

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE FORMIGA – UNIFOR-MG
CURSO DE BIOMEDICINA
JEFERSON KELVIN ALVES DE OLIVEIRA SILVA

**PREVALÊNCIA DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO
DE IGUATAMA-MG: AVALIAÇÃO ENTRE DUAS METODOLOGIAS DE
DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO**

FORMIGA - MG

2017

JEFERSON KELVIN ALVES DE OLIVEIRA SILVA

PREVALÊNCIA DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE
IGUATAMA-MG: AVALIAÇÃO ENTRE DUAS METODOLOGIAS DE
DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Formiga – UNIFOR-MG, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dr. Fernando Sérgio Barbosa

FORMIGA - MG

2017

S586 Silva, Jeferson Kelvin Alves de Oliveira.

Prevalência de Leishmaniose Visceral Canina no município de Iguatama-MG: avaliação entre duas metodologias de diagnóstico imunológico / Jeferson Kelvin Alves de Oliveira Silva. – 2017.

46 f.

Jeferson Kelvin Alves De Oliveira Silva

PREVALÊNCIA DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE
IGUATAMA-MG: AVALIAÇÃO ENTRE DUAS METODOLOGIAS DE
DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Biomedicina do Centro Universitário de
Formiga – UNIFOR-MG, como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Dr. Fernando Sérgio Barbosa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Sérgio Barbosa
Orientador

Prof. Dr^a. Daniela Rodrigues de Faria Barbosa
UNIFOR-MG

Prof. Tânia Aparecida de Oliveira Fonseca
UNIFOR-MG

Formiga, 27 de Outubro 2017.

Dedico este trabalho ao avanço científico.

AGRADECIMENTOS

“Se vi mais longe foi por estar em pé sobre ombros de gigantes” – Isaac Newton

Ao estimado Dr. Fernando Sérgio Barbosa por toda dedicação, ajuda, orientação, tempo e confiança investidos em mim. Obrigado! Sua presença foi indispensável para esta realização.

A Talita Vaz Pereira e Dr. Gilberto Fontes pela incrível oportunidade de fazer ciência com vocês, os momentos em campo jamais serão esquecidos.

Aos professores, Dr. José Barbosa Júnior e Dr^a. Daniela Rodrigues de Faria Barbosa pelo carinho e por serem promotores da minha inserção no meio científico.

Um agradecimento especial aos professores Dr. Willian de Freitas Carvalho, Dr. Pascoal José Gaspar Júnior e Dr^a. Lília Rosário Ribeiro por me direcionarem a ter uma visão mais clara e crítica da prática clínica.

A Ana Paula Alves Santos por ser um exemplo de profissional, assim como o Professor Renato Ângelo da Silva e a Professora Mariana Carolinny Ferreira que esteve sempre presente e nos ensinou a sermos gratos pela profissão que exercemos.

Aos meus amigos de classe, em especial Edmilson José e Tayná Oliveira, obrigado por todos os momentos e por fazerem com que estes anos fossem mais fáceis de se passar.

Agradeço a minha parceira Jordânia Costa por todas ideias arquitetadas, planos mirabolantes e agradáveis discussões científicas durante este período, que nossa amizade continue.

Sou grato aos meus pais, Jarbas José da Silva e Lucilene Alves de Oliveira Silva por confiarem nos meus objetivos, mesmo sem entenderem, e abdicarem dos seus sonhos para tornar o meu possível. Aos meus parentes e familiares pelas boas intenções emanadas.

Ao meu amigo Cristian Felipe por me instigar a sempre ir mais longe, bem como João Paulo e Rafael Rodrigues por estarem sempre ao meu lado.

Aos amigos de vida e do ensino médio, Alef, Bruno Gusmão, Diego, Gabriela, Isabela, Pamela e Tulio, sei que vocês entendem a minha ausência.

Aos colegas da LABMED – Laboratório Mauricéa Pieroni, pela oportunidade, paciência, ensinamentos e momentos de aprendizado desenvolvidos com vocês. Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A Leishmaniose é uma doença onde os indivíduos podem desenvolver os sinais, sintomas e características imunológicas da condição parasitária do protozoário descrito no gênero *Leishmania*. Esta parasitose é um grave problema na saúde pública mundial, já que está presente em aproximadamente 98 países atingindo cerca de 350 milhões de indivíduos em grande parte do globo, além de ser uma doença endêmica em várias regiões do Brasil. Considerado um parasito de ciclo heteroxênico, apresentando os insetos do gênero *Lutzomyia* como vetor, sendo o *Lutzomyia longipalpis* o mais importante na disseminação da parasitose no Brasil; O *Leishmania sp.* também aproveita de outros animais para manter a existência da espécie bem como no processo de transmissão aos humanos, fazendo com que outros mamíferos e principalmente os cães sirvam de reservatório. Nestas circunstâncias, os objetivos deste trabalho foram estimar a prevalência de casos positivos de LVC no município de Iguatama-Minas Gerais; avaliar os principais sinais clínicos apresentados nos cães e verificar a concordância de diagnóstico entre as duas metodologias DPP® e ELISA. Foi estudada exclusivamente a população canina domiciliar urbana do município de Iguatama-MG, onde os resultados foram classificados em 'reagentes' e 'não reagentes'. Posteriormente foi utilizado o cálculo de *Kappa* para analisar a concordância de ambas as técnicas. A prevalência de LVC encontrada foi 7,4%. Ressalta-se a importância de uma vigilância epidemiológica no município, bem como examinar o protocolo atual para diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina.

Palavras-chave: Diagnóstico. Epidemiologia. Leishmaniose.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease in which an individual encounters the development of signs, symptoms and immunological characteristics of the parasitic condition of the protozoan described without genus *Leishmania*. This parasitosis is a serious problem in the world's public health, it is present in approximately 98 countries that generate about 350 million dollars in great part of the globe, besides being a final illness in several regions of Brazil. Considered a parasite of heteroxenic cycle, presenting the insects of the genus *Lutzomyia* as vector, being *Lutzomyia longipalpis* the most important in the dissemination of parasitosis in Brazil; *Leishmania* sp. is also approved of other animals to maintain the existence of the species as well as the process of human transmission, making other mammals and especially dogs serve as reservoir. In these circumstances, the objectives of this study were to estimate the prevalence of positive cases of LVC in the municipality of Iguatama-Minas Gerais; Evaluation of the main apical clinical trials in dogs and to verify the diagnostic agreement between the two DPP[®] and ELISA methodologies. It was studied exclusively an urban domiciled canine population of the municipality of Iguatama-MG, where the results were classified as 'reagents' and 'non-reagents'. Subsequently it was used or calculated from *Kappa* to analyze the agreement of both techniques. A prevalence of LVC found was 7.4%. We emphasize the importance of epidemiological surveillance in the municipality, as well as to examine the current protocol for the diagnosis of Visceral Canine Leishmaniasis.

Keywords: Diagnosis. Epidemiology. Leishmaniasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação geográfica da localização do município de Iguatama- MG.....	23
Figura 2 – Materiais fornecidos pelo <i>Kit</i> de Imunocromatografia rápida – DPP.....	27
Figura 3 – Representação dos possíveis resultados observados no teste DPP®.....	28
Figura 4 – Representação da montagem da placa para o teste de ELISA.....	29
Figura 5 – Vista aérea parcial do município de Iguatama-MG.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tamanho de Amostra (n. ° de cães) segundo a população canina estimada no setor e prevalência canina esperada, para um nível de significância de 5%.....	24
Tabela 2 – Cálculo amostral do número de cães a serem examinados em cada bairro da cidade (área urbana) de Iguatama-MG.....	25
Tabela 3 – Modelo de tabela de contingência para realização do teste <i>Kappa</i>	31
Tabela 4 - Resultados observados em 270 espécimes caninas, obtidas pela realização da técnica de DPP® e ELISA, em um inquérito realizado no município de Iguatama-MG....	33
Tabela 5 – Tabela de contingência dos resultados obtidos do soro de 270 cães examinados pelas técnicas de DPP® e ELISA para diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina no município de Iguatama-MG.....	33

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Interpretação de <i>Kappa</i>	31
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCO – Campus Centro Oeste

CDC – Central Disease Control

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animal

CO – *Cut-off*

COBEA – Conselho Brasileiro de Experimentação Animal

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DPP – Dual Path Plataphorm

DTN – Doenças Tropicais Negligenciadas

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FIOCRUZ – Fundação Osvaldo Cruz

FUNED – Fundação Ezequiel Dias

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LC – Leishmaniose Cutânea

LD – Leishmaniose Dérmica

LDPK – Leishmaniose Dérmica Pós-kala-azar

LMC – Leishmaniose Mucocutânea

LV – Leishmaniose Visceral

LVA – Leishmaniose Visceral Americana

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

MG – Minas Gerais

PAHO – Pan-American Healthly Organization

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PEAa – Programa de Erradicação do *Aedes aegypti*

RIFI – Reação Imunofluorescente Indireta

RPM – Rotações Por Minuto

SUS – Sistema Único de Saúde

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TMB - Tetrametilbenzidina

UFSJ – Universidade Federal de São João Del Rei

WHO – World Healthly Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	18
2.1. Aspectos Históricos	18
2.2. Ciclo da Leishmaniose	19
2.3. Características Epidemiológicas	19
3 JUSTIFICATIVA	21
4 OBJETIVOS	22
4.1. Objetivo Geral	22
4.2. Objetivos específicos	22
5 MATERIAIS E MÉTODOS	23
5.1. Esboço do estudo	23
5.2. Área de estudo	23
5.3. População canina estimada	23
5.4. Cálculo amostral	24
5.5. Aspectos ético-legais	25
5.6. Termo de consentimento livre esclarecido	25
5.7. Coleta de sangue canino	26
5.8. Pesquisa Sorológica	26
5.8.1. Teste de imunocromatografia rápida = DPP®	26
5.8.2. Ensaio Imunoenzimático - ELISA	28
5.9. Estudos complementares	30
5.10. Análise Estatística	31
6 RESULTADOS	32
6.1. Características da amostra e positividade	32
6.2. Sinais clínicos associados a positividade	32
6.3. Comparação das técnicas de Diagnóstico sorológico	32
7 DISCUSSÕES	34
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36

REFERÊNCIAS	37
ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	42
ANEXO B – Ficha de Avaliação Clínica	43
ANEXO C – Dados da campanha de vacinação de 2016.	44
ANEXO D – Tabela para sorteio de números aleatórios.....	45
ANEXO E – Certificado de aceite pelo comitê de Ética.....	46

1. INTRODUÇÃO

Diversas doenças foram disseminadas no novo continente através das viagens da capitania portuguesa e do descobrimento das Américas no século XVI, (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003). Artefatos oriundos da época retratam imagens de pessoas afetadas por deformações similares as lesões provocadas em indivíduos com Leishmaniose, o que evidencia a existência secular desta doença (LAINSON, 2010).

A Leishmaniose visceral (LV), também conhecida como Doença de Calazar, é uma zoonose provocada por diversos parasitos descritos dentro do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), esta doença é frequentemente encontrada na região europeia, e em países localizados nas zonas tropicais e subtropicais do globo (CDC, 2013).

Esta parasitose pode ser considerada de quatro formas diferentes de acordo com o agente, região do corpo acometida e virulência da cepa, sendo estas: Leishmaniose Visceral (LV), Leishmaniose Dérmica (LDPK – Leishmaniose Dérmica pós-kala-azar), Leishmaniose Mucocutânea (LMC) e Leishmaniose Cutânea (LC), além de também serem classificadas através do seu reservatório, humanos e não humanos como doenças antroponozoonóticas ou zoonóticas respectivamente (WHO, 2016).

O meio de transmissão mais comum ao homem e animais é quando fêmeas de flebotomíneos, da família Psychodidae, principalmente da espécie *Lutzomyia longipalpis* realizam a hematofagia. Estes insetos estão presentes nas regiões Sudeste, Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil, e recentemente há relatos de que *Lu. cruzi* no estado de Mato Grosso do Sul e a espécie *Pintomyia fischeri* em São Paulo, estejam envolvidos na transmissão da doença, ou seja, um vetor em potencial (GONTIJO e MELO, 2004; BRASIL 2006; GALVIS-OVALLOS, 2017).

A LV acomete populações marginalizadas que vivem em extrema pobreza e níveis de instrução e recursos inferiores, sendo listada como uma doença pertencente ao grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) (PAHO, 2014; BARATA et al., 2013).

A condição da endemidade para esta parasitemia é alarmante, pois está presente em 98 países e territórios, expondo cerca de 350 milhões de pessoas (PAHO, 2014); desde o ano de 2013 há relatos com número de casos autóctones que averiguam a incidência e prevalência desta parasitemia em diferentes países (WHO, 2017).

Apesar da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) ser provocada pelo *L. infantum* (SOLCÀ, et. al., 2014), outras espécies estão envolvidas no desenvolvimento desta parasitemia em diferentes regiões do mundo, na região asiática principalmente no

Nepal e Bangladesh assim como na Índia o agente causador é *L. donovani*, provocando mil novos casos nestes três países em 2010 (PICADO et. al., 2014).

Estima-se que 75% dos casos formalmente notificados estão reunidos em apenas 10 países, sendo que quatro destes estão localizados na América Latina (PAHO, 2014). Grande parte dos países que dividem fronteira com o Brasil notificam os casos de infecção. Na Colômbia apesar de não haverem programas de erradicação da LV, o número de casos tem diminuído, entretanto a presença do vetor é um grande problema epidemiológico, fazendo com que o risco de adquirir a doença seja aumentado (GONZÁLEZ, PAZ e FERRO, 2014).

No Brasil a Leishmaniose Visceral (LV) era mais comumente encontrada em áreas rurais, entretanto essa realidade já é obsoleta e nos últimos 25 anos o número de casos nacionais notificados aumentaram aproximadamente 70% assim como as chances de disseminação. (BRASIL, 2016). Isso pode ser levado em consideração devido ao desmatamento, condições migratórias, razões econômicas e sociais, bem como o êxodo rural favorecendo o aparecimento de novos focos devido à expansão da área endêmica (ACOSTA et al., 2013; BRASIL, 2006).

Além de parasitar humanos, o *Leishmania* sp. também utiliza outros vertebrados como reservatórios; o cão doméstico (*Canis familiares*) e a raposa (*Lycalopex vetulus*). Entretanto, ressalta-se o fato de que o inseto vetor *Lu. longipalpis* (LUTZ & NEIVA, 1912) tem maior antropofilismo (DANTAS-TORRES, 2006; DEANE e DEANE, 1955).

Por apresentar um ciclo epidemiológico complexo que envolve diversos fatores na transmissibilidade da doença, associado aos hábitos caninos que se tornaram sinantrópicos, a combinação entre o ciclo doméstico e o ciclo silvestre foi facilitada, entretanto pesquisas ainda devem ser feitas em relação aos meios de transmissão envolvendo o vetor, pois pouco se sabe sobre sua biologia (GONTIJO e MELO, 2004).

O maior problema na transmissão da parasitose são os canídeos, que além de albergarem o agente podem desenvolver a patologia fazendo com que as estratégias e erradicação se tornem difíceis, principalmente pelo fato de alguns proprietários não sabem lidar com o fim dado ao animal depois de diagnosticado, e mesmo quando compreendem a necessidade da eutanásia, adquirem outros animais e os mantém em condições de baixo zelo propiciando assim a possível continuação do ciclo da Leishmaniose (GONTIJO e MELO, 2004; MENEZES et al., 2016; BORGES et al., 2009).

Outra circunstância que dificulta o controle da doença é o fato dos flebotomíneos manterem seus hábitos próximos às residências, em comparação com áreas de mata fechada, o levantamento de dípteros próximos às imediações urbanas foi seis vezes superior, sendo que 17% dos apurados estavam na região intradomiciliar e 65% na região peridomiciliar. (REBELO et al., 1999). A presença do inseto vetor anexada as condições de cuidados dos cães estão intimamente ligadas ao aumento nos números de casos de LV assim como a urbanização desta parasitose (BORGES et al., 2009).

Visando a melhoria da situação epidemiologia e morbimortalidade da LV, o controle desta parasitemia aborda ações que tangem desde o tratamento de infecções humanas tal como a redução na população de reservatórios e vigilância entomológica. Entretanto, a identificação das populações suspeitas de estarem infectadas com o parasito, seja no diagnóstico clínico ou laboratorial, possuem limitações de importância, como sintomatologia, sensibilidade e especificidade relativa ou ainda meios invasivos (BRASIL, 2006).

O diagnóstico de cães suspeitos de infecção até 2011, era realizado através do protocolo ELISA/RIFI pelo Ministério da Saúde, entretanto um novo parecer deste mesmo órgão estabeleceu que os testes de diagnósticos devem ser realizados através do protocolo DPP[®]/ELISA, estando sua eficácia comprovada por estudos recentes (BRASIL, 2011; FARIA, 2014).

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1. Aspectos Históricos

No ano de 1893, o cirurgião militar William Boog Leishman, em pesquisa na cidade de Londres começou a estudar formas amastigotas, até então denominadas de ‘pequenos corpos ovais’, encontradas no baço de um soldado que sofria de febre baixa, disenteria e caquexia, este indivíduo foi avaliado e apresentava características da “febre de Dum-Dum” (ALTAMIRANDO-ENCISO, 2003; ROSS, 1903; LEISHMAN, 1893).

No ano de 1903, o médico Charles Donovan que pesquisava as formas da malária, através de estudos *post mortem* associou a presença de um parasito com a “febre de Dum-Dum” também conhecida como calazar (Kala-Azar), entretanto a identificação prévia foi feita ao pensar que eram degenerações das células do baço e só após ler o artigo de Leishman correlacionou o fato (ROSS, 1903).

Em meados de novembro de 1903, o médico Ronald Ross através de lâminas coradas com Romanowsky enviadas por Donovan discordou de Leishman ao classificar os corpos intracelulares como a desintegração de tripanossomos, e sugeriu tratar-se de um novo organismo quando associado aos sintomas (ROSS, 1903; ROSS, 1903).

Na procura em identificar de que espécie tratava-se este organismo, o médico Larevan também concordou que as formas ovais não tratavam-se de involuções de tripanossomos, entretanto devido a sobreposição celular imaginou tratar-se de um parasito que também se alocasse nas hemácias e afirmou erroneamente em classificá-lo em *Piroplasma donovani*, que não foi aceito, diferente a sugestão de Ross que o denominou de *Leishmania donovani* em homenagem aos primeiros pesquisadores (ALTAMIRANDO-ENCISO, 2003; ROSS, 1903).

O primeiro caso Leishmaniose Visceral Humana (LVH) registrado em terras brasileiras ocorreu no ano de 1913, quando Migone, ao avaliar o material de uma necrópsia em um paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso descreveu tratar-se de LVH (ALENCAR *et al.* 1991 *apud* MS, 2006).

O agente etiológico da LV no Brasil ainda é um tema de bastantes discussões em meio científico, pois existem alguns autores que consideram as espécies *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi* sendo responsáveis pela

propagação da condição parasitária no Velho e Novo Mundo, respectivamente (BRASIL, 2006; FARIA, 2014).

2.2. Ciclo da Leishmaniose

A Leishmaniose é transmitida quando fêmeas do flebotomíneos realizam o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado liberando as formas infectantes, promastigotas. Já em contato com elementos sanguíneos as formas promastigotas são endocitadas pelos macrófagos e outras células do sistema mononuclear, transformando-se em formas amastigotas que se multiplicam através de bipartição e difundem-se por todo o organismo. Quando há novo repasto pelos flebotomíneos, as formas amastigotas presentes nos macrófagos são ingeridas pelo inseto vetor e no seu intestino se desenvolvem em formas promastigotas, e posteriormente em formas paramastigotas que colonizam o esôfago e a faringe do vetor, permanecendo aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas e migram novamente para a probóscide do inseto para dar continuidade ao ciclo (BRASIL, 2006; CDC, 2013).

2.3. Características Epidemiológicas

A Leishmaniose Visceral Humana é considerada um grande problema de saúde pública mundial, principalmente quando se diz respeito às suas altas taxa de morbimortalidade e distribuição geográfica que corroboram para classificá-las em uma Doença Tropical Negligenciada (PAHO, 2013).

Os indivíduos que estão infectados com Leishmaniose apresentam variações na sintomatologia e das condições hematoimunológicas, com variações interindividuais podendo apresentar ou não os sintomas com quadro clássicos de manifestações hemorrágicas, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, perda ponderal com episódios febris e anemia, que quando não tratados precocemente podem ocasionar o óbito (PAHO, 2013; BRASIL, 2006).

Responsável por afetar cerca de 350 milhões de pessoas em diversas áreas do globo, está presente em aproximadamente 98 países, além de ter a sua presença associada ao clima temperado dos trópicos, fazendo com que esta parasitose esteja intimamente implantada no Brasil (WHO,2017).

Nas Américas, entre os anos de 2001 e 2011 houve a notificação de 38.808 casos de LVH, dentre estes, 96,6% foram registrados no Brasil (PAHO, 2013). Entretanto, o número de casos que ocorrem no mundo na verdade deve ser superior a esta estimativa já que podem existir fatores que impliquem nesta quantificação, principalmente em países onde a notificação desta doença não seja obrigatória ou ainda haja zonas com focos amplamente dispersos (Desjeux, 2004 *apud* Faria, 2014).

Em dez anos, o número de casos de LV nacionais reduziu em 9%, anteriormente em 2005 o número de casos era de 3.597 e dez anos após os casos caíram para 3.289, mas ainda assim o número é agravante (BRASIL, 2017).

3. JUSTIFICATIVA

Um dos grandes problemas que a saúde pública brasileira enfrenta nas cidades interioranas, é a dificuldade que o Sistema Único de Saúde (SUS) tem em efetivar os protocolos propostos para vigilância epidemiológica, seja esse empecilho causado pela não ação correta dos servidores, falta de programas de capacitação ou ainda pela ausência no repasse de subsídios pelas esferas municipais.

No município de Iguatama-MG foi ressaltada uma alta prevalência de Leishmaniose em um inquérito realizado por Faria (2014). Diante disso considera-se esta, uma região ideal para mensurações adequadas da validade e reprodutibilidade de testes rápidos no diagnóstico da LVC, que são comercializados no mercado.

A utilização destes ensaios são de extrema relevância no que diz respeito no funcionamento da vigilância epidemiológica. Vendo que é através destas análises sorológicas que a relação de prevalência da doença no município é estimada, este estudo visa investigar o desempenho dos testes no ambiente laboratorial.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Analisar os testes sorológicos DPP[®] e ELISA para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina (LVC).

4.2. Objetivos específicos

- a) Estimar a prevalência de casos positivos de LVC no município de Iguatama-Minas Gerais;
- b) Avaliação dos principais sinais clínicos apresentados nos cães
- c) Verificar a concordância diagnóstica entre as duas metodologias DPP[®] e ELISA;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Esboço do estudo

Trata-se de um estudo quantitativo transversal efetivado com base em uma amostra do tipo estratificada por conglomerado de caráter não controlado no município de Iguatama – Minas Gerais para comparar os testes de diagnósticos bem como a prevalência de LVC. O trabalho em campo foi realizado entre fevereiro e maio de 2017.

5.2. Área de estudo

As colheitas das amostras de sangue canino foram realizadas no município de Iguatama que está localizada na região central do estado de Minas Gerais (20° 10' 27"S 45° 42' 41"W) (FIG. 1), com os municípios limítrofes de Arcos, Doloresópolis, Luz e Bambuí. Sua população estimada é de 8.031 habitantes distribuídos 6.716 no perímetro urbano e 1.315 na zona rural em uma área territorial de 628,2 Km² (IBGE, 2010).

Figura 1 – Representação geográfica da localização do município de Iguatama-MG.



Fonte: Abreu, R. L, 2014.

5.3. População canina estimada

O número de cães presentes no perímetro urbano é estimado com base na última campanha de vacinação antirrábica realizada em 2016, totalizando 885 cães e uma relação

populacional humana/canina de 12,7% ou $\cong 1$ animal para cada sete humanos (ANEXO C).

5.4. Cálculo amostral

Devido aos limites territoriais do município não serem extensos o cálculo da amostra para o estudo contou com a inclusão de todos os bairros localizados na zona urbana constituindo o produto da amostragem, onde estes estratos formam o setor do PEAa (Programa de Erradicação do *Aedes aegypti*) e os quarteirões os conglomerados (BRASIL, 2006).

Nos municípios onde não é conhecida a prevalência de animais infectados com o parasito, é preconizado para calcular o tamanho da amostra uma taxa de prevalência igual a 2% (BRASIL, 2006). Entretanto, o dado utilizado para cálculo amostral é de 8,3% de acordo com o inquérito populacional realizado no ano de 2013 (FARIA, 2014).

Seguindo as recomendações do Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral, o tamanho da amostra será calculado de acordo com a população canina estimada e população canina esperada, dados estes contidos na tabela de prevalência esperada/observada considerando um nível de significância de 5% (Tabela 1). Deste modo, observando os elementos tabelados, serão amostrados no município um total de 270 cães, sendo a população estimada superior a 1000 animais e prevalência esperada de 2,1 a 3,0%.

Tabela 1: Tamanho de amostra (n.º de cães) segundo a população canina estimada no setor e prevalência canina esperada, para um nível de significância de 5%.

População Estimada no Setor	Prevalência Esperada/Observada ($\leq 0,05$) $\alpha = 0,05$						
	$\leq 1,0$	1,1 – 2,0	2,1 – 3,0	3,1 – 4,0	4,1 – 5,0	5,1 – 9,9	$\geq 10,0$
500 – 599	356	300	240	212	184	137	108
600 – 699	430	334	272	228	196	144	112
700 – 799	479	363	291	242	206	149	115
800 – 899	524	388	306	252	214	153	118
900 – 999	565	410	320	262	220	157	120
± 1000	603	430	332	269	226	159	121

Fonte: BRASIL, 2006.

Para cada estrato foi realizado um sorteio de conglomerados utilizando de um conjunto de tabelas de números aleatórios (ANEXO D), a coleta teve início sistematicamente de forma a visitar a residência mais ao norte e ao leste, saltando a seguinte, atingindo 50% dos imóveis ao fim da busca ativa pelo número de cães calculados (Tabela 2), obtendo uma amostra espacial mais homogênea e desqualificando a possibilidade de dados viciados (BRASIL, 2006).

Tabela 2 - Cálculo amostral do número de cães a serem examinados em cada bairro da cidade (área urbana) de Iguatama-MG.

Nº	Estratos (Bairros)	População	Nº de Conglomerados	Nº de cães esperados	Nº de cães a serem examinados
1	Alto São Francisco	548	10	110	32
2	Bela Vista	1.079	36	216	29
3	Capoeira	277	6	55	17
4	Centro	2349	75	470	74
5	Cidade Nova	623	19	125	13
6	Garças de Minas	497	28	99	26
7	Jardim Paraíso	774	24	155	23
8	Perdizes	247	11	49	19
9	Pio XII	1.051	19	210	37
TOTAL		7.445	228	1489	270

Fonte: Dados do Programa de Controle da Febre amarela e Dengue do município de Iguatama-MG.

5.5. Aspectos ético-legais

A realização do projeto de pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São João Del Rei – Campus Dona Lindu - CEUA-UFSJ, sob protocolo nº 028/2016 (ANEXO E). Todos os procedimentos de coleta do material foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), além de seguir as normas prescritas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

5.6. Termo de consentimento livre esclarecido

Durante as visitas nas residências os membros da equipe de pesquisa conversaram com os tutores dos animais e explicaram qual o intuito e objetivo da pesquisa

evidenciando os benefícios e possíveis riscos em participar do projeto. Caso houvesse a concordância, o tutor do animal assinava o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para autorização da colheita do sangue (ANEXO A).

5.7. Coleta de sangue canino

A equipe de pesquisa visitou o imóvel sorteado e foi realizada a avaliação clínica do cão em busca de sinais e histórico de mudança de comportamento em conversa com o tutor do animal (ANEXO B). Logo em seguida do preenchimento da ficha clínica o cão foi contido com o uso de guia e focinheira para não ferir o animal e garantir a segurança da equipe. Posteriormente com uma seringa hipodérmica foi coletada a quantidade de 5 mL de sangue da veia cefálica dianteira para cães de grande porte ou na veia jugular para cães de médio e pequeno porte.

Após colheita o sangue foi transferido da seringa para o tubo de ensaio sem anticoagulante ou ativador de coágulos, previamente identificados por nome e número idêntico ao presente na ficha clínica do animal. No laboratório as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a uma velocidade de 3000rpm para alcance do soro, estes posteriormente foram armazenados a uma temperatura negativa de -20°C, e logo após os testes imunológicos foram realizados.

5.8. Pesquisa Sorológica

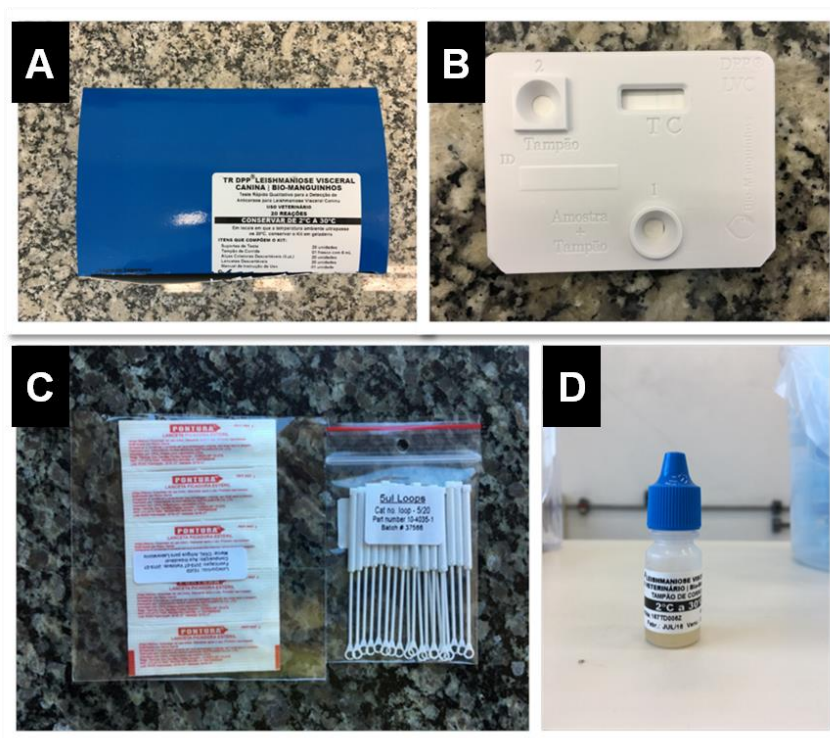
Todos os testes foram realizados no laboratório de Parasitologia e Imunologia da Universidade Federal de São João Del Rei – Campus Centro-Oeste (CCO), credenciado junto a Fundação Ezequiel Dias (FUNED) como unidade referência no diagnóstico de Leishmaniose Canina no Centro-Oeste Mineiro.

5.8.1. Teste de imunocromatografia rápida = DPP®

A realização dos testes de Imunocromatografia rápida DPP® -FIOCRUZ/Bio-Manguinhos, foi devidamente realizado em ambiente laboratorial controlado, livre de contaminações, mudanças extremas de temperaturas seguindo as regras de biossegurança e recomendações do fabricante.

- As plataformas de corrida, testes individuais (FIG. 2), que estiveram armazenados sobre refrigeração foram colocadas sobre uma superfície plana e limpa até que alcancem temperatura ambiente.

Figura 2 – Materiais fornecidos pelo *Kit* de Imunocromatografia rápida – DPP



A – Enquadramento da superfície externa da embalagem do *Kit* DPP®; B – Plataforma de corrida para realização do teste; C – Lancetas e alças de coleta para trabalho em campo; D – Reagente Tampão.

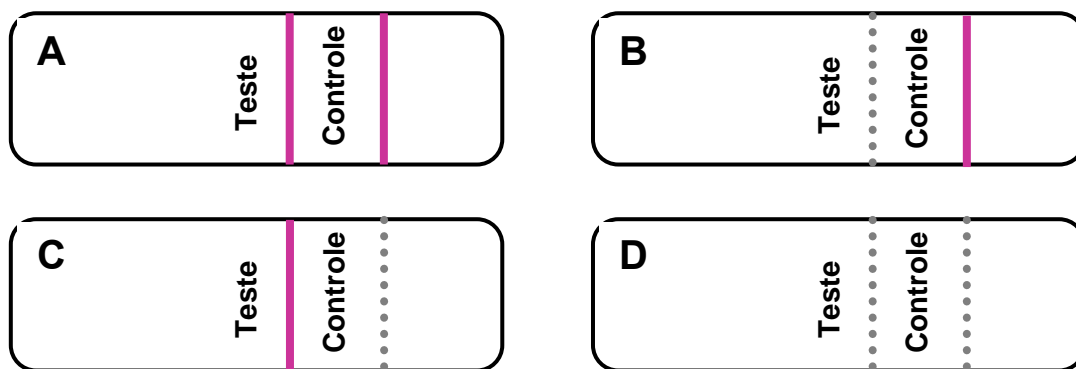
Fonte: Arquivo Pessoal

- O *Kit* é munido de 20 plataformas de corrida, 1 tampão de corrida e 20 alças coletoras.
- As plataformas foram retiradas do envelope plástico laminado, e com caneta/pincel permanente foram devidamente identificadas com nome ou número do cão em que o teste foi aplicado. Após isso a integridade dos testes e seus componentes foram verificados, bem como a existência de 2 linhas azuis na janela de teste do suporte, não houveram casos de discrepância do teste, descartando a comunicação ao fabricante.
- Com auxílio de uma pipeta volumétrica automática de capacidade regulável entre 5 μ L e 50 μ L, da marca ‘Eppendorf’, a quantidade de 5 μ L

do soro canino foi colocada no poço #1, e logo em seguida duas gotas do tampão também foram colocadas no mesmo poço. Depois de verificar se o Tampão+Amostra escorreu pela janela do teste apagando as linhas azuis aguardou-se 5 minutos.

- Passado 5 minutos, quatro gotas do tampão foram colocadas no poço #2, então a leitura somente foi realizada após 10 minutos.
- A leitura do teste seguiu as recomendações do fabricante, ou seja, quando linha controle ascende significa integridade da plataforma e validade do ensaio, observações diferentes a essa na área teste inviabilizará o procedimento (FIG. 3).

Figura 3 – Representação dos possíveis resultados observados no teste DPP®.



A – Teste ‘POSITIVO’; B – Teste ‘NEGATIVO’; C – Teste ‘INVALIDO’; D – Teste ‘INVALIDO’.

Fonte: Arquivo Pessoal

- Na marca teste, a linha pode ser evidenciada ou não, utilizando assim a classificação ‘positivo’ ou ‘negativo’ respectivamente (FIG.3).

5.8.2. Ensaio Imunoenzimático - ELISA

Para a realização do teste de ELISA, o *Kit* utilizado foi o EIE – LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, fabricado pela empresa Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, e assim como recomendado foi executado em ambiente laboratorial livre de possíveis contaminações e interferentes externos.

- O *Kit* contém Diluente de Amostra/Conjugado, Lecitina de leite, Tampão de Lavagem, Diluente do Substrato, Cromógeno (TMB -

Tetrametilbenzidina), Substrato (H_2O_2), Ácido Sulfúrico, Controle Positivo, Controle Negativo, Conjugado, Molduras c/ 6 *strips* duplas sensibilizadas, Folhas Adesivas.

- Os *Kits* que estavam sob refrigeração e após espera atingiram a temperatura ambiente para realização do teste.
- Todas as placas seguiram o mesmo critério de montagem (FIG. 4) sendo o primeiro e segundo poço #1/#2 (A-1 e B-1) preenchidos com o Controle Positivo, os poços #3 e #4 (C-1 e D-1) com o Controle Negativo, os poços #5 e #6 (E-1 e F-1) com o Branco (Diluyente da Amostra+Conjugado).

Figura 4 – Representação da montagem da placa para o teste de ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Fonte: Arquivo Pessoal

- O diluyente foi preparado para 96 reações, utilizando 14mL do Diluyente da amostra/conjugado, 1,4g de Lecitina de Leite e 56mL de Água destilada, assim como recomendado pelo fabricante.
- Assim como os controles, as amostras caninas analisadas foram diluídas na proporção de 1:100, ou seja, 5 μ L da amostra em 500 μ L do Diluyente da Amostra/Conjugado, dando continuidade no preenchimento dos poços, sempre de 'A' para 'H' e '1' para '12' (FIG. 4).

- Depois de aplicada todas as amostras na placa, a mesma permaneceu selada com a folha adesiva disponibilizada no *Kit* e incubada por 30 minutos a uma temperatura de 37°C, e posteriormente lavados seis vezes com o preparado do tampão de lavagem.
- Depois de lavadas, e com o conjugado previamente diluído, 100µL dessa diluição estas foram distribuídas por todos os poços homogeneizando bem.
- Com a solução do substrato preparada momentos antes e reservada em recipiente escuro, 100µL da solução foram distribuídos rapidamente em cada orifício e incubado em temperatura ambiente reservados da luz durante 30 minutos.
- Antes de realizar a leitura espectrofotométrica, a reação foi bloqueada pela solução de Ácido Sulfúrico 2M, adicionando em cada orifício 50µL.
- A Leitura foi feita em espectrofotômetro adaptado a um filtro de 450nm dispensando o uso do filtro de referência (620nm-630nm).
- O cálculo do ponto de corte (*cut-off* - CO) foi feito através da multiplicação do triplo da média da densidade óptica dos orifícios do controle negativo ($CO = 3\bar{X} CN$).
- Também foi calculada a “faixa cinza” (FC), que corresponde ao intervalo de testes com valores indeterminados ($FC = 1,2CO$). As amostras foram consideradas reagentes quando apresentavam densidade óptica igual ou superior ao valor expresso na “faixa cinza”, interpretada inversamente para as amostras não reagentes, bem como as amostras indeterminadas apresentam-se na densidade óptica entre a ponto de corte e a “faixa cinza”.

5.9. Estudos complementares

Por haver outras linhas de pesquisa dentro deste projeto, utilizando as mesmas amostras, a realização da pesquisa para sequências específicas do gênero *Leishmania* sp. consistiu em ser o ‘padrão ouro’ na identificação da espécie causadora desta parasitemia, tal como a pesquisa direta do parasito em amostras *post mortem*.

5.10. Análise Estatística

A prevalência de LC foi calculada somente na área urbana do município de Iguatama-MG, desconsiderando possíveis erros causados pelo tipo de amostragem, já que todos os bairros do município foram utilizados como conglomerado, com intervalo de confiança de 95% utilizando um programa computacional para o cálculo, além de utilizar do teste de qui-quadrado (X^2) para julgar a capacidade fidedigna do estudo quanto ao percentual de confiança de 95%.

Para verificarmos a concordância entre os dois testes sorológicos, utilizando a fórmula descrita a seguir para calcular o índice de *Kappa* (k), onde os resultados estão dispostos em variáveis de “menos 1” a “mais 1” que comparados junto ao quadro de interpretação do índice (Quadro 1), classificam o nível de concordância entre ruim e perfeita (PAHO, 1997; PEREIRA, 2014).

$$k = 2 \frac{[(a \times d) - (b \times c)]}{(N1 \times N4) + (N2 + N3)}$$

Quadro 1 – Interpretação de *Kappa*.

<i>Kappa</i>	Concordância
< 0,00	Ruim
0,00 – 0,20	Fraca
0,21 – 0,40	Sofrível
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Fonte: PEREIRA, 2014.

Tabela 3 – Modelo de tabela de contingência para realização do teste *Kappa*

		Teste 1		
		Positivo	Negativo	Total
Teste 2	Positivo	A	B	A+B=N1
	Negativo	C	D	C+D=N2
	Total	A+C=N3	B+D=N4	TOTAL

Fonte: FARIA, 2014.

6. RESULTADOS

6.1. Características da amostra e positividade

Com este inquérito tivemos como resultado o estudo de 270 (duzentos e setenta) cães, independentes de sexo, raça e porte, excluindo da pesquisa os cães com idade inferior a seis meses, nos nove bairros do município. Das casas visitadas somente dois tutores dos cães se recusaram a participar do projeto.

Das amostras colhidas na região, 20 (vinte) cães foram diagnosticados positivos para Leishmaniose canina, segundo o protocolo DPP[®]/ELISA estabelecido pelo Ministério da Saúde (2011). Contudo obtivemos a prevalência de 7,4%.

6.2. Sinais clínicos associados a positividade

Todos os cães, cujo as amostras positivas para o protocolo (DPP[®]/ELISA), utilizado nos diagnósticos da LVC, tiveram suas fichas clínicas avaliadas em busca de sinais clínicos que pudessem estar correlacionados a condição parasitária do animal, vendo que mesmo com ausência de sinais evidentes o cão pode estar infectado com o parasito e viver durante um grande período e transmiti-lo ao vetor (BRASIL, 2006.; FERROGLIO, et al., 2013; MADEIRA, et al., 2004)

Dos vinte cães positivos para o protocolo, aproximadamente 5% apresentavam condições sintomáticas, os mais frequentes eram onicogribose, ceratoconjuntivite e alopecia.

6.3. Comparação das técnicas de Diagnóstico sorológico

Para todas as 270 amostras foram realizados os testes DPP[®] e ELISA, o que nos possibilita a comparação de seus resultados para análise de concordância (TAB.6). Destas 270 amostras, duzentos e vinte cinco não foram positivas para nenhum dos dois testes. Entretanto o valor diminui quando comparamos as e notamos que há a discordância em

reatividade do diagnóstico, vinte e cinco testes foram classificados como discordantes pois apresentavam-se reagente para um e negativo para outro ou ainda indefinidos.

Tabela 4 – Resultados observados em 270 espécimes caninas, obtidas pela realização da técnica de DPP[®] e ELISA, em um inquérito realizado no município de Iguatama-MG.

Resultados observados no inquérito	Número de amostras
Reagente DPP [®] + ELISA	20
Reagente Somente DPP [®]	35
Reagente somente ELISA	24
Não reagente para DPP [®] e ELISA	225

Através dos dados expressos na Tabela 4 associado ao modelo da tabela de contingência demonstrada pela Tabela 3, é possível construir uma tabela de contingência com os resultados e calcular a concordância entre as duas técnicas por meio da análise de *Kappa* (TAB.5) (TAB.6).

Tabela 5 – Tabela de contingência dos resultados obtidos do soro de 270 cães examinados pelas técnicas de DPP[®] e ELISA para diagnóstico de LVC no município de Iguatama-MG.

		DPP [®]		
		Positivo	Negativo	Total
ELISA	Positivo	20	4	24
	Negativo	15	231	246
	Total	35	235	270

$$k = 2 \frac{[(20 \times 231) - (4 \times 15)]}{[(24 \times 235) + (246 \times 35)]}$$

$$k = 2 \frac{[(4620) - (60)]}{[(5640) + (8610)]}$$

$$k = 0,64$$

Neste estudo foi observado que o valor de *Kappa* é de 0,64, quando observado a sua interpretação no Quadro 1 indica que a concordância entre as duas técnicas de diagnóstico é classificada como ‘Boa’.

7. DISCUSSÕES

A partir deste estudo, que procura tornar contínuo o processo de vigilância e manutenção epidemiológica no município de Iguatama, foi possível encontrar a soroprevalência de anticorpos caninos em 7,4% dos animais amostrados, isto indica que este município deve ser classificado como uma área de transmissão moderada de acordo com o Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral (BRASIL, 2006).

O município mais próximo a Iguatama a realizar um inquérito epidemiológico de LVC é Divinópolis, cujo a prevalência encontrada foi de 4,6% (TEXEIRA-NETO et al., 2014) e também pôde ser considerada como uma zona de transmissão moderada, bem como Montes Claros-MG (4,9%) (MONTEIRO, E. M. et al., 2005), Brumadinho-MG (4,2%) (PEREIRA, D. C. A. et al., 2016) e Poxoréo-MT (7,8%) (AZEVEDO, M. A. A., 2004), diferente dos municípios de Pedro Leopoldo-MG (1,1%) (NAVEDA, L. A. B. et al., 2006), Cláudio-MG (1,1%) (PEREIRA, V. V. et al., 2016) e Juiz de Fora-MG (3,8%) (CASTRO-JUNIOR, J. G. et al., 2014) que são classificadas como zonas de transmissão esporádica.

Já as cidades de Marambaia – Rio de Janeiro (18,1%), Araçuaí – Minas Gerais (19,5%), Juatuba – Minas Gerais (10,6), Jacira – Mato Grosso do Sul (54%) e Cuiabá – Mato Grosso do Sul (22,1%), Barra das Garças – Mato Grosso do Sul (11%), são áreas extremamente endêmica para LV por possuírem uma prevalência superior a 10% como relatado por Alonso e cols. (2014), Ursine e cols. (2016), Borges e cols. (2014), Lopes e cols. (2014) Almeida e cols. (2012) e Marchi e cols. (2013) respectivamente.

Assim como grande parte das doenças infecciosas, a LV possui dimensões temporais, espaciais e até mesmo sazonais fazendo com que dentro de uma mesma área de estudo possa haver diferenças na distribuição de vetores, diferentes padrões de contato vetor/hospedeiro e variações de suscetibilidade populacional além de outros fatores de risco (SEVÁ, A. P. et al., 2017).

No município de Iguatama não houve homogeneidade quanto a distribuição de casos, isso também foi notado por Borges e cols. (2014), Naveda e cols. (2006). O bairro onde a maior prevalência foi observada não se difere tanto do restante da cidade (FIG.6), este possui ruas asfaltadas e arborizadas, extremidades de conglomerado ou quintais com plantações e ainda regiões com condições precárias de saneamento, além topografia e clima favoráveis a proliferação entomológica, assim como Naveda e cols. (2006), Prado e cols. (2011), Lopes e cols. (2014), Ursine e cols. (2016) e Almeida e cols. (2012)

observaram em Pedro Leopoldo-MG, Montes Claro-MG, Jacira-MT, Araçuaí-MG e Cuiabá-MT respectivamente.

Figura 5 – Vista aérea parcial do município de Iguatama-MG.



Fonte: Prefeitura Municipal de Iguatama < <https://iguatama.mg.gov.br/videos/visita-da-imagem-de-n-s-aparecida/>>

Assim como relatado por Naveda et al., (2006), Prado et al., (2011), Lopes et al., (2014) e Ursine et al., (2016), a população canina envolvida no estudo não apresentou diferença significativa quanto ao número de cães machos e fêmeas, assim como a idade também não foi fator preditivo para a infecção pelo parasito ou taxas de detecção imunológica, entretanto ressalta-se que o grupo de cães sem raça definida foi o que maior foi se destacou em relação a reatividade dos testes, fato também descrito por Gomes (2007), Borges (2014) e Alonso (2014). Este fato, porém, pouco tem relação quanto ao tropismo do vetor a estas raças, mas sim a facilidade que o tutor proporciona ao cão em mantê-lo em regime semi-domiciliar, isso possibilita que o animal perambule entre conglomerados com diferentes endemicidades e adquira o parasito.

O cálculo de *Kappa* é um coeficiente de concordância utilizado na epidemiologia para avaliar a confiabilidade de informações; assim como em nosso estudo (*Kappa* = 0,64), Belo e cols. (2017) encontraram um valor de *Kappa*, 0,61, que também classifica a concordância entre os testes de DPP® e ELISA como ‘Boa’, considerando a harmonia diagnóstica intraprotocolo eficaz, mas ainda não satisfazendo a concordância ótima associada a um custo efetivo melhor.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proximidade de cães infectados, associados a presença de vetores nas regiões endêmicas é fator contribuinte para a ocorrência de casos humanos desta parasitose, e uma alta prevalência como a encontrada apenas reforça que a Leishmaniose deixou de ser uma doença exclusiva das regiões rurais e já propagou-se em meio urbano.

Ainda que esteja sendo eficaz quanto ao diagnóstico de LVC, este novo protocolo implementado pelo Ministério da Saúde deve ser revisto, para obter um protocolo ainda mais barato, que careça de menos tempo e mão de obra, sem perder a confiabilidade diagnóstica.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, A. L. et al. Expansion of the distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) in the department of Caldas: increased risk of visceral leishmaniasis. **Biomédica** [online], v.33, n.2. 2013.

ALMEIDA, A. B. P. F. et al. Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n. 4, p. 359-365, out./dez. 2012

ALONSO, R. S. **Leishmaniose visceral**: estudo de reservatório canino na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. 2014. 80f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, fev. 2014.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J. et al. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História ciência saúde-Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 3, p. 853-882, dez. 2003.

AZEVEDO, M. A. A. **Epidemiologia da leishmaniose visceral canina no município de Poxoréo – MT**. 2004. 48f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2004.

BARATA, R. A. et al. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in a Reemerging Focus of Intense Transmission in Minas Gerais State, Brazil. **BioMed Research International**, vol. 2013, 2013.

BELO, V. S. et al. Reliability of techniques used in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by the national control program in Brazil: A survey in an area of recent transmission. **Preventive Veterinary Medicine** v.146 p. 10-15, 2017.

BORGES, B. K. A. et al. Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1035-1043, 2009.

BORGES, L. F. N. M. et al. Prevalência e distribuição espacial da leishmaniose visceral em cães do município de Juatuba, Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.2, p.352-357, fev. 2014.

BRASIL – Portal do Brasil. Ministério da Saúde. **Casos de leishmaniose caem no País, mas doença ainda requer atenção**. 10 ago. 2017. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2017/08/casos-de-leishmaniose-caem-no-pais-mas-doenca-ainda-requer-atencao>>. Acesso em: 16 de set. 2017.

_____. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**: normas e manuais técnicos, Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasil, 2006.

BRASIL. **Nota Técnica Conjunta N° 01/2011 – CGDT GLAB/DEVIT/SVS/MS:** esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) 2011. Disponível em: <<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/notas-tecnicas/nota-tecnica-n10-2014-lvc.pdf>>. Acesso em 24 mar. 2017.

_____. **Situação epidemiológica.** Brasília: Ministério da Saúde, DF, 2016. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados>> , Acesso em 17 mar. 2017.

CASTRO-JÚNIOR, J. G. et al. Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs from Juiz De Fora, Minas Gerais state, Brazil, based on immunochromatographic dual-path platform (DPP[®]) and PCR assays. **Revista do Instituto de Medicina Tropical.** Sao Paulo v.56, n.3 p.225-229, may-jun, 2014

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Leishmaniasis FAQs.** Jan. 2013. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/gen_info/faqs.html> Acesso em 16 mar. 2017.

COURA-VITAL, W. et al. Evaluation of Change in Canine Diagnosis Protocol Adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a New Proposal for Diagnosis. **PLoS ONE** v.9, n.3, mar. 2014.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, 2009.

_____. **Epidemiologia da Leishmaniose Visceral no Município de Paulista, Estado de Pernambuco, Nordeste.** 2006. 96f. (Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2006.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar, no Ceará. **O Hospital**, v.48, p.79-98, 1955.

FARIA, M. T. **Prevalência de leishmaniose canina no município de iguatama-mg, utilizando diagnóstico imunológico.** 2014. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de São João Del Rei, Divinópolis-MG, 2014.

FERROGLIO, E. et al. Evaluation of a Rapid Device for Serological Diagnosis of *Leishmania infantum* Infection in Dogs as an Alternative to Immunofluorescence Assay and Western Blotting. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20 n.5 p. 657– 659 may. 2013.

FURTHER NOTES ON LEISHMAN'S BODIES. By MAJOR RONALD ROSS, F.R.S., F.R.C.S., C.B., **The Britanic Medicine Journal**, nov. 28, 1903.

GALVIS-OVALLOS, F.; SILVA, M. D.; BISPO, G. B. S.; OLIVEIRA, A. G.; NETO. J. R. G.; MALAFRONTTE, R. S.; GALATI, E. A. B. Canine visceral leishmaniasis in

the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite**, vol. 24 n.2 jan. 2017.

GOMES, L. V. **Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil**. Dissertação. 2007. 122f. (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto-MG, 2007.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista brasileira de epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, set. 2004.

GONZÁLEZ, C.; PAZ, A.; FERRO, C. Predicted altitudinal shifts and reduced spatial distribution of *Leishmania infantum* vector species under climate change scenarios in Colombia. **Acta Tropical**, v.129, p.83-90, jan. 2014.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades, Minas Gerais: Iguatama**. 2017. Disponível em: < <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=313030&search=||info%20-%20informa%20-%20completas>> Acesso: 07 abr 2017.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Rev. Pan-Amazônica Saúde** v.1 n.2 Ananindeua jun. 2010.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - a review **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100 n.8 Rio de Janeiro Dec. 2005.

LAURENTI, M. D. et al. Comparative evaluation of the DPP[®] CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.2005 p.444–450, set. 2014.

LEISHMAN, W. B. On the Possibility of the Occurrence of Trypanosomiasis in India, **British Medical Journal**, May 3rd, p.1252, 1893.

LOPES, P. M. et al Seroprevalence and risk factors associated with visceral leishmaniasis in dogs in Jaciara, State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.47, n.6, p.791-795, nov-dec, 2014.

MADEIRA, M. F. et al . Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the Municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal Infection Disease**, Salvador, v. 8, n. 6, p. 440-444, Dec. 2004.

MARCHI, P. G. F.; MASCARENHAS, L. A.; LAGO, M. C. N. R. Levantamento sorológico de leishmaniose visceral canina no município de Barra do Garças/MT. Interdisciplinar: Revista Eletrônica da Univar. Ago 2013, n.º 10, Vol – 2, p. 67 – 70. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n.8, p.505-511, aug. 2016.

MENEZES, J. A. et al. Peridomiliary risk factors and knowledge concerning visceral leishmaniasis in the population of formiga, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.19, n.2, p.362-374, abr-jun 2016.

MONTEIRO, E. M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.38, n.2, p.147-152, mar-abr, 2005.

NAVEDA, L. A. B.; et al. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.58, n.6, p.988-993, 2006.

PAHO – PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Avaliação de testes de diagnóstico.** In: Métodos de investigação epidemiológica em doenças transmissíveis. v.1 , 2. ed., p. 21-40, 1997.

PAHO – PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **General informations:** leishmaniasis, Apr. 2014. Disponível em < http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417&Itemid=40250&lang=en>, Acesso em 17 mar. 2017.

PAHO. LEISHMANIASES - Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. **Report Leishmaniasis**, v. 1, p. 1–4, 2013.

PEREIRA, D. C. A. **Aspectos epidemiológicos da transmissão de leishmaniose visceral canina no município de Brumadinho – Minas Gerais.** 2016. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de São João Del Rei, Divinópolis-MG, 2016.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia:** teoria e prática. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

PEREIRA, V. V. et al. **Prevalência de leishmaniose visceral canina e frequência de leishmaniose visceral humana no município de Cláudio, Minas Gerais, Brasil.** Tese (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de São João Del Rei, Divinópolis-MG, 2016.

PICADO, A. et al. Risk Factors for Visceral Leishmaniasis and Asymptomatic *Leishmania donovani* Infection in India and Nepal. **PLoS ONE** v.9, n.1, 2014.

PRADO, P. F. et al. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral humana e canina em Montes Claros, estado de Minas Gerais, Brasil, entre 2007 e 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.5. p.561-566, set-out, 2011.

REBÊLO, J. M. M. et al. Flebótomos (Diptera, Phlebotominae) da Ilha de São Luis, zona do Golfão Maranhense, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.32 n.3 p.247-253, mai-jun, 1999.

ROSS, R. Notes on the bodies recently described by Leishmann and Donovan. **Britanic Medicine Journal**, v. 2, p. 1261-1262, 1903.

SEVÁ, A. P. et al. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases** v.6, n.11, p.2 feb. 2017.

SOLCÀ, M. S. et al. Avaliação dos testes sorológicos preconizados pelo Ministério da Saúde em cães vacinados contra leishmaniose visceral. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 12, n. 3, p.366, 2014.

TEIXEIRA-NETO, R. G. et al. Canine visceral leishmaniasis in an urban setting Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. **Parasites & Vectors**, v.7; n.485, 2014.

URSINE, R. L. et al. Human and canine visceral leishmaniasis in an emerging of focus in Araçuaí, Minas Gerais: spatial distribution and socio-environmental factors. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** vol.111 n.8 Rio de Janeiro Aug. 2016.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological Record**. n. 22, 2016, 91, 285–296 Disponível em: <<http://www.who.int/wer>> Acesso em 23 mar. 2017.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Observatory (GHO) data**, 2017. Disponível em:< http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/>, Acesso em 17 mar. 2017.

YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memory American Entomology Institute** v.54. p.1-881, 1994.

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Reavaliação de uma área endêmica para leishmaniose visceral canina no centro oeste de Minas Gerais.

Eu, _____ RG _____, CPF _____, residente no endereço: _____, proprietário do cão _____ da raça _____, aceito que meu animal participe desse estudo, cujo

objetivo é determinar a prevalência atual de leishmaniose canina no município e compará-la a prevalência encontrada há três anos. Fui informado que o meu cão terá seu sangue coletado para os testes de diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) no estudo acima referido. Fui orientado em relação aos benefícios desse estudo, que contribuirá para determinar a prevalência e o controle da leishmaniose no município de Iguatama. Autorizo a Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Centro Oeste a conservar, sob sua guarda, o material biológico, para ser usado com objetivo de pesquisa médica, em saúde ou educacional, podendo ser utilizado em pesquisas posteriores. Estou ciente que poderei recusar ou retirar meu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer penalização ou pressão e que não serei ressarcido financeiramente para participar deste estudo.

Este “termo de consentimento” me foi totalmente explicado e eu entendi seu conteúdo e minha participação no mencionado estudo. Estou consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica. Concordo em participar e dou o meu consentimento sem que para isso eu tenha sido forçado ou obrigado.

Endereço do responsável pelo projeto: Professor Dr. Gilberto Fontes

Instituição: Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Centro Oeste.

Endereço: Rua Sebastião Gonçalves Coelho, 400, Bairro Chanadour, Divinópolis - MG, CEP: 35501-296. Telefones p/ contato: (37) 3221-1584.

Iguatama, _____ de _____ de 2017.

Assinatura do responsável pelo cão

Membro da equipe de pesquisa

ANEXO B – Ficha de Avaliação Clínica



FICHA CLÍNICA CANINA

Reavaliação de uma área endêmica para leishmaniose visceral canina no centro oeste de Minas Gerais.

IDENTIFICAÇÃO

TUTOR:	
ENDEREÇO:	
DATA:	
NOME DO CÃO:	
IDADE:	SEXO:
RAÇA:	PORTE:
PELAGEM:	
VACINADO CONTRA LEISHMANIOSE (QUAL):	

SINAIS CLÍNICOS

ALTERAÇÃO	NÃO	SIM	COMPLEMENTO			
Mucosas normocoradas			Hipocoradas:	Hiperacoradas:		
Ceratoconjuntivite			Olho direito:	Olho esquerdo:		
Opacidade da córnea			Olho direito:	Olho esquerdo:		
Blefarite			Olho direito:	Olho esquerdo:		
Cegueira						
Alopecia			Local:			
Dermatite			Local:			
Escore corporal bom			Magro(a):	Obeso(a):		
Edema de patas			MAE:	MAD:	MPE:	MPD:
Paresia de patas			MAE:	MAD:	MPE:	MPD:
Onicogribose						
Linfoadenopatia						
Hepatomegalia/ Esplenomegalia						
OBSERVAÇÕES						

TESTE	NEGATIVO	POSITIVO
DPP		
ELISA		

ANEXO C – Dados da campanha de vacinação de 2016.



Dados da vacinação anti-rábica em cães, do ano 2016, da cidade de Iguatama-MG.

Zona Urbana: 885 cães

- Bela Vista, Cidade Nova e Garças de Minas - 346
- Alto São Francisco - 118
- Centro - 153
- Pio XII - 63
- Perdizes, Jardim Paraíso e Capoeira - 205

TOTAL: 885 cães vacinados na área urbana.

ANEXO D – Tabela para sorteio de números aleatórios

Tabelas para sorteio de números aleatórios

03 47 43 73 86	36 96 47 36 61	46 98 63 71 62	33 26 16 80 45	60 11 14 10 95
97 74 24 67 62	42 81 14 57 20	42 53 32 37 32	27 07 36 07 51	24 51 79 89 73
16 76 62 27 66	56 50 26 71 07	32 90 79 78 53	13 55 38 58 59	88 97 54 14 10
12 56 85 99 26	96 96 68 27 31	05 03 72 93 15	57 12 10 14 21	88 26 49 81 76
55 59 56 35 64	38 54 82 46 22	31 62 43 09 90	06 18 44 32 53	23 83 01 30 30
16 22 77 94 39	49 54 43 54 82	17 37 93 23 78	87 35 20 96 43	84 26 34 91 64
84 42 17 53 31	57 24 55 06 88	77 04 74 47 67	21 76 33 50 25	83 92 12 06 76
63 01 63 78 59	16 95 55 67 19	98 10 50 71 75	12 86 73 58 07	44 39 52 38 79
33 21 12 34 29	78 64 56 07 82	52 42 07 44 38	15 51 00 13 42	99 66 02 79 54
57 60 86 32 44	49 17 46 09 62	49 17 46 09 62	90 52 84 77 27	08 02 73 43 28
18 18 07 92 46	44 17 16 58 09	79 83 86 19 62	06 76 50 03 10	55 23 64 05 05
26 62 38 97 75	84 16 07 44 99	83 11 46 32 24	20 14 85 88 45	10 93 72 88 71
23 42 40 64 74	82 97 77 77 81	07 45 32 14 08	32 98 94 07 72	93 85 79 10 75
52 36 28 19 95	50 92 26 11 97	00 56 76 31 38	80 22 02 53 53	83 60 42 04 53
37 85 94 35 12	83 39 50 08 30	42 34 07 96 88	54 42 06 87 98	35 85 29 48 39
70 29 17 12 13	40 33 20 38 26	13 89 51 03 74	17 76 37 13 04	07 74 21 19 30
56 62 18 37 35	96 83 50 87 75	97 12 25 93 47	70 33 24 03 54	97 77 46 44 80
99 49 57 22 77	88 42 95 45 72	16 64 36 16 00	04 43 18 66 79	94 77 24 21 90
16 08 15 04 72	33 27 14 34 09	45 59 34 68 49	12 72 07 34 45	99 27 72 95 14
31 16 93 32 43	50 27 89 87 19	20 15 37 00 49	52 85 66 60 44	38 68 88 11 80
68 34 30 13 70	55 74 30 77 40	44 22 78 84 26	04 33 46 09 52	68 07 97 06 57
74 57 25 65 76	59 29 97 68 60	71 91 38 67 54	13 58 18 24 76	15 54 55 95 52
27 42 37 86 53	48 55 90 65 72	96 57 69 36 10	96 46 92 42 45	97 60 49 04 91
00 39 68 29 61	66 37 32 20 30	77 84 57 03 29	10 45 65 04 26	11 04 96 67 24
29 94 98 94 24	68 49 69 10 82	53 75 91 93 30	34 25 20 57 27	40 48 73 51 92
16 90 82 66 59	83 62 64 11 12	67 19 00 71 74	60 47 21 29 68	02 02 37 03 31
11 27 94 75 06	06 09 19 74 66	02 94 37 34 02	76 70 90 30 86	38 45 94 30 38
35 24 10 16 20	33 32 51 26 38	79 78 45 04 91	16 92 53 56 16	02 75 50 95 98
38 23 16 86 38	42 38 97 01 50	87 75 66 81 41	40 01 74 91 62	48 51 84 08 32
31 96 25 91 47	96 44 33 49 13	34 86 82 53 91	00 52 43 48 85	27 55 26 89 62
66 67 40 67 14	64 05 71 95 86	11 05 65 09 68	76 83 20 37 90	57 16 00 11 66
14 90 84 45 11	75 73 88 05 90	52 27 41 14 86	22 98 12 22 08	07 52 74 95 80
68 05 51 18 00	33 96 02 75 19	07 60 62 93 55	59 33 82 43 90	49 37 38 44 59
20 46 78 73 90	97 51 40 14 02	04 02 33 31 08	39 54 16 49 36	47 95 93 13 30
64 19 58 97 79	15 06 15 93 20	01 90 10 75 06	40 78 78 89 62	02 67 74 17 33
05 26 93 70 60	22 35 85 15 13	92 03 51 59 77	59 56 78 06 83	52 91 05 70 74
07 97 10 88 23	09 98 42 99 64	61 71 62 99 15	06 51 29 16 93	58 05 77 09 51
68 71 86 85 85	54 87 66 47 54	73 32 08 11 12	44 95 92 63 16	29 56 24 29 48
26 99 61 65 53	58 37 78 80 70	42 10 50 67 42	32 17 55 85 74	94 44 67 16 94
14 65 52 68 75	87 59 36 22 41	26 78 63 06 55	13 08 27 01 50	15 29 39 39 43
17 53 77 58 71	71 41 61 50 72	12 41 94 96 26	44 95 27 36 99	02 96 74 30 83
90 26 59 21 19	23 52 23 33 12	96 93 02 18 39	07 02 18 36 07	25 99 32 70 23
41 23 52 55 99	31 04 49 69 96	10 47 48 45 88	13 41 43 89 20	97 17 14 49 17
60 20 50 81 69	31 99 73 68 68	35 81 33 03 76	24 30 12 48 60	18 99 10 72 34
91 25 38 05 90	94 58 28 41 36	45 37 59 03 09	90 35 57 29 12	82 62 54 65 60
34 50 57 74 37	98 80 33 00 91	09 77 93 19 82	74 94 80 04 04	45 07 31 66 49
85 22 04 39 43	73 81 53 94 79	33 62 46 86 28	08 31 54 46 31	53 94 13 38 47
09 79 13 77 48	73 82 97 22 21	05 03 27 24 83	72 89 44 05 60	35 80 39 94 88
88 75 80 18 14	22 95 75 42 49	39 32 82 22 49	02 48 07 70 37	16 04 61 67 87
90 96 23 70 00	39 00 03 06 90	55 85 78 38 36	94 37 30 69 32	90 89 00 76 33

ANEXO E – Certificado de aceite pelo comitê de Ética



 Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSJ – CEUA/UFSJ

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Reavaliação de uma área endêmica para leishmaniose visceral canina no centro oeste de Mians Gerais”, protocolo nº 028/2016 sob a responsabilidade de Gilberto Fontes que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo. Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de São João del-Rei, em reunião de 26/08/2016

Finalidade	() Ensino	(x) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Início: 01/10/2016	Término: 30/04/2017
Espécie/Linhagem/raça	Cão/ Canis familiaris	
Nº de animais	272	
Peso / Idade	-----	
Sexo	-----	
Origem	Cães domiciliados que serão amostrados (inquérito epidemiológico) e serão examinados através de sangue colhido em Iguatama – MG	

Leila de Genova Gaya

Prof.^a Leila de Genova Gaya

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA-UFSJ