

Simone Baldini Lucheis

Tripanossomatídeos em cães de pacientes chagásicos crônicos, habitantes de Botucatu (SP) e região, avaliados pelos métodos de xenodiagnóstico artificial, hemocultura e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do Título de Doutor em Doenças Tropicais (Modalidade Biologia Tropical)

Orientadora: Prof^a Dr^a Jussara Marcondes-Machado

Botucatu – SP

2003

INTRODUÇÃO

***Aspectos Gerais da Epidemiologia da doença de Chagas**

- DC ou Tripanossomíase Sul-Americana
protoz. flagelado *T. cruzi*
 - 17 países da A.L. – 16 a 18 milhões infectados
Brasil: 5 milhões
 - Enzootia; mamíferos e triatomíneos silvestres
 - Desequilíbrio ecológico: invasão dos abrigos de animais e habitações humanas por triatomíneos – adaptação progressiva
homem e animais (**cães**) infectados pelo *T. cruzi*
 - Áreas com reservatórios silvestres (gambás e roedores) de tripanossomatídeos – infecção no âmbito peridomiciliar e domiciliar

- Carlos Chagas (1909): **infecção canina** – reservatório natural de vários tripanossomatídeos
- Interação vetores $\Leftrightarrow$ homem $\Leftrightarrow$ cão $\Leftrightarrow$ reserv. silvestres
 - infecções naturais com outros tripanossomas: *T. rangeli*
- *T. rangeli*: homem, reservatórios animais e vetores triatomíneos
- Infecções naturais: Venezuela, Colômbia, Paraguai: cães, gambás; camundongos e ratos
- Infecções únicas e/ou mistas; reatividade cruzada em ensaios sorológicos

- Referências sobre existência de triatomíneos
1950: início de combate aos vetores (SPM – SUCEN)
Estado de SP: anos 70: início da interrupção da transmissão pelo *T. infestans*
- Ações de controle sistematizadas em 1975
1983: transmissão virtualmente interrompida pelo *T. Infestans*
- Vigilância entomológica atual - espécies secundárias: *P. megistus*, *T. sordida*, *R. neglectus*
- Vias de infecção: vetorial, via oral (alimentos/carnivorismo), ectoparasitas

- Diagnóstico laboratorial: xenodiagnóstico, hemocultura e PCR para identificação específica dos tripanossomas – cinetoplasto (kDNA)
- kDNA *T. cruzi*: 330 pb; kDNA *T. rangeli*: amplificado com os mesmos primers do *T. cruzi*; 760 pb e bandas adicionais (300 – 450 pb – Vallejo et al. 1999)

Doença de Chagas na região de Botucatu (SP)

- **Sede da DIR-XI**
- **H.C.: A. D .T. P. – pacientes chagásicos crônicos**

Importância do estudo

- **Cão: principal reservatório doméstico - caráter zoonótico**
- **Investigar a infecção de cães por tripanossomatídeo**
- **DIR-XI e DIR-XXIII : procedência da maioria dos pacientes**
- **Cães: papel exercido no contexto da epidemiologia da DC**
- **Susceptíveis à infecção**
- **Possível presença do vetor; animais sinantrópicos**
- **Busca ativa constante**

OBJETIVOS

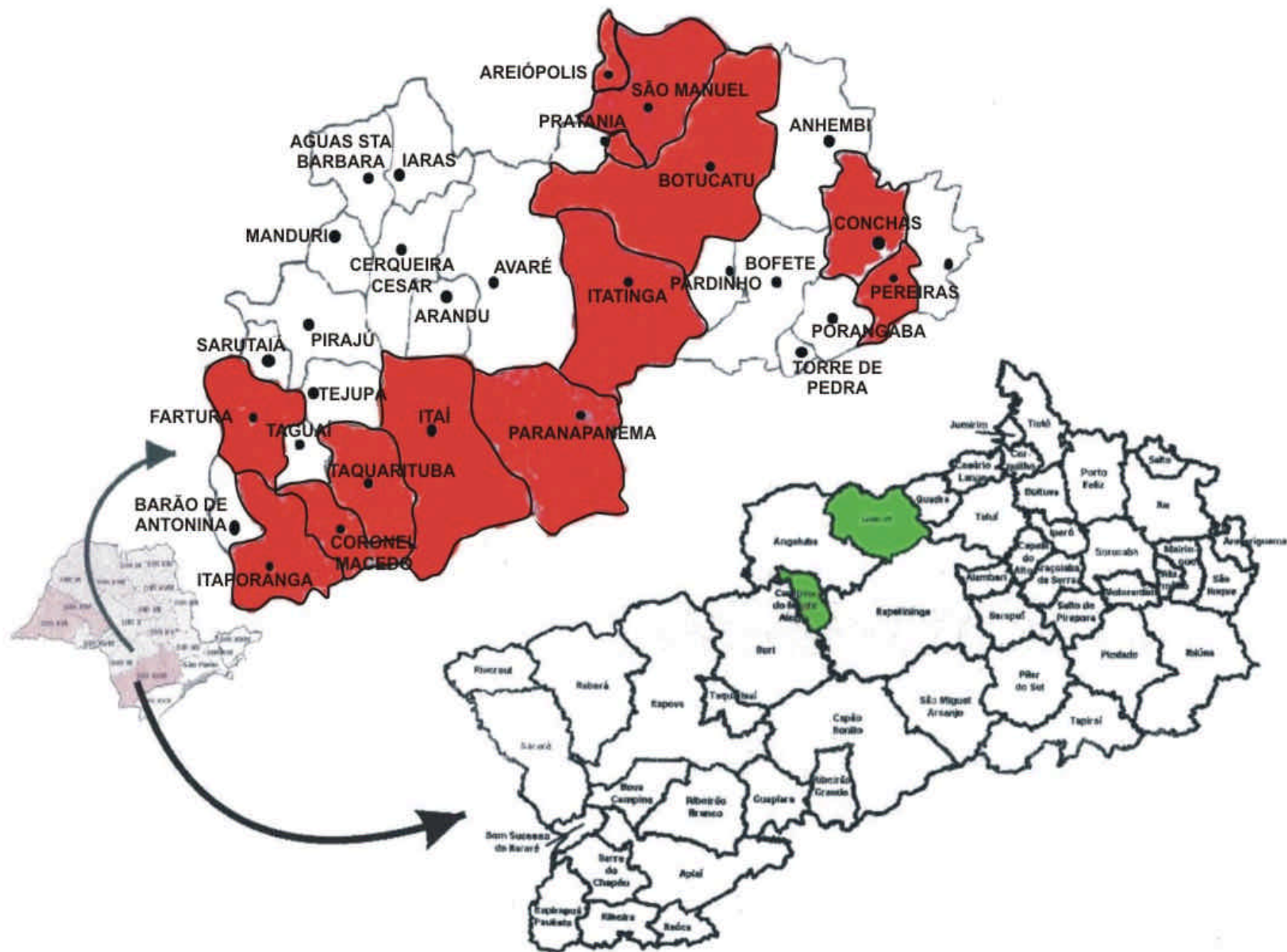
Tendo em vista a informação de que a doença de Chagas está erradicada do Estado de São Paulo, desde 1983 (Wanderley 1993), este trabalho teve como finalidade, em municípios da DIR-XI e da DIR-XXIII:

- 1) Verificar a presença de infecção por tripanossomatídeos, por meio de xenodiagnóstico artificial e hemocultura, em cães que convivam no ambiente domiciliar com indivíduos sorologicamente positivos, com ou sem xenodiagnóstico positivo para doença de Chagas.
- 2) Submeter todas as amostras positivas ao xenodiagnóstico artificial e/ou à hemocultura à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Trypanosoma cruzi* / *Trypanosoma rangeli*.
- 3) Estudar comparativamente os resultados obtidos nas provas diagnósticas aplicadas e sua associação com as variáveis epidemiológicas (sexo, faixa etária e procedência).

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas pesquisadas

- **Período de fevereiro – setembro/2001**
- **13 municípios da DIR XI e dois da DIR XXIII**



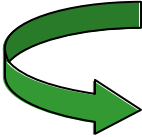
*** Características dos proprietários dos cães**

- **Chagásicos crônicos –
seleção proprietários de cães**
- **30 pacientes com sorologia positiva;
entrevista epidemiológica**

*** Características dos cães**

- **50 cães pertencentes a 30 indivíduos chagásicos crônicos;**
- **Todos domiciliados; aspecto geral bom**
- **Características gerais dos cães**

*** Coleta das amostras**

8ml sangue  **5ml tubo com citrato de sódio**
3ml tubo com EDTA

*** Pesquisa de triatomíneos nos domicílios**

- **Funcionários da SUCEN – vistorias no intra e peridomicílio**
- **Ênfase nos locais de maior permanência dos cães**







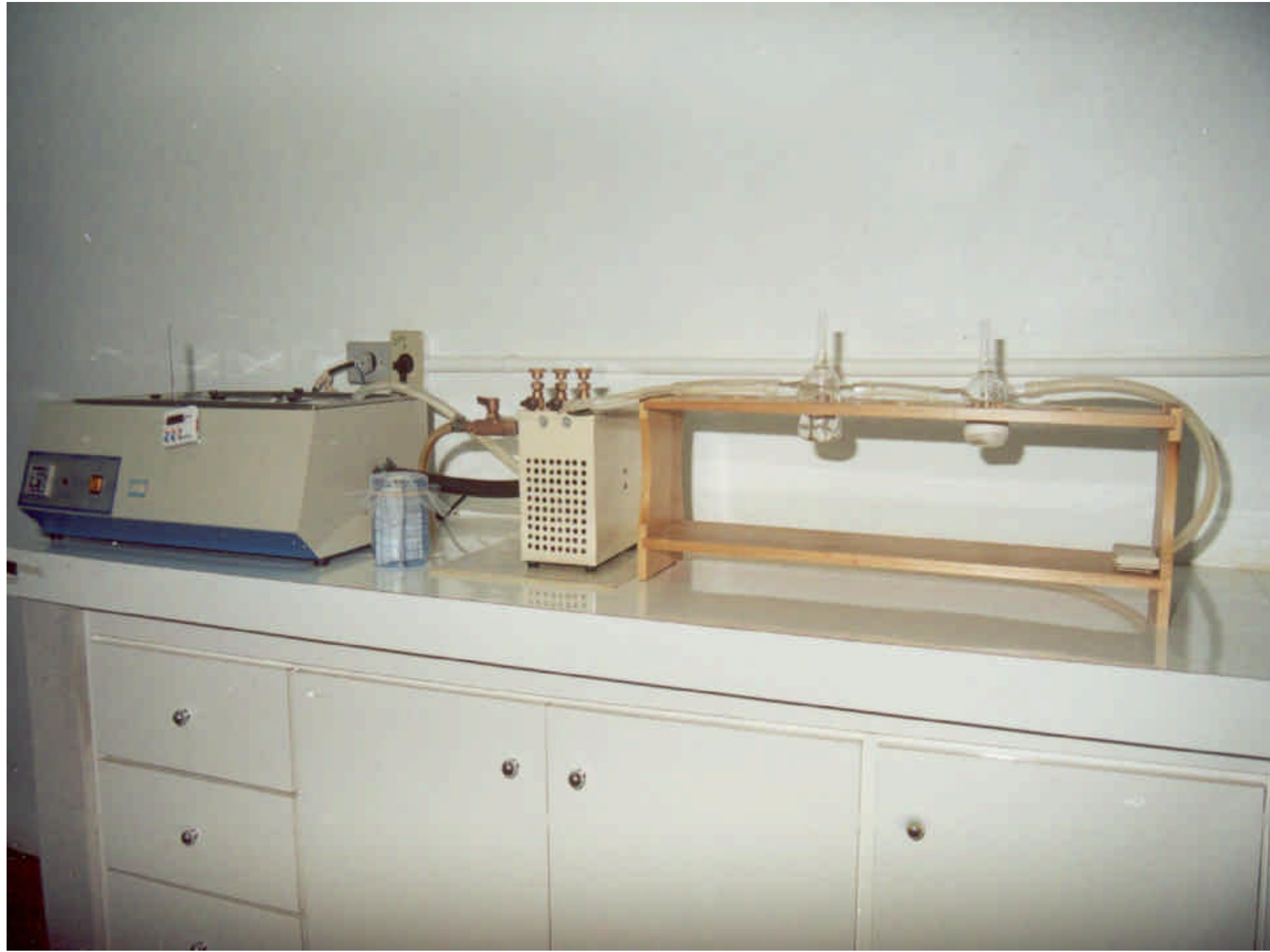






*** Xenodiagnóstico artificial**

- Lab. Experimental de Doenças Tropicais da FM
- 5ml sangue em citrato de sódio
- 40 ninfas de *Dipetalogaster maximus*





*** Hemocultura**

- **Lab. Experimental de Doenças Tropicais da FM**
- **3ml sangue em EDTA – capela**
- **Plasma, camada leucocitária, sedimento de hemácias**
- **LIT- Lab. Diagn. Zoonoses - FMVZ**



*** Preparo das amostras de sangue canino em meio LIT para a técnica da PCR**

- Tripanossomos em LIT e culturas negativas**
- Lavagem em PBS estéril (pH 7.2)**
- Centrifugação a 1000rpm/ 10`/2 x**
- Sedimento armazenado a -20C até extração de DNA**

*** Análise Estatística**

Foram abordados dois aspectos na análise estatística dos resultados, descritos a seguir, utilizando como referência Rosner (1986).

1. Influência de antecedentes (sexo, faixa etária e procedência) nos resultados dos testes: foram elaboradas tabelas com o número e a proporção de positividade e o número total de amostras. A comparação entre as proporções de positividade foi feita pelo teste de Qui-quadrado, com o cálculo direto de p .

2. Concordância ou reprodutibilidade entre pares de técnicas: foram elaboradas tabelas cruzando-se as duas técnicas e anotando-se as frequências de concordâncias (++) e --) e de discordâncias (+- e -+). Utilizou-se a estatística kappa, com os cálculos de κ , z e p, onde z é a normal padrão; quando $\kappa < 0,4$ a concordância pode ser considerada fraca ou marginal.

Em todas as análises efetuadas, as estatísticas calculadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, onde p é a probabilidade de erroneamente concluir-se pela significância.

RESULTADOS

Tabela 1. Distribuição de 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP, quanto ao sexo e à idade.

Faixa Etária		Macho	Fêmea	TOTAL
I	[0 – 6 meses)	2	0	2
	[6 meses – 1 ano)	3	1	4
	[1 – 2 anos)	3	3	6
II	[2 – 3 anos)	6	6	12
	[3 – 4 anos)	1	6	7
III	[4 – 5 anos)	4	5	9
	[5 – 10 anos)	5	3	8
	mais de 10 anos	2	0	2
TOTAL		26	24	50

Tabela 2. Distribuição de 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP, quanto à zona de residência e à procedência.

Procedência		Nº de cães	Zona rural	Zona urbana
Sub-região A	Taquarituba	13	6	7
	Botucatu	12	4	8
	Fartura	5	2	3
Sub-região B	Itaporanga	3	0	3
	Campina do Monte Alegre	3	0	3
	Areiópolis	2	0	2
	Itaí	2	0	2
	Paranapanema	2	1	1
	Pereiras	2	2	0
Sub-região C	Conchas	1	1	0
	Itatinga	1	0	1
	Aparecida de São Manuel	1	0	1
	Guareí	1	1	0
	São Manuel	1	0	1
	Coronel Macedo	1	0	1
TOTAL		50	17	33

Tabela 3. Influência do sexo de 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP, na ocorrência de positividade ao xenodiagnóstico.

SEXO	Xenodiagnóstico		
	Número de cães positivos	Proporção	TOTAL
Macho	19	0,7308	26
Fêmea	15	0,6250	24
TOTAL	34	0,6800	50

Estatística: $\chi^2 = 0,642$; $p > 0,10$

Comentário: Não foi constatada associação significativa entre sexo e resultado do xenodiagnóstico.

Tabela 4. Influência da faixa etária de 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP, na ocorrência de positividade ao xenodiagnóstico.

FAIXA ETÁRIA	Xenodiagnóstico		
	Número de cães positivos	Proporção	TOTAL
I	9	0,7500	12
II	12	0,6316	19
III	13	0,6842	19
TOTAL	34	0,6800	50

I – cães desde 0 meses até 2 anos incompletos; II – cães desde 2 anos completos até 4 anos incompletos; III – cães com mais de 4 anos completos

Estatística: $\chi^2 = 0,476$; $p > 0,50$

Comentário: Não foi constatada associação significativa entre faixa etária e resultado do xenodiagnóstico.

Tabela 5. Influência da procedência, quanto à zona de residência, de 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP, na ocorrência de positividade ao xenodiagnóstico.

PROCEDÊNCIA	Xenodiagnóstico		
	Número de cães positivos	Proporção	TOTAL
Urbana	21	0,6364	33
Rural	13	0,7647	17
TOTAL	34	0,6800	50

Estatística: $\chi^2 = 0,848$; $p > 0,10$

Comentário: Não foi constatada associação significativa entre procedência e resultado do xenodiagnóstico

Tabela 6. Influência do sexo de 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP, na ocorrência de positividade à hemocultura.

SEXO	Hemocultura		
	Número de cães positivos	Proporção	TOTAL
Macho	20	0,7692	26
Fêmea	10	0,4167	24
TOTAL	30	0,6000	50

Estatística: $\chi^2 = 6,461$ $p < 0,05$

Comentário: Foi constatada associação significativa entre sexo e resultado da hemocultura, tendo-se verificado entre os machos ocorrência significativamente maior de positividade em relação às fêmeas.

Tabela 7. Influência da faixa etária de 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP, na ocorrência de positividade à hemocultura.

FAIXA ETÁRIA	Hemocultura		
	Número de cães positivos	Proporção	TOTAL
I	8	0,6667	12
II	11	0,5789	19
III	11	0,5789	19
TOTAL	30	0,6000	50

I – cães desde 0 meses até 2 anos incompletos; II – cães desde 2 anos completos até 4 anos incompletos; III – cães com mais de 4 anos completos

Estatística: $\chi^2 = 0,293$; $p > 0,50$

Comentário: Não foi constatada associação significativa entre faixa etária e resultado da hemocultura.

Tabela 8. Influência da procedência, quanto à zona de residência, de 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP, na ocorrência de positividade à hemocultura.

PROCEDÊNCIA	Hemocultura		
	Número de cães positivos	Proporção	TOTAL
Urbana	20	0,6061	33
Rural	10	0,5882	17
TOTAL	30	0,6000	50

Estatística: $\chi^2 = 0,015$; $p > 0,50$

Comentário: Não foi constatada associação significativa entre procedência, segundo a zona de residência e resultado da hemocultura.

Tabela 9. Influência do sexo de 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP, na ocorrência de positividade à PCR para *T.cruzi* e/ou *T. rangeli*.

SEXO	PCR		
	Número de cães positivos	Proporção	TOTAL
Macho	12	0,4615	26
Fêmea	13	0,5417	24
TOTAL	25	0,6000	50

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

Estatística: $\chi^2 = 0,321$; $p > 0,50$

Comentário: Não foi constatada associação significativa entre sexo e resultado da PCR.

Tabela 10. Influência da faixa etária de 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP, na ocorrência de positividade à PCR para *T.cruzi* e/ou *T. rangeli*.

FAIXA ETÁRIA	PCR		
	Número de cães positivos	Proporção	TOTAL
I	6	0,5000	12
II	7	0,3684	19
III	12	0,6316	19
TOTAL	25	0,5000	50

I – cães desde 0 meses até 2 anos incompletos; II – cães desde 2 anos completos até 4 anos incompletos; III – cães com mais de 4 anos completos

Estatística: $\chi^2 = 2,632$; $p > 0,10$

Comentário: Não foi constatada associação significativa entre faixa etária e resultado da PCR.

Tabela 11. Influência da procedência, segundo a zona de residência, de 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP, na ocorrência de positividade à PCR para *T.cruzi* e/ou *T. rangeli*.

PROCEDÊNCIA	PCR		
	Número de cães positivos	Proporção	TOTAL
Urbana	18	0,5455	33
Rural	7	0,4118	17
TOTAL	25	0,5000	50

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

Estatística: $\chi^2 = 0,802$; $p > 0,10$

Comentário: Não foi constatada associação significativa entre procedência e resultado da PCR.

Tabela 12. Influência do sexo de 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP, na ocorrência de positividade à xenodiagnóstico e/ou hemocultura.

SEXO	Xenodiagnóstico / Hemocultura		
	Número de cães positivos	Proporção	TOTAL
Macho	22	0,8462	26
Fêmea	18	0,7500	24
TOTAL	40	0,8000	50

Estatística: $\chi^2 = 0,722$; $p > 0,10$

Comentário: Não foi constatada associação significativa entre sexo e resultado da positividade ao xenodiagnóstico e/ou hemocultura.

Tabela 13. Influência da faixa etária de 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP, na ocorrência de positividade a xenodiagnóstico e/ou hemocultura.

FAIXA ETÁRIA	Xenodiagnóstico / Hemocultura		
	Número de cães positivos	Proporção	TOTAL
I	9	0,7500	12
II	17	0,6316	19
III	14	0,7368	19
TOTAL	40	0,8000	50

I – cães desde 0 meses até 2 anos incompletos; II – cães desde 2 anos completos até 4 anos incompletos; III – cães com mais de 4 anos completos

Estatística: $\chi^2 = 1,727$; $p > 0,10$

Comentário: Não foi constatada associação significativa entre faixa etária e resultado da positividade a xenodiagnóstico e/ou hemocultura.

Tabela 14. Influência da procedência, segundo a zona de residência, de 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP, na ocorrência de positividade a xenodiagnóstico e/ou hemocultura.

PROCEDÊNCIA	Xenodiagnóstico / Hemocultura		
	Número de cães positivos	Proporção	TOTAL
Urbana	27	0,8182	33
Rural	13	0,7647	17
TOTAL	40	0,8000	50

Estatística: $\chi^2 = 0,201$; $p > 0,50$

Comentário: Não foi constatada associação significativa entre procedência e resultado da positividade à xenodiagnóstico e/ou hemocultura.

Tabela 15. Influência do sexo de 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP, na ocorrência de positividade à xenodiagnóstico e/ou hemocultura e/ou PCR.

SEXO	Xenodiagnóstico / Hemocultura / PCR		
	Número de cães positivos	Proporção	TOTAL
Macho	23	0,8846	26
Fêmea	20	0,8333	24
TOTAL	43	0,8600	50

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
Estatística: $p > 0,10$ (Fisher)

Comentário: Não foi constatada associação significativa entre sexo e resultado da positividade ao xenodiagnóstico e/ou hemocultura e/ou PCR.

Tabela 16. Influência da faixa etária de 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP, na ocorrência de positividade a xenodiagnóstico e/ou hemocultura e/ou PCR.

FAIXA ETÁRIA	Xenodiagnóstico / Hemocultura / PCR		
	Número de cães positivos	Proporção	TOTAL
I	10	0,8333	12
II	17	0,8947	19
III	16	0,8421	19
TOTAL	43	0,8600	50

I – cães desde 0 meses até 2 anos incompletos; II – cães desde 2 anos completos até 4 anos incompletos; III – cães com mais de 4 anos completos

Estatística: $\chi^2 = 0,312$; $p > 0,50$

Comentário: Não foi constatada associação significativa entre faixa etária e resultado da positividade a xenodiagnóstico e/ou hemocultura e/ou PCR.

Tabela 17. Influência da procedência, segundo a zona de residência, de 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP, na ocorrência de positividade a xenodiagnóstico e/ou hemocultura e/ou PCR.

PROCEDÊNCIA	Xenodiagnóstico / Hemocultura / PCR		
	Número de cães positivos	Proporção	TOTAL
Urbana	30	0,9091	33
Rural	13	0,7647	17
TOTAL	43	0,8600	50

Estatística: $p > 0,10$ (Fisher)

Comentário: Não foi constatada associação significativa entre procedência e resultado da positividade à xenodiagnóstico e/ou hemocultura e/ou PCR.

Tabela 18. Concordância entre os resultados obtidos nos testes de xenodiagnóstico e hemocultura, em 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP.

Xenodiagnóstico	Hemocultura		
	Positiva	Negativa	TOTAL
Positivo	24	10	34
Negativo	6	10	16
TOTAL	30	20	50

Proporção de Concordância: $p = 34/50 = 0,68 = 68\%$

Estatística: $\kappa = 0,3103$; $\Delta\kappa = 0,1393$; $z = 2,23$; $p < 0,05$

Comentário: Embora significativa, a concordância entre os dois métodos é fraca (marginal).

Tabela 19. Concordância entre os resultados obtidos nos testes de xenodiagnóstico e PCR para *T.cruzi* e/ou *T. rangeli*, realizados em 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP.

Xenodiagnóstico	PCR		
	Positivo	Negativo	TOTAL
Positivo	21	13	34
Negativo	4	12	16
TOTAL	25	25	50

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

Proporção de Concordância: $p = 33/50 = 0,66 = 66\%$

Estatística: $\kappa = 0,32$; $\Delta\kappa = 0,1319$; $z = 2,43$; $p < 0,05$

Comentário: Embora significativa, a concordância entre os dois métodos é fraca (marginal).

Tabela 20. Concordância entre os resultados obtidos nos testes de hemocultura e PCR para *T.cruzi* e/ou *T. rangeli*, realizados em 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP.

Hemocultura	PCR		
	Positivo	Negativo	TOTAL
Positiva	18	12	30
Negativa	7	13	20
TOTAL	25	25	50

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

Proporção de Concordância: $p = 31/50 = 0,62 = 62\%$

Estatística: $\kappa = 0,24$; $\Delta\kappa = 0,1386$; $z = 1,73$; $p < 0,10$

Comentário: A concordância entre os dois métodos é muito fraca e não significativa.

Tabela 21. Concordância entre os resultados obtidos nos testes de xenodiagnóstico e hemocultura, em relação aos resultados obtidos no teste de PCR para *T.cruzi* e/ou *T. rangeli*, realizados em 50 cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doenças de Transmissão Parenteral – UNESP.

Xenodiagnóstico / Hemocultura	PCR		
	Positivo	Negativo	TOTAL
Positiva	22	18	40
Negativa	3	7	10
TOTAL	25	25	50

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

Proporção de Concordância: $p = 29/50 = 0,58 = 58\%$

Estatística: $\kappa = 0,16$; $\triangle\kappa = 0,1131$; $z = 1,41$; $p > 0,10$

Comentário: A concordância entre os métodos do xenodiagnóstico e da hemocultura, em relação ao método da PCR é muito fraca e não significativa.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

1) Os cães domiciliados de pacientes com forma crônica da doença de Chagas, de municípios pertencentes à DIR-XI e à DIR-XXIII, estão exercendo papel de reservatórios domésticos de tripanossomatídeos, sendo que 50% deles estão infectados por *T. cruzi* e/ou *T. rangeli*.

2) Apesar de não terem sido encontrados triatomíneos, quer no intra, quer no peridomicílio dos cães, não está descartada a possibilidade de haver triatomíneos no local, devido à demonstração de facilidades para sua manutenção e instalação, em grande parte dos domicílios visitados.

3) A infecção oral é uma via de transmissão passível de ter ocorrido, devido à presença de animais silvestres nas proximidades das casas situadas na zona rural, bem como à presença constante de roedores, tanto na zona rural como na zona urbana.

4) A prova parasitológica que revelou maior porcentagem de cães infectados foi o xenodiagnóstico, seguido da hemocultura.

5) Os resultados gerais apontam para a necessidade da continuidade deste trabalho, com o intuito de investigar, além de cães de indivíduos portadores, os de não portadores de infecção chagásica, procedendo-se, então, à caracterização das cepas isoladas, nas mesmas localidades estudadas na presente pesquisa.