

Márcia Ávila Andrade de Azevedo

**Epidemiologia da leishmaniose visceral canina no
município de Poxoréo – MT**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de MESTRE
em Medicina Veterinária (Área de
Concentração: Vigilância Veterinária).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cárís Maroni Nunes

**Botucatu-SP
2004**

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE
BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Azevedo, Márcia Ávila Andrade de.

Epidemiologia da leishmaniose visceral canina no município do
Poxoréo - MT / Márcia Ávila Andrade de Azevedo. – 2004.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2004.

Orientador: Caris Maroni Nunes

Assunto CAPES: 40602001

1. Saúde pública. 2. Epidemiologia. 3. Vigilância sanitária.

CDD 614.49

Palavras chave: ELISA; Epidemiologia; Imunofluorescência indireta;
Leishmaniose visceral canina; PCR.

*“ Todas as coisas cooperam para o bem daqueles
que amam a Deus”*

Romanos 8:28

“ Tudo posso naquele que me fortalece”

Filipenses 4:13

“”Dedico o meu trabalho aos meus pais que ensinaram-me a amar a verdade, as letras e ao próximo,

ao meu esposo e filhos que tanto incentivaram a conclusão do curso e orgulham-se do meu trabalho. ”

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a Deus pela saúde e oportunidade da realização da Pós-Graduação.
- Ao coordenador do curso Prof. Germano Francisco Biondi e orientadora Prof. Caris Nunes Marone, confiando no meu trabalho, aos professores, a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, juntamente todos os funcionários, que dispensaram atenção e respeito.
- A Universidade Federal do Mato Grosso, Campus Rondonópolis, especialmente ao Coordenador do Curso de Zootecnia/ ICEN/CUR/UFMT, Prof. José Libério do Amaral ao chefe do departamento de ciências Biológicas/ICEN/CUR/UFMT, Prof. Mauro Osvaldo Medeiros, do Coordenador de Ensino do Departamento de Ciências Biológicas ICEN/CUR/UFMT Prof. Manoel Messa, ao Prof. Claudionor Oliveira e a Prof. Dilceny Prietch pelo apoio, cooperação e incentivo.
- Ao Prefeito de Poxoréo, Sr. Antônio Rodrigues Silva, ao Secretário Municipal de Saúde de Poxoréo, Sr. José Corrêa Filho, ao Coordenador da FUNASA de Poxoréo, Sr. Candido Alves Moreira, e aos Agentes de Saúde Adriano Moreira Barbosa, Adalto Santos, Geivani de Souza, Carlos Márcio O. Silva, Donizete Rodrigues Venâncio, Adilson Alves Pereira, Cezar Marcos Corrêa de Oliveira, Ricardo Moacir do Nascimento.
- Ao Estado de Mato Grosso, Laboratório Central de Mato Grosso (LACEN), pela realização dos exames de Imunofluorescência Indireta (IFI), e a Coordenadoria de Vigilância Ambiental do Estado, a Dr. Tereza Pompilio.
- A prof. Valéria Faiçal Lima pelas avaliações laboratoriais.
- Aos alunos Ana Karina Kerche Dias e Henrique Borges de Paula, pela realização das PCRs das amostras.
- A prof. Silvia Helena Venturoli Perri pelas análises estatísticas.
- Aos amigos Orlando Gea e Genoveva Nogueira Gea, Orlando Evaldo Gea, Maria Lúcia Spazzini Gea e Filhos, Meire Cristina Gea Amaral e filhos, acolheram-me com cuidado, atenção e são minha família paulista.

AZEVEDO, M.A.A. Epidemiologia da leishmaniose visceral canina em Poxoréo-MT. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – p.46 (Mestrado em Medicina Veterinária – Vigilância Sanitária), 2004.

RESUMO

A leishmaniose visceral, importante problema de saúde pública, tem no cão doméstico o reservatório de maior importância para a transmissão da doença ao homem. Com o intuito de contribuir para a implementação de medidas de controle desta zoonose, realizou-se avaliação epidemiológica da leishmaniose visceral na população canina domiciliada do município de Poxoréo-MT. A prevalência observada através da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em 1112 amostras foi de 7,8%. Observou-se ainda associação estatisticamente significativa entre a prevalência de LVC e as variáveis faixa etária ($P=0,0006$), presença de sinais clínicos ($P=0,0013$) e presença de outra espécie animal co-habitando com os cães avaliados ($P=0,0315$), tendo sido a espécie equina a mais frequentemente observada entre os animais soropositivos. A prevalência da LVC foi maior para cães com idade maior que 84 meses; ceratoconjuntivite, lesões cutâneas e onicogribose, respectivamente, foram os sinais clínicos mais frequentemente observados nos animais soropositivos. O sexo, a coleta de lixo domiciliar bem como a renda familiar não apresentaram associação estatisticamente significativa com a prevalência da LVC. A amplificação de DNA de amostras de sangue periférico através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) não se revelou em bom instrumento diagnóstico para a vigilância epidemiológica da LVC devido à baixa sensibilidade (55%) e especificidade (67%) observadas.

AZEVEDO, M.A.A. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in Poxoréo-MT, Brazil. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – p.46 (Mestrado em Medicina Veterinária – Vigilância Sanitária), 2004.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is an important public health problem where dogs play an important role as reservoir in the domestic cycle. An epidemiological survey was conducted in dogs from Poxoréo- MT, Brazil, using indirect immunofluorescence antibody test. A total of 1,112 dog blood samples were screened and prevalence was 7.8%. Significant association was found between prevalence of CVL and age of the dogs ($P=0,0006$), clinical signs ($P=0,0013$) and presence of other animals in the backyard ($P=0,0315$), with horses being more likely associated with seropositivity. Prevalence was higher in dogs aging more than 84 months; clinical signs more frequently associated with seropositivity were keratoconjunctivitis, cutaneous lesions and onychogriphosis, respectively. Gender, garbage collection in the residence and family income were not associated with CVL prevalence. DNA amplification from dog blood samples by PCR was not a good diagnostic tool for epidemiological surveillance of visceral leishmaniasis because of its low sensibility (55%) and specificity (67%).

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	ii	
AGRADECIMENTO		iii
RESUMO	iv	
ABSTRACT	v	
1. INTRODUÇÃO e REVISÃO DE LITERATURA		7
2. OBJETIVO	11	
3. MATERIAL E MÉTODOS		11
3.1- Área de estudo	11	
3.2- AMOSTRAGEM	12	
3.3 Colheita de material		12
3.4 Avaliação laboratorial	14	
3.5 Análise estatística	15	
4. RESULTADOS	16	
5. DISCUSSÃO	36	
6. CONCLUSÕES	39	
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		40
ANEXO 1	45	
ANEXO 2	46	

1- INTRODUÇÃO e REVISÃO DA LITERATURA

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, compreende uma das sete endemias mundiais de prioridade absoluta da Organização Mundial de Saúde (OMS), devido ao seu caráter endêmico em várias regiões do mundo, afetando um a dois milhões de pessoas por ano. Estima-se que anualmente 500.000 casos são diagnosticados no mundo, ressaltando-se os territórios do subcontinente indiano, o leste africano, o litoral do Mediterrâneo e Portugal, Rússia, Arábia Saudita, Iraque, Irã, China e América Latina, especialmente o Brasil (BADARÓ & DUARTE, 1997).

Pelo menos vinte espécies de *Leishmania* foram identificadas nas Américas as quais foram agrupadas em quatro complexos de acordo com as características clínicas da doença: leishmaniose cutânea persistente, cutânea difusa, mucocutânea e leishmaniose visceral, causadas respectivamente pela *Leishmania (L.) mexicana*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) brasiliensis* e *Leishmania (L.) chagasi* (GRIMALDI & TESH, 1993; DESJEUX, 1996). Atualmente *L.(L) chagasi* tem sido considerada idêntica à *L. (L) infantum*, que ocorre no Mediterrâneo (MILES et al., 1999).

Na América do Sul as espécies vetoras do subgênero *Lutzomyia* estão mais freqüentemente associadas com a transmissão, particularmente *Lutzomyia longipalpis* (DESJEUX, 1996).

Os principais reservatórios naturais da LV são os roedores, edentados, marsupiais, procionídeos, primatas, incluindo o homem, além do cão doméstico, considerado o reservatório de maior importância para a transmissão da doença ao homem (DEANE & DEANE, 1955; SHAW & LAINSON, 1987).

No Brasil, as formas canina e humana da leishmaniose visceral ocorrem endemicamente em vários Estados das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Paranhos-Silva et al. (1996) avaliaram 1.681 amostras de cães de Jequié-BA e observaram 23,5% de prevalência; Madeira et al. (2000) avaliaram 310 amostras de cães assintomáticos da região Itaipu-RJ e observaram 11,94% de positividade; Camargo – Neves et al (2001) encontraram em Araçatuba-SP (CAMARGO-NEVES, 2001), onde a doença é endêmica, no período de 1998-1999 a prevalência observada foi de 12%; França-Silva et al. (2003) observaram 9,7% de prevalência em cães da área endêmica de Montes Claros-MG.

Em todos os Estados há associação entre cães infectados e presença do vetor (MILES et al., 1999). A leishmaniose visceral humana, nem sempre obedece a uma distribuição espacial paralela à do calazar canino, porém tem sido observado que as infecções caninas são mais freqüentes que as humanas e que, normalmente, as precedem. (PARANHOS – SILVA et al., 1996).

O baixo padrão de vida da população, a maior densidade dos flebotomíneos e cães infectados são fatores predisponentes para implantação desta zoonose (SILVA et al., 1984; BADARÓ et al., 1986; ALENCAR, 1983; MONTEIRO et al., 1994; NASCIMENTO, 1996). Nas últimas décadas, a LV tem ocorrido com grande frequência em áreas urbanas como Belo Horizonte-MG, Rio de Janeiro-RJ e Cuiabá-MT, apresentando características distintas dos padrões clássicos anteriormente descritos para área rural (EVANS et al., 1990; COSTA et al., 1991; PARANHOS – SILVA et al., 1996; TAFURI et al., 1996; DESJEUX, 1996; MOURA et al., 1999).

O ciclo biológico da *Leishmania (L) chagasi* é do tipo heteroxênico envolvendo como transmissor as fêmeas da *Lutzomyia longipalpis*. Ao picar um animal vertebrado infectado para exercer o repasto sangüíneo, o inseto ingere, juntamente com o sangue, macrófagos e leucócitos parasitados pelas formas amastigotas, presentes no local da picada. Durante o tempo em que o sangue é ingerido, permanecem amastigotas. Estas se transformam em promastigotas e sofrem multiplicação, adaptando-se às novas condições fisiológicas existentes. As formas promastigotas são encontradas a partir de 15 horas após repasto infectante e multiplicam-se rapidamente através de divisão binária, colonizando principalmente o trato digestivo médio e anterior do flebotomíneo. Estas se transformam em paramastigotas que são encontradas no esôfago e faringe aderidas ao epitélio por hemisdesmossomas. Posteriormente ocorre nova transformação para promastigotas metacíclicas extremamente ágeis que nadam livremente. Ao exercer novamente o repasto sangüíneo sobre um hospedeiro não infectado – o homem ou outro reservatório –, o flebotomíneo inocula as formas promastigotas, presentes no trato digestivo anterior, probóscida, faringe e esôfago. No local em que ocorreu a picada do inseto vetor, as formas promastigotas injetadas são fagocitadas por células sistema mononuclear fagocitário (SMF). No interior dos macrófagos, as formas promastigotas se transformam rapidamente em formas amastigotas que iniciam então sua multiplicação através de sucessivas divisões no interior do vacúolo fagocitário dos macrófagos. Quando os macrófagos estão densamente parasitados, rompem-se pondo em liberdade as formas amastigotas que serão fagocitadas novamente por outros macrófagos (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

A infecção por *Leishmania (L) chagasi* geralmente causa uma doença sistêmica crônica. Os sintomas mais frequentemente observados no homem são hepato-esplenomegalia, emagrecimento, distúrbios gastro-intestinais, edema de membros inferiores, esplenomegalia, prostração, hipertermia, palidez cutânea, hemorragias, dores articulares e mialgia (ALENCAR et al., 1991).

Em cães, após a infecção da pele, ocorre disseminação do parasita por todo organismo com posterior desenvolvimento dos sintomas. O aparecimento dos sinais clínicos depende da imunocompetência do hospedeiro e a sintomatologia da doença é semelhante à do homem. Geralmente observa-se febre irregular por longos períodos, anemia, alterações dermatológicas e perda de peso progressiva (FEITOSA et al., 2000).

Um dos primeiros métodos utilizados para diagnóstico das leishmanioses foi o exame parasitológico, através do raspado de lesões ulcerativas cutâneas corado pelo Giemsa, quando VIANNA (1911) identificou um protozoário que julgava pertencer ao gênero *Leishmania*, porém com características estruturais próprias. Posteriormente, novos métodos alternativos para identificar o complexo e espécies de *Leishmania* sp foram propostos para a melhoria do diagnóstico de LV humana e canina, destacando-se entre eles os métodos sorológicos. Como cerca de 60-80% dos cães que tiveram contato com o parasita em área endêmica não apresentam sinais clínicos da doença, o diagnóstico tem sido feito através da detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp. Vários métodos diagnósticos têm sido empregados com sensibilidade variando de 78 a 100% e especificidade variando de 80 a 98%. No Brasil, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) tem sido mais frequentemente utilizada para triagem sorológica na população canina (ASHFORD et al., 1995).

Mais recentemente, a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e a imunohistoquímica têm sido utilizada para diagnóstico em pacientes humanos. Grande número de PCRs para identificação do gênero *Leishmania* ou para caracterização individual dos complexos têm sido descritos (RODGERS, et al., 1990; SMYTH et al., 1992; ASHFORD et al., 1995; HARRIS et al., 1998; REALE et al., 1999; REITHINGER et al., 2000; FISA et al., 2001; LACHAUD et al., 2002).

Rodgers et al. (1990), assim como outros autores, basearam-se na região conservada do minicírculo de DNA. O kinetoplasto de DNA (kDNA) é composto de maxicírculos e minicírculos sendo que os maxicírculos são compostos de 20 à 40 Kb de comprimento e apresentam de 30 à 50 cópias de genes mitocondriais. Os minicírculos possuem 1 Kb de peso e estão presentes em 10.000-20.000 cópias (RODGERS et al., 1990).

A amplificação de fragmentos de DNA de *Leishmania* pela PCR tem sido alcançada em diferentes tecidos bem como de aspirado de linfonodos, medula óssea e de leucócitos de sangue periférico (IKONOMOPOULOS et al., 2003). O uso de sangue periférico apresenta a vantagem de ser um processo de coleta fácil, menos invasivo, porém resulta em menor sensibilidade do teste (REITHINGER et al., 2003)

As principais medidas de controle da LV no Brasil estão baseadas no diagnóstico e tratamento de casos humanos, no controle dos vetores através do uso de inseticidas e na triagem sorológica com posterior eutanásia de cães positivos para leishmaniose (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001). O custo destas atividades tem sido alto; num período de 7 anos, por exemplo, 6,5 milhões de cães foram sorologicamente avaliados dos quais 153.819 foram eutanasiados (AKHAVAN, 1996). O conhecimento de parâmetros epidemiológicos, além da quantificação da doença, deve ser considerado quando da implementação de medidas de controle.

Os estudos de fatores de riscos associados a dados epidemiológicos da população canina como faixa etária, sexo e raça não são numerosos (FRANÇA-SILVA et al., 2003). No Brasil, Alencar & Cunha (1963) não observaram diferença de ocorrência da LVC entre

machos e fêmeas. Em Portugal, Abranches et al. (1991) observaram a doença apenas em adultos jovens e animais idosos. Já Feitosa et al. (2000) realizando estudo de animais positivos para LVC em Araçatuba-SP, observaram maior ocorrência em animais entre 1 e 3 anos de idade. França-Silva et al. (2003) observaram prevalência semelhante em todas as idades de cães avaliados em Montes Claros-MG. O risco oferecido aos cães que co-habitam com outras espécies animais foi avaliado por Moreira et al. (2003) que observaram maior risco para a criação da espécie suína, seguida de aves (galinhas) e animais de produção.

A pesquisa foi realizada na região de Poxoréo-MT, por apresentar relatos prévios de casos humanos de leishmaniose visceral. As atuais medidas para o controle desta enfermidade no município têm sido a identificação e tratamento de casos humanos, a identificação e eutanásia de cães soropositivos e a realização de borrifação com inseticida piretróide intra e peridomiciliar, quando de casos humanos.

2 OBJETIVOS

Objetivou-se realizar avaliação epidemiológica da leishmaniose visceral na população canina domiciliada no município de Poxoréo-MT com o intuito de contribuir para a implementação de medidas de controle desta zoonose. Objetivou-se ainda avaliar a aplicação da reação em cadeia pela polimerase (PCR) como instrumento de vigilância epidemiológica da LVC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Área de Estudo

Os parâmetros referentes aos cães foram estimados tendo-se como base a população canina do Município de Poxoréo-MT. Este Município está localizado no sudeste Mato-Grossense, a 700 metros de altitude e possui uma área de 6.907,60 km², localiza-se a 15°24'00" de latitude Sul e 54°18'15" longitude oeste (Anexo 1). O clima é do tipo tropical quente e sub-úmido; a temperatura média é de 22° C com a estação da seca de 4 meses, de

maio a agosto, sendo que as chuvas ocorrem com mais intensidade nos meses de dezembro a fevereiro. O índice pluviométrico médio anual é de 1750 a 1900 mm. De acordo com o IBGE, a população em 2000 era de 20.008 habitantes (Figura 1).



Figura 1- Vista do Setor Irantinópolis, Poxoréo- MT.

3.2 Amostragem

3.2.1 Tamanho da amostra

A amostragem inicial necessária ao nível de confiança de 95% ($\alpha= 5\%$), precisão absoluta de 2% e prevalência esperada (P) de 10% foi de 864 cães (LWANGA; LEMESHOW, 1991). Foram colhidas 1.112 amostras de sangue de cães sem raça definida do município de Poxoréo, número este maior que o calculado para amostragem, uma vez que em alguns setores o número de animais era diferente do estimado (Tabela 1).

3.2.2 Seleção da amostra

Considerando-se que não há dados prévios referentes ao tamanho e distribuição da população canina no município de Poxoréo, a amostra foi estratificada utilizando-se a divisão de setores já existente na área urbana, de acordo com a área de trabalho da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Considerando-se o número médio de 3,8

habitantes por residência e considerando-se a relação de 1 cão para cada 10 habitantes, a seleção da amostra foi feita de forma aleatória, proporcionalmente ao número médio de cães/ por setor, conforme apresentado na Tabela 1.

3.3 -Colheita de material

A colheita do material foi realizada por 08 agentes de saúde e 1 técnico da FUNASA (Fundação Nacional de Saúde), além da pesquisadora responsável, no período de três meses (Setembro a Novembro de 2002). As atividades de campo constaram das seguintes tarefas:

- 1- Confirmação do registro do cão em ficha própria com: nome, proprietário, endereço, raça, idade, sexo, sinais clínicos, renda familiar, condições do quintal, coleta de lixo, etc (ANEXO 2).
- 2- Exame clínico sumário e classificação do cão em assintomático e sintomático (um ou mais sinais), conforme descrição a seguir: alopecia, lesões cutâneas, opacificação de córnea e pelagem, onicogribose, ceratoconjuntivite (ANEXO 2).
- 3- Colheita de sangue através da punção da veia cefálica com seringa de 3 ml descartável, para obtenção do soro e sangue periférico, após consentimento esclarecido do proprietário. Devido a grande distância de determinados locais, após transporte em isopor com gelo, o sangue era depositado em banho Maria por 10 minutos e centrifugado, separando-se o soro o qual era conservado a -20°C .

Tabela 1- Números e porcentagem de cães a serem amostrados segundo os Setores do Município de Poxoréo-MT. Setembro a novembro de 2002.

Setor	Número total de casas	Estimativa de cães / setores	Porcentagem da amostra	Cães (n) a serem amostrados
Alameda M. Dourado	116	44	3,3	37
Alto Coité	510	194	8,4	93
Aparecida do Leste	175	67	4,2	47
Centro de Poxoréo	1009	383	8,4	93
COHAB Bela Vista	371	141	3,8	42
COHAB Xavante	572	217	14,0	156
Irantinópolis	755	287	16,2	180
Jarudore Povoado	139	53	4,0	45
Jarudore vila	180	68	6,1	68
Jd Poxoreo	356	135	4,7	52
Lagoa Bairro	276	105	7,0	78
Paraíso do Leste	137	52	4,5	50
Sta Maria Bairro	137	52	4,9	55
Sta Teresinha	220	84	5,5	61
Vila Cruzeiro	286	109	4,9	55
TOTAL	5239	1991	100,0	1112

3.4 Avaliação laboratorial

As amostras de soro colhidas dos animais foram avaliadas para presença de anticorpos anti-*Leishmania* através do teste de Imunofluorescência indireta (IFI), realizado pelo Laboratório Central do Estado do Mato Grosso (LACEN). As amostras de sangue

periférico total foram analisadas quanto à presença de DNA de *Leishmania* sp. através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

3.4.1 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Para o processamento da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) a técnica utilizada neste modelo foi aquela descrita por Camargo e Rebonato (1969). Como antígeno, utilizaram-se formas promastigotas, em fase exponencial de crescimento de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* (MHOM/BR/ BH6), mantidas em meio de cultura (LIT). Como conjugado, foi utilizado anti-imunoglobulina de cão, fração IgG, marcada com isotiocianato de fluoresceína (Biomanguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro). A diluição discriminante do soro foi de 1/40. As amostras consideradas positivas e amostras negativas, oriundas do mesmo setor, também foram avaliadas pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

3.4.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

3.4.2.1 Extração de DNA

Foram utilizados 500 µL de sangue periférico, conservados a -20°C. O DNA foi extraído utilizando-se kit para extração de DNA GFX genomic blood kit® (Amersham Biotech, Piscataway, New Jersey, USA). O volume final foi de 100 µL.

3.4.2.2 Limiar de detecção da PCR

Inicialmente procedeu-se à padronização da PCR bem como a avaliação do limiar de detecção da técnica. Para tal, amostras de sangue periférico de 2 cães provenientes de área não endêmica para LVC (Diadema-SP) foram utilizadas procedendo-se à contaminação artificial das amostras, em duplicata, com diluições seriadas, na base 10, de formas promastigotas de *Leishmania* (*L.*) *chagasi*, mantidas em cultura.

A amplificação de DNA de minicírculos de kinetoplastos de *Leishmania* sp foi realizada pela PCR utilizando-se os primers 13A (5'-GTC GGG GAG GGG CGT TCT -3') e 13B (5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3') descritos por Rodgers et al. (1990). As reações foram realizadas em duplicata, contendo 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8,3),

200µM de desoxinucleotídeo trifosfato, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 µM cada primer e 0,04 U de Taq DNA polimerase., em um volume final de 50 µL. As amostras foram amplificadas em um aparelho termociclador (MJ Research Thermal cycler) com denaturação inicial a 95°C por 5 minutos, sendo seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos para denaturação, 63°C por 45 segundos para anelamento, 72°C por 30 segundos para extensão e 72°C por 5 minutos para extensão final.

A verificação da amplificação dos fragmentos de DNA foi feita por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE [89 mM Tris borato, 2 mM EDTA (pH 8,3)] e em gel de poliacrilamida a 8% em TBE. Os géis de agarose foram corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta e os géis de poliacrilamida foram corados com nitrato de prata.

3.5 Análise estatística

Os resultados de positividade e negatividade observados foram expressos em porcentagem. A avaliação de associação entre dados epidemiológicos (setores do município, sexo, faixa etária, sintomatologia clínica dos cães e condições ambientais) e o resultado da avaliação sorológica foi realizada pelo teste do Qui quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher (LANDIS & KOCH, 1977). Adotou-se nível de significância de 95% ($\alpha = 5\%$). A concordância entre os métodos utilizados (IFI e PCR) foi avaliada pelo coeficiente de concordância Kappa (ZAR, 1998).

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa computacional SAS® (SAS, 1999).

4 RESULTADOS

Dentre os animais avaliados, 62% (691/1112) eram do sexo masculino e 36% (398/1112) do sexo feminino. Vinte e três registros (2%) não continham informações sobre sexo. A representação gráfica destes resultados é apresentada na Tabela 2 e Figura 2.

Tabela 2- Número e porcentagem de amostras de cães avaliadas segundo o sexo

Sexo	Total	
	n	%
M	691	62,0
F	398	36,0
Sem informação	23	2,0
TOTAL	1112	100,0

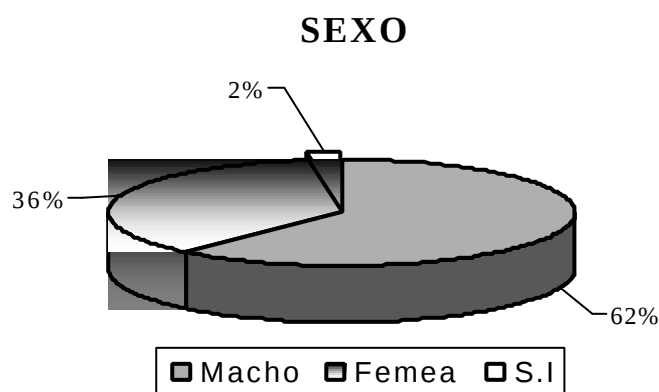


Figura 2 – Porcentagem de cães do município de Poxoréo-MT segundo o sexo.

A distribuição etária dos cães avaliados foi maior para a faixa etária entre 0 e 60 meses, diminuindo progressivamente após esta idade (Tabela 3 e Figura 3). Dentre os registros avaliados, 303 (27,24%) não continham informações sobre a idade dos animais.

Tabela 3- Número e porcentagem de amostras de cães avaliadas segundo a faixa etária em meses.

Idade (meses)	TOTAL	
	n	%
0-12	279	25,0
13-36	298	27,0
37-60	125	11,2
61-84	71	6,4
> 84	36	3,2
Sem informação	303	27,2
TOTAL	1112	100,0

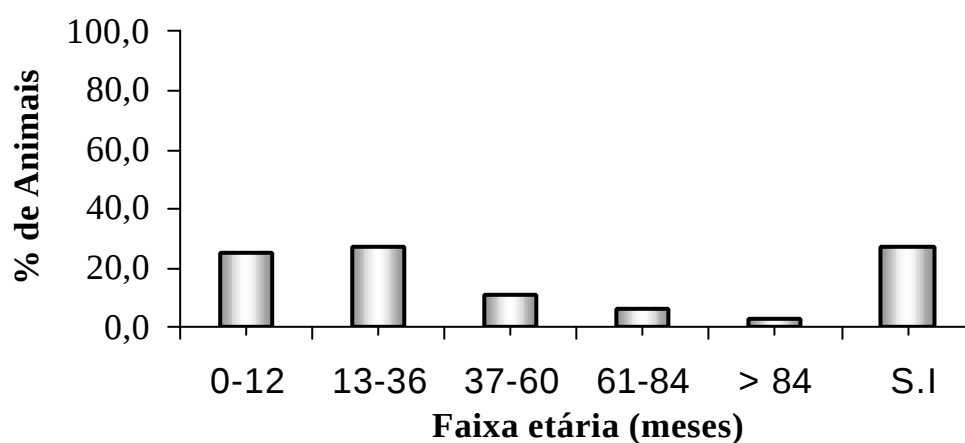


Figura 3 – Porcentagem de cães avaliados do município de Poxoréo-MT segundo a faixa etária (meses).

A avaliação clínica realizada no momento da colheita da amostra de sangue revelou 31% (319/1112) dos animais com sintomas clínicos (alopecia, onicogrifose e/ou ceratoconjuntivite) e 63% (709/1112) dos animais assintomáticos (Tabela 4 e Figura 4). Foram observados 84 (8,0%) registros sem informações sobre sintomatologia clínica.

Os sintomas mais freqüentemente observados foram lesões cutâneas (58,9%), onicogrifose (57,1%), alopecia (53,9%) e ceratoconjuntivite (18,2%). Infartamento ganglionar foi observado apenas em 3,1% dos animais (Tabela 5).

Tabela 4- Número e porcentagem de cães avaliados segundo presença de sintomatologia clínica

Sintomatologia	Total	
	n	%
Sintomático	319	29,0
Assintomático	709	63,0
Sem informação	84	8,0
Total	1112	100

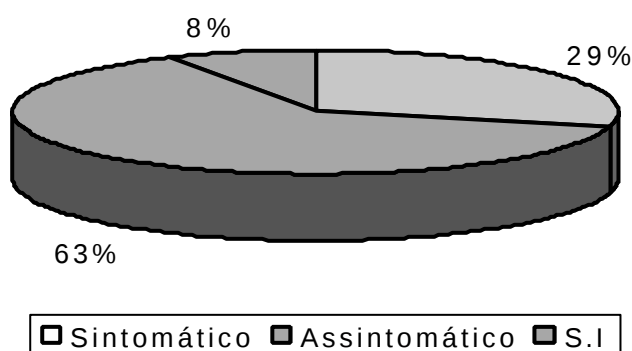


Figura 4 – Porcentagem de cães do município de Poxoréo-MT segundo a presença de sintomatologia clínica.

Tabela 5- Número e porcentagem da sintomatologia clínica (n= 319) dos cães soropositivos avaliados

Sintomas	Total	
	n	%
alopecia	172	53,9
ceratoconjuntivite	58	18,2
edema membros	2	0,6
Infartamento ganglionar	10	3,1
lesões cutâneas	188	58,9
onicogrifose	182	57,1

Os quintais das residências avaliadas eram, na grande maioria (96,4%), de terra. Em geral, encontravam-se em boas condições de higiene embora a maioria apresentasse escoamento de água residual da cozinha e lavanderia.

A presença de outras espécies animais (eqüinos, aves e suínos) que serviriam de fonte para repasto sanguíneo dos flebotomíneos também foi avaliada. A presença de galinhas foi observada em 92,7% (638/688) do total de animais que co-habitavam com os cães, seguida da presença de suínos (4,7%) e de eqüinos (2,6%). A Figura 5 representa estes resultados. Quatrocentos e vinte e quatro registros (38,1%) não continham informações sobre a presença de outra espécie animal no quintal.

A renda familiar da população avaliada variou de 1 a 20 salários-mínimos sendo que a maioria (93%) apresentava renda familiar de 1-2 salários-mínimos (Figura 6).

Das residências avaliadas, a coleta de lixo era realizada em 75% delas (732/975) sendo diariamente em 4,1%, uma vez/semana em 37,9% ou mais que uma vez por semana em 33% das residências. Vinte e cinco por cento das residências avaliadas não dispunham de serviço de coleta de lixo domiciliar e 137 registros (12,3%) não continham esta informação.

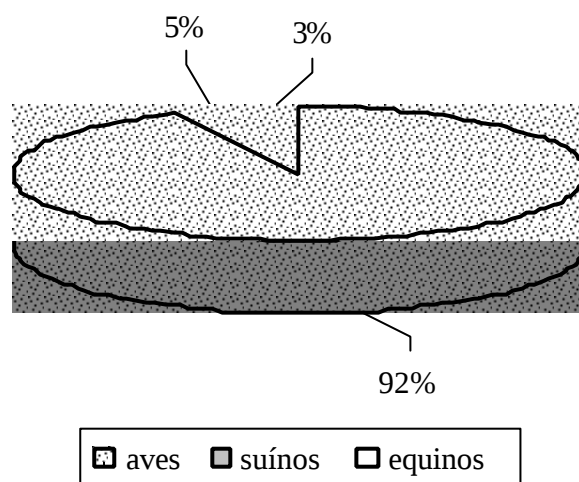


Figura 5- Porcentagem de outras espécies animais que co-habitam com os cães avaliados no município de Poxoréo-MT.

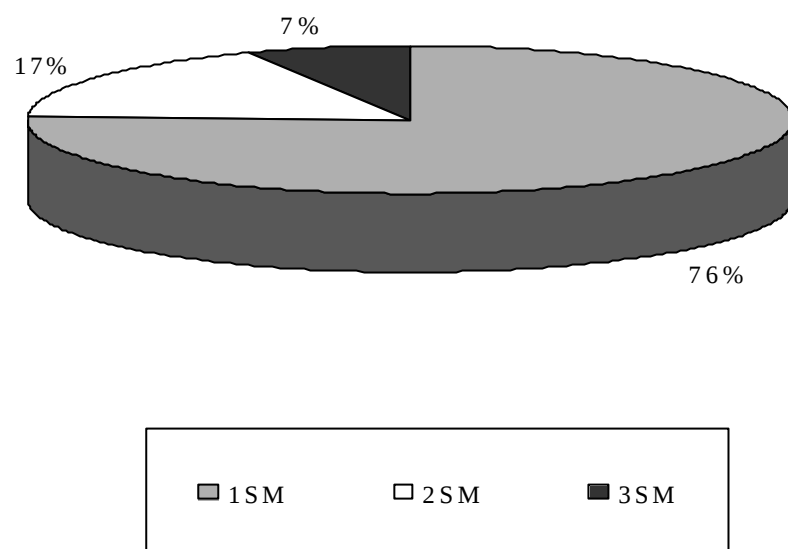


Figura 6 – Porcentagem de renda familiar, em salários-mínimos, segundo os cães avaliados.

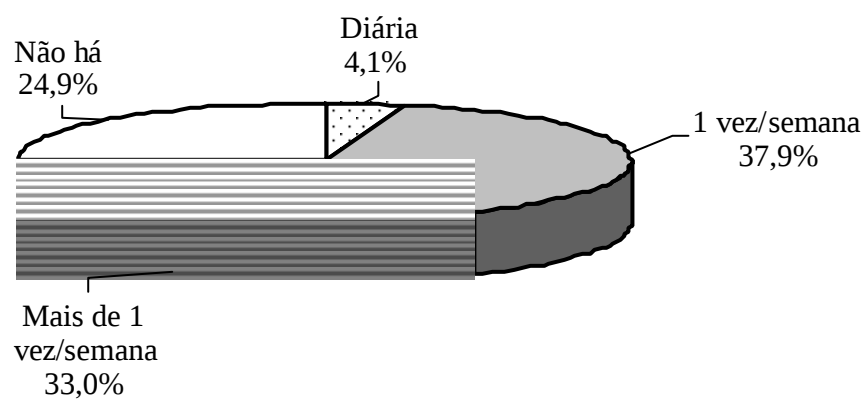


Figura 7- Porcentagem de residências segundo a frequência da coleta de lixo domiciliar.

As amostras foram avaliadas quanto à presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. através da reação de imunofluorescência indireta, resultando em 7,8% (87/1112) de prevalência.

A Tabela 6 apresenta o número e a porcentagem de amostras de cães colhidas nos diferentes Setores do município de Poxoréo-MT, segundo o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., através da reação de imunofluorescência indireta. Observaram-se animais positivos em todos os Setores avaliados (Figura 8) sendo que os Setores que apresentaram maior prevalência foram Alameda M. Dourado (18,9%), Santa Teresinha (16,4%), Jardim Poxoréo (15,4%) e Jarudore Vila (13,2%). Houve associação estatisticamente significativa ($P= 0,0037$) entre os Setores e o resultado observado.

Tabela 6 – Número (n) e porcentagem (%) de cães segundo os Setores do município de Poxoréo-MT e o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., através da reação de imunofluorescência indireta.

Setor	Positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
Alameda M. Dourado	7	18,9	30	81,1	37	100,0
Alto Coite Vila	8	8,6	85	91,4	93	100,0
Aparecida do Leste	5	10,6	42	89,4	47	100,0
Centro Poxoréo	7	7,5	86	92,5	93	100,0
Cohab Bela Vista	1	2,4	41	97,6	42	100,0
Cohab Xavante	10	6,4	146	93,6	156	100,0
Irantinópolis	6	3,3	174	96,7	180	100,0
Jarudore Povoado	1	2,2	44	97,8	45	100,0
Jarudore Vila	9	13,2	59	86,8	68	100,0
Jd Poxoréo	8	15,4	44	84,6	52	100,0
Lagoa Bairro	4	5,1	74	94,9	78	100,0
Paraíso do Leste	3	6,0	47	94,0	50	100,0

Sta Maria Bairro	6	10,9	49	89,1	55	100,0
Sta Teresinha	10	16,4	51	83,6	61	100,0
Vila Cruzeiro	2	3,6	53	96,4	55	100,0
Total	87	7,8	1025	92,2	1112	100,0

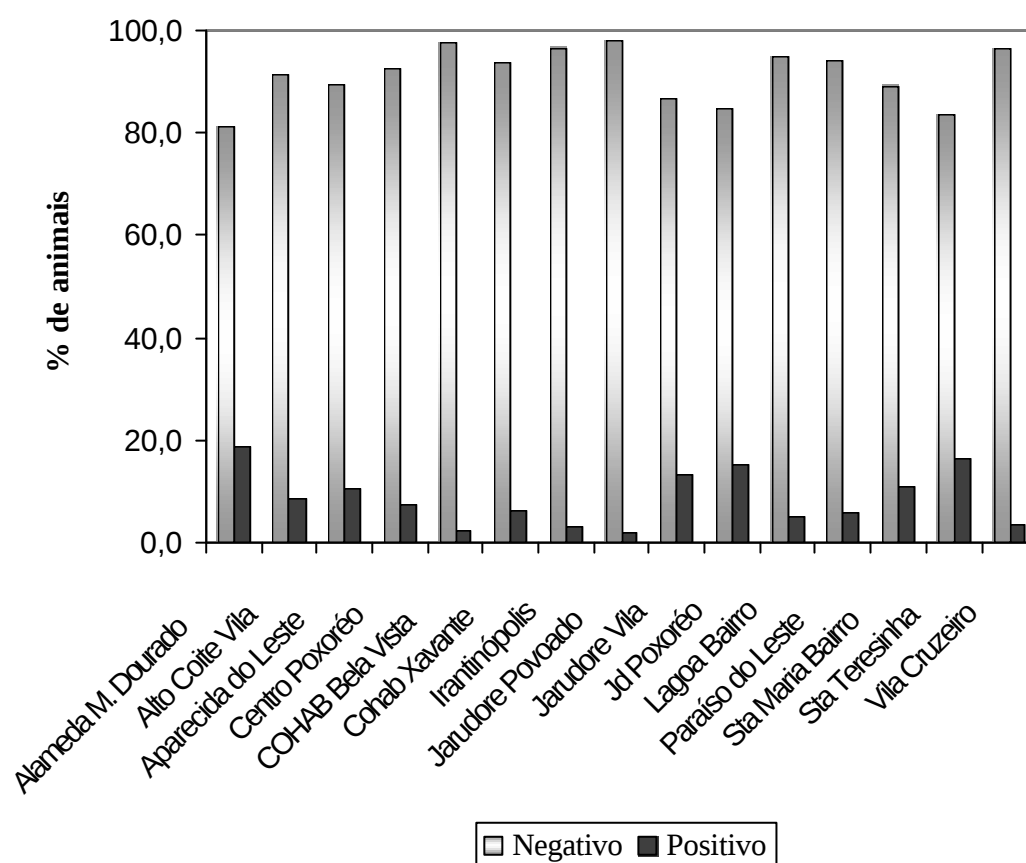


Figura 8- Porcentagem de cães do município de Poxoréo-MT segundo os Setores e o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp.

A ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania* sp. nos machos foi de 8,2% (57/691) enquanto que nas fêmeas foi de 7,5% (30/398), não havendo diferença estatisticamente significativa ($P= 0,6768$) entre esta variável e prevalência observada. Em 2,0% dos cães avaliados não foi possível obter a informação quanto ao sexo. A Tabela 7 a Figura 9 apresentam os resultados observados.

Tabela 7 - Número (n) e porcentagem (%) de cães avaliados segundo o sexo e o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., através da reação de imunofluorescência indireta.

Sexo	Positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
Macho	57	8,2	634	91,8	691	100,0
Fêmea	30	7,5	368	92,5	398	100,0
Avaliado	87	100,0	1002	100,0	1089	100,0

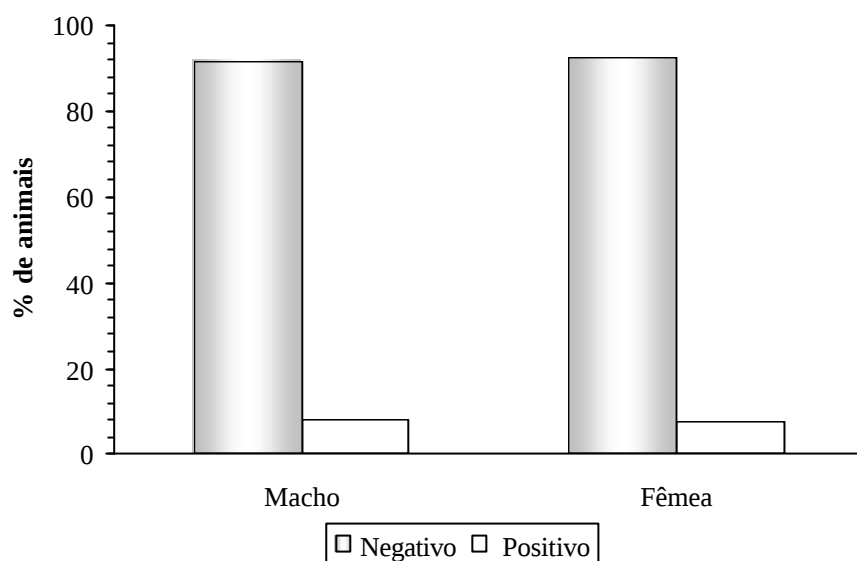


Figura 9 – Porcentagem de cães município de Poxoréo-MT segundo o sexo e o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. dos cães avaliados

A ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania* sp. foi observada em todas as faixas etárias, com exceção dos animais maiores que 168 meses de idade. Trezentos e três registros (27,2%) não continham informações sobre a idade dos animais. Os animais idosos (>84 meses de idade) apresentaram maior percentual de positividade, bem como os animais entre 60 e 84 meses de idade. Houve diferença estatisticamente significante entre as faixas etárias e ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania* sp. ($P=0,0006$). Na Tabela 8 e Figura 10 são apresentados os resultados das amostras avaliadas.

Tabela 8 - Número (n) e porcentagem (%) segundo a faixa etária o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., através da reação de imunofluorescência indireta dos cães avaliados.

Faixa etária (meses)	Positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
0-12	19	6,8	260	93,2	279	100,0

13-36	15	5,0	283	95,0	298	100,0
37-60	11	8,8	114	91,2	125	100,0
61-84	11	15,5	60	84,5	71	100,0
>84	8	22,2	28	77,8	36	100,0
Total	64	8,0	745	92,0	809	100,0

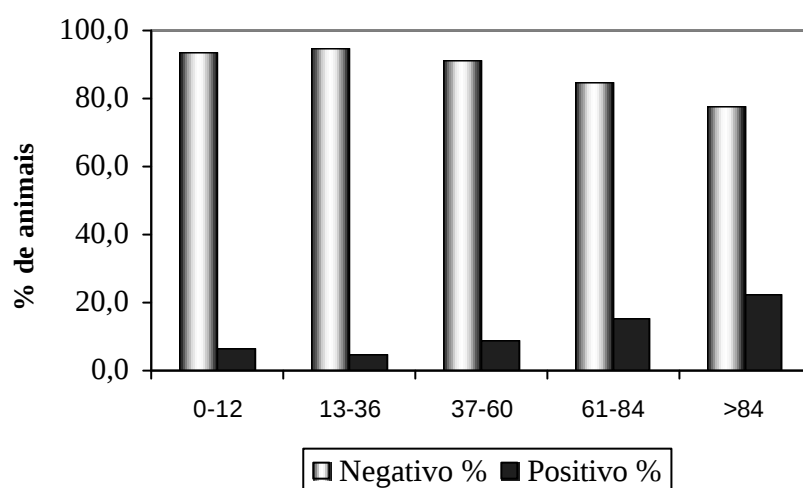


Figura 10 – Porcentagem dos cães avaliados no município de Poxoréo-MT segundo a faixa etária (meses) e o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp.

Dos animais sintomáticos, 12,85% (41/319) apresentaram resultado positivo para a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. Houve associação estatisticamente significativa entre a ocorrência de sintomatologia clínica e o resultado da pesquisa anti-*Leishmania* sp. ($P= 0,0013$). A Tabela 9 e a Figura 11 apresentam tais resultados.

Tabela 9- Número (n) e porcentagem (%) dos cães avaliados no município de Poxoréo-MT segundo a condição (sintomático e assintomático) e o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., através da reação de imunofluorescência indireta.

Condição	Positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
Sintomático	41	12,8	278	87,2	319	100,0
Assintomático	48	6,8	661	93,2	709	100,0
Total	89	8,7	939	91,3	1028	100

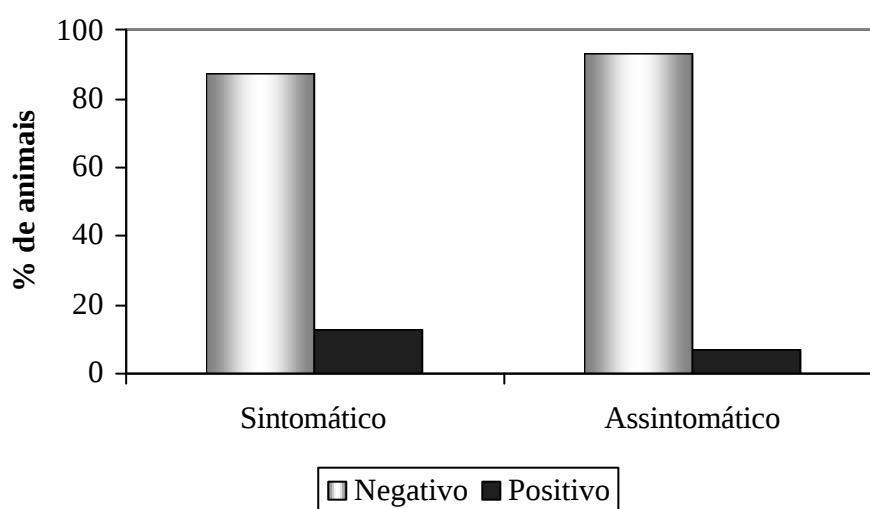


Figura 11- Porcentagem dos cães avaliados no município de Poxoréo-MT segundo a condição (sintomático e assintomático) e o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp.

Dentre os animais positivos, a sintomatologia clínica mais frequentemente observada foi ceratoconjuntivite (12,1%), seguida de lesões cutâneas (11,2%), onicogribose (11,0) e infartamento ganglionar (10,0). Edema de membros não foi observado em nenhum animal com positividade. Em 7,5 % das fichas não foi registrada a sintomatologia clínica. Observou-se associação estatisticamente significativa entre os diferentes sinais clínicos e a positividade ($P \leq 0,018$) para pesquisa anticorpo anti-*Leishmanias* sp. A Tabela 10 e a Figura 12 apresentam os resultados.

Tabela 10- Número (n) e porcentagem (%) dos cães avaliados no município de Poxoréo-MT segundo os sinais clínicos observados e o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., através da reação de imunofluorescência indireta.

Sinal clínico	Positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
Ceratoconjuntivite	7	12,1	51	87,9	58	100,0
Lesões cutâneas	21	11,2	167	88,8	188	100,0
Onicogribose	20	11,0	162	89,0	182	100,0
Infartamento Ganglionar	1	10,0	9	90,0	10	100,0
Alopecia	5	2,9	167	97,1	172	100,0
Edema membros	0	0,0	2	100,0	2	100,0
Total	54	8,8	558	91,2	612	100,0

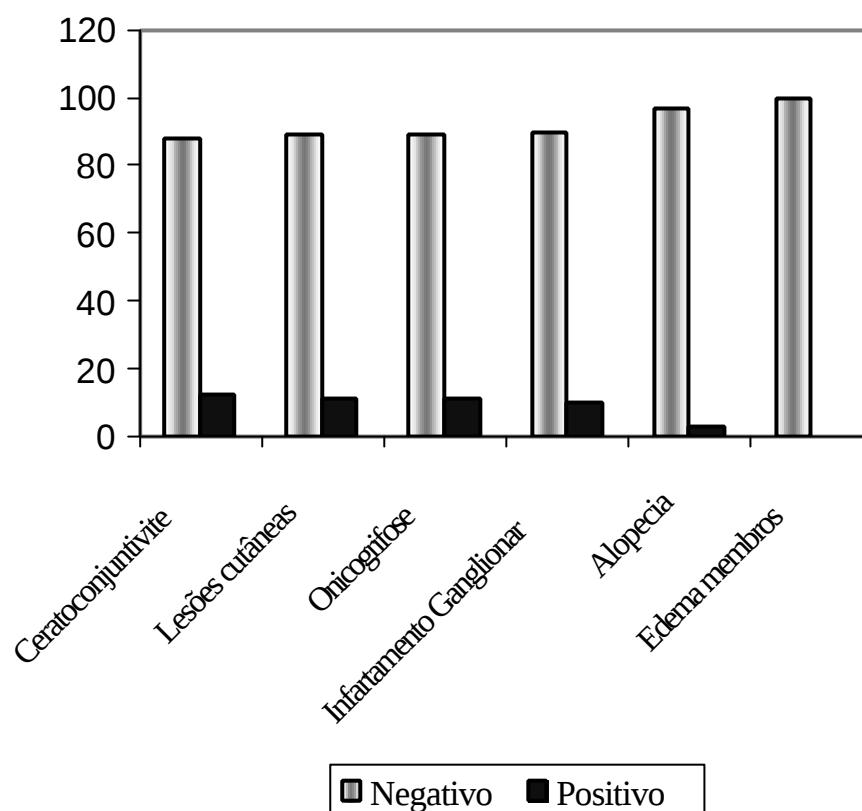


Figura 12 – Porcentagem de cães do município de Poxoréo-MT segundo os sinais clínicos e o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp.

Dentre os cães positivos, a espécie equina foi mais frequentemente observada co-habitando com os cães avaliados (22,2%), seguida da espécie suína (18,75%) e das aves, particularmente galinhas (9,0%). A Tabela 11 e a Figura 13 apresentam tais resultados. Observou-se associação estatisticamente significativa ($P=0,0315$) entre a presença de outras espécies animais e a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., através da reação de imunofluorescência indireta.

Com relação existência de coleta de lixo domiciliar, não houve associação estatisticamente significativa ($P=0,5705$) entre esta variável e a positividade dos cães avaliados. Os resultados podem ser observados na Tabela 12 e Figura 14.

Tabela 11- Número (n) e porcentagem (%) de cães do município de Poxoréo-MT segundo as espécies animais co-habitando os quintais e o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., através da reação de imunofluorescência indireta.

Animais	Positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
Aves	58	9,1	580	90,9	638	100,0
Suínos	6	18,8	26	81,3	32	100,0
Equinos	4	22,2	14	77,8	18	100,0
Total	68	9,9	620	90,1	688	100,0

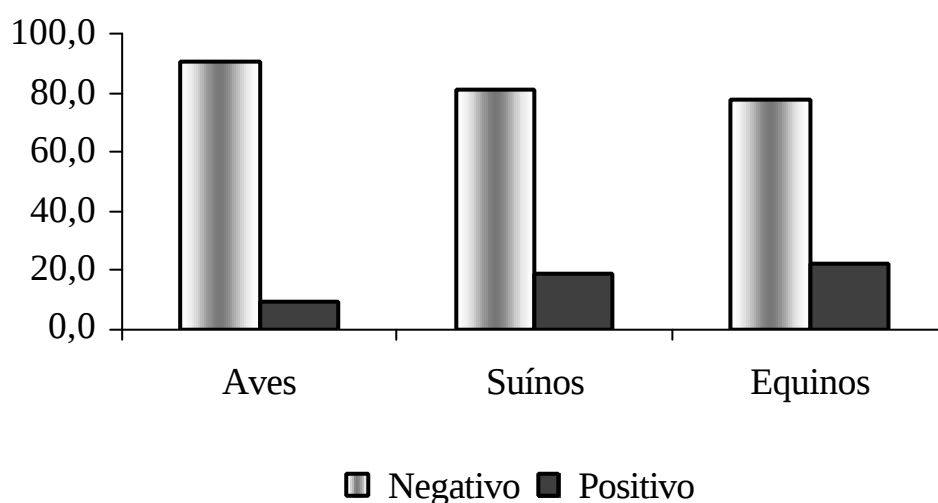


Figura 13- Porcentagem segundo as espécies animais co-habitando com os cães avaliados e o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp.

A Tabela 13 e a Figura 15 apresentam os resultados da positividade segundo a renda familiar, em salários mínimos. Esta variável também não apresentou associação estatisticamente significativa ($P=0,2650$) com a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., através da reação de imunofluorescência indireta.

Tabela 12- Número (n) e porcentagem (%) cães segundo a coleta de lixo domiciliar e o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., através da reação de imunofluorescência indireta.

Coleta Lixo	Positivos		Negativos		Total	
	n	%	n	%	n	%
Presente	51	7,0	681	93,0	732	100,0
Ausente	12	5,0	231	95,0	243	100,0
Total	63	6,5	912	93,5	975	100,0

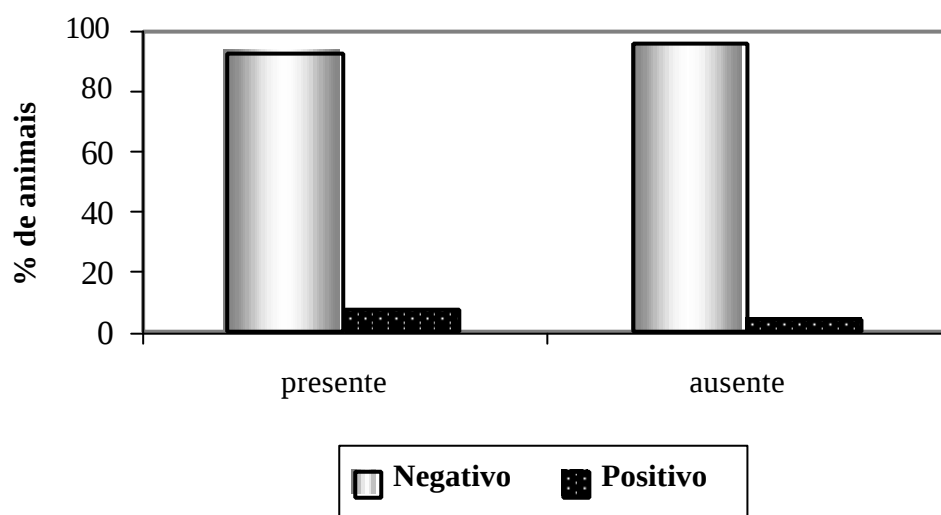


Figura 14- Porcentagem de cães do município de Poxoréo-MT segundo a presença de coleta de lixo domiciliar e o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp.

Tabela 13– Número (n) e porcentagem (%) de cães segundo a renda familiar (salário mínimo) e o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., através da reação de imunofluorescência indireta.

Renda Familiar	Positivo		Negativo		Total	
Salário mínimo	n	%	n	%	n	%
1	57	7,1	744	92,9	801	100,0
2	17	9,2	167	90,8	184	100,0
3	2	2,6	74	97,4	76	100,0
Total	76	7,2	985	92,8	1061	100,0

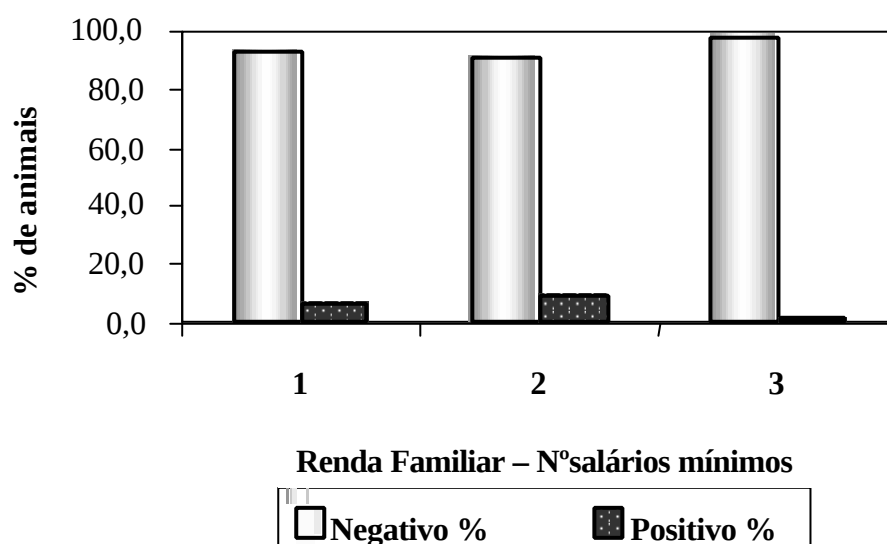


Figura 15- Porcentagem de cães do município de Poxoréo-MT segundo a renda familiar (salário mínimo) e o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp.

Com o intuito de avaliar a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) como instrumento de vigilância da LVC, 168 amostras de sangue periférico foram avaliadas para a amplificação de DNA de kinetoplasto de *Leishmania* sp., sendo 80 amostras reagentes para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. através da RIFI e 88 não reagentes.

A avaliação do limiar de detecção da PCR revelou ser possível a amplificação de fragmento de DNA (120bp) em amostra de sangue artificialmente contaminada com 10^{-2} formas promastigotas de *Leishmania L. chagasi* (Figura 16).

A Figura 17 apresenta alguns dos resultados observados em amostras de sangue de cães do município de Poxoréo-MT, com reação sorológica positiva e negativa para *Leishmania* sp. Observa-se que houve amplificação de fragmento de DNA em 6 das 8 amostras positivas (b, c, h, i, l, p), não ocorrendo a amplificação em 2 amostras positivas (f, g). Todas as amostras soro positivas da Figura 17 apresentaram ausência de amplificação de fragmento de DNA de *Leishmania* sp.

A Tabela 14 apresenta os resultados observados segundo a avaliação laboratorial realizada. Adotando-se a RIFI como método diagnóstico padrão, a validação da PCR segundo Guimarães (1985) revelou, entre a PCR e RIFI, co-sensibilidade de 55%, co-especificidade de 67% e concordância de 61,3%. O coeficiente de concordância Kappa foi calculado em 0,2213 e, tomando-se como base a classificação de Kappa proposta por Landis & Koch (1977), esta concordância foi considerada leve.

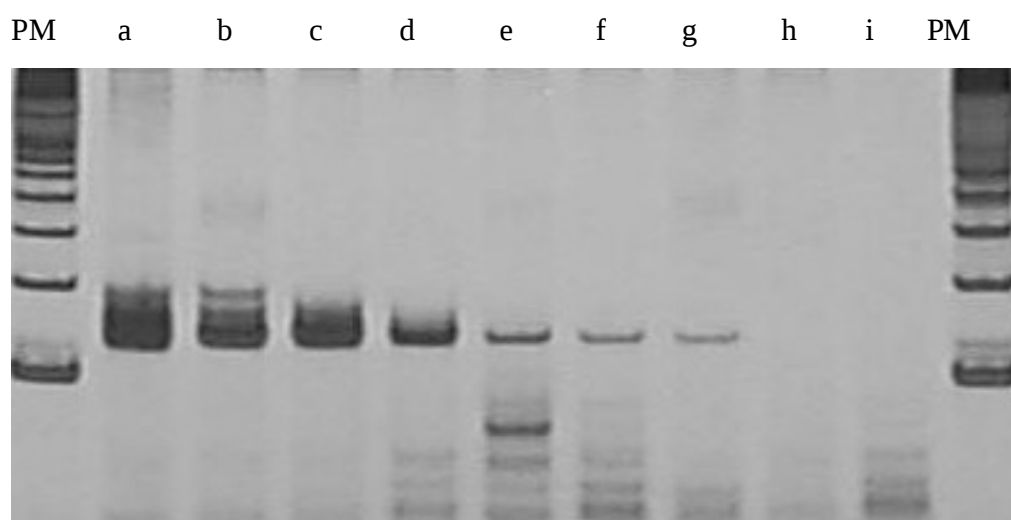


Figura 16- Eletroforese em gel de acrilamida 8% corado com nitrato de prata. Amplificação de fragmento de DNA de (a) formas promastigotas de *Leishmania chagasi*; (b) 10.000 formas promastigotas de *Leishmania chagasi*; (c) 1.000 formas promastigotas de *Leishmania chagasi*; (d) 100 formas promastigotas de *Leishmania chagasi*; (e) 10 formas promastigotas de *Leishmania chagasi*; (f) 0,1 formas promastigotas de *Leishmania chagasi*; (g) 0,01 formas promastigotas de *Leishmania chagasi*; (h) DNA de cão negativo e (i) sem DNA. PM = marcador em escada de 100pb.

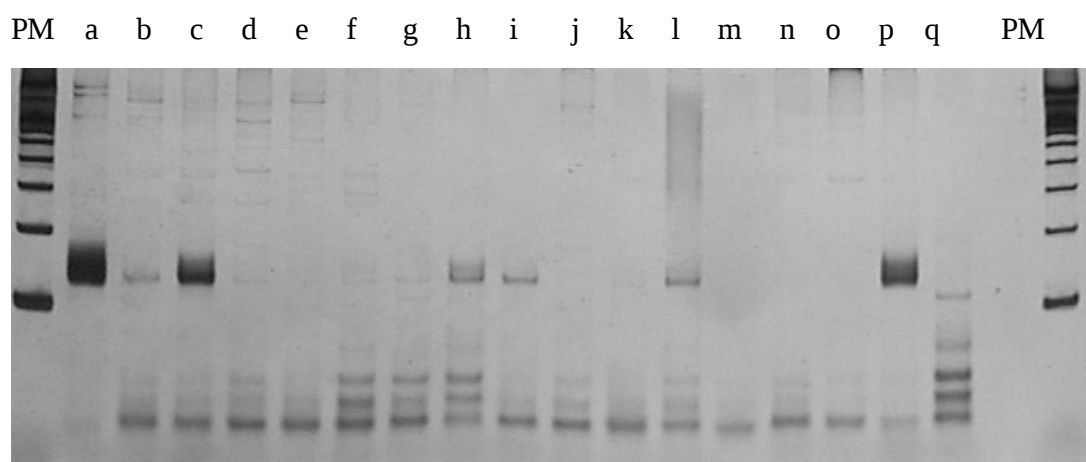


Figura 17- Eletroforese em gel de acrilamida 8% corado com nitrato de prata. Amplificação de fragmento de DNA (a) Controle Positivo contendo 10^{-1} formas promastigotas de *Leishmania chagasi*.; (b-e) de sangue periférico de cão oriundo do Setor Irantinópolis; (f-k) Setor Jd. Poxoréo; (l-m) Setor Lagoa; (n) Setor Xavante; (o) de sangue periférico de cão de área não endêmica; (p) de sangue periférico de cão naturalmente infectado com *Leishmania* sp.(q) sem DNA. PM = marcador em escada de 100pb.

(b, c, f, g, h, i, l, n, p) cães positivos para a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. através da reação de imunofluorescência indireta; (d, e, j, k, m, o) cães negativos para a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. através da reação de imunofluorescência indireta

Tabela 14- Número de amostras de sangue de cães segundo o resultado da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e reação em cadeia pela polimerase (PCR).

PCR	IFI		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	44	29	73
Negativo	36	59	95
Total	80	88	168

Co-sensibilidade= 55%; co-especificidade= 67%; co- concordância= 61,3%

Coeficiente Kappa= 0,221

DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado Poxoréo-MT, município com registro de casos humanos e caninos de leishmaniose visceral, localizado em área próxima à região de floresta, com a presença de reservatórios silvestres, além da presença de animais domésticos tidos como reservatórios urbanos.

A região possui atividades comerciais e rurais voltadas para o garimpo e a pecuária bovina em sistema extensivo, atividades com permanente trânsito entre a região urbana e rural, propiciando a urbanização da doença e a manutenção do ciclo enzoótico.

As medidas de controle realizadas anteriormente compreendem a notificação e tratamento de casos humanos, borrifação domiciliar e peri-domiciliar com inseticida piretróide e diagnóstico e eutanásia de cães soropositivos, através da Imunofluorescência Indireta.

A prevalência de 7,8% observada na pesquisa encontra-se dentro dos parâmetros já relatados para regiões endêmicas. O valor de prevalência relatado tem variado na dependência da área avaliada, da amostragem utilizada bem como do método diagnóstico. Paranhos-Silva et al. (1996) observaram 23,5% de prevalência de cães de Jequié-BA, porém estes autores utilizaram o teste ELISA indireto como método diagnóstico o que pode ter contribuído para a diferença de prevalência observada, além das áreas analisadas serem diferentes. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) tem sido o método mais frequentemente utilizado e o valor observado na presente investigação (7,8%) está de acordo com o observado por Madeira et al. (2000) que observaram 11,94% de positividade em amostras de cães assintomáticos da região Itaipu-RJ; por Camargo-Neves et al (2001) que observaram 12% de prevalência em Araçatuba-SP; por França-Silva et al. (2003) cuja prevalência observada foi de 9,7% em cães da área endêmica de Montes Claros-MG.

A prevalência observada nos diferentes Setores de Poxoréo-MT variou de 2,2% (Jarudore Vila) a 18,9% (Alameda M. Dourado). Embora estas diferenças sejam estatisticamente significantes, não foram observadas características físicas ou de densidade populacional que pudessem ser relacionadas a estes achados. Paranhos-Silva et al. (1996) também observaram grande variação na prevalência de diferentes estratos de Jequié-BA,

porém sem relação com os parâmetros avaliados. Em ambos os casos, a avaliação da densidade de flebotomíneos não foi realizada.

A ausência de associação estatisticamente significativa entre soro-prevalência e sexo observada no presente trabalho também foi relatada por Paranhos-Silva (1996), por Feitosa et al. (2000), por Cabrera et al. (2003) e por França-Silva et al (2003).

A positividade e a faixa etária dos cães avaliados revelou associação estatisticamente significativa, tendo sido maior para cães com idade acima de 84 meses (22,2%). Abranches et al. (1991) em Portugal e França-Silva et al. (2003) no Brasil, também observaram maior prevalência em animais de 72 a 84 meses de idade (12,8%); já Feitosa et al. (2000) relataram maior positividade em animais entre 36-72 meses de idade (29%). As diferenças observadas podem ser decorrentes de ambientes distintos, bem como das diferentes medidas de controle adotadas.

O quadro clínico da leishmaniose visceral americana canina varia de animais aparentemente saudáveis a aqueles em estágios finais da doença. Nesse estudo, os cães foram clinicamente classificados em assintomáticos, com ausência de sinais clínicos e sintomáticos, quando apresentavam alopecia, ceratoconjuntivite, onicogribose, lesões cutâneas e/ou edema de membros. Observou-se 6,8% dos animais soropositivos para LVC sem quaisquer sinais clínicos da doença. O período de incubação longo (2-4 meses) e a imunocompetência dos animais podem contribuir para a ocorrência de cães soropositivos e assintomáticos. Madeira et al. (2000) também relataram positividade (11,94%) em cães assintomáticos da região de Itaipu-RJ.

Dos animais soropositivos e sintomáticos, a ceratoconjuntivite, lesões cutâneas e onicogribose foram os sinais clínicos mais freqüentemente observados (12,1, 11,2 e 11,0%, respectivamente). Feitosa et al. (2000) relataram 68% de cães positivos para LVC com alterações dermatológicas que compreendiam alopecia difusa e lesões ulcerativas e 51% de cães positivos com onicogribose. Linfadenopatia, como o sinal clínico mais frequente foi observada em 10% dos cães soropositivos e as diferenças observadas podem ter sido decorrentes da população de cães estudada uma vez que os animais avaliados, recorreram a um serviço veterinário devido a alguma alteração fisiológica.

A presença de outras espécies animais co-habitando com os cães avaliados revelou associação estatisticamente significativa com a positividade, sendo maior quando da

presença da espécie eqüina (22,2%) seguida da suína (18,8%). Estes resultados diferem dos de Moreira Júnior et al. (2003) que relataram, na Bahia, maior risco relativo com relação à presença da espécie suína (4,1). Estes autores não se referem à presença de eqüinos na referida pesquisa

A presença da coleta de lixo domiciliar pode influenciar o ambiente urbano propiciando maior ou menor fonte de matéria orgânica para os flebotomíneos. Tal variável não revelou associação estatisticamente significativa com a prevalência observada e não há relatos de outros autores com relação à esta variável.

A renda familiar mais freqüentemente observada (1 salário mínimo), retrata uma população de baixa renda vivendo em condições que podem favorecer a manutenção ou até o incremento da doença.

Os resultados de validação da PCR não revelaram ser esta uma boa ferramenta para a vigilância epidemiológica da LVC uma vez que apresentou baixa sensibilidade (55%) e baixa especificidade (67%) relativas. Embora avaliassem a PCR para teste de triagem da leishmaniose cutânea, Reithinger et al. (2003) também observaram baixa sensibilidade desta ferramenta diagnóstica. Os testes sorológicos, além de apresentarem maior sensibilidade, têm a maior facilidade de execução e o baixo custo a seu favor. Por outro lado, a PCR pode ser de grande valia no diagnóstico individual e no acompanhamento de tratamento de paciente humano.

CONCLUSÕES

- A prevalência da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em Poxoréo-MT foi de 7,8%;
- Houve associação estatisticamente significativa entre os diferentes Setores do município de Poxoréo-MT e o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. nos cães avaliados;
- Não se observou associação estatisticamente significativa entre os sexos e a prevalência de LVC;
- Houve associação estatisticamente significativa entre a faixa etária e a prevalência de LVC, tendo sido maior em cães maiores que 7 anos de idade;
- Houve associação estatisticamente significativa entre os sinais clínicos observados e a prevalência de LVC;
- Ceratoconjuntivite, lesões cutâneas e onicogribose, respectivamente, foram os sinais clínicos mais freqüentemente observados nos animais soropositivos;
- A presença de outra espécie animal co-habitando com os cães avaliados revelou associação estatisticamente significativa com a prevalência de LVC sendo a espécie equina a mais freqüentemente observada entre os animais soropositivos.;
- A coleta de lixo domiciliar não apresentou associação estatisticamente significativa com a prevalência da LVC;
- A renda familiar não apresentou associação estatisticamente significativa com a prevalência da LVC;
- A aplicação da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em amostras de sangue periférico não se revelou em bom instrumento diagnóstico para a vigilância epidemiológica da LVC devido à baixa sensibilidade e especificidade observadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M.C.D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.M.; SANTOS-GOMES, G.M.; JANZ, J.G. Canine leishmaniasis pathological and ecological factors influence transmission of infection. **Journal of Parasitology**, v.77, p.557-561, 1991.
- AKHAVAN, D. Análise de custo-efetividade do componente de leishmaniose no projeto de controle de doenças endêmicas no nordeste do Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 25, p.203-252, 1996.
- ALENCAR, J.E. Expansão do calazar no Brasil. **Ceará Medicina**, v. 5, n.1-2, p.86-102, 1983.
- ALENCAR, J.E.; NEVES, J; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar) In: Veronesi, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 8ed. P.706-717, 1991.
- ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J.C.; SHERLOCK, I.EULALIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER JR., R.; BADARO, R.; DAVID, J. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.53, n.3, p. 251- 255 1995.
- BADARO, R. & DUARTE, M. Leishmaniose visceral. In: Veronesi, R. & Foccacia, R. **Tratado de Infectologia**. v.1, p.1234-1258, 1997.
- BADARO, R.; JONES, T.C.; LORENÇO, R.; CERF, B.J. SAMPAIO, D. CARVALHO, E.M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W.R. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Journal of Infectious Disease**, v. 54, n.4, p. 639-649, 1986.
- CABRERA, M.A; PAULA, A, A.; CAMACHO, L.A.; MARZOCHI, M.C.; XAVIER, S.C.; SILVA, A.V.; JANSEN, A.M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of Risk Factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 25, n.2, p. 79-83, 2003.

- CAMARGO M.E., REBONATO C. Cross reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, p.500-505, 1969.
- CAMARGO-NEVES, V.L.F.; KATZ, G.; RODAS, L.A.C.; POLETTO, D.W.; LAGE, L.C.; SPÍNOLA, R.M.F.; CRUZ, O.G. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana- Araçatuba-São Paulo, Brasil, 1998-1999. **Cadernos de Saúde Pública**, v.17, n.5, p.1263-1267, 2001.
- CORRÊA, W. M. & CORRÊA, C.N.; **Leishmaniose- Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**, Rio de Janeiro, 2ª Ed., 1992.; p 718-9.
- COSTA C.A.; GENARO, O.; LANA, M.; MAGALHÃES, P.A.; DIAS, M.; MICHALICK, S.M.; MELO, M.N.; COSTA, R.T.; MAGALHÃES-ROCHA, N.M.; MAYRINK, W. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 24, p 21-25, 1991.
- DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar, no Ceará. **O Hospital**, v.48, p. 61-76, 1955.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v.1. p.417-423, 1996.
- EVANS, T.G.; VASCONCELOS, I.A.B.; LIMA, J.W.; TEIXEIRA, J.M.; McAULLIFE, I.T.; LOPES, U.G.; PEARSON, R.D.; VASCONCELOS, A.W. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Assessment of serodiagnostic methods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n.2, p.118-123, 1990.
- FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTO, M. C.; PERRI, S.H.; Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba- SP, Brasil. **Clínica Veterinária**, v.28, p. 36-44, 2000.
- FISA, R.; RIERA, C.; GÁLLEGO, M; MANUBENS, J.; PORTÚS, M.; Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Veterinary Parasitology**, v. 99, p.105-111,2001.
- FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A. M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E.P.; COSTA, J.S.;GENNARO, O., NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of

Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.111, p.161-173, 2003.

GRIMALDI, G. Jr.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Revista Clinica Microbiologica**, v.6, p.230 – 250, 1993.

GUIMARÃES, M.C. Exames de laboratório: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, p.117-120, 1985.

HARRIS, E.; KROPP, G.; BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AGABIAN, N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of new world leishmania complexes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.1989-1995, 1998.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS,S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; GORGOULIS, V.G. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology** , v. 113, p.99-113, 2003.

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J.P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p.210-215, 2002.

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

LIGHT,R.J. Measures of response agreement for qualitative data: Some generalizations and alternatives. **Psychology Bulletin**, v. 76,p. 365-377, 1971

MADEIRA, M. F.; SERRA, C. M.; UCHOA, C.M.; DUARTE, R.; CRUZ, D,A.; PERDOMO, C.C. Leishmaniose canina: avaliação sorológica de 310 cães na região de Itaipu, Rio de Janeiro. **Caderno de Saúde Pública**, V. 16, n. 2, p. 568, 2000.

MILES, M.A; VEXENAT, J.A.; FURTADO CAMPOS, J.H.; FONSECA DE CASTRO, J.A.A. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis .**Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum**, Spain, p.46-53. 1999

MONTEIRO, P.S.; LACERDA, M.M.; ARIAS, J.R. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.27,supl. III,p.64-72, 1994.

MOREIRA Jr., E.D.; SOUSA, V.M.; SREENIVASAN, M.; LOPES, N.L.; BARRETO, R.B.; CARVALHO, L.P. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.69, n.4, p.393-397, 2003.

MOURA, S.; FERNANDES, C.G.; PANDOLPHO, V.C.; SILVA,R.; Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Journal Veterinary Res. Animal Science**, v. 36, n.2, p.101-102, 1999.

NASCIMENTO, M.S.B.T. **Epidemiologia da leishmaniose visceral na ilha de São Luis, Maranhão-Brasil** . (tese de doutoramento, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 1996).

PALATINIK-DE-SOUSA, C.B.; SANTOS, W.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; REIS, A.B.; PALATINIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 65, n.5, p.510-517, 2001.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L.A.R.; SANTOS, W.C.; GRIMALDI Jr, G.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 55, n.1, p. 39-44, 1996.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLOSRIOSOS, N.S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.2931-2935, 1999.

REITHINGER, R.; ESPINOZA, J.C; COURTENAY, O.; DAVIES,C.; Evaluation of PCR as a Diagnostic Maa-Screening Tool to detect Leishmanis(Vianna)spp in Domestic Dogs (*Canis familiaris*). **Journal of Microbiology**, v 41, n.41, p. 1486-1493, 2003.

REITHINGER,R.; LAMBSON, B. E.; BARKER, D.C.; DAVIES, C.R. Use of PCR do detect *Leishmania* (Viannia) spp. in dog blood and bone marrow. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.748-751, 2000.

RODGERS, M.R.; POPPER, S..J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, p.267-275, 1990.

SAS Institute Inc., **SAS OnlineDoc®**, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.

SHAW, J.J.; LAISON, R., Ecology and epidemiology: new world. In: Peters, W.; Killick-Kendrick, R.; eds. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Volume 1** New York: Academic Press, 1987, p.291-363.

SILVA, A.R.; BULCÃO, J.R.; MENDES, W.A.; COSTA, E.; BRASIL, R.P. Leishmaniose visceral: uma nova realidade no quadro nosológico do Estado do Maranhão. In: XX Congresso Brasileiro de Medicina Tropical, 1984. **Anais**. p.96. 1984.

SMYTH, A.J.; GHOSH, A.; HASSAN, M.Q.; BRUJIN, M.H.L.; ADHYA, S.; MALLIK, K.K.; BARKER, D.C. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**, v. 105, p.183-192, 1992.

TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L.; BARBOSA, A. J. A.; MICHALICK, M. S. M; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J. C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 38, n.2, p.81-89, 1996.

VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania*. **Brazil-Médico**, v.25, n.41, p. 411, 1911.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1998. 930 p.

ANEXO 2

FICHA N° _____

DATA: _____ Setor/Bairro: _____

NOME DO DONO: _____ Tel: _____

ENDEREÇO: _____

NOME DO CÃO: _____ () M () F

RAÇA: _____ TAMANHO: () grande () médio () pequeno

PELAME () curto () longo COR: _____

IDADE: _____ ANOS () não sabe, indicar: () <6 m () 6 m-1 ano () adulto

DE QUE CIDADE ADQUIRIU ESTE ANIMAL?

() Poxoréo; () outra cidade: _____; () não sabe

ESTADO GERAL: () bom () regular () ruim

SINAIS CLÍNICOS: () assintomático () sintomático

() alopecia ocular/nasal () edema de membros

() ceratoconjuntivite () onicogribose

() lesões cutâneas () infartamento ganglionar

QUANTOS ANIMAIS JÁ FORAM SACRIFICADOS POR LEISHMANIOSE? _____

QUANTOS OUTROS ANIMAIS VOCÊ TEM EM CASA?

() nenhum; () não sabe _____ cães; _____ cadelas; _____ filhotes

OUTROS ANIMAIS NO QUINTAL:

() galinha: distância _____ m;

() porco: distância _____ m

() cavalo: distância _____ m

COLETA DE LIXO: () diária () 1 vez /semana () + de 1 vez/semana () não há

QUAL A RENDA FAMILIAR? _____ (salários mínimos)

Declaro ter sido esclarecido de que as amostras de sangue colhidas de meu animal serão utilizadas para pesquisa de leishmaniose.

R.G: _____ Assinatura: _____