizabeth Castro Moreno*****	brasileira*****	RG 867963 SSP MG
Patrícia Flávia Quaresma*****	brasileira*****	RG 11616996 SSP MG
Filipe Augusto Maximiano Madeira*****	brasileiro*****	RG 11030749 SSP MG
Heitor Morais Cunha*****	brasileiro*****	CRBio 44441/04-D MG
Lutiana Amaral de Melo*****	brasileira*****	RG 9117142 SSP MG
Edelberto Santos Dias*****	brasileiro*****	CRBio 13446/4-D MG
Ricardo Andrade Barata*****	brasileiro*****	CRBio 160154 MG
Adriano Pereira Paglia*****	brasileiro*****	RG 2099566 SSP MG
Terra Indígena: Xakriabá		Etnia: Xakriabá
Administração Regional: Governador Valadares		Posto Indígena: Xakriabá
VIGÊNCIA DA AUTORIZAÇÃO		
Início: 12 de outubro de 2008		Término: 12 de outubro de 2009
OBSERVAÇÕES		
* Remeter à Funai/Coordenação Geral de Estudos e Pesquisas - CGEP, duas cópias da monografia, relatórios, artigos, livros, gravações, imagens e outras produções oriundas do trabalho realizado.		
* Esta autorização não inclui cessão de uso de imagem e som de voz dos índios, nem acesso a conhecimentos tradicionais associados a biodiversidade.		
Autorizo:		
Brasília, 17 de setembro de 2008.  		

8.3 Anexo 3: MMA/IBAMA/SISBIO LICENÇA PERMANENTE PARA COLETA DE MATERIAL ZOOLOGICO N.º 12989-1 DATA DE EMISSÃO: 21/11/2007 17:46



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 12989-1		Data da Emissão: 21/11/2007 17:46
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2055205	Nome: Adriano Pereira Paglia	CPF: 893.843.266-15
Nome da Instituição : CONSERVATION INTERNACIONAL DO BRASIL		CNPJ: 38.737.938/0001-61

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT);
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas;
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente não exige o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NAO exige o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa a obtenção de autorização de acesso ao componente do patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado nos termos da legislação vigente.
14	As atividades contempladas nesta autorização NAO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ORDEM	Didelphimorphia, Rodentia, Lagomorpha
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFMG - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	coleção

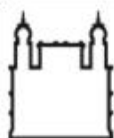
Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 31875873



Página 1/2

8.4 Anexo 4: MS/FIOCRUZ/VPPLR PTOTOCOLO N.º 32/10-3 CEUA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo CruzVice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência**PROTOCOLO No. 32/10-3**Comissão de Ética
no Uso de Animais**Título do projeto :**

Estudo sobre a leishmaniose canina na reserva indígena Xacriabá, Minas Gerais, Brasil.

Palavras Chave :

leishmaniose, cães, reservatório, diagnóstico

Tempo de execução : 2 Ano(s)**Solicitante :****Nome :** SHARA REGINA DA SILVA**Cargo :** MÉDICO VETERINÁRIO**Unidade :** CENTRO DE PESQUISAS RENE RACHOU**Vínculo :** Bolsista**Email :** shara@cpqrr.fiocruz.br**Telefone(s) :** 3133497795 3133497758**Endereço para correspondência :****Rua :** Augusto de Lima**Número :** 1715**Complemento :** sala 235**Bairro :** Barro Preto**Cidade :** BELO HORIZONTE**UF :** MG**CEP :** 30190002**Formação / Titulação :** MÉDICA VETERINÁRIA, MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE.**Responsável pelo solicitante, na FIOCRUZ :****Nome :** CELIA MARIA FERREIRA GONTIJO**Matricula Siape :** 0464687**Unidade :** CENTRO DE PESQUISAS RENE RACHOU**Email :** gontijo@cpqrr.fiocruz.br**Cargo :** PESQUISADOR EM SAÚDE PÚBLICA**Titulação :** DOUTORADO - PARASITOLOGIA**Resumo do projeto / protocolo :**

Será realizado inquérito sorológico canino na reserva Indígena Xacriabá, município de São João das Missões, Minas Gerais. Serão coletadas amostras de sangue periférico para sorologia para leishmaniose, pelas técnicas de ELISA e RIFI, em todos os cães domiciliados na localidade de Imbaúbas. Os cães com resultados soropositivos serão recolhidos e eutanasiados, conforme instruções do Ministério da Saúde. Desses animais serão coletadas amostras para diagnóstico molecular (PCR) e parasitológico (direto e por cultura). Os parasitos isolados serão caracterizados até nível de espécie pela técnica de isoenzimas. O número de cães a serem eutanasiados dependerá do número de cães com resultados positivos na sorologia, portanto, O NÚMERO DE CÃES A SEREM TRABALHADOS (QUANTIFICADOS NOS PROCEDIMENTOS) É APENAS UMA ESTIMAÇÃO NÃO SENDO UM NÚMERO PRECISO.

Equipe participante :**SHARA REGINA DA SILVA****Vínculo :** Outros - Bolsista

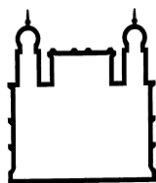
Estudo sobre a leishmaniose canina na reserva indígena Xacriabá, Minas Gerais, Brasil.

Comissão de Ética no Uso de Animais

Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

Página : 1

8.5 Anexo 5: MS/FIOCRUZ/CPqRR ESTUDO: Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Reserva Indígena Xacriabá, Minas Gerais, Brasil – CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO VOLUNTÁRIO



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

ESTUDO: Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Reserva Indígena Xacriabá, Minas Gerais, Brasil.

Nome do voluntário: _____

ID: _____

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO VOLUNTÁRIO

Esta pesquisa tem como objetivo estudar aspectos da leishmaniose tegumentar relacionados à doença humana, aos possíveis reservatórios silvestres (roedores, gambás) e domésticos (cães) e aos insetos vetores na reserva indígena Xacriabá, utilizando exame físico e de sangue e será desenvolvido sob a responsabilidade da Pesquisadora Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo.

A minha participação será restrita a uma entrevista individual e uma entrevista domiciliar, à realização de teste intradérmico para diagnosticar leishmaniose tegumentar, à doação de sangue para realização de testes de diagnóstico e, quando houver lesão característica, poderá ser realizada a retirada de um pequeno fragmento para isolamento do agente causador da doença. Na entrevista serão feitas perguntas com o objetivo de avaliar os fatores de risco para doença. Além disso, dou permissão para coleta de amostras biológicas de animais domésticos e de pequenos animais silvestres próximos da minha residência.

Tenho conhecimento de que caso meu animal doméstico (cão) apresente resultado positivo nos exames sorológicos ele será recolhido e eutanasiado conforme as instruções do Manual de Controle da Leishmaniose do Ministério da Saúde.

Tenho conhecimento de que caso seja submetido ao tratamento para a leishmaniose tegumentar serão feitas fotografias para documentação da evolução do tratamento. Tenho conhecimento de que as fotografias retiradas preservarão minha identidade.

Tenho conhecimento de que as informações fornecidas nas entrevistas e também os resultados dos testes realizados a partir das amostras de sangue e pele de lesão cedidas por mim serão CONFIDENCIAIS e utilizados somente para esta pesquisa. Meu nome, endereço ou qualquer informação que possa me identificar não aparecerão, de nenhum modo, em qualquer apresentação pública.

Tenho consciência que a minha participação como voluntário não me trará nenhum benefício ou privilégio e em hipótese alguma prejudicará a minha saúde e bem-estar. Os exames e procedimentos aplicados serão gratuitos e receberei atenção médica adequada em todos os momentos da pesquisa.

Poderei a qualquer momento me retirar do projeto de pesquisa por qualquer motivo, sem que isso acarrete prejuízo para mim ou minha família.

Poderei no momento em que desejar procurar a coordenadora da pesquisa para esclarecer qualquer questão ou o médico responsável pelo projeto.

Coordenadora da pesquisa: **Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo**

Endereço: Centro de Pesquisas René Rachou, Avenida Augusto de Lima nº 1715, Bairro Barro Preto, Belo Horizonte, MG.

Telefone: (31) 3349 7755.

Médicos responsáveis:

Dr. Joaquim Edemilson Diniz. CRM: 37630

Endereço: Rua Januária 530, Bairro JK, Manga, MG.

Telefone: (38) 3615 1585.

Dra. Janaina de Moura Freire. CRM: 28158

Endereço: Rua Marechal Jofre 231, apto 406, Bairro Grajaú, Belo Horizonte, MG

Telefone: (31) 3327 2412

Eu li este consentimento e me foram dadas oportunidades para esclarecer minhas dúvidas. Minha participação é inteiramente voluntária, portanto, concordo em participar e assino abaixo em duas vias.

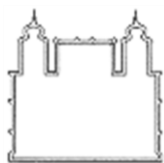
Local _____

Assinatura _____ do _____ voluntário

Assinatura do pesquisador responsável _____

Data: ____/____/____

**8.6 Anexo 6: MS/FIOCRUZ/CPqRR MS/FUNASA/DSEI MG-ES
UFMG/ICB Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na Reserva Indígena
Xacriabá, Minas Gerais - Entrevista Individual**



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou



Ministério da Saúde
Fundação Nacional de Saúde
DSEI MG-ES



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas

Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na Reserva Indígena Xacriabá, Minas Gerais

Sub-projeto: Estudo **caso-controle** para identificação de fatores de risco para as formas clínica e subclínica da LTA.

Entrevista Individual

Instruções

Explicar para o entrevistado os objetivos da pesquisa em leishmaniose e todo o procedimento a ser realizado caso ele concorde em participar (exames médicos de 3 em 3 meses, entrevistas, coletas de sangue, biópsia da ferida, intradermoreação e visita domiciliar). Explicar que além das pessoas que tem essa doença, serão acompanhadas também algumas pessoas que não tem a doença para verificar se eles vão adoecer, já que todos estão em uma região onde a doença é muito comum. As pessoas convocadas foram sorteadas entre todos que moram na aldeia. Falar sobre a importância do acompanhamento dos participantes selecionados, esclarecendo que sua participação não é obrigatória, mas é importante. Informar que as informações prestadas não serão comentadas com outras pessoas e que o sangue não será vendido. Explicar que os líderes já foram informados sobre todos os procedimentos e estão de acordo com a pesquisa.

Identificação do participante (ID): _____

Data da entrevista: ___ / ___ / ___

Nome do entrevistador: _____

Resultado da abordagem ao entrevistado:

Entrevista realizada () não realizada ()

Motivo da recusa:

Em caso de recusa, se possível, identificar: Sexo: 0 () Fem 1 () Masc

Idade: _____ anos

Entrevista concluída: Sim ()

Não () Se não concluída, por quê? _____

Início da entrevista: _____ Término: _____

Duração: _____ min

Respondeu a entrevista:

1. Participante

2. Responsável

IDENTIFICAÇÃO:	Codificação (não preencher)
1. Número da Casa ____	1. ____ CASA
2. Identificação (ID) ____	2. ____ ID
Nome: _____	
3. Aldeia onde mora: _____	3. ____ ALDEIA1
4. Polo: _____	4. ____ POLO
5. Sexo: 1 Masc 2 Fem	5. ____ SEXO
6. Data de nascimento: ____/____/____	6. ____/____/____
	DATANAS
7. Idade: ____ (anos completos)	7. ____ IDADE
8. Você é indígena? 0 Não 1 Sim	8. <input type="checkbox"/> INDIG
9. Há quanto tempo mora na reserva? ____ (anos)	9. <input type="checkbox"/> TEMPRES
10. Onde morava anteriormente? _____	10. <input type="checkbox"/>
() sempre morou na reserva Nome da Aldeia (ou outro local)	ONDMORAV
11. O Sr(a) se considera:	
1 branco 2 negro 3 moreno	11. <input type="checkbox"/> COR
12. Até que ano de escola o sr(a) estudou? (circular o último ano completo)	12. <input type="checkbox"/>
1 curso superior: 1 2 3 4 5 6	
2 2º grau: 1 2 3	ESCOLARI
3 1º grau: 1 2 3 4 5 6 7 8 9	
4 não estudou	
13. Qual é a ocupação do Sr(a)?	13. <input type="checkbox"/>
1 trabalhador rural, vaqueiro	ANOESCOL
2 dona de casa	
3 construção civil	
4 serviços de nível médio ou especializado (comércio, funcionário da prefeitura, agente de saúde, técnico, professor)	
5 aposentado ou pensionista	
6 estudante	
7 não tem trabalho	
8. outro: _____	

<p>14. A família do Sr(a) recebe alguma ajuda do governo? Qual?</p> <p>1 cesta básica</p> <p>2 bolsa família</p> <p>3 bolsa escola</p> <p>4 outro: _____</p>	<p>14 <input type="checkbox"/> AJUDA</p>
<p>15. O sr (a) tem renda própria?</p> <p>1 Sim</p> <p>2 As vezes</p> <p>3 Não</p> <p>8 Não aplicável (crianças-estudantes)</p>	<p>15. <input type="checkbox"/> RENDA</p>
<p>16. Quantas pessoas contribuem com as despesas da casa? _____</p>	<p>16. _____ QUANTCON</p>
<p>17. Qual é a renda mensal da sua família?</p> <p>(1) menos de 1 salário mínimo (até R\$ 350,00)</p> <p>(2) 1 a 2 salários mínimos (até R\$700,00)</p> <p>(3) até 6 salários mínimos (até R\$ 2.100,00)</p> <p>(4) mais de 6 salários mínimos (mais de R\$ 2.100,00)</p>	<p>17. _____ RENDAF</p>
<p>HÁBITOS PESSOAIS</p>	
<p>O Sr (a) costuma sair da área da Reserva?</p>	
<p>0 não (Vá para a questão 21)</p> <p>1 sim</p>	
<p>18. Com que frequência Sr (a) sai da Reserva ?</p> <p>1 diariamente</p> <p>2 constantemente (toda semana, 2 a 3 vezes por mês)</p> <p>3 1 vez por mês</p> <p>4 raramente (menos de 1 vez por mês)</p> <p>8 NA</p>	<p>18. <input type="checkbox"/> FREQSAI</p>
<p>19. Para que o senhor sai da aldeia?</p> <p>1 Receber</p> <p>2 Fazer exames</p> <p>3. Fazer compras</p> <p>4 Outro: _____</p>	<p>19. <input type="checkbox"/> PQSAI</p>

20. O Sr(a) fez alguma viagem este ano?	20. <input type="checkbox"/> VIAGEM
0 Sim	
1 Não (Vá para a questão 23)	
21. Caso tenha ficado fora por mais de um mês, identificar:	21a <input type="checkbox"/> ONDEFIC
21a. onde ficou _____	
21b. por quanto tempo ficou _____	21b <input type="checkbox"/> QUANTEMP
22. Onde você geralmente dorme?	22. <input type="checkbox"/> ONDEDORM
0 dentro de casa (cômodo fechado)	
1 lugar aberto	
23. Geralmente, a partir das 18 horas onde você está?	23. <input type="checkbox"/> APOS18H
1 Dentro de casa	
2 Do lado de fora da casa	
3 Na mata	
4 No trabalho	
5 Na escola	
6 Não tem rotina	
7 Em trânsito	
8 Outro	
24. Você tem contato com a mata?	24 <input type="checkbox"/> CONTMATA
0 Não (Vá para a questão 27)	
1 Sim	
25. Se sim, com que frequência?	25 <input type="checkbox"/> FREQMATA
1. Diariamente ou quase diariamente (4 dias por semana ou mais)	
2. Semanalmente (uma a 3 vezes na semana)	
3. Ocasionalmente (quinzenal, mensal, esporadicamente, sem rotina)	
26. Para quê?	
26a. Residência é próxima	26a () RESPROX
26b. Usa como banheiro (fazer necessidades)	26b () COMOBANH
26c. Tomar banho em rio, riacho	26c () BANHORIO
26d. Atividade extrativa (buscar lenha, cortar madeira, caçar, pescar)	26d () EXTRATI
26e. Ir para escola	26e () IRESCOL
26f. Outro. Qual: _____	26f () OTOUTRO

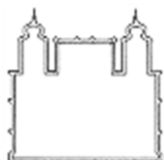
<p>27. A que horas o Sr(a) costuma ir ou passar pela mata?</p> <p>1 () Após anoitecer (18:00 as 7:00 da manhã)</p> <p>2 () Durante o dia (7:00 às 18:00)</p> <p>3 () Não tem hora definida</p> <p>28. O Sr(a) tem contato com a roça (plantação)?</p> <p>0 () Não (Vá para a questão 31)</p> <p>1 () Sim</p> <p>29. Se sim, com que frequência?</p> <p>1.() Diariamente</p> <p>2.() Semanalmente (uma ou mais vezes por semana)</p> <p>3.() Às vezes (menos de uma vez por semana, sem rotina)</p> <p>30. O Sr(a) usa alguma coisa para se proteger dos mosquitos?</p> <p>30a () Mosquiteiro</p> <p>30b () Repelente corporal</p> <p>30c () Repelentes ambientais (aparelho elétrico, citronela, espiral, etc)</p> <p>30d () Queima estrume</p> <p>30e () Fecha as janelas ao entardecer</p> <p>30f () Outros. Qual: _____</p>	<p>27. <input type="checkbox"/> HORAMATA</p> <p>28. <input type="checkbox"/> CONTROCA</p> <p>29. <input type="checkbox"/> FREQROCA</p> <p>30a <input type="checkbox"/> MOSQUIT</p> <p>30b <input type="checkbox"/> REPELE</p> <p>30c <input type="checkbox"/> REPELAMB</p> <p>30d <input type="checkbox"/> QUEIMA</p> <p>30e <input type="checkbox"/> JANELA</p> <p>30f <input type="checkbox"/> PROTECAO</p>
<p>CONHECIMENTO SOBRE A DOENÇA</p>	
<p>31. O Sr(a) já viu alguém com este tipo de ferida? Mostrar as fotos de LTA</p> <p>0 Não</p> <p>1 Sim</p>	<p>31 <input type="checkbox"/> VIU</p>
<p>32. Que doença o Sr(a) acha que é essa?</p> <p>_____</p>	<p>32 <input type="checkbox"/> CONHECID</p>
<p>33. O Sr(a) já tinha ouvido falar em leishmaniose antes desta pesquisa?</p> <p>1 Sim</p> <p>2 Não (Vá para questão 32)</p> <p>9 Não sabe</p>	<p>33. <input type="checkbox"/> FALAR</p>

34. Onde Sr(a) ouviu falar (ou aprendeu) sobre essa doença?	
34a. () agentes de saúde	34a <input type="checkbox"/> AGENT
34b. () escola, curso	34b <input type="checkbox"/> NAESCOLA
34c. () reuniões na comunidade	34c <input type="checkbox"/> REUNIAO
34d. () parente, vizinho, amigo	34d <input type="checkbox"/> PARENTE
34e. () pessoas que vem pesquisar a doença na Reserva	34e <input type="checkbox"/> PESQUISA
34f. () cartaz, folheto	34f <input type="checkbox"/> CARTAZ
34g. () rádio, televisão	34g <input type="checkbox"/> RADIO
34h. () outro	34h <input type="checkbox"/> APOUTRO
35. O Sr(a) já teve leishmaniose?	
1 Sim	35. <input type="checkbox"/> JATEVE
2 Não	
8 NA	
9 NR, NS	
36a. Alguém da sua casa já teve leishmaniose? (além de você)	36a <input type="checkbox"/> ALGTEVE
0 Não	36b <input type="checkbox"/> QUANTTIV
1. Sim _____ Identificar quem e época aproximada	
37. Em sua opinião, a leishmaniose é um problema aqui na reserva?	37. <input type="checkbox"/> PROBLEMA
1 Sim	
2 Não	
8 NA	
9 NS	
38. Na sua opinião, o que você acha que acontece com uma pessoa com leishmaniose, se não for tratada?	
1 cura sozinho	38. <input type="checkbox"/> QUEACONT
2 a ferida aumenta, espalha pelo corpo	
3 fica com a doença o resto da vida	
4 morre	
5 outro: _____	
0 NS	
9 NR	

<p>39a. Se alguém na sua casa tivesse uma ferida dessa o que você faria?</p> <p>1 () usaria um remédio caseiro. Qual: _____</p> <p>2 () procuraria o posto de saúde ou farmácia</p> <p>3 () procuraria o pajé</p> <p>4 () pediria conselho a vizinho ou parentes</p> <p>5 () usaria primeiro um caseiro e depois procuraria o médico</p>	<p>39a <input type="checkbox"/> FARIA</p>
<p>SOBRE A TRANSMISSÃO</p>	
<p>40. Como você acha que essa doença é transmitida?</p> <p>40.1 através da picada do “mosquito”</p> <p>40.2 pega do cachorro</p> <p>40.3 passa diretamente de uma pessoa para outra</p> <p>40.4 outro. Explicar: _____</p>	<p>40. <input type="checkbox"/> TRANSMIT</p>
<p>41. O Sr(a) conhece o “mosquito” que transmite a leishmaniose?</p> <p>0 Não</p> <p>1 Sim</p>	<p>41 <input type="checkbox"/> CONH</p>
<p>42. O Sr(a) saberia apontar qual desses é o transmissor da leishmaniose?</p> <p><u>apresentar o mostruário, mesmo que o morador tenha dito que não conhece</u></p> <p>1 reconhece o flebotomíneo</p> <p>0 não reconhece Vá para a questão 46</p> <p>9 NS</p>	<p>42. <input type="checkbox"/> RECONHEC</p>
<p>43. Onde o Sr(a) já viu esse “mosquito”?</p> <p>1. dentro de casa</p> <p>2. no quintal</p> <p>3. no galinheiro</p> <p>4. na casinha do cachorro</p> <p>5. plantação</p> <p>6. mata</p> <p>8. NA</p>	<p>43. <input type="checkbox"/> VIUONDE</p>
<p>44. Sabe como fica a picada dele na pele? () NA</p> <p>44a. () dá calombo (como pernilongos)</p> <p>44b. () queima, arde, dói</p> <p>44c. () dá pequenos pontinhos vermelhos</p> <p>() NS, Não lembra</p>	<p>44a <input type="checkbox"/> CALOMBO</p> <p>44b <input type="checkbox"/> ARDE</p> <p>44c <input type="checkbox"/> PONTOS</p>

<p>45. O Sr(a) já reparou como eles voam?</p> <p>0 não sabe, nunca reparou ou descreve o vôo de outros insetos (como “ao redor das pessoas”, “em nuvem”, “ao redor da luz”)</p> <p>1 sabe descrever o vôo dos flebotomíneos (aos pulinhos, vôos curtos)</p> <p>8. NA</p>	<p>45. () VOAM</p>
<p>SOBRE RESERVATÓRIOS</p>	
<p>46. Quais os bichos que vocês costumam ver por aqui, na mata ou perto da sua casa?</p> <p>a () ratos do mato, camundongo</p> <p>b () ratazana</p> <p>c () saruê</p> <p>d () mocó</p> <p>e () preguiça</p> <p>f () paca</p> <p>g () cachorro do mato</p> <p>h () tamanduá</p> <p>i () gambá</p> <p>j () rabudo</p> <p>k () raposa</p> <p>l () outros: _____</p>	<p>46a () RATOS</p> <p>46b () RATAZA</p> <p>46c () SARUE</p> <p>46d () MOCO</p> <p>46e () PREGUI</p> <p>46f () PACA</p> <p>46g () CACHOMAT</p> <p>46h () TAMANDUA</p> <p>46i () GAMBA</p> <p>46j () RABUDO</p> <p>46k () RAPOSA</p> <p>46l () OUTBICH</p>
<p>47. Na sua casa tem ou já teve cachorro?</p> <p>0 Não – Encerrar a entrevista</p> <p>1 Sim</p>	<p>47. <input type="checkbox"/> TEMCACHO</p>
<p>48. Algum cachorro da sua casa já teve leishmaniose?</p> <p>0 NS</p> <p>1 Não ou nunca fizeram exame</p> <p>2 Sim</p> <p>8 NA (nunca teve cães) (Finalizar a entrevista)</p>	<p>48. <input type="checkbox"/> CACHOTEV</p>
<p>49. O cachorro foi sacrificado?</p> <p>1 Sim 2 Não 0 NR 8 NA</p>	<p>49. <input type="checkbox"/> SACRIF</p>
<p>50. Se não, por quê?</p> <p>_____</p>	<p>50 <input type="checkbox"/> PQNAOSAC</p>

**8.7 Anexo 7: MS/FIOCRUZ/CPqRR MS/FUNASA/DSEI MG-ES CEE UFMG/ICB
Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na Reserva Indígena Xakriabá,
Minas Gerais - Ficha clínica**



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René
Rachou



Ministério da Saúde
Fundação Nacional de
Saúde
DSEI MG-ES



Comunidade
Européia



Universidade Federal de
Minas Gerais
Instituto de Ciências
Biológicas

Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na Reserva Indígena Xakriabá, Minas Gerais

Ficha clínica

Data do exame: ____/____/____ Médico Responsável: _____ <small>DATEXAME MEDICO</small>	Codificação (<i>não preencher</i>)
Identificação:	
1. Identificação (ID) ____ ____ ____ Nome: _____	1. ID ____ ____ ____
2. Localidade (Aldeia/Polo) : _____	2. _____
3. Idade: ____ ____	ALDEIA 3.IDADEC ____ ____
4. Sexo: 1() Masc 2 () Fem	4.SEXOC ____
5. Peso: ____ ____ ____, ____ Kg	5. PESO ____ ____, ____
6. Altura: ____ ____ ____, ____ cm	6.ALTURA ____ ____, ____
7. Profissão: ocupação principal: _____	7a.PROFPR ____
ocupação secundária: _____	7b. PROFSEC ____
Anamnese:	
8. Doenças identificadas no exame clínico ou citadas pelo paciente	
8.1 () Tuberculose	8.1 TUBER ____
8.2 () Doença de Chagas	8.2 CHAGAS ____
8.3 () Doença venérea	8.3 VENER ____
8.4 () Pneumonia	8.4 PNEUMO ____
8.5 () Hipertensão arterial	8.5 HIPER ____
8.6 () Diabetes	8.6 DIAB ____
8.7 () Varizes dos membros inferiores	8.7 VARIZES ____
8.8 () Alcoolismo (se bebe mais de 2 x na semana)	8.8 ALCOOL ____
8.9 Outra: _____	8.9 OUTRAD ____
8.10 () Não apresenta ou relata doenças	8.10 NAODOEN ____

9a. Sinais e sintomas relatados pelo paciente:			www
	Há qto tempo	Melhora com:	
1() artralgia			9.1 ASTRA ____
2() mialgia			9.2 MIA ____
3() inapetência			9.3 INAP ____
4() náuseas			9.4 NAU ____
5() vômitos			9.5 VOM ____
6() plenitude gástrica			9.6 PLEN ____
7() epigastralgia			9.7 EPIG ____
8() pirose			9.8 PIRO ____
9() dor abdominal: local _____			9.9 DORAB ____
10() prurido			9.10 PRURI ____
11() febre: _____°C			9.11 FEBRE ____
12() fraqueza, cansaço			9.12 FRAQ ____
13() cefaléia			9.13 CEFA ____
14() tontura			9.14 TON ____
15() palpitação			9.15 PALP ____
16() insônia			9.16 INSO ____
17() nervosismo			9.17 NERV ____
18() choque pitogênico			9.18 CHOQ ____
19() edema			9.19 EDEM ____
20() insuficiência renal aguda			9.20 INSUR ____
21 () dor no peito			9.21 DORPE ____
Exame clínico: Temperatura axial: _____ °C Pressão arterial: _____ mmHg FC ____ FP ____ FR ____			TEMP ____ PA ____ x ____ FC ____ FP ____ FR ____

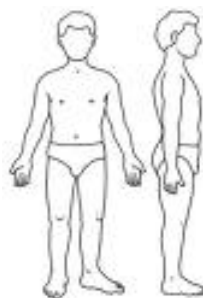
Cabeça:				
Orofaringe:	0() Normal	1() Alterado	Especificar:_____	ORO ____
Nariz/Cavid.Nasal	0() Normal	1() Alterado	Especificar:_____	NASAL ____
Pescoço	0() Normal	1() Alterado	Especificar:_____	PESCO ____
Tórax:				
Axila: Linfonodos	0() Normal	1() Alterado	Especificar:_____	AXILA ____
Ap. Respiratório	0() Normal	1() Alterado	Especificar:_____	APRESP ____
Ap.Cardio-vascular	0() Normal	1() Alterado	Especificar:_____	APCARD ____
Abdome	0() Normal	1() Alterado	Especificar:_____:	ABDOM ____
Fígado	0() Normal	1() Alterado	Especificar:_____	FIG ____
Baço	0() Normal	1() Alterado	Especificar:_____	BACO ____
Força Muscular	0() Normal	1() Alterado	Especificar:_____	FORCA ____
Ossos/Articulação	0() Normal	1() Alterado	Especificar:_____	OSSO ____
Pele	0() Normal	1() Alterado	Especificar:_____	PELE ____
9b. O Sr(a) está usando algum medicamento de uso contínuo?				9b. MEDICCON ____
0() não 1() sim 9c. Para que? _____				9c. _____
				MEDICPAR
10. Verificar a presença de acometimento linfático (mesmo sem a presença de lesões)				
10.1 Gânglios:	0() não	1() sim		10.1 GAN ____
10.2 local	_____			10.2 LOCGAN ____
10.3 Tamanho	_____ (cm)			10.3 TAMGAN ____
10.4 Linfangite	0() não	1() sim		10.4 LINFA ____
10.5 local	_____			10.5 LOCLIN ____

11. O Sr(a) tem alguma ferida **ativa**?

0 () não

1 () sim

Assinale o local na figura →

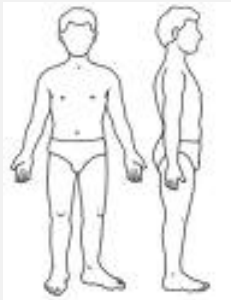


11. FERIATI

Localização, número, aspecto e tamanho das **lesões ativas** (maior diâmetro em cm de cada lesão):

Local	Nº	Diâm.	Aspecto			
Cabeça/pescoço		—, — —, —	() Úlcera () Lesão vegetante	() Pápula	() Nódulo () Lesão verrucosa	() Placa
Tronco		—, — —, —	() Úlcera () Lesão vegetante	() Pápula	() Nódulo () Lesão verrucosa	() Placa
Abdome		—, — —, —	() Úlcera () Lesão vegetante	() Pápula	() Nódulo () Lesão verrucosa	() Placa
Antebraço		—, — —, —	() Úlcera () Lesão vegetante	() Pápula	() Nódulo () Lesão verrucosa	() Placa
Braço		—, — —, —	() Úlcera () Lesão vegetante	() Pápula	() Nódulo () Lesão verrucosa	() Placa
Mão		—, — —, —	() Úlcera () Lesão vegetante	() Pápula	() Nódulo () Lesão verrucosa	() Placa
Coxa		—, — —, —	() Úlcera () Lesão vegetante	() Pápula	() Nódulo () Lesão verrucosa	() Placa
Tíbia		—, — —, —	() Úlcera () Lesão vegetante	() Pápula	() Nódulo () Lesão verrucosa	() Placa
Pés		—, — —, —	() Úlcera () Lesão vegetante	() Pápula	() Nódulo () Lesão verrucosa	() Placa

<p>13. Número total de lesões (ativas): _____ 8 () NA 9 () NR</p>	<p>13. NUMATIV _____</p>
<p>14. Há quanto tempo o Sr (a) está com essa ferida? Aproximadamente _____ (meses) 8 () NA 9 () NR</p>	<p>14. _____ meses TEMPFERI</p>
<p>15. Onde o Sr acha que pegou essa ferida? 8 () NA 9 () NR 1 () Domicilio 2 () mata 3 () morro 4 () outro: _____</p>	<p>15. ONDPEG _____</p>
<p>Se apresentar mais de uma lesão ativa:</p>	
<p>16. Todas as lesões apareceram ao mesmo tempo? 1 () sim</p>	<p>16a. MESMTEMP _____</p>
<p>2 () não 16b. Quanto tempo depois apareceram as outras? ____ meses 0 () Não sabe 8 () Não aplicável</p>	<p>16b. TEMPOUT _____</p>
<p>17. A lesão está: (se necessário, marcar mais de uma opção)</p>	
<p>17.1 () Ativa, ulcerada</p>	<p>17.1 ATIVULC _____</p>
<p>17.2 () Parcialmente epitelizada</p>	<p>17.2 PARCEPIT _____</p>
<p>17.3 () Epitelizada com bordas infiltradas e / ou descamativas</p>	<p>17.3 EPITE _____</p>
<p>17.4 () Ativa em placa</p>	<p>17.4ATIVPLAC _____</p>
<p>18. Como apareceu essa ferida (ou cicatriz)</p>	
<p>Anotar o histórico do aparecimento da lesão atual (ou da cicatriz). Quando apareceu a primeira ferida. Se fez tratamento para leishmaniose. Se a ferida fechou. Se apareceram outras, quando, etc</p>	<p>18.</p>

Sobre a lesão antiga ou cicatriz (se já tiver apresentado lesões anteriormente)		
19a. O Sr(a) tem alguma cicatriz de leishmaniose? 0 () não 1 () sim		19a. CICATRIZ ____
19b. Local da cicatriz 1 () cabeça/ pescoco 2 () tronco 3 () abdome 4 () antibraco 5 () braco 6 () mao 7 () coxa 8 () tibia 9 () pes 10 () joelho 88 () NA (não tem cicatriz)	Assinale o local na figura → 	19b. LOCCIC ____
19c. Há quanto tempo o sr tem essa cicatriz? _____ meses		19c. TEMPCICA ____
19d. Na época em que apareceu a primeira ferida, o Sr fez o teste de pele (IDR)? 1() sim 0() não 8() Não aplicável 9() Não sabe		19d. AIDRM ____
20. Nessa época o Sr(a) tomou as injeções para leishmaniose? (Glucantime) 1() sim 0() não 8 () Não aplicável 9() Não sabe		20. AINJ ____
21. Quantas injeções o Sr (a) tomou? _____ 8 () Não aplicável		21.AQTINJ ____
22. Na época, o rr. fez o tratamento completo para leishmaniose que o médico receitou? 1() sim 0() não 8 () Não aplicável 0() Não sabe		22. ATRAT ____

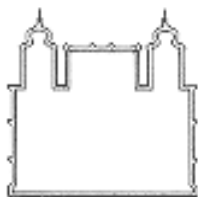
<p>23. Por que o sr abandonou o tratamento?</p> <p>1 () melhora clínica</p> <p>2 () falta do medicamento</p> <p>3 () dificuldades de acesso (locomoção, distância, disponibilidade, etc)</p> <p>4 () outro: _____</p>	<p>23. APQABA _____</p>
<p>24a. Na época o Sr (a) chegou a usar algum remédio caseiro?</p> <p>1 () sim 0 () não 8 () Não aplicável 9 () Não sabe</p>	<p>24a.ACASEI _____</p>
<p>24b. Qual ?</p> <p>1 () água de barbatimão</p> <p>2 () raspa de pau</p> <p>3 () folha curtida</p> <p>4 () imbumaroto (ameixa)</p> <p>5 () saputá,</p> <p>6 () pau ferrinho</p> <p>7 () chá de raiz de embaúba</p> <p>9 () cabelo de nego</p> <p>10 () imburana</p> <p>11 () aroeira</p> <p>12.Outro: _____</p>	<p>24.1 BARBA1 _____</p> <p>24.2 RASPA1 _____</p> <p>24.3 FOLHA1 _____</p> <p>24.4 AMEIXA1 _____</p> <p>24.5 SAPUTA1 _____</p> <p>24.6 PAUFER1 _____</p> <p>24.7 IMBAUBA1 _____</p> <p>24.9 CABELO1 _____</p> <p>24.10 IMBURA1 _____</p> <p>24.11 AROEIRA1 _____</p> <p>24.12 OUTRCAS1_____</p>
<p>24c. Na época em que teve essa ferida, o sr fez algum outro tipo de tratamento?</p> <p>1 () sim 0 () não 8 () Não aplicável 9 () Não sabe</p>	<p>24c OUTRTRAT _____</p>
<p>24d. Qual? _____</p>	<p>24d QUALTRAT _____</p>
<p>24e. Quando o Sr. parou de tomar as injeções, o Sr voltou ao médico para ver se estava curado?</p> <p>1 () sim</p> <p>0 () não</p> <p>8 () Não aplicável 9 () Não sabe</p>	<p>24e. RETORMED _____</p>

<p>24f. E o que o médico disse?</p> <p>1 () Que estava curado (a ferida fechou)</p> <p>2 () Que ainda não estava curado</p> <p>0 () Não sabe</p> <p>8 () Não aplicável</p> <p>24e. Você acha que cicatrizou?</p> <p>0 () não</p> <p>1 () sim</p> <p>2 () parcialmente</p> <p>8 () Não se aplica</p> <p>9 () Não respondeu</p>	<p>24f . RESPMED ____</p> <p>24e COMOCICA ____</p>
<p>Lesão ativa atual (Em relação a essa ferida que o Sr tem agora):</p> <p>25a. Atualmente o Sr (s) está tratando com algum remédio caseiro?</p> <p>1() sim 0() não 8 () Não aplicável 9() Não sabe</p> <p>25b. Qual ?</p> <p>1() água de barbatimão</p> <p>2() raspa de pau</p> <p>3() folha curtida</p> <p>4() imbumaroto (ameixa)</p> <p>5() saputá,</p> <p>6() pau ferrinho</p> <p>7() chá de raiz de embaúba</p> <p>9() cabelo de nego</p> <p>10() imburana</p> <p>11() aroeira</p> <p>12.Outro: _____</p>	<p>25a. ____ TRATCASE</p> <p>25.1 BARBA2 ____</p> <p>25.2 RASPA2 ____</p> <p>25.3 FOLHA2 ____</p> <p>25.4 AMEIXA2 ____</p> <p>25.5 SAPUTA2 ____</p> <p>25.6 PAUFER2 ____</p> <p>25.7 IMBAUBA2 ____</p> <p>25.9 CABELO2 ____</p> <p>25.10 IMBURA2 ____</p> <p>25.11 AROEIRA2 ____</p> <p>25.12 OUTRCAS2 ____</p>

<p>26. E remédio comprado em farmácia, o Sr (a) tem usado? 0 () não 1() sim 8 () Não aplicável</p>	<p>26.COMPFARM ____</p>
<p>27a. Qual? Citar o nome: _____</p>	<p>27a. QUALREM ____</p>
<p>27b. Formulação: () tópico () injetável () comprimido () oral</p>	<p>27b. FORMREM ____</p>
<p>27c. Classe: () antibiótico () antiinflamatório () antimicrobiano</p>	<p>27c. CLASREM ____</p>
<p>28a. Para essa ferida, o Sr(a) tomou já tomou alguma injeção? 0 () não – vá para questão 33 1() sim 8 () Não aplicável</p>	<p>28a. NOVAINJ ____</p>
<p>28b. Qual é o nome da injeção? 1 () glucantime 2 () anfotericina B 8 () Não se aplica 9 () Não sabe, não respondeu</p>	<p>28b. QUALINJ ____</p>
<p>29a. Quantas injeções o Sr (a) já tomou? _____ 8 () Não aplicável</p>	<p>29a. QTINJNOV ____</p>
<p>29b. O Sr ainda está tomando as injeções? 1() sim 0() não 8 () Não aplicável 9() Não respondeu</p>	<p>29b. AINDAINJ ____</p>
<p>Se tiver abandonado o tratamento (não tiver tomado no mínimo 20 injeções): 30. Por que o sr abandonou o tratamento? () melhora clínica () falta do medicamento () dificuldades de acesso (locomoção, distância, disponibilidade, etc) () outro: _____ () Não aplicável</p>	<p>30. BPQTRAT ____</p>

<p>31. Há quanto tempo o Sr(a) tomou a última dose? _____ meses</p> <p>8 () Não aplicável</p> <p>32. Resposta terapêutica ao ultimo tratamento que está sendo feito:</p> <p>1 () cicatrização total das lesões (cura)</p> <p>2 () cicatrização parcial das lesões</p> <p>3 () sem melhora</p> <p>4 () piora da lesão</p> <p>5 () surgimento de novas lesões</p> <p>6 () resultado ignorado</p> <p>8 () Não aplicável</p> <p>33. Conclusão do diagnóstico clínico ATUAL:</p> <p>0. () curado (cicatriz)</p> <p>1. () quadro primário (caso novo, ou seja, caso ainda não tratado)</p> <p>2. () recidiva (lesão no mesmo local da lesão anterior)</p> <p>3. () reinfecção (apresenta cicatriz e lesão em outro local)</p> <p>4. () não é caso clínico de LTA</p> <p>5. () indefinido (pode ser recidiva ou reinfecção)</p>	<p>31. ULTDOSE ____</p> <p>32. RESPTRAT ____</p> <p>33. DIAG ____</p>
<p>Assinatura do médico responsável : _____</p>	

8.8 Anexo 8: MS/FIOCRUZ/CPqRR/LALEI Ficha clínica cães



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Laboratório de Leishmanioses



Ficha clínica cães

Nome da localidade: _____
 Casa: _____
 Aldeia: _____
 Nome do proprietário: _____
 Número do animal: _____
 Data da coleta: _____

1) Dados do animal

- Nome: _____
- Raça: _____
- Sexo macho () fêmea ()
- Idade: _____
- Pelagem: _____
- Marcador: _____
- Cão viajou nos últimos seis meses? _____

2) Sintomatologia clínica

- Lesão cutânea única ()
- Lesões cutâneas múltiplas ()
- Lesão mucosa ()
- Cicatrizes de lesão ()
- Sem lesão ()

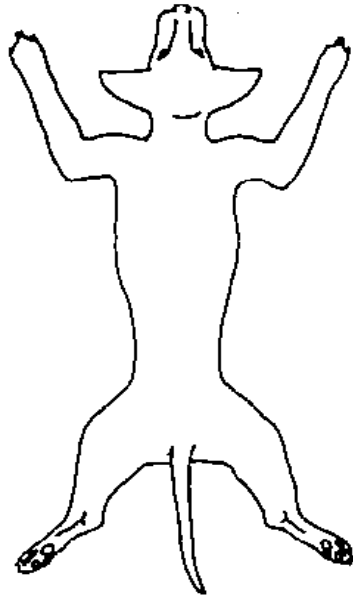
3) Amostras coletadas

Sangue periférico-veia cefálica ou jugular ()

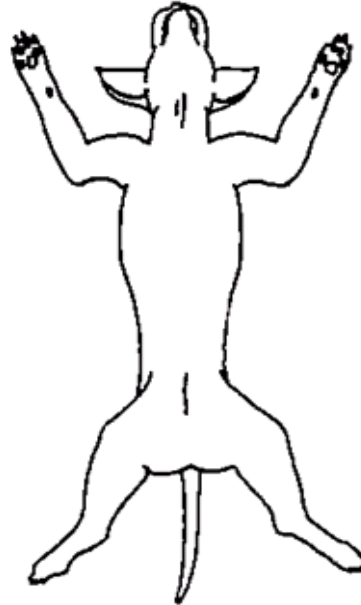
Biópsia lesão ()

Aspirado lesão ()

Exame dermatológico – localização e número de lesões



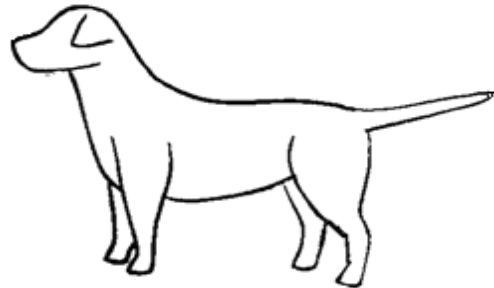
Dorsal



Ventral



Direito



Esquerdo

EXAMES:

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO:

Leitura de lâmina de fragmento de lesão: _____

Cultura de fragmento de lesão: _____

Cultura de aspirado de lesão: _____

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO: _____

DIAGNÓSTICO MOLECULAR: _____

8.9 Anexo 9: Artigo publicado: Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, da Silva SR, Moura Júnior AJ, Teixeira Neto RG, Madeira FM, Carvalho MB, Paglia AP, Melo MN, Gontijo CM. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2011 Oct;105(10):579-85. Epub 2011 Sep 3. PubMed PMID: 21890159.



Contents lists available at ScienceDirect

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/trstmh>

Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil

Patrícia F. Quaresma^{a,*}, Felipe D. Rêgo^a, Helbert A. Botelho^a, Shara R. da Silva^a,
 Airton J. Moura Júnior^b, Rafael G. Teixeira Neto^a, Filipe M. Madeira^b,
 Maria Beatriz Carvalho^b, Adriano P. Paglia^b, Maria Norma Melo^c,
 Célia M.F. Ferreira Gontijo^a

^a Laboratório de Leishmanioses, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima, 1715 Barro Preto, 30190-002 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos, 6627 Pampulha, 31270-910 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos, 6627 Pampulha, 31270-910 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 December 2010

Received in revised form 8 July 2011

Accepted 8 July 2011

Available online 3 September 2011

Keywords:

Leishmania

Host reservoirs

Dogs

Mixed infection

PCR

Brazil

ABSTRACT

Domestic, synanthropic and wild hosts of *Leishmania* spp. parasites were studied in an area endemic for American tegumentary leishmaniasis (ATL), specifically in northern Minas Gerais State, Brazil. Domestic dogs and small forest mammals are reservoir hosts for *L. (Leishmania) infantum*. However, the role that these animals play in the transmission cycle of the *Leishmania* spp. that cause cutaneous leishmaniasis is not well known. This study evaluated 72 rodents, 25 marsupials and 98 domestic dogs found in two villages of the Xakriabá Indigenous Territory, an area of intense ATL transmission. A total of 23 dogs (23.47%) were shown to be positive according to at least one test; 8 dogs (8.16%) tested positive in a single serological test and 15 dogs (15.31%) tested positive by IFAT and ELISA. Eleven dogs were euthanised to allow for molecular diagnosis, of which nine (81.8%) tested positive by PCR for *Leishmania* in at least one tissue. Seven animals were infected only with *L. (L.) infantum*, whilst two displayed a mixed infection of *L. (L.) infantum* and *L. (V.) braziliensis*. Isoenzymatic characterisation identified *L. (L.) infantum* parasites isolated from the bone marrow of two dogs. Of the 97 small mammals captured, 24 tested positive for *Leishmania* by PCR. The results showed that *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* and *L. (V.) guyanensis* are circulating among wild and synanthropic mammals present in the Xakriabá Reserve, highlighting the epidemiological diversity of ATL in this region.

© 2011 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by protozoa of the *Leishmania* genus, which are transmitted by phlebotomine sand flies to different vertebrate hosts. The

primary reservoir hosts of *Leishmania* are wild mammals, mainly rodents and canines. However, with the increased domiciliation of the transmission cycle of leishmaniasis, domestic and synanthropic animals have assumed an important role in maintaining the parasite in transmission areas.¹ In the Americas, more than 40 species of mammals can be carriers of *Leishmania* spp. parasites.² However, only some of these animals function as reservoirs, acting as sources of infection for phlebotomine sand fly vectors and

* Corresponding author.

E-mail address: patyquaresma@cpqrr.fiocruz.br (P.F. Quaresma).

thereby contributing to the establishment of *Leishmania* in the area.

Identification of the vertebrate hosts for the *Leishmania* species that cause cutaneous leishmaniasis (CL) is an object of intense study. Few animals have been definitively identified as reservoirs. In fact, the natural reservoirs of *L. (Viannia) braziliensis*, the most widely spread aetiological agent for American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Brazil, are not well known. Because the transmission cycle of *L. (V.) braziliensis* is primarily forest-based and is frequently associated with human penetration into forests or regions of vegetation, there is a strong suspicion that wild mammals could be the natural reservoirs for this species.^{3,4} Reports of small rodents and marsupials infected with *L. (V.) braziliensis* as well as identification of parasite DNA in the tissues of these mammals suggest that they may help to maintain this species in the natural environment.^{2,5}

Another relevant factor is the recent modification of the epidemiological cycle of ATL. With the disease now established in rural and urbanised areas, the transmission cycle in these places appears to be maintained through the participation of synanthropic or even domestic reservoirs. Epidemiological and experimental evidence indicates dogs as the principal reservoir hosts for *L. (Leishmania) infantum* in urban settings.¹ However, it is unclear whether these animals serve as domestic reservoirs for *L. (V.) braziliensis* and other dermatotropic species.^{6–12} There are many reports of dogs found naturally infected with *L. (V.) braziliensis*,^{10,13–18} but their capacity for phlebotomine infection appears to be low.¹⁹ Considering that domestic dogs are not the principal reservoir hosts of the aetiological agents of CL,^{3,20–22} it remains to be determined which mammals play this role in rural and urban areas.

This study investigated infection by *Leishmania* spp. in domestic, wild and synanthropic animals in an area where ATL is endemic, specifically in the Xakriabá Indigenous Reserve in northern Minas Gerais State, Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Area of study

The Xakriabá Indigenous Reserve is located in the municipality of São João das Missões (latitude 14°53'01" south and longitude 44°05'26" west), in northern Minas Gerais, Brazil. The reserve covers 78% of the entire municipality and has a population of 8380 inhabitants.²³ The region predominantly displays Brazilian savannah (cerrado) vegetation mixed with areas of caatinga (scrubland).

Two villages within the Xakriabá Territory with the greatest number of leishmaniasis cases were selected for this study.

2.2. Wild and domestic animal capture and sample collection

Traps were distributed across transects such that the entire area was covered, and four trails were defined between the houses for capturing small mammals (rodents and marsupials) in selected villages. Thirty traps were placed along each trail, two at each collection point. The

collection points were nearly 20 m apart from each other. Twenty-one houses were also chosen and two traps were placed around each one. Thus, a total of 42 traps around houses and 120 traps along the trails were used in each 2 months during the 1 year of capture (May 2008 to June 2009). The collection points were established so as to sample different habitats related to patterns of human activity. The field method used was that of Lacher et al.,²⁴ Paglia et al.²⁵ and Fonseca et al.²⁶

To perform molecular tests for *Leishmania* detection, all collected mammals were euthanised and samples of blood, bone marrow, tail skin, ear skin, spleen and liver were collected from all of the small mammals captured. Species identification was performed by analysing the morphological characteristics of each animal and comparing them with specimens deposited in the Mastozoology Collection of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) (Belo Horizonte, Brazil).

All domestic dogs living in the selected villages were included in the study. The animals were examined and peripheral blood samples were collected for serological diagnosis. Animals displaying one or more ulcers in their hide had a fragment of a lesion collected for molecular diagnosis. Dogs testing positive for the disease were collected and euthanised by the local team responsible for zoonosis control.

After sedating and anaesthetising seropositive animals, the bone marrow was punctured in the region of the tibia crossbow. The aspirated mesenteric or popliteal lymph node was collected and inoculated into a culture medium to isolate promastigotes of *Leishmania*. The following tissue fragments were also collected for direct parasitological examination and for molecular diagnosis: ear skin; spleen; liver; and the mesenteric lymph node.

2.3. Serological diagnosis of canine leishmaniasis

IFAT and ELISA tests were performed using antigen made from the promastigotes of *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1967/BH46 strain) and following the protocols of the *Leishmania* Serology Laboratory of the UFMG.

2.4. Detection and identification of *Leishmania* in clinical samples from small mammals and domestic dogs

2.4.1. Parasite isolation in the culture medium

Five-hundred microlitres of aspirated bone marrow from seropositive dogs was added to tubes containing blood agar-enriched LIT culture medium and was maintained at 25 ± 1 °C. Each culture was examined weekly and was considered positive if promastigote forms of *Leishmania* were observed. Isolated samples were cryopreserved for subsequent characterisation by multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) and molecular methods. Identification of the parasite by MLEE was performed by typing processes at the *Leishmania* Collection of the Oswaldo Cruz Institute (Brazil).

2.4.2. Molecular diagnosis

Presence of the parasite was also investigated by amplifying DNA isolated directly from the tissue samples

of small mammals and domestic dogs. Different targets of *Leishmania* DNA, *hsp70*²⁷ and internal transcribed spacer ITS1,²⁸ were used to detect and identify the parasite.

Amplification products were visualised in 2% agarose gels stained with ethidium bromide. Samples that had the specific 1300-bp *hsp70* band or 350-bp ITS1 band were submitted for RFLP analysis using the *Hae*III enzyme.

Restriction profiles were analysed in 2% agarose gel and were compared with the pattern obtained when the PCR product was digested with the reference strains of *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) or *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147).

3. Results

3.1. Detection of *Leishmania* in wild and synanthropic small mammals

Eight campaigns to capture small rodents and marsupials were performed between May 2008 and June 2009. A total of 97 specimens were collected, including 72 rodents and 25 marsupials. Three rodent species (*Thrichomys apereoides*, *Rhipidomys mastacalis* and *Rattus rattus*) and three marsupial species (*Didelphis albiventris*, *Gracilinanus agilis* and *Marmosops incanus*) comprised the dominant fauna of small wild mammals in the area during the period of study. Most of these specimens fell into traps placed in the trails between houses. Only seven were captured in the peridomicile of the residences (Table 1).

Sixteen rodents and eight marsupials had positive PCR results for *hsp70* in at least one biological sample, representing 24.74% of the 97 small mammals. *Leishmania* DNA was detected in 15 tail skin, 6 ear skin, 5 liver and 1 spleen sample. The species of *Leishmania* identified by the PCR-RFLP of *hsp70* (Figure 1) were *L. (V.) braziliensis* (17 animals), *L. (L.) infantum* (4 animals) and *L. (V.) guyanensis* (3 animals). Table 2 shows the relationship between tissues with parasites and the mammal species infected.

3.2. Detection of *Leishmania* in domestic dogs

All domestic dogs found in the houses of the villages were examined for the presence of clinical signs of leishmaniasis. Blood samples from a total of 98 dogs were collected for serological diagnosis. Eight dogs (8.16%) were positive

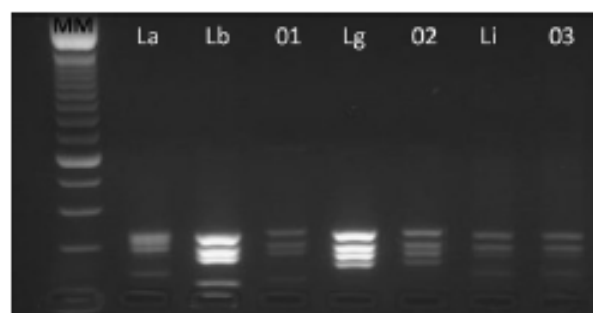


Figure 1. Profile of *Hae*III digestion of the *hsp70* gene of *Leishmania* spp. The gene was amplified from DNA extracted from small mammal samples. MM: 100 bp marker; La: *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8); Lb: strain pattern *L. (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903); Li: strain pattern *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75); and Lg: strain pattern *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147). 01, 02 and 03 indicate DNA samples taken from the tail skin of a *Didelphis albiventris*, the ear skin of a *Thrichomys apereoides* and the liver of a *Rhipidomys mastacalis*.

by a single serological test and 15 (15.31%) were positive by IFAT and ELISA. Only dogs positive by both serological methods were considered for euthanasia according to the Brazilian Health Ministry. However, only 11 were found at the moment of the catch for euthanasia.

Approximately 90% of the sampled dogs were asymptomatic (89 individuals); only nine dogs (9.2%) had at least one clinical sign of canine CL and/or canine visceral leishmaniasis (VL) and were classified as symptomatic.

Of the 11 dogs euthanised for molecular diagnosis, nine (81.8%) had at least one positive sample by PCR in which *Leishmania* genes (ITS1 and/or *hsp70*) were amplified. *Leishmania* samples were isolated from the bone marrow of two dogs and were identified as *L. (L.) infantum* by MLEE and PCR-RFLP of *hsp70*. Overall, seven animals were infected only with *L. (L.) infantum*, whilst two animals had a mixed infection of *L. (L.) infantum* and *L. (V.) braziliensis*. Results for the domestic dogs are shown in Table 2.

4. Discussion

One factor limiting the understanding of the epidemiology of ATL is a lack of knowledge about reservoirs in different endemic regions. The diversity of *Leishmania* spp. and of phlebotomine vectors leads to a great variety of infected vertebrate hosts causing different epidemiological patterns in Brazil. Natural reservoirs are not well known because of the difficulty in capturing a significant number

Table 1
Small mammals captured in the Xakriabá Indigenous Reserve (Minas Gerais State, Brazil) and the results of PCR-RFLP of *hsp70* to detect *Leishmania* DNA

Species	Captured (%)	Positive <i>hsp70</i> PCR/total		<i>Hae</i> III PCR-RFLP		
		Peridomicile	Trails	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. infantum</i>
<i>Thrichomys apereoides</i>	64(65.98)	0/1	13/63	10	2	1
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	7(7.22)	0/0	2/7	0	0	2
<i>Rattus rattus</i>	1(1.03)	1/1	0/0	0	0	1
<i>Didelphis albiventris</i>	19(19.59)	1/5	3/14	4	0	0
<i>Gracilinanus agilis</i>	4(4.12)	0/0	3/4	3	0	0
<i>Marmosops incanus</i>	2(2.06)	0/0	1/2	0	1	0
Total	97(100)	2/7	22/90	17	3	4
		24/97		24		

Table 2Domestic, synanthropic and wild hosts of *Leishmania* captured in the Xakriabá Indigenous Reserve (Minas Gerais State, Brazil) between May 2008 and February 2010

Species	Samples						Total no. of animals infected
	Spleen	Tail skin	Ear skin	Liver	Lymph node	Snout skin	
<i>Canis familiaris</i>	5 ^{Ac}	0	5 ^{Ac}	4 ^c	3 ^{Ac}	2 ^{Ac}	9
<i>Thrichomys apereoides</i>	0	9 ^a	4 ^{abc}	2 ^a	0	0	13
<i>Marmosops incanus</i>	0	0	1 ^b	0	0	0	1
<i>Didelphis albiventris</i>	1 ^a	3 ^a	0	0	0	0	4
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	0	0	0	2 ^c	0	0	2
<i>Gracilinanus agilis</i>	0	3 ^a	1 ^a	0	0	0	3
<i>Rattus rattus</i>	0	0	0	1 ^c	0	0	1
Total no. of infected tissues	6	15	11	9	3	2	33

^a*L. braziliensis*.^b*L. guyanensis*.^c*L. infantum*.

of wild animals and because of the limitations of some of the techniques used for isolating and detecting the parasites. This study investigated the role of small rodents, marsupials and domestic dogs in the ATL transmission cycle in an endemic area with a high prevalence of clinical (8.6%) and asymptomatic cases (19.2%) (P.F. Quaresma, unpublished data) using different methods to detect and identify *Leishmania*. *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, *L.* (*L.*) *infantum* and *L.* (*V.*) *guyanensis* were found circulating among different wild, synanthropic and domestic animals present in the Xakriabá Reserve. Among these species, *L.* (*V.*) *braziliensis* and *L.* (*L.*) *infantum* have already been reported in this area, but *L.* (*V.*) *guyanensis* has previously only been found in the north and northeast regions of the country.

The present research suggests that a forest cycle exists for *L.* (*V.*) *guyanensis* in the Xakriabá Reserve. *Lutzomyia umbratilis* is the species responsible for this parasite transmission to humans, which was previously found in the north and northeast regions of Brazil.^{29,30} However, *Lu. whitmani* females have been collected in the area where the mammals were found (P.F. Quaresma, unpublished data). Based on the isolation of *L.* (*V.*) *guyanensis* from *Lu. whitmani* in Amazônia, it has been suggested that this phlebotomine is responsible for maintaining enzootic among wild animals.^{31–33}

An estimated 60 and 42 species of small mammals live in the Brazilian savannah (cerrado)³⁴ and caatinga,³⁵ respectively. These animals can occupy the transitional areas between biomes (i.e. the Ecological Tension Zones, or ecotones) that generally have characteristics of both biomes.³⁶ The caatinga is habitat to at least ten marsupial species, with the most abundant being *Monodelphis domestica*, *D. albiventris* and *Micoureus demerarae*. It is also habitat to approximately 30 rodent species, including *T. apereoides*, *Wiedomys pyrrhorhinus*, *Cerradomys subflavus*, *Oligoryzomys nigripes*, *Necomys lasiurus*, *Kerodon rupestris* and *Phyllomys lamarum*.³⁵ The small mammal fauna of the cerrado is varied and the species commonly found are *Akodon cursor*, *Bolomys lasiurus*, *C. subflavus*, *T. apereoides*, *D. albiventris* and *G. agilis*.³⁴

The most ubiquitous small mammal species was *T. apereoides*, known regionally as the long-tailed rat. These animals live on plantations or in rocky habitats where they construct permanent nests. They are found throughout

northern Minas Gerais State as well as in the northeast and west regions of the state. *Thrichomys apereoides* was the small mammal with the highest number of specimens infected with *Leishmania*. Ten specimens of *T. apereoides* were infected with *L.* (*V.*) *braziliensis*, two with *L.* (*V.*) *guyanensis* and one with *L.* (*L.*) *infantum* (Table 1). Oliveira et al.² previously identified *T. apereoides* infected with a *Leishmania* parasite of the *L. mexicana* complex elsewhere in Minas Gerais. The second most captured species was *D. albiventris*, which also was the second most infected by *L.* (*V.*) *braziliensis*. This marsupial is very important in the process of ATL transmission in Brazil since it was previously found to be infected by *L.* (*V.*) *braziliensis*^{5,37–41} and *L.* (*V.*) *guyanensis*.⁴² *Leishmania* (*L.*) *infantum* was identified in two positive specimens of *R. mastacalis*, the second most captured rodent. These animals are arboreal, with nocturnal and solitary habits. They give birth in trees and on rocks, inhabiting all altitudes of the forests, and invade not only farms but also rural houses in search of food. The genus *Rhipidomys* is distributed throughout northern and northeast Brazil and across nearly all of Minas Gerais, with the exception of the south and the western areas.

Most specimens (93%) were captured in the traps placed in the trails between the houses. Only seven animals were captured in the peridomicile of residences. However, the trails were located around indigenous dwellings in areas frequented by the residents. The most common mammal captured in the peridomicile area was *D. albiventris*, an important marsupial because of its habit of approaching human habitations to prey on domestic birds, especially hens. *Didelphis albiventris* appears at dusk and at night, seeking shelter in tree hollows, between tree roots and beneath fallen tree trunks.⁴³ Four specimens of this species were infected with *L.* (*V.*) *braziliensis*, with only one of these having been captured in the peridomicile.

Among the species captured in the houses, one individual of *R. rattus*, the roof rat, was infected by *L.* (*L.*) *infantum*. There are previous reports^{2,37} of *L.* (*V.*) *braziliensis* infection in this rodent, which is commonly found in rural properties and in small and mid-sized cities in the interior of most of Brazil. Its intradomiciliary habit keeps it in close contact with humans, which is an important factor in linking its presence with the establishment of various health complaints. However, the possible role of *R. rattus* as a reservoir

for *Leishmania* has so far been little studied. The species of mammals infected by *Leishmania* in this area can also be found in many other leishmaniasis-endemic areas of Brazil as well as others countries of Latin America. Thus, this study could contribute to clarifying leishmaniasis epidemiology in general, but especially in regions of occurrence of these mammals species.

Between 2001 and 2008, 224 cases of ATL and only two cases of VL were recorded in Xakriabá Territory. These data differ from the high levels of canine seroprevalence and *L. (L.) infantum* infections observed in the animals detected in this area. This fact is significant since it raises the possibility of occurrence of new human cases of VL in this area. The presence of *L. (V.) braziliensis* in dogs was restricted to two animals who were also infected with *L. (L.) infantum*, making for an interesting case of mixed infection. Promastigotes isolated in the bone marrow samples of these dogs were identified as *L. (L.) infantum* by MLEE. One of these animals had a lesion on its snout caused by *L. (V.) braziliensis* and the other had *L. (V.) braziliensis* DNA in skin taken from its ear.

Although ATL was originally associated with forest habitats, deforestation and urbanisation have led to the adaptation of its transmission cycle to peridomestic environments.¹⁰ In ATL-endemic areas, it is common to find infected dogs,³⁸ suggesting that they may act as reservoirs for *Leishmania*. Identification of identical strains of *Leishmania* in humans and dogs provides circumstantial evidence that dogs can be reservoirs for the ATL-causing species of *Leishmania*.¹⁰ In Brazil, natural infections of domestic dogs by *L. (V.) braziliensis* have been documented in ATL foci in rural³⁹ and peri-urban areas.^{17,40} Given that one measure of VL control used in Brazil is the euthanasia of seropositive dogs, confirming the *Leishmania* species and the role of the dog as an infection source for the phlebotomine vectors are important issues. Use of specific techniques that can distinguish between VL and ATL is imperative to avoiding the unnecessary culling of dogs.^{12,18,40}

In endemic areas where more than one species of *Leishmania* is present, characterising the parasite is very important to understanding the natural history of the disease. The method employed in this study to detect and identify *Leishmania* in wild, synanthropic and domestic hosts incorporated different techniques in an effort to increase the chance of finding infected animals. PCR-RFLP of *hsp70* was used for the first time in samples from wild mammals, although it has already been used for identifying *Leishmania* spp. associated with human leishmaniasis and for culture promastigote species typing.^{27,44} This technique was very efficient in detecting *Leishmania* DNA and enabled the identification of the main species of this parasite found in Brazil. It is important to mention that this method is capable of distinguishing *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.) shawi*, which belongs to the *guyanensis* group and the latter occurs in the south of the Amazon.⁴⁴

The Xakriabá Reserve is an area of intense ATL transmission where a large number of human cases have recently been recorded. The presence of a significant number of rodents and marsupials infected with *L. (V.) braziliensis* correlates with this high rate of transmission and suggests that these animals are important in maintaining the parasite in

this area. In addition, these mammals also appear to play a role in maintaining other species of *Leishmania* found in this region. Some important criteria are needed to incriminate a mammal as a *Leishmania* reservoir host, including: (i) overlap between geographical and temporal distribution of vectors and hosts; (ii) survival of the reservoir host long enough to guarantee disease transmission; (iii) infection prevalence rates higher than 20% among hosts; (iv) maintenance of the parasite in skin lesions or blood (at quantities large enough to infect the vector easily); and (v) presence of the same *Leishmania* spp. in the reservoir and in humans.⁴⁵ However, the finding of infected small mammals is an important factor suggesting the role of these animals as possible reservoirs of *Leishmania* spp., even if more criteria should be studied. This study highlights the epidemiological diversity of ATL in the indigenous reserve and underscores the seriousness of the situation. Finding wild, synanthropic and domestic hosts infected by *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* and *L. (V.) guyanensis* indicates a coexistence of the established cycles of these three species in the region. Moreover, the close cohabitation of the Xakriabá population with host mammals infected by *L. (L.) infantum* emphasises the possibility of there being human VL cases, since the presence of the vector species *Lu. longipalpis* has already been verified (P.F. Quaresma, unpublished data). Integrated analysis of the results obtained in this and other studies currently underway in the Xakriabá Reserve may help in choosing measures to prevent and control the transmission of leishmaniasis in the area.

Authors' contributions: PFQ, APP, MNM and CMFG designed the study; PFQ, SRS, HAB, AJMJ, RGTN, FMM and MBC participated in the field data collection; PFQ, FDR and HAB performed the laboratory analysis of the samples; PFQ, FDR, SRS, HAB, AJMJ, RGTN, FMM, MBC and CMFG performed the data analysis and interpretation of data; PFQ drafted the manuscript; FDR, HAB, SRS, AJMJ, RGTN, FMM, MBC, APP, MNM and CMFG revised the article critically for intellectual content; CMFG deeply reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. PFQ is guarantor of the paper.

Acknowledgements: The authors thank the Parasitology Department of the Federal University of Minas Gerais (UFMG; Brazil) and the *Leishmania* Collection of the Oswaldo Cruz Institute (CIOC; Brazil) for their collaboration with the techniques IFAT, ELISA and MLEE.

Funding: This work was funded in part by grants from the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ; Brazil), the Minas Gerais Research Support Foundation (FAPEMIG; Brazil), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Brazil) and EpiLeishNet (European Community).

Conflicts of interest: None declared.

Ethical approval: All procedures for the capture of animals and sample collection were performed in accordance with the Ethical Principles for Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation. This

study was approved by the Brazilian Institute for the Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA, license no. 12989-1) and the Commission for the Ethical Use of Animals (CEUA - FIOCRLZ, ruling P-514/08). The project was conducted with permission of the Indigenous National Foundation (FUNAI, license no. 149/CGEP/08) to enter into indigenous lands.

References

- Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 2007; **149**:139–46.
- Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol* 2005; **129**:219–27.
- Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 2005; **35**:1169–80.
- Grimaldi G, Tesh RB. Leishmaniasis in the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 1993; **6**:230–50.
- Brandão-Filho SP, Brito MEF, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; **97**:291–6.
- Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad Saude Publica* 2000; **16**:925–50.
- Falquito A, Sessa PA, Vazjão JBM, Barros GC, Momen H, Grimaldi Jr G. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo State, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; **86**:499–500.
- Gomes AH, Ferreira IM, Lima ML, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MF, et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2007; **144**:234–41.
- Padilla AM, Marco JD, Diosque P, Segura MA, Mora MC, Fernandez MM, et al. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina. *Vet Parasitol* 2002; **110**:1–10.
- Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg* 1999; **61**:530–41.
- Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Davies CR. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dog blood and bone marrow. *J Clin Microbiol* 2000; **38**:748–51.
- Reithinger R, Espínoza JC, Davies CR. The transmission dynamics of canine American cutaneous leishmaniasis in Huánuco, Peru. *Am J Trop Med Hyg* 2003; **69**:473–80.
- Castro EA, Thomaz-Soccol V, Augur C, Luz E. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the state of Paraná (Brazil). *Exp Parasitol* 2007; **117**:13–21.
- Fenech FF. Leishmaniasis in Malta and the Mediterranean basin. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; **91**:747–53.
- Madeira MF, Uchoa CM, Leal CA, Macedo Silva RM, Duarte R, Magalhães CM, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in naturally infected dogs [in Portuguese]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; **36**:551–5.
- Madeira MF, Schubach A, Schubach TM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; **100**:442–5.
- Massunari GK, Voltarelli EM, dos Santos DR, dos Santos AR, Poiani LP, Oliveira O, et al. A serological and molecular investigation of American cutaneous leishmaniasis in dogs, three years after an outbreak in the Northwest of Paraná State, Brazil. *Cad Saude Publica* 2009; **25**:97–104.
- Ryan PR, Arana BA, Ryan JR, Wirtz RA, Wortmann GW, Rizzo NR. The domestic dog, a potential reservoir for *Leishmania* in the Peten region of Guatemala. *Vet Parasitol* 2003; **115**:1–7.
- Travi BL, Tabares CJ, Cadena H. *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in two Colombian dogs: a note on infectivity for sand flies and response to treatment. *Biomedica* 2006; **26**:249–53.
- Alvar J, Cahavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2004; **57**:1–88.
- Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol* 1996; **14**:523–32.
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; **27**:305–18.
- Ministério da Saúde do Brasil, Fundação Nacional de Saúde. Sistema de Informações da Atenção à Saúde Indígena (SIASI): Demografia dos Povos Indígenas. 2010. <http://www.funasa.gov.br/internet/desai/sistemaSiasiDemografiaIndigena.asp> [accessed 13 November 2010].
- Lacher TE, Mares MA, Alho CJR. The structure of a small mammal community in a central Brazilian savanna. In: Redford KH, Eisenberg JF, editors. *Advances in neotropical mammalogy*. Gainesville, FL: The Sandhill Crane Press; 1989. p. 137–62.
- Paglia AP, De Marco Jr P, Costa FM, Pereira RF, Lessa G. Heterogeneidade estrutural e diversidade de pequenos mamíferos em um fragmento de mata secundária de Minas Gerais, Brasil. *Rev Bras Zool* 1995; **12**:67–79.
- Fonseca GAB, Herrmann G, Leite YLR, Mittermeier RA, Rylands AB, Patton JL. Lista anotada dos mamíferos do Brasil. *Occasional Papers in Conservation Biology* 1996; **4**:1–38.
- Garcia AL, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol* 2004; **42**:2294–7.
- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; **47**:349–58.
- Balbino VQ, Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Marques da Silva W, Marcondes CB. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Atlantic forest in Recife, Pernambuco state, Brazil: the species coming to human bait, and their seasonal and monthly variations over a 2-year period. *Ann Trop Med Parasitol* 2005; **99**:683–93.
- Barbosa MG, Fe NF, Marciao AH, Silva AP, Monteiro WM, Guerra JA. Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a focus of American cutaneous leishmaniasis on the urban periphery of Manaus, State of Amazonas [in Portuguese]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; **41**:485–91.
- Arias JR, Freitas RA. Sobre os vetores da Leishmaniose Cutânea na Amazônia Central do Brasil. 2. Incidência de flagelados em flebotomos selváticos. *Acta Amazônica* 1978; **8**:387–96.
- Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Ready PD, Naiff RD. Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in North Pará State. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979; **73**:239–42.
- Lainson R, Shaw JJ, Ready PD, Miles MA, Póvoa M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Para State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of 'pian-bois'. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; **75**:530–6.
- Bonvicino CR, Lindbergh SM, Maroja LS. Small non-flying mammals from conserved and altered areas of Atlantic Forest and cerrado: comments on their potential use for monitoring environment. *Braz J Biol* 2002; **62**:765–74.
- Oliveira JA, Gonçalves PR, Bonvicino CR. Mamíferos da Caatinga. In: Leal IR, Tabarelli M, Silva JMC, editors. *Ecologia e Conservação da Caatinga*. Recife, Brazil: UFPE University Press; 2005. p. 375–84.
- Paglia AP, Chiarello AG, Melo FR, Tavares V, Rodrigues F. Mamíferos. In: Drummond GM, Martins CS, Greco MB, Viera F, editors. *Diagnóstico do Conhecimento sobre a Biodiversidade no Estado de Minas Gerais - Subsídio ao Programa Biota Minas*. Belo Horizonte, Brazil: Fundação Biodiversitas Press; 2009. p. 298–314.
- Alexander B, Lozano C, Barker DC, McCann SHE, Adler GH. Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. *Acta Trop* 1998; **69**:41–50.
- Santos GPI, Sanavria A, Marzochi MCA, dos Santos EGOB, Silva VL, Pacheco RS, et al. Prevalence of canine infection from endemic areas of American cutaneous leishmaniasis in Paracambi District, Rio de Janeiro State, between 1992 and 1993 [in Portuguese]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; **38**:161–6.
- Gontijo CMF, da Silva ES, de Fuccio MB, de Sousa CA, Pacheco RS, Dias ES, et al. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop* 2002; **81**:143–50.
- Schallig DFH, da Silva ES, Van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CMF. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region

- of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007;**7**:387–93.
41. Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi FG, Sessa PA, Carias VRD, et al. Participation of the dog in the cycle of transmission of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Viana, State of Espírito Santo, Brazil [in Portuguese]. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986;**81**:155–63.
 42. Arias JR, Naiff RD, Miles MA, de Souza AA. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981;**75**:537–41.
 43. Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. *Mamíferos do Brasil*. Londrina, Brazil: Imprensa da UEL; 2006.
 44. da Silva LA, de Sousa CS, da Graça GC, Porrozi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the *hsp70* gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol* 2010;**10**:77–83.
 45. Silva ES, Gontijo CMF, Melo MN. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends Parasitol* 2005;**21**:550–2.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alencar JE, Pessoa EP, Fontenelle ZF. Infecção natural de *Rattus rattus alexandrinus* por *Leishmania* (provavelmente *L. braziliensis*) em zona endêmica de Leishmaniose Tegumentar do Estado do Ceará, Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo 1960; 2: 347-348.
- Alexander B, Ferro C, Young DG, Morales A, Tesh RB. Ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Northern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87: 387-395.
- Alexander B, Lozano C, Barker DC, Mccann SHE, Adler GH. Detections of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. Acta Trop 1998; 69: 41-50.
- Alexander B, Carvalho RL, Mccallum H, Pereira MH. Domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban leishmaniasis in Brazil. Emerg Infect Dis. 2002; 8: 1480-1485.
- Aguilar CM, Rangel EF, Grimaldi Filho G, Momem H. Human, canine and equine leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area in the State of Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987. 82(1): 143.
- Aliaga L, Cobo F, Mediavilla JD, Bravo J, Osuna A, Amador JM et al. Localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: clinical and microbiological findings in 31 patients, Medicine (Baltimore) 2003. 82: 147–158.
- Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. Adv. Parasitol 2004. 5: 1–88.
- Araújo Filho NA. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Ilha Grande, PhD Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1979. 144 pp.
- Arias JR, Freitas RA. Sobre os vetores de leishmaniose cutânea na Amazônia Central do Brasil. 2: Incidência de flagelados em flebotomos selváticos. Acta Amazon 1978. 8: 387-396.
- Arias JR, Naiff RD. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1981. 76: 279-286.
- Arias JR, Naiff RD, Miles MA, De Souza AA. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae) as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1981. 75: 537-541.
- Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clin Dermatol 1996. 14: 523-532.
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol 2000. 30: 1269-1281.

- Bacha HA, Tuon FF, Zampieri RA, Floeter-Winter LM, Oliveira J, Nicodemo AC et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* identification by PCR in the state of Para, Brazil. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 2011. 105(3):173-178.
- Bañuls AL, Jonquieres R, Guerrini F, Le Pont F, Barrera C, Espinel I, et al. Genetic analysis of *Leishmania* parasites in Ecuador: are *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (V.) guyanensis* distinct taxa? *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(5): 838-845.
- Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Exp Parasitol* 2009; 121(4): 317-322.
- Bates PA. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol* 2008; 11: 340-344.
- Belli AA, Miles MA, Kelly JM. A putative *Leishmania panamensis/Leishmania braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Parasitol* 1994; 109(4): 435-442.
- Belkaid Y, Valenzuela JG, Kamhawi S, Rowton E, Sacks DI, Ribeiro JM. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(12): 6704-6709.
- Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L. et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 2003; 97: 291-296.
- Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de controle de controle de roedores. Brasília: MS, 2002. 132 p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria De Vigilância em Saúde. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico clínico e diferencial. Brasília: MS, 2006. 13 p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Relatório interno da Unidade Regional de Montes Claros. [s.l.]: [s.n.], 2007.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria De Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: MS, 2010. 180 p.
- Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AVM, et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2003; 45: 79-83.
- Calvopina M, Gomez EA, Uezato H, Kato H, Nonaka S, Hashiguchi Y. Atypical clinical variants in New World cutaneous leishmaniasis: disseminated, erysipeloid, and recidiva cutis due to *Leishmania (V.) panamensis*. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73(2): 281-284.

- Camara Coelho LI, Paes M, Guerra JA, Barbosa MD, Coelho C, Lima B, et al. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res* 2011; 108(3): 671–677.
- Campbell-Lendrum DH, Brandão-Filho SP, Pinto MC, Vexenat A, Ready PD, Davies CR. Domesticity of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: psychodidae) populations: field experiments indicate behavioural differences. *Bull Entomol Res*. 2000; 90(1): 41-48.
- Campos-Ponce M, Ponce C, Ponce E, Maingon RD. *Leishmania chagasi/infantum*: further investigations on Leishmania tropisms in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. *Exp Parasitol*. 2005; 109(4): 209-219.
- Carvalho MLR, Andrade ASR, Fontes CJF, Hueb M, Silva SO, Melo MN. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the prevalent species infecting tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. *Acta Trop* 2006; 98: 277-285.
- Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcão AL, Rocha Lima AC, Gontijo CMF. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 8: 407-414.
- Castellucci L, Cheng LH, Araújo C, Guimarães LH, Lessa H, Machado P, et al. Familial aggregation of mucosal leishmaniasis in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73(1): 69-73.
- Castro EA, Thomaz-Soccol V, Augur C, Luz E. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the state of Paraná (Brazil). *Exp Parasitol* 2007; 117: 13–21.
- Chaves LF, Hernandez MJ, Dobson AP, Pascual M. Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2007; 23(7): 311-316.
- Cruz I, Cañavate C, Rubio Jm, Morales Ma, Chicharro C, Laguna F et al. Spanish Hiv-*Leishmania* Study Group. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96(1): S/185 – S1/189.
- Dantas-Torres, F. The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 2007; 149: 139–146.
- David, C. V.; Craft, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol The* 2009;r 22:491–502.
- Davies, C. R.; Reithinger, R.; Campbell-Lendrum, D.; Feliciangeli, D.; Borges, R.; Rodriguez, N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad. Saude Publica* 2000; 16, 925– 950.
- De Carneri I, Nuttels N, Miranda JA. Epidemic of Cutaneous Leishmaniasis among the Waur'a Indians of the Xingu National Park (State of Mato Grosso, Brazil). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1963; 10: 271-272.

Dedet, J. P.; Gay, F.; Chatenay, G. Isolation of *Leishmania* species from wild mammals in French Guiana. Trans R Soc Trop Med Hyg 1989; 83: 613-615.

Delgado O, Cupolillo E, Bonfante-Garrido R, Silva S, Belfort, Grimaldi Jr G, et al. Cutaneous Leishmaniasis in Venezuela Caused by Infection with a New Hybrid between *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1997; 92: 581-582.

Desjeux, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001; 69: 473-480.

Desjeux, P. Leishmaniasis. Nature Reviews: 2, 692-693. 2004.

Dias M, Mayrink W, Deane LM, Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, et al. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana. I. Estudo de reservatórios em área endêmica no estado de Minas Gerais. Rev Inst Med Trop São Paulo 1977; 19 (6): 403-410.

Dorval, M. E. et al. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of an endemic area in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.104, p. 695-702, 2009.

Dujardin JC, Victoir K, De Doncker S, Guerbouj S, Arévalo J, Le Ray D. Molecular epidemiology and diagnosis of *Leishmania*: what have we learnt from genome structure, dynamics and function? Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 96 (1): 81-86.

Dujardin JC, Bañuls AL, Llanos-Cuentas A, Alvarez E, Dedoncker S, Jacquet D, et al. Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. Acta Trop 1995; 59(4): 293-307.

Falqueto A, Coura JR, Barros, CG, Grimaldi JrG, Sessa PA, Carias VRD et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1986; 81: 155-163.

Falqueto A, Sessa PA, Varejão JBM, Barros GC, Momen H, Grimaldi JR G. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo state, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. Mem Inst Oswaldo Cruz 1991; 86(4): 499-500.

Falqueto A. Especificidade Alimentar de Flebotomíneos em Duas Áreas Endêmicas de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Espírito Santo, [tese]. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 84 pp.; 1995.

Falqueto A, Sessa PA, Ferreira AL, Vieira VP, Santos CB, Varejão JBM et al. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American Cutaneous and Mucocutaneous Lesihmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98 (8): 1003-1010.

Fenech FF. Leishmaniasis in Malta and the Mediterranean basin. Ann Trop Med Parasitol 1997; 91 (7): 747-753.

Folgueira C, Cañavate C, Chicharro C, Requena JM. Genomic organization and expression of the *HSP70* locus in New and Old World *Leishmania* species. *Parasitol* 2007; 134(3): 369-77.

Fonseca GAB, Herrmann G, Leite YLR, Mittermeier, RA, Rylands AB, Patton JL. Lista anotada dos mamíferos do Brasil. *Occasional Papers in Conservation Biology* 4, Conservation Internacional. 1996

Forattini OP, dos Santos M. Note on a focus of American cutaneous leishmaniasis in the State of Mato Grosso, Brazil. *Rev Bras Malariol Doencas Trop* 1956; 8(1):127-33.

Forattini OP. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1960; 2(4): 195-203.

Forattini OP, Pattoli DBG, Rabello EX, Ferreira OA. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar do Estado de São Paulo. *Rev Saúde Pública* 1972; 6: 255-261.

Forattini OP. 1973. *Entomologia Médica*, vol. 4, Editora Edgard Blücher & Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 658 pp.

Galati EAB, Nunes VLB, Dorval MEC, Oshiro ET, Cristaldo G, Espíndola MA et al. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Saúde Pública* 1996; 30: 115–128.

Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol* 2004; 42(5): 2294 – 2297.

Gomes AH, Ferreira IM, Lima ML, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MF et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2007; 144: 234–241.

Gomez MA, Contreras I, Hallé M, Tremblay ML, McMaster RW, Olivier M. *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Sci Signal* 2009; 2: 58.

Gontijo CMF, Pratlong F, Passos VMA, Falcão AI, Dedet JP. Isoenzyme characterization of *Leishmania* isolates from Minas Gerais State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995; 90(1): 143.

Gontijo CMF. Leishmaniose tegumentar em Minas Gerais: estudos moleculares de amostras de *Leishmania* isoladas de casos humanos. [tese] Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2000.

Gontijo CMF, Da Silva ES, De Fuccio MB, De Sousa MCA, Pacheco RS, Dias ES et al. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop* 2002; 81: 143-150.

- Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8(4): 419–432.
- Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 2005; 35: 1169–1180.
- Grimaldi-Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Rev Clin Microbiol* 1993; 6(3): 230-250.
- Guerbouj S, Victoir K, Guizani I, Seridi N, Nuwayri-Salti N, Belkaid M, et al. Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure *Parasitol* 2001; 122 (1): 25-35.
- Guerra JAO, Paes MG, Coelho LIAR, Barros MLB, Fé NF, Barbosa MG et al. Estudo de dois anos com animais reservatórios em área de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana humana em bairro de urbanização antiga na cidade de Manaus, AM, Brasil. *Acta Amazon* 2007; 37: 133–138.
- Guimarães LH, Machado PR, Lago EL, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, et al. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103(7): 712-715.
- Kawa H, Sabroza PC, Oliveira, RM, Barcellos C. Production of transmission foci for cutaneous leishmaniasis: the case of Pau da Fome, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saúde Publica* 2010; 26(8): 1495-1507.
- Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* 1999; 17(3): 279-289.
- Lacher Jr TE, Mares MA, Alho CJR. The structure of a small mammal community in a central Brazilian savanna, 137-162. *In: Redford, K. H. & Eisenberg, J.F. (eds). Advances in Neotropical Mammalogy. The Sandhill Crane Press, Inc., Gainesville, USA, 1989.*
- Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis – Incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1968, 62: 385-395.
- Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso State, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1970 64: 654-667.
- Lainson R, Shaw JJ, Ready PD, Miles MA, Póvoa M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of “pian-bois”. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981: 75, 530-536.
- Lainson R, Shaw JJ. Evolution classification and geographical distribution. *In: Peters W, Killick-Kendrick R, editores. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. 1st ed. London: Academic Press; 1987. P. 1-120.*

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, De Souza AA., Braga RR, Ishikawa EA. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89(3): 435-443.

Lainson R, Shaw, JJ. New World Leishmaniasis - Neotropical *Leishmania* species. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD, editores. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology. 9th ed. London/New York: Topley & Wilson; 1998. P. 241-68.

Lescure FX, Bonnard P, Chandener J, Schmit JI, Douadi Y Atypical cutaneous leishmaniasis. Presse Med 2002; 31(6): 259-261.

Madeira MF, Uchôa CMA, Leal CA, Silva RMM, Duarte R, Magalhães CM, Serra CMB. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in naturally infected dogs. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36: 551-555.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Serra CMB, Pereira AS, Figueiredo FB, Confort EM, Quintella LP, Marzochi MCA. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? Parasitol Res 2005; 97: 73-76.

Madeira MF, Schubach A, Schubach TMP, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 2006; 100: 442-445.

Magalhães-Rocha NM, Melo MN, Babá EH, Dias M, Michalick MSM, Da-Costa CA, et al. *Leishmania braziliensis braziliensis* from *Akodon arviculoides* captured in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1988; 82: 69.

Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). Trans R Soc Trop Med Hyg 1986; 80(6): 859-897.

Martins AV, Barretto MP, Brener Z, Pellegrino J. Observações preliminares sobre um foco de leishmaniose tegumentar americana em Minas Gerais. Rev Bras Malariol Doenças Trop 1956; 8 (4): 577-581.

Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. Cad Saude Publ 1994; 10(2): 359-375.

Massunari GK, Voltarelli EM, dos Santos DR, dos Santos AR, Poiani LP, Oliveira O, et al. A serological and molecular investigation of American cutaneous leishmaniasis in dogs, three years after an outbreak in the Northwest of Paraná State, Brazil. Cad Saude Publ 2009 (25)1: 97-104.

Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, et al. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce valley, State of Minas Gerais, Brazil. Ann Trop Med Parasitol 1979; 73: 123-137.

Medeiros AR, Silva WAJr, Roselino AM. DNA sequencing confirms the involvement of *Leishmania (L.) amazonensis* in American tegumentary leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. Clinics 2008; 63(4): 451-456.

Nolder D, Roncal N, Davies CR, Llanos-Cuentas A, Miles MA. Multiple hybrid genotypes of *Leishmania (Viannia)* in a focus of mucocutaneous Leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 2007; 76(3): 573-578.

Nunes VL, Dorval ME, Oshiro ET, Noguchi RC, Arão LB, Hans-Filho G, et al. Epidemiologic study on tegumentary leishmaniasis in the municipality of Corguinho, Mato Grosso do Sul: Studies in the human population. Rev Soc Bras Med Trop 1995; 28(3):185-193.

Oddone R, Schweynoch C, Schönian G, de Sousa CS, Cupolillo E, Espinosa D, et al. Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania (Viannia)* species. J Clin Microbiol 2009; 47(9): 2818-2825.

Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. Vet Parasitol 2005; 129: 219-227.

Padilla AM, Marco JD, Diosque P, Segura MA, Mora MC, Fernandez MM, et al. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina. Vet. Parasitol 2002; 110: 1-10.

Paglia AP, de Marco Jr.P, Costa FM, Pereira RF, Lessa G. Heterogeneidade estrutural e diversidade de pequenos mamíferos em um fragmento de mata secundária de Minas Gerais, Brasil. Rev Bras Zool 1995; 12: 67-79.

Passos VMA, Falcão AL, Marzochi MCA, Gontijo CMF, Dias ES, Katz N. Epidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in a periurban área of Belo Horizonte, MG, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1993; 88: 103-110.

Peterson AT, Shaw J. *Lutzomyia* vector for cutaneous leishmaniasis in southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, an climate change effects. Inter J Parasitol 2003; 33: 919-931.

Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF, Andrade CA. Biology of *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 and *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. I. Feeding aspects of larvae and adults. Mem Inst Oswaldo Cruz 1986; 81: 431-438.

Rangel EF, Azevedo ACR, Andrade CA, Souza NA, Wermelinger ED. Studies on sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in focus of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1990; 85: 39-45.

Rangel EF, Meneses CRV, Cupolillo E, Azevedo ACR, Costa WA, Costa SM. Aspectos da ecologia de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) e a fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) em área de transmissão da *Leishmania (V.) braziliensis* no Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop 1999; 32(1): 115.

- Rangel EF, Lainson R. Ecologia das Leishmanioses: Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Rangel EF, Lainson R, editores. Flebotomíneos do Brasil. 1st ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2003. P. 291-309.
- Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104: 937-954.
- Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. Mamíferos do Brasil, Londrina, Paraná. 2006.
- Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. Am J Trop Med Hyg 1999; 61(4): 530 – 541.
- Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Davies CR. Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in dog blood and bone marrow. J Clin Microbiol 2000; 38: 748–751.
- Reithinger R, Espinoza JC, Davies CR. The transmission dynamics of canine American cutaneous leishmaniasis in Huanuco, Peru. Am J Trop Med Hyg 2003; 69: 473–480
- Reithinger R, Dujardin JC. 2007a. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. J Clin Microbiol 45(1): 21–25.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. 2007b. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis 7(9): 581-596.
- Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macêdo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. Am J Trop Med Hyg 2001; 65(5):456-465.
- Romero GA, Noronha EF, Pirmez C, Pires FDOE, Fernandes O, Nehme NS, et al. Sensitivity and reproducibility of a PCR assay for *Leishmania* detection using skin biopsy imprints on filter paper. Acta Trop 2009; 109(1): 74-77.
- Rotureau B, Ravel C, Nacher M, Couppié P, Curtet I, Dedet JP et al. Molecular epidemiology of *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in French Guiana. J Clin Microbiol. 2006; 44(2): 468-473.
- Ryan PR, Arana BA, Ryan JR, Wirtz RA, Wortmann GW, Rizzo NR. The domestic dog, a potential reservoir for *Leishmania* in the Peten region of Guatemala. Vet Parasitol 2003; 115: 1–7.
- Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. Annu Rev Microbiol. 2001; 55:453-83.
- Santiago MEB, Vasconcelos RO, Fattori KR, Munari DP, Michelin AF, Lima VMF. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban áreas in Bauru (São Paulo, Brazil). Vet Parasit 2007; 150: 283-290.

Schallig HDFH, Da Silva ES, Van Der Maide WF, Schoone GJ, Gontijo CMF. *Didelphis marsupialis* (Common Opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil), Vector-Borne Zoon Dis 2007; 7: 387–393.

Schönian G, Akuffo H, Lewin S, Maasho K, Nylén S, Pratlong F, Eisenberger CL, Schnur LF, Presber W. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. Mol Biochem Parasitol 2000; 106(2): 239-248.

Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 47(1): 349-358.

Schriefer A, Schriefer ALF, Góes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, et al. Multiclonal *Leishmania braziliensis* Population Structure and Its Clinical Implication in a Region of Endemicity for American Tegumentary Leishmaniasis. Infect Immun 2004; 72(1): 508–514.

Schriefer A, Guimarães LH, Machado PR, Lessa M, Lessa HA, Lago E, et al. Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil. Emerg Infect Dis. 2009; 15(6): 871-876.

Silva ACT, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GAS. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. Trop Med Internat Health 2006; 9: 1388-1398.

Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1975; 69: 323-335.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky MJr, Grimaldi G. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. VI – Investigações sobre reservatórios silvestres e comensais. Rev Soc Bras Med Trop 1988; 21: 23-27.

Shimabukuro PHF, Silva TRR, Ribeiro FOF, Baton LA, Galati EAB. Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of São Paulo, Brazil. Parasit Vectors 2010; 3:121.

Silva ACT, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GAS. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. Trop Med Internat Health 2006; 9: 1388-1398.

Silva LMR, Cunha PR. A urbanização da leishmaniose tegumentar americana no Município de Campinas – São Paulo (SP) e região: magnitude do problema e desafios. An Bras Dermatol 2007; 82: 515-9.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; (99): 239-235.

Souza WJS, Sabroza PC, Santos CS, de Sousa E, Henrique MF, Coutinho SG. Montenegro skin tests for American cutaneous leishmaniasis carried out on school children in Rio de Janeiro, Brazil: an indicator of transmission risk. *Acta Trop* 1992; 52: 111-119.

Travi BL, Osorio Y, Becerra MT, Adler GH. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 275-278.

Travi BL, Tabares CJ, Cadena H. *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in two Colombian dogs: a note on infectivity for sand flies and response to treatment. *Biomedica* 2006; 26 (1): 249–253.

Turetz ML, Machado PR, Ko AL, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis* 2002; 186(12): 1829-1834.

Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Fe-Filho NM, Queiroz RG, Santana EW, Bozza M, et al. The identify of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturite, Northeastern Brazil. *Am Jour Trop Med Hyg* 1994; 50: 158-164.