

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**Dinâmica da transmissão da leishmaniose visceral em uma  
coorte de cães em Juatuba-MG, de 2010 a 2011**

Eliane Gonçalves Paiva Lopes

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
2013

Eliane Gonçalves Paiva Lopes

**Dinâmica da transmissão da leishmaniose visceral em uma  
coorte de cães em Juatuba-MG, de 2010 a 2011**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção de  
grau de Doutor em Ciência Animal

Área de concentração: Epidemiologia

Linha de pesquisa: Epidemiologia, diagnóstico e métodos de  
controle das zoonoses

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Ferreira de Magalhães Soares  
(UFMG)

Co-orientadores: Prof. Dr. João Paulo Amaral Haddad (UFMG)  
Prof. Dr. Edelberto Santos Dias (CPqRR)

Escola de Veterinária – UFMG  
Belo Horizonte  
2013

L864d Lopes, Eliane Gonçalves Paiva, 1963-  
Dinâmica da transmissão da leishmaniose visceral em uma coorte de cães em  
Juatuba-MG, de 2010 a 2011 / Eliane Gonçalves Paiva Lopes. – 2013.

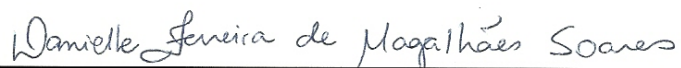
141 p. : il.

Orientador: Danielle Ferreira de Magalhães Soares  
Co-orientadores: João Paulo Amaral Haddad, Edelberto Santos Dias  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.  
Inclui bibliografia

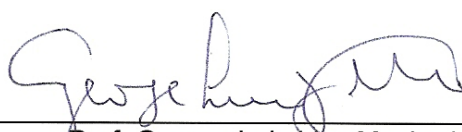
1. Cão – Doenças – Teses. 2. Leishmaniose visceral – Fatores de risco – Teses. 3.  
Leishmaniose visceral – Epidemiologia – Teses. I. Soares, Danielle Ferreira de  
Magalhães. II. Haddad, João Paulo Amaral. III. Dias, Edelberto Santos. IV. Universidade  
Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.708 96

Tese defendida e aprovada em 05 de dezembro de 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:



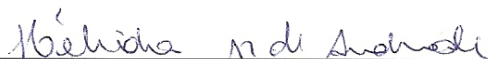
Prof<sup>a</sup>. Danielle Ferreira de Magalhães Soares  
Presidente - Orientador



Prof. George Luiz Lins-Machado-Goelho  
Escola de Medicina - UFOP



Dra. Rose Ferraz Carmo  
Escola de Saúde Pública de Minas Gerais



Prof<sup>a</sup>. Héliida Monteiro de Andrade  
Instituto de Ciências Biológicas – UFMG



Prof<sup>a</sup>. Mariângela Carneiro  
Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

*Este trabalho foi desenvolvido no município de Juatuba, Minas Gerais, Brasil, em colaboração multi-institucional entre: Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais, Secretaria Municipal de Juatuba, Universidade Federal de Minas Gerais, Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz, Centro de Controle de Zoonoses de Betim e Fundação Ezequiel Dias - FUNED; com apoio financeiro da FAPEMIG.*

*A todos, meus agradecimentos!*

## Meus agradecimentos

---

### **A jornada foi longa ...**

*Paganini, grande violinista do passado, apresentou-se ao seu auditório certo dia e descobriu, logo após os aplausos iniciais, que havia algo errado com o violino. Olhou-o e percebeu que aquele não era o seu valioso instrumento. Havia sido trocado por outro. Disse: “Senhoras e senhores, vou mostrar-lhes que a música não está no instrumento, mas na alma.” E tocou como nunca antes.*

**Por muitas vezes, tive que tocar com a minha alma!  
E, sei. Deus me ouviu. À Ele, minha eterna gratidão.**

Meus filhos, ainda adolescentes quando retornei à vida acadêmica e hoje, compartilham comigo os estudos na UFMG. Agradeço a paciência, o carinho e às vezes que tiveram que comer sanduíches e pizzas, pela minha ausência. Amo muitíssimo vocês.

Meu marido, que pacientemente me encorajou a continuar, mesmo sabendo que isto implicaria numa esposa temporariamente desconectada. Obrigada, meu amor!

Aos familiares agradeço a compreensão pelos momentos ausentes.

À minha orientadora Danielle F. M. Soares, como sua primeira aluna de doutorado, sinto-me à vontade para dizer que seu futuro é promissor, com base no seu perfil de amiga, responsável, presente e comprometida. De coração, muito obrigada!

Ao amigo Edelberto Santos Dias, o que seria do trabalho de campo sem a sua ajuda? Agradeço por disponibilizar o laboratório, por fazer parte do meu comitê de orientação e pelo carinho, apoio e amizade.

Ao co-orientador João Paulo A. Haddad, volto a repetir que você deve agradecer todos os dias à Deus por ter te dado o dom de entender tão bem os números. Obrigada.

Agradeço aos meus professores da Escola de Veterinária por todo conhecimento repassado e, em especial, aos que encerraram a carreira mas continuam próximos à mim: meus amigos Elvino Carlos Moreira e José Ailton da Silva.

Aos participantes da minha banca de qualificação que avaliaram meu trabalho, mesmo parcial, com tanto zelo no sentido de orientar-me da melhor forma possível: M<sup>a</sup> Helena F. Morais, Pedro Lúcio L. Pereira e Marcos Heinemann Bryan.

Algumas pessoas selaram a colaboração com um toque de carinho inesquecível. Meu amigo de tantos projetos, desde as cavernas capturando morcegos hematófagos para coleta de saliva aos dias de hoje com leishmaniose. Trabalhamos juntos e te vi crescer em todos os sentidos. Tenho um carinho especial de “irmã mais velha” por você, Luiz Felipe N. M. Borges. Sei que vai longe, meu amigo. Bem merecido!

Professora Héliada M. Andrade que gentilmente me ajudou com a análise molecular em seu laboratório; o amigo João Carlos França-Silva que tornou nossas viagens e as necropsias em momentos produtivos sem perder a delicadeza da poesia. À Shara Regina da Silva por todo apoio no campo e no laboratório, além da amizade construída. Ao querido amigo Gustavo Drumond Pawlowski pelos momentos trabalhosos no laboratório e por seu jeito manso e prestativo de ser. À amiga Ana Cláudia Parreiras tão responsável e organizada com as atividades laboratoriais. Obrigada Misael, por análises e mais análises de qualidade. São tantos os que me ajudaram: Cristiano M. Cruz, Eliana Furtado, Andreza P. Marcelino, Ronaldo Barbosa, Misael E. O. Pastrana, Rafael Felipe Silva, Rafael Henrique Figueiredo, Renata Q. Stefani, Aliani M. Fonseca, Jordana L.L. Celeste, Marcela Drummond, Camila S.F. Oliveira, Stefanne Gonçalves, muito obrigada!

Aos demais amigos e funcionários da Escola de Veterinária que fizeram parte deste capítulo da minha história.

Agradeço aos gestores da Prefeitura de Belo Horizonte pela confiança, respeito e flexibilidade no horário para que eu pudesse concluir o doutorado.

Desde já, a cada participante da minha banca de defesa por ter aceitado meu convite. Sei que sou privilegiada por contar com a colaboração de vocês. Obrigada!

---

*O temor do Senhor é o princípio do saber ...*  
**(Provérbios 1:7)**

*Porque desde a antiguidade não se ouviu,  
nem com os ouvidos se percebeu,  
nem com os olhos se viu Deus além de ti,  
que trabalha para aquele que Nele espera.*  
**(Isaías 64:4)**

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	15
<b>ABSTRACT</b>	15
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2. LITERATURA CONSULTADA</b>	17
2.1 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral	17
2.1.1 As leishmanioses	17
2.1.2 Agente etiológico	19
2.1.3 Vetores	20
2.1.4 Reservatórios	20
2.1.5 Fatores de risco para leishmaniose visceral canina	21
2.1.6 Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV)	22
2.2 Métodos de diagnóstico	23
2.2.1 Diagnóstico sorológico	23
2.2.2 Diagnóstico parasitológico	24
2.2.3 Reação em cadeia da polimerase – PCR	25
2.2.4 Geoprocessamento e saúde	25
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	26
3.1 Tipo de estudo	26
3.2 Descrição da área estudada	26
3.2.1 O município Juatuba	26
3.3 Desenho do estudo	28
3.3.1 Universo da pesquisa: população canina do município de Juatuba	29
3.3.2 Amostra	30
3.3.2.1 Tamanho da amostra	30
3.3.2.2 Seleção da amostra	30
3.3.2.3 Critério de seleção em domicílios com mais de um cão	30
3.3.3 Instrumento de avaliação: questionário	30
3.3.4 Exame clínico do cão	31
3.3.5 Coleta de sangue	31
3.3.6 Testes sorológicos	31
3.3.7 Controle de qualidade sorológica pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED)	32
3.3.8 Coleta de amostras na necropsia	32
3.3.9 Exames parasitológicos	33
3.3.9.1 Impressão e esfregaço em lâminas	33
3.3.9.2 Mielocultura	33
3.3.10 Testes moleculares	34
3.3.10.1 Extração de DNA para PCR	34
3.3.10.2 Reação em cadeia da polimerase – PCR	34
3.3.10.3 PCR kDNA para o gênero <i>Leishmania</i>	34
3.3.10.4 PCR RFLP kDNA	35
3.3.10.5 PCR SSUrRNA (Nested) para o gênero <i>Leishmania</i>	35
3.3.10.6 Sequenciamento de DNA	36
3.4 Análises estatísticas	36
3.4.1 Medidas de morbidade da leishmaniose visceral canina	36
3.4.2 Associação entre fatores de risco e proteção com sorologia para leishmaniose visceral em cães	37
3.4.3 Concordância entre testes de diagnóstico	37
3.4.4 Geoprocessamento	37
3.5 Aspectos éticos	38
3.6 Apoio financeiro	38



<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>38</b>
	<b>BLOCO I – Diagnóstico laboratorial e clínico</b>	
4.1	Distribuição dos animais amostrados por bairro	38
4.2	Tamanho amostral na 2ª e na 3ª coletas – dinâmica da população canina em Juatuba	41
4.3	Coefficientes de morbidade da leishmaniose visceral	42
4.4	Soroconversão dos cães com resultado indeterminado pela IFI	45
4.5	Destino dos cães sororreagentes	47
4.6	Resultado sorológico pelo controle de qualidade – FUNED	48
4.7	Relação dos resultados sorológicos entre ELISA e IFI	49
4.8	Relação dos sinais clínicos x título da IFI dos cães sororreagentes necropsiados	49
4.9	Resultado do parasitológico direto	52
4.10	Resultado - análise molecular	52
4.11	Concordância entre os testes diagnósticos	56
4.12	Relação dos resultados de sorologia, parasitológico e análise molecular das amostras com espécies de <i>Leishmania</i> identificadas	58
4.13	Exame clínico dos cães das três etapas de coletas de sangue	59
4.14	Análise multivariada dos sinais clínicos nos cães	61
4.15	Quadro clínico dos cães sororreagentes	62
	<b>BLOCO II</b>	
	<b>ENTREVISTA – Questionário da 1ª coleta</b>	<b>63</b>
4.16	Características da população humana –entrevistados	63
4.16.1	Perfil demográfico e socioeconômico do entrevistado	63
4.16.2	Conhecimento do entrevistado sobre a leishmaniose visceral	65
4.17	Características do imóvel	67
4.17.1	Tipo e revestimento do imóvel	67
4.17.2	Serviço de saneamento básico	67
4.17.3	Limpeza do peridomicílio	67
4.17.4	Presença de plantas e outros no peridomicílio	68
4.17.5	Uso de inseticida no imóvel	68
4.17.6	Presença de animais no imóvel	68
4.17.7	Morte de animais no imóvel	68
4.17.8	Características da vizinhança	68
4.18	Características do cão	69
4.18.1	Sexo	69
4.18.2	Idade	69
4.18.3	Tipo de pelo: tamanho e cor	70
4.18.4	Porte	70
4.18.5	Raça, tipo de alimentação e castração	71
4.19	Cuidados preventivos com o cão	71
4.19.1	Vacinação	71
4.19.2	Uso de coleira repelente	72
4.19.3	Exame laboratorial	72
4.19.4	Uso de ectoparasiticida	73
4.19.5	Local de permanência do cão	73
4.19.6	Tempo do cão com o proprietário	73
4.20	Trânsito dos animais	74
	<b>ENTREVISTA – Questionários das 2ª e 3ª coletas</b>	<b>75</b>
4.21	Alterações relacionadas ao imóvel	75
4.21.1	Tipo de piso no peridomicílio	75
4.21.2	Uso de inseticida no imóvel	75
4.21.3	Introdução de cães no domicílio	76
4.21.4	Morte de cães no domicílio	76
4.21.5	Introdução de outros animais no domicílio	76
4.21.6	Contato do cão da amostra com outros animais	77

4.22	Alterações relacionadas ao cão da amostra	77
4.22.1	Consulta com médico veterinário	77
4.22.2	Vacina contra leishmaniose visceral	77
4.22.3	Uso de coleira repelente	77
4.22.4	Exame laboratorial para leishmaniose visceral	78
4.22.5	Reprodução	79
4.22.6	Viagem do cão	79
4.23	Análise multivariada – variáveis dos questionários	79
	<b>BLOCO III</b>	81
4.24	Análise espacial	81
<b>5.</b>	<b>5. DISCUSSÃO</b>	84
	<b>BLOCO I</b>	84
5.1	Diagnóstico laboratorial e clínico	84
5.1.1	Sorologia: coeficientes de morbidade: prevalência e incidência	84
5.1.2	Resultado sorológico indeterminado pela IFI	89
5.1.3	Retirada de cães sororreagentes	91
5.1.4	Concordância entre os resultados sorológico, parasitológico e molecular	92
5.1.5	Exame clínico	95
5.1.5.1	Cães das três etapas de coleta de sangue da coorte com resultado sorológico negativo, indeterminado e positivo	95
5.1.5.2	Cães sororreagentes das três coletas	96
5.1.5.3	Cães da necropsia	96
5.1.6	Controle de qualidade da sorologia pela FUNED	97
	<b>BLOCO II</b>	97
5.2	Fatores de risco e proteção	97
5.2.1	Mudanças ocorridas com o ambiente e o cão: 2ª e 3ª etapas	101
	<b>BLOCO III</b>	102
5.3	Análise espacial	102
6.	<b>CONCLUSÕES</b>	104
7.	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	105
8.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	105
	<b>ANEXOS</b>	113

---

**LISTA DE TABELAS**

---

Tabela 1	Distribuição dos cães amostrados por bairro de Juatuba, 2010 a 2011.	39
Tabela 2	Distribuição mensal do quantitativo de amostras coletadas de sangue de cão e dias trabalhados na coleta em Juatuba, 2010 a 2011.	40
Tabela 3	Distribuição da frequência dos resultados obtidos pela IFI nas amostras de sangue dos cães amostrados em Juatuba, 2010 a 2011.	42
Tabela 4	Soropositividade nas diluições de 1:40 e 1:80 na IFI, dos cães amostrados nas três etapas de coleta de sangue em Juatuba, de 2010 a 2011.	42
Tabela 5	Distribuição dos coeficientes de prevalência e incidência da leishmaniose visceral em cães por bairro de Juatuba, de 2010 a 2011.	43
Tabela 6	Concordância entre os resultados sorológicos de ELISA e IFI dos cães amostrados em Juatuba, 2010 e 2011.	49
Tabela 7	Titulação na IFI das amostras de cães necropsiados em comparação com os resultados das diluições de 1:40 e 1:80 durante as três etapas de coleta de sangue.	50
Tabela 8	Classificação dos animais sororreagentes quanto aos sinais clínicos e alterações esplênicas observadas durante a necropsia, Juatuba, 2010 a 2011.	51
Tabela 9	Número de acesso no <i>GenBank</i> das sequências utilizadas nas análises filogenéticas.	52
Tabela 10	Relação das espécies geneticamente mais próximas das amostras analisadas.	53
Tabela 11	Relação das amostras que não tiveram êxito na análise filogenética.	54
Tabela 12	Perfil de restrição dos fragmentos de 120 pares de bases do kDNA de <i>Leishmania</i> com as enzimas de restrição Ava I e HAE III.	55
Tabela 13	Relação dos resultados positivos pelo parasitológico, PCR de tecido e mielocultura de cães com sorologia positiva na IFI.	56
Tabela 14	Espécie de <i>Leishmania</i> identificada nas amostras PCR-RFLP positivas de mielocultura dos cães sororreagentes necropsiados.	58
Tabela 15	Espécie de <i>Leishmania</i> identificada nas amostras PCR-RFLP positivas de tecido dos cães sororreagentes necropsiados.	58
Tabela 16	Distribuição da frequência de cães com sinais clínicos por grupo de resultado sorológico, Juatuba, 2010 a 2011.	60
Tabela 17	Análise univariada dos sinais clínicos observados nos cães soropositivos e soronegativos das três etapas de coleta de sangue em Juatuba, 2010 a 2011.	61
Tabela 18	Modelo final da análise multivariada com nível de significância de 0,05 dos sinais clínicos observados nos cães das três etapas de coleta de sangue em Juatuba, 2010 a 2011.	62
Tabela 19	Distribuição de frequências das variáveis relacionadas à idade, escolaridade e condições socioeconômicas dos entrevistados em Juatuba, 2010 a 2011.	64
Tabela 20	Conhecimento do proprietário sobre a leishmaniose visceral por grupo de cães com resultados negativo, positivo e indeterminado na IFI, Juatuba, 2010 a 2011.	66
Tabela 21	Distribuição da frequência do sexo dos cães amostrados quanto às coletas realizadas e por grupo de resultado sorológico, Juatuba, 2010 a 2011.	69
Tabela 22	Faixa etária dos cães amostrados por grupo de resultado sorológico, Juatuba, 2010 a 2011.	70
Tabela 23	Tamanho da pelagem dos cães amostrados por grupo de resultados sorológicos, Juatuba, 2010 a 2011.	70
Tabela 24	Cor da pelagem dos cães amostrados por grupo de resultados sorológicos, Juatuba, 2010 a 2011.	70
Tabela 25	Porte dos cães amostrados por grupo de resultados sorológicos, Juatuba, 2010 a 2011.	71
Tabela 26	Exame laboratorial para leishmaniose visceral realizado nos cães amostrados em data anterior ao início do estudo em Juatuba, 2010.	73
Tabela 27	Local de permanência diurna e noturna dos cães amostrados de Juatuba, 2010.	73

Tabela 28	Relação entre a idade e tempo com o proprietário dos cães amostrados de Juatuba, 2010.	73
Tabela 29	Município de procedência dos cães amostrados por bairro de Juatuba, 2010.	74
Tabela 30	Frequência de uso de inseticida nos imóveis entre as coletas de sangue em Juatuba, 2010 a 2011.	75
Tabela 31	Quantitativo de cães presentes nos domicílios visitados nas três coletas de sangue em Juatuba, 2010 a 2011.	76
Tabela 32	Causa de morte de outros cães do domicílio da pesquisa em Juatuba, 2010 a 2011.	76
Tabela 33	Frequência de contato do cão do estudo com outros animais além do domicílio, Juatuba, 2010 a 2011.	77
Tabela 34	Exame laboratorial extra pesquisa para leishmaniose visceral em cães de Juatuba, 2010 a 2011.	79
Tabela 35	Variáveis pré-selecionadas na análise univariada com $p \leq 0,20$ do questionário da primeira etapa do estudo em Juatuba, de 2010 a 2011.	80
Tabela 36	Modelo final das variáveis com $p \approx 0,05$ sobre condições socioeconômicas dos entrevistados, características do cão e medida preventiva no ambiente para leishmaniose visceral em Juatuba, de 2010 a 2011.	81
Tabela 37	Distribuição dos casos humanos de leishmaniose visceral notificados em Juatuba, de 1999 a 2012.	84

---

#### LISTA DE GRÁFICOS

---

Gráfico 1	Causas da redução do número de coletas realizadas no período total de monitoramento da coorte canina em Juatuba, de 2010 a 2011.	41
Gráfico 2	Causas da redução do número de coletas realizadas nas 2ª e 3ª visitas à coorte canina em Juatuba, em 2010 e 2011.	42
Gráfico 3	Distribuição da frequência dos coeficientes de prevalência (1ª coleta) e incidência (2ª e 3ª coletas) da leishmaniose visceral em cães de Juatuba, de 2010 a 2011.	44
Gráfico 4	Distribuição da frequência dos resultados sorológicos na IFI por mês de coleta de sangue dos cães em Juatuba, de 2010 a 2011.	44
Gráfico 5	Distribuição da frequência dos resultados sorológicos nas 3 coletas de sangue dos cães amostrados em Juatuba, 2010 a 2011.	45
Gráfico 6	Desfecho do total de cães com sorologia indeterminada detectada na 1ª e na 2ª coleta de sangue em Juatuba, de 2010 a 2011.	45
Gráfico 7	Distribuição dos resultados de ELISA das amostras caninas que apresentaram resultado indeterminado pela IFI, Juatuba, 2010 a 2011.	46
Gráfico 8	Distribuição dos resultados de IFI apresentados na FUNED de amostras de sangue canino com resultado indeterminado pela IFI no Laboratório de Leishmanioses da UFMG.	46
Gráfico 9	Destino dos cães sororreagentes das três coletas de sangue dos cães amostrados em Juatuba, 2010 a 2011.	47
Gráfico 10	Causas do não recolhimento dos cães sororreagentes participantes da coorte fechada em Juatuba, 2010 a 2011.	48
Gráfico 11	Distribuição da frequência de amostras processadas no controle de qualidade na FUNED, 2010 a 2011.	48
Gráfico 12	Distribuição da frequência de diluições reagentes pela imunofluorescência indireta dos cães necropsiados de Juatuba, 2010 a 2011.	50
Gráfico 13	Relação do título de anticorpos na IFI dos animais sororreagentes com os sinais clínicos e alterações esplênicas observadas durante à necropsia.	52
Gráfico 14	Proporção de cão com sinal clínico nas três coletas de sangue, Juatuba, 2010 a 2011.	59
Gráfico 15	Proporção de cães com os sinais clínicos mais frequentes nas três etapas do estudo, Juatuba, 2010 a 2011.	61

Gráfico 16	Proporção de cães sororreagentes com presença de sinais clínicos nas três etapas do estudo, Juatuba, 2010 a 2011.	62
Gráfico 17	Distribuição dos sinais clínicos mais frequentes nos cães sororreagentes amostrados em Juatuba, de 2010 a 2011.	63
Gráfico 18	Tipo de piso dos imóveis dos proprietários dos cães do estudo, Juatuba, 2010 a 2011.	67
Gráfico 19	Faixa etária dos cães pesquisados, Juatuba, 2010 a 2011.	69

---

#### LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1	Localização do município de Juatuba em relação aos municípios limítrofes da Região Metropolitana de Belo Horizonte.	27
Figura 2	Esquema do estudo das três coletas de sangue canino e necropsia dos soropositivos amostrados de Juatuba, 2010 a 2011.	29
Figura 3	Árvore filogenética mostrando as distâncias entre as amostras analisadas e as sequências utilizadas como referência.	54
Figura 4	Visualização de produto da PCR-RFLP em amostras (1-10) de miocultura. Pa (padrão), L.a ( <i>Leishmania amazonensis</i> – IFLA/BR/1967/PH8), L.b ( <i>Leishmania braziliensis</i> – MHOM/BR/1975/M2903), L.c ( <i>Leishmania infantum</i> = <i>Leishmania chagasi</i> - MHO/BR/70/BH46).	55
Figura 5	Avaliação dos testes diagnósticos em relação à imunofluorescência indireta das amostras biológicas de cães de Juatuba, 2010 a 2011.	57
Figura 6	Estimativa das densidades, pelo método de <i>Kernel</i> , por casos caninos positivos (A), população canina (B) e taxa de positividade (C) da leishmaniose visceral em cães em Juatuba, 2010 e 2011.	82
Figura 7	Índice Moran Local (LISA), análise de <i>clusters</i> e valores atípicos para população e para a taxa de positividade em cães, Juatuba, 2010 a 2011.	83
Figura 8	Delimitação do espaço geográfico em área rural (delimitada de azul) e área urbana (fora da delimitação de azul) em mapa de <i>Kernel</i> com taxas de positividade (número de cães soropositivos/população canina local) da LVC do município de Juatuba, de 2010 a 2011.	84

---

#### LISTA DE ANEXOS

---

Anexo 01	Divisão administrativa em bairros de Juatuba.	113
Anexo 02	Recomendações para o controle da leishmaniose visceral em áreas classificadas como de transmissão esporádica, segundo o Ministério da Saúde, 2006.	114
Anexo 03	Questionário a ser aplicado aos proprietários dos cães examinados na primeira coleta de sangue em Juatuba, Minas Gerais, 2010.	115
Anexo 04	Questionário a ser aplicado aos proprietários dos cães examinados na segunda e terceira coletas de sangue em Juatuba, Minas Gerais, 2010 e 2011.	118
Anexo 05	Modelo de identificação (crachá) utilizado pelos estudantes da Escola de Veterinária da UFMG.	119
Anexo 06	Distribuição dos cães amostrados de acordo com os quarteirões, bairros e zonas de Juatuba, Minas Gerais, 2009.	120
Anexo 07	Sorteio dos quarteirões de cada bairro de Juatuba, de acordo com a tabela de números aleatórios.	121

Anexo 08	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a primeira coleta de sangue canino.	122
Anexo 09	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a segunda e terceira coletas de sangue canino.	123
Anexo 10	Autorização do COEP para primeira etapa do estudo.	124
Anexo 11	Autorização do CETEA para primeira etapa do estudo.	125
Anexo 12	Autorização do CETEA para conclusão do estudo.	126
Anexo 13	Autorização do COEP para conclusão do estudo.	127
Anexo 14	Análise univariada, referente ao perfil socioeconômico demográfico do entrevistado, conhecimento e práticas sobre a LV e características do cão e do ambiente, analisadas ao nível de significância de 0,20.	128
Anexo 15	Modelo final de regressão logística ao nível de significância de 0,05.	130
Anexo 16	Cluster primário - Cães soropositivos das três etapas do estudo.	131
Anexo 17	Índice Moran da variável população.	132
Anexo 18	Cluster secundário - Cães soropositivos das três etapas do estudo.	133
Anexo 19	Cães soropositivos da primeira etapa do estudo.	134
Anexo 20	Cães soropositivos da segunda etapa do estudo.	135
Anexo 21	Cães soropositivos da terceira etapa do estudo.	136
Anexo 22	Cães soropositivos da segunda e terceira etapas do estudo.	137
Anexo 23	Vista aérea de Juatuba 2005 e 2013.	138
Anexo 24	Distribuição e intensidade dos casos de leishmaniose visceral canina no Cluster Primário, Juatuba, Minas Gerais, 2010 (Borges, 2011).	139
Anexo 25	Fotos dos bairros de Juatuba, 2011.	140
Anexo 26	Alterações observadas nos cães soropositivos necropsiados, Juatuba 2010 a 2011.	141

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ACE	Agente de Combate à Endemia
CCZ-Betim	Centro de Controle de Zoonoses de Betim
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
DPP	<i>Dual Path Platform</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EV	Escola de Veterinária
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
GRS	Gerência Regional de Saúde
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Intervalo de confiança
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFI	Imunofluorescência Indireta
K	<i>Kappa</i>
LIT	Liver Infusion Tryptose
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral americana
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LVC	Leishmaniose visceral em cães
LVH	Leishmaniose visceral em humanos
MG	Minas Gerais
MS	Ministério da Saúde
NNN	Novy-McNeal-Nicole
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCLV	Programa de Controle da Leishmaniose Visceral
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RMBH	Região Metropolitana de Belo Horizonte
RR	Risco relativo
RVN	Razão de verossimilhança negativa
RVP	Razão de verossimilhança positiva
SCZ	Serviço de Controle de Zoonoses
SES-MG	Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
TR DPP®	Teste Rápido Qualitativo para a Detecção de Anticorpos de Cão para <i>Leishmania</i>
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

## RESUMO

Objetivou-se estudar a dinâmica de transmissão da leishmaniose visceral (LV) em uma coorte prospectiva de cães em Juatuba, entre 2010 e 2011, para verificar a incidência e fatores associados à infecção por *Leishmania infantum*. Foi feito um estudo observacional e prospectivo de coorte fechada por meio de análise sorológica em cães selecionados aleatoriamente em todo o município, com acompanhamento semestral dos resultados soronegativo e indeterminado na Imunofluorescência Indireta (IFI). Usou-se questionário semiestruturado junto aos proprietários de cães para avaliação da soroconversão e fatores determinantes à essa, por meio da regressão logística. Foram feitas análises parasitológica e molecular com caracterização da espécie de *Leishmania* dos fragmentos obtidos na necropsia. O coeficiente de incidência canina foi de 206/1000cães.ano (IC: 178 – 238), e foi identificado *cluster* em área com elevada concentração de cães positivos, mas com baixa densidade populacional canina. A variável cão de grande porte foi identificada como fator de risco e as variáveis idade do cão superior a 4 anos, limpeza diária do peridomicílio e melhores condições socioeconômicas como fatores de proteção. A maioria dos cães era assintomática e dentre os sintomáticos a IFI apresentou título predominante no ponto de corte. Foram caracterizadas *L. amazonensis* e *L. infantum* em cães com comprometimento visceral, o que demanda melhor entendimento da epidemiologia das leishmanioses. A infecção está ocorrendo em curto período de tempo e com ampla distribuição em Juatuba.

Palavras-chave: leishmanioses, incidência, soroconversão, fatores de risco, canina.

## ABSTRACT

A prospective cohort study of canine visceral leishmaniasis (CVL) was carried out from 2010 to 2011 in Juatuba – Minas Gerais State – in order to know the dynamic of the disease transmission, its incidence and factors associated to *Leishmania infantum* infection as well. An observational and prospective cohort facade study was made by serologic analyses of dogs which were selected at random throughout the county. Each semester, the results negative and undetermined at sera Indirect Immunofluorescence (IFA) were checked. A semi-structured questionnaire was applied to the owners of the dogs to evaluate the seroconversion and its determinant factors, by logistic regression. Parasitological and molecular analyses were performed using fragments obtained from necropsy and *Leishmania* species was determined. The canine incidence coefficient was 206/1,000dogs per year (IC: 178 – 238) and cluster was identified in an area with high concentration of positive dogs, however presenting a low population density. Large dog variable was identified as risk factor and the following variables - dogs more than 4-year old, daily peridomicile cleaning, and better socioeconomic conditions - as protection factors. Most dogs were asymptomatic and IFA showed predominant titer at cohort point among the symptomatic animals. *L. amazonensis* and *L. infantum* were characterized in dogs with visceral disease, which demands a better understanding of leishmaniasis epidemiology. The infection is occurring in a short period of time and showing a wide distribution in Juatuba.

Key words: leishmaniasis, incidence, seroconversion, risk factors, canine



## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é uma zoonose dentre as principais endemias de preocupação mundial para a Saúde Pública, presente em sua maioria em países em desenvolvimento, como o Brasil. Esta zoonose é considerada negligenciada a considerar o tempo de ocorrência e os valores altos atuais das taxas de incidência e letalidade. Caracteriza-se como emergente em casos humanos com quantitativos crescentes de coinfeção com o HIV e de comorbidades acometendo principalmente adultos jovens em plena idade produtiva. Situações em que focos sob controle são reativados evidenciam a reemergência da LV.

Desde a década de 1930, a partir do primeiro caso clínico identificado no Nordeste do Brasil (Chagas, 1937), esta zoonose vem se expandindo para as cinco regiões geográficas do país, mais recentemente a região Sul em 2009 (Leishmaniose..., 2009), e já é autóctone em 21 das 27 Unidades da Federação (20 estados e o Distrito Federal).

O perfil de transmissão da doença, com focos inicialmente restritos às áreas rurais, principalmente nas regiões Nordeste e Norte, devido à modificações ambientais e processos migratórios de populações carentes, passou por mudanças que permitiram a expansão da LV para as periferias dos centros urbanos. Facilitadores inerentes às grandes cidades contribuíram para a urbanização da LV, com destaque para as regiões Sudeste e Centro-Oeste, como infraestrutura sanitária deficiente, alta densidade populacional, convívio muito próximo de pessoas com os animais domésticos, principalmente o cão, fácil adaptação do flebotomíneo a diversos nichos ecológicos e hábito alimentar eclético da fêmea deste vetor, envolvendo várias espécies de animais vertebrados, inclusive o homem.

O cão, considerado o principal reservatório doméstico (Abranches *et al.*, 1991) e principal fonte de infecção para os flebotomíneos no ambiente urbano (Costa-Val *et al.*, 2007), é um elo polêmico do ciclo de transmissão. Possivelmente, por ser foco da medida de controle realizada com maior intensidade no país sem ter sido suficiente junto às demais implementadas voltadas ao homem e ao vetor, para eliminar a transmissão, impedir as

epidemias e reduzir os coeficientes de morbidade da LV, tanto na população humana quanto canina.

A resignificação do cão na atualidade como componente familiar, representando segurança e companhia, levou o proprietário do animal a ter atitudes de resistência frente à proposta do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV). Muitos se recusam a abrir o domicílio para as atividades de controle e a entregar o cão soropositivo para eutanásia.

O diagnóstico sorológico da LV em cães (LVC) é questionado não somente pelo proprietário do animal quando positivo, mas por pesquisadores e profissionais do serviço de saúde com base nos baixos valores de sensibilidade e especificidade dos testes recomendados para inquérito epidemiológico. Estudos recentes tem demonstrado que estes testes falham em identificar animais infectados, principalmente assintomáticos, quando comparados aos testes moleculares.

O cão apresenta um amplo espectro de sinais clínicos e muitos, mesmo infectados, não apresentam sinal clínico sugestivo de LV. A soroconversão ocorre tanto em cães soronegativos como em cães com resultado indeterminado que positivam posteriormente, e o contrário também ocorre em uma minoria de cães que evoluem para cura espontânea. Alguns animais podem permanecer infectados por longo tempo sem apresentar sorologia positiva.

A análise epidemiológica de cada localidade indica as ações de prevenção e controle a serem adotadas. Isto porque existe risco diferenciado de acometimento pela LVH de acordo com a inserção social, o quantitativo de cães presentes no domicílio e as condições de moradia e do meio ambiente. Os municípios mineiros possuem características peculiares que retratam realidades e necessidades distintas, o que abrange os recursos e limitações para a efetivação das ações de controle desta zoonose. Juatuba faz parte da Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) e teve o caso índice da doença em 1999, com registro de mais cinco casos até 2012, sendo classificado como área de transmissão esporádica da LV. Registrava taxas anuais de positividade canina em torno de 20% de

amostras procedentes de solicitações espontâneas feitas pela população.

Um estudo de coorte permite o monitoramento da dinâmica populacional canina ao longo do tempo com análises específicas de dados prospectivos; avaliação do coeficiente de incidência influenciado pelas exposições do animal ao ambiente, comportamentos da população humana, condições socioeconômicas e sanitárias.

A presente pesquisa tem como objetivo geral estudar a dinâmica de transmissão da LV em uma coorte prospectiva de cães em Juatuba, entre 2010 e 2011, para verificar a incidência e fatores associados à infecção por *Leishmania infantum*. Tem como objetivos específicos: a) estimar a prevalência da LVC em Juatuba em 2010; b) estimar o coeficiente de incidência em períodos semestrais e anual da LVC em Juatuba, no período de 2010 a 2011; c) analisar a soroconversão canina para LV através do monitoramento semestral dos cães com resultado laboratorial indeterminado pela IFI, com novas coletas de sangue em Juatuba, de 2010 a 2011; d) avaliar a concordância entre os resultados sorológico, parasitológico e molecular, os dois últimos realizados em animais positivos pela IFI; e) avaliar os sinais clínicos da LVC considerando os títulos de anticorpos pela IFI; f) verificar quais são os fatores de risco e proteção na população canina amostrada; g) identificar a espécie de *Leishmania* presente nos cães sororreagentes necropsiados; h) avaliar a distribuição espacial dos casos humanos e caninos de LV.

## 2. LITERATURA CONSULTADA

### 2.1 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral

#### 2.1.1 As leishmanioses

As leishmanioses encontram-se entre as endemias consideradas prioritárias no mundo. São um complexo de doenças infecciosas causadas por parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ross, 1903), o qual agrupa espécies de protozoários unicelulares, digenéticos (heteroxenos), pertencentes à ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae, encontrados nas formas flagelada promastigota, no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados

e, amastigota, semiflagelo livre, parasito intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear (SFM) dos hospedeiros vertebrados. A transmissão ocorre pela picada da fêmea de flebotomíneo infectada.

A Organização Mundial de Saúde divide as leishmanioses em quatro grupos clínicos: cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral. A forma mais grave é a LV que representa um sério problema de Saúde Pública em vários países do mundo (Health..., 2013). As leishmanioses apresentam polimorfismo clínico dependente das espécies de *Leishmania* e resposta imune do hospedeiro (Leishmaniasis, 2013).

As leishmanioses podem ser classificadas de acordo com o tropismo apresentado pelo parasito. Na leishmaniose tegumentar (LT) as leishmanias se direcionam para a pele e mucosas (principalmente nasal e orofaríngea), e na LV, os parasitos apresentam acentuado tropismo pelo SFM do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides. Espécies distintas de *Leishmania* apresentam características clínicas, patológicas e epidemiológicas diversas, em cada área geográfica, sendo então consideradas entidades nosológicas distintas (Ashford, 2000).

Atualmente, as leishmanioses são endêmicas em 98 países (Leishmaniasis, 2013). Estima-se que aproximadamente 350 a 400 milhões de pessoas no mundo, encontram-se em risco de contrair a leishmaniose e 12 a 14 milhões estão infectadas. Neste contexto, sabe-se que 59.000 pessoas morrem anualmente de LV dentre as quais 35.000 são homens e 24.000 mulheres. É importante ressaltar que esses dados são subestimados, devido às limitações inerentes ao sistema de notificação de cada país (Desjeux, 2004; Leishmaniasis, 2013). Estimativas indicam que a incidência da leishmaniose humana é de 1,6 milhões ao ano, sendo meio milhão de forma visceral e 1,1 milhão da forma cutânea (Working..., 2010). Em termos globais a leishmaniose é a terceira mais importante doença transmitida por vetor, depois da malária e filariose.

A LT tem sido descrita no continente americano com registro do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, com exceção do Uruguai e do Chile (Manual..., 2007; Leishmaniasis, 2013).

No Brasil, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões. É uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção pela capacidade de produzir deformidades no ser humano com reflexos nos campos social e econômico, por ser considerada doença ocupacional na maioria dos casos (Manual..., 2007).

Cerca de 90% dos casos notificados de LV no mundo ocorrem em Bangladesh, Índia, Nepal, Brasil e Sudão, sendo o Brasil responsável por 90% dos registros que ocorrem no continente americano (Desjeux, 2004). Nas Américas, a LV é encontrada desde o Canadá até o norte da Argentina. Nos EUA ocorrem surtos de LVC, mas não há registro de LVH neste país e no Canadá (Duprey *et al.*, 2006).

Do ponto de vista epidemiológico, as mudanças ambientais, o crescimento demográfico e o deslocamento de animais e seres humanos são fatores que contribuem para a modificação da distribuição biogeográfica das leishmanioses, assim como para a incorporação de novos hospedeiros. Essas mudanças confirmam as leishmanioses como sendo zoonoses reemergentes (Ashford, 2000).

O Brasil tem registrado, anualmente, mais de 3.000 casos confirmados da doença (Casos ..., 2013) e apresentado taxa de letalidade variando de 5,5 a 6,7% nos últimos anos (Letalidade ..., 2013). Em 2011, o coeficiente de incidência por 100.000 habitantes foi de 0,7 para a região Sudeste, com 592 casos, tendo a maior participação o estado de Minas Gerais com coeficiente de 2,1 e um total de 412 casos (Coeficiente ..., 2013).

Minas Gerais foi o primeiro estado da região sudeste onde a doença foi descrita, com caso comprovadamente autóctone no norte do estado na década de 1940. Outros casos foram identificados e na década seguinte os três focos mais expressivos estavam em Porteirinha, Diamantina e Vale do Rio Doce (Oliveira *et al.*, 1959). A literatura descreve vários focos, a partir de então, culminando com a urbanização da doença no final da década de 1970, no país. O estado mineiro, atualmente, conta com 84% dos casos humanos de LV oriundos de zonas urbanas. Em 1992 havia 22 municípios com

transmissão da doença aumentando para 81 municípios em 2004. Está distribuída nas regiões norte, central, noroeste e nordeste de Minas Gerais (Resende, 2007).

Belo Horizonte, a capital mineira, é um dos grandes centros urbanos acometidos pela doença. Os primeiros cães notificados foram em 1992 e em 1994 foram diagnosticados os primeiros casos humanos da doença. Inicia-se a expansão da LV no município e arredores (Luz *et al.*, 2001). De 2003 a 2010, anualmente em Belo Horizonte, ocorreu a notificação de mais de uma centena de casos humanos e a taxa de letalidade se mantinha com valores elevados – a média de letalidade de 2000 a 2007 foi de 12,6% (Lopes *et al.*, 2010). Em 2011 a taxa de letalidade foi de 17,2% aumentando para 23,6% em 2012, com registro de 13 óbitos em 55 casos de LVH (Leishmaniose..., 2012).

A RMBH, também, contou com a rápida expansão da doença, desde o registro do primeiro caso em Sabará em 1989 (Genaro *et al.*, 1990). Foi observada entre 2000 e 2006 uma média de seis novos municípios com registro do primeiro caso autóctone no ano (Resende, 2007). A persistência da doença em determinada área depende basicamente da presença de vetor e da presença do reservatório susceptível. Tanto os inquéritos sorológicos na população de cães quanto os levantamentos entomológicos nas áreas endêmicas têm revelado que altas taxas de prevalência de calazar canino e presença predominante e abundante do vetor ocasionam elevado risco de transmissão para o homem (França-Silva *et al.*, 2005; Barata *et al.*, 2013).

A Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais (SES-MG) destaca duas ações mais recentes, dentre outras, como mais impactantes no controle da LV no estado de Minas Gerais: a elaboração e implementação do “Plano de intensificação do controle da LV em Minas Gerais”, executado nos anos de 2005 a 2007, priorizando vinte e cinco municípios classificados epidemiologicamente como de transmissão intensa, e a organização laboratorial para o diagnóstico sorológico canino com a integração entre laboratórios públicos e privados na padronização de procedimentos, desde 2004 (Resende, 2007).

### 2.1.2 Agente etiológico

No Novo Mundo, a *Leishmania (Leishmania) infantum* é o agente etiológico comumente isolado em pacientes com LV. Estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. chagasi* e a *L. infantum* uma única espécie (Maurício *et al.*, 2000) e esta última sinonímia, por ter sido mais utilizada atualmente, foi adotada, também, neste estudo.

A classificação taxonômica do agente etiológico da LV reconhecida pelo Ministério da Saúde (MS) foi proposta por Cunha e Chagas em 1937 (Manual..., 2006):

*Leishmania (Leishmania) chagasi=infantum* - Reino: Protista (Haeckel, 1866) - Sub-reino: Protozoa (Goldfuss, 1817) - Filo: Sarcostigophora (Honigberg e Balamuth, 1963) - Subfilo: Mastigophora (Deising, 1866) - Classe: Zoomastigophorea (Calkins, 1909) - Ordem: Kinetoplastida (Honigberg, 1963, *emend.* Vickerman, 1976) - Sub-ordem: Trypanosomatina (Kent, 1880) - Família: Trypanosomatidae (Dofein, 1901, *emend.* Grobber 1905) - Gênero: *Leishmania* (Ross, 1903) - Sub-gênero: *Leishmania* (Saf'yanova, 1982) - Espécie: *chagasi* (Cunha e Chagas, 1937)=*infantum*.

Os agentes etiológicos da LV são protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, parasito intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) de mamíferos, são eles: *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* (= *L. (L.) chagasi*) todos pertencentes ao complexo *L. (L.) donovani* (Lainson e Shaw, 1987).

A *L. (L.) donovani* (Laveran e Mesnil, 1903) é agente causador de uma antroponose na Índia, Paquistão e Bangladesh e em algumas regiões da África Oriental, onde o homem é o único hospedeiro mamífero encontrado infectado, sendo, portanto o único reservatório; acomete principalmente indivíduos adultos e é também conhecida por calazar indiano .

A *L. (L.) infantum* (Nicole, 1908) encontrada em parte do continente asiático, africano e europeu, é agente etiológico de uma antrozooponose de canídeos silvestres (raposas e chacais), tendo o cão como principal reservatório doméstico do protozoário, atinge acidentalmente o homem,

principalmente crianças entre um e quatro anos, por isso é também conhecida por calazar infantil. Este quadro sofreu alteração com a ocorrência de coinfeção da LV com o vírus HIV, com registro da metade dos casos na Europa em adultos. Na África e Índia a maior incidência está em crianças e adultos jovens (Control..., 2010).

*L. (L.) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937), é agente causador de uma antrozooponose no Novo Mundo de forma semelhante a *L. (L.) infantum*; é também denominada de Leishmaniose Visceral Americana (LVA) ou calazar neotropical. Havia uma polêmica à respeito da origem da LV no Novo Mundo, se há milhões de anos ou se em data mais recente após a colonização europeia sendo causada pela *L. infantum*. Entretanto, estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares já consideram a *L. chagasi* e a *L. infantum* uma única espécie (Maurício *et al.*, 2000).

O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, e compreende 22 espécies patogênicas ao homem, das quais 15 tem sido identificadas nas Américas (Leishmaniases, 2013). A LTA é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas. Primariamente, é uma infecção zoonótica, afetando outros animais que não o ser humano, o qual pode ser envolvido secundariamente. No Brasil, tem sete espécies identificadas, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenbergl* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (Manual..., 2007). A *L. (L.) amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente, alguns indivíduos podem desenvolver o quadro clássico da leishmaniose cutânea difusa (Manual..., 2007).

Dias *et al.* (2010) identificaram as 2 espécies, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*, em cães sorologicamente positivos para LV e com comprometimento visceral, em Paracatu, área endêmica. Tolezano *et al.* (2007) registraram os primeiros casos de *L. amazonensis* em cães domésticos de Araçatuba, clinicamente diagnosticados como LV, mesmo sem registro de

caso humano de LT neste município, na época. Barral *et al.* (1986) isolaram *L. amazonensis* de medula óssea de um caso de leishmaniose visceral em humano (LVH). Martinez *et al.* (2002) relataram coinfeção por *L. amazonensis* e *L. infantum* na mesma lesão de um caso de leishmaniose difusa cutânea em uma criança na Bolívia. Estes encontros demandam mais estudos no sentido de esclarecer a epidemiologia da LV e da LT.

### 2.1.3 Vetores

Os vetores da LV são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, sub-família Phlebotominae. No Velho Mundo pertencem ao gênero *Phlebotomus* e, no Novo Mundo (Américas), gênero *Lutzomyia*. O *Phlebotomus argentipes* é o vetor do calazar indiano, o *Phlebotomus perniciosus* é o vetor da LV na Europa, Oriente Médio e Sul da Rússia, e na África, onde há presença concomitante de *L. infantum* e *L. donovani*, os vetores da LV são, predominantemente, *Phlebotomus martini* e *Phlebotomus orientalis*, de hábitos ecléticos (Lewis, 1971).

Os vetores da LV são insetos denominados flebotomíneos. Nas Américas o gênero *Lutzomyia* é o mais importante, com mais de 400 espécies identificadas, mas destas, pouco mais de 50 estão envolvidas na transmissão da *Leishmania* na região (Leishmaniasis, 2013). No Brasil, a principal espécie é *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912), sendo encontrada em todas as cinco regiões do Brasil, sendo que na região Sul o primeiro registro foi em dezembro de 2008 (Guia..., 2009). Na região do estado do Mato Grosso do Sul a espécie *Lutzomyia cruzi* tem sido incriminada como vetor da doença, tendo importância epidemiológica restrita àquela região (Galati *et al.*, 1997).

A atividade dos flebotomíneos é crepuscular e noturna. A *L. longipalpis* abriga-se em locais úmidos e sombrios, desenvolvendo-se em solo úmido com matéria orgânica em decomposição. Apenas as fêmeas são hematófagas, com hábitos alimentares ecléticos, podendo se alimentar em diferentes espécies de mamíferos e aves encontrados no peridomicílio, tais como suínos, cães, galinhas, equinos, bovinos, roedores (Barata *et al.*, 2005). A *L. longipalpis* adapta-se

facilmente a variadas temperaturas e pode picar o homem tanto no intra como no peridomicílio (Barata *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2010). Há indício que o período de maior transmissão ocorra durante e logo após a estação chuvosa, quando há aumento da densidade populacional do inseto (França-Silva *et al.*, 2005; Guia..., 2009).

No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei*. O principal vetor da *Leishmania (L.) amazonensis* é a espécie *L. flaviscutellata* que apesar de ser pouco antropofílica apresenta ampla distribuição geográfica nos estados brasileiros: Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Bahia, Ceará, Maranhão, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo, ocorrendo em matas úmidas, onde apresenta densidade elevada (Manual..., 2007).

O conhecimento da fauna de flebotomíneos presente em uma região é importante para o conhecimento das principais espécies vetoras e mesmo secundárias que possam participar na transmissão das leishmanioses (Ferreira *et al.*, 2012).

### 2.1.4 Reservatórios

O cão (*Canis familiaris*) é considerado a principal fonte de infecção na área urbana do Brasil para a LV, sendo apontado por Deane (1956) não só como reservatório doméstico da doença, mas como elo essencial na manutenção da cadeia epidemiológica da LV. No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vertulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (Guia..., 2009). Na Bahia, Sherlock *et al.* (1984) encontraram o gambá-da-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) naturalmente infectado e esse foi o primeiro registro de um hospedeiro silvestre marsupial para *L. infantum*.

A prevalência da LV na população canina tem sido superior e antecedente à ocorrência de casos humanos (Oliveira *et al.*, 2001; Manual..., 2006). Mesmo os animais assintomáticos, muitas vezes representando a maioria (Marzochi *et al.*, 1985; Silva *et al.* 2001) apresentam intenso parasitismo

cutâneo por formas amastigotas (Reis *et al.*, 2006) e podem ser fonte de infecção para os flebotomíneos (Costa-Val *et al.*, 2007). Estudos mostram que a transmissão humana ocorre em áreas com maiores taxas da prevalência canina (Camargo-Neves *et al.*, 2001).

As relações afetivas dos proprietários com os cães sejam estes de segurança ou companhia, tem dificultado a eutanásia dos animais soropositivos muito mais no ambiente urbano que rural. Estudos tem registrado quantitativo elevado de recusa dos proprietários na entrega dos cães positivos para a LV (Barboza *et al.*, 2006; Coura-Vital *et al.*, 2013; Controle..., 2013). A reposição de cães recolhidos tem sido registrada em mais de 39% dos casos (Nunes *et al.*, 2008; Morais, 2011) e destes registros de até 15% de animais já infectados (Moreira *et al.*, 2004).

No caso da *Leishmania (L.) amazonensis* os roedores silvestres do gênero *Proechymis* e o *Oryzomys* são indicados como reservatórios desta espécie de *Leishmania* (Manual..., 2007). De acordo com a região geográfica é que se definem os ciclos de transmissão da LTA, com o envolvimento de uma diversidade de espécies de parasitos, vetores, reservatórios e hospedeiros.

### 2.1.5 Fatores de risco para leishmaniose visceral canina

Estudos sobre fatores de riscos da LVC associados com raça, sexo e idade, além de outros determinantes, são poucos, e nem sempre são consensuais (França-Silva *et al.*, 2003), apesar de sua relevância para o controle e compreensão da dinâmica da doença (Belo *et al.*, 2013).

Alencar e Cunha (1963) verificaram que a LVC foi observada em todas as faixas etárias, mas havia uma tendência crescente da infecção por *L. infantum* à medida que a idade do animal avançava. Segundo Ashford (1996), em áreas da América do Sul, especialmente no Nordeste do Brasil, a maioria dos cães torna-se infectados durante as fases iniciais da vida, sendo que 20 a 30% dos animais estão soropositivos em qualquer período. Resultados semelhantes foram observados por França-Silva (1997). Este mesmo autor não encontrou diferença significativa na distribuição da LVC por sexo, mas observou que a distribuição da doença tinha diferença

significativa entre os grupos de raças. Autores sugerem que o local de permanência do cão possa ser mais impactante do que a raça para transmissão da LV (Costa *et al.*, 1996). Uma explicação apropriada é que cães de trabalho usualmente dormem do lado de fora das casas sendo mais, frequentemente, sujeitos às picadas dos flebotomíneos (Dye *et al.*, 1992; Coura-Vital, 2011). Tanto cães de trabalho como de estimação são altamente valorizados e a LVC tem sido um problema veterinário significativo (França-Silva, 1997).

Em relação á característica fenotípica, cães de pelo curto são mais susceptíveis à LV do que cães de pelo longo (França-Silva *et al.*, 2003; Moreira Jr *et al.*, 2003; Coura-Vital, 2011; Barata *et al.*, 2013). Coura-Vital (2011) relatou fatores associados à infecção canina: renda familiar menor que um salário mínimo, maior tempo de permanência do cão no quintal e não ter realizado exame para LV anteriormente; fatores de risco durante observação de uma coorte canina: presença de casos anteriores de LVC na residência, parede sem reboco, pelo curto e fuga do cão para a rua; fatores de risco associados à soropositividade: presença de entulho no quintal e cão ser de grande porte.

Cães infectados e não retirados do campo seja pela morosidade do serviço ou pela baixa sensibilidade do teste sorológico continuam como reservatório em potencial para manutenção do ciclo de transmissão da LV (Braga *et al.*, 1998; Morais, 2011). Autores chamam atenção para o quantitativo expressivo de cães que fica no ambiente por tempo prolongado devido a resultado indeterminado pela IFI (Lopes *et al.*, 2005, 2008 e 2010, Menezes, 2011) ou mesmo com sorologia negativa e PCR<sup>+</sup> que soroconvertem posteriormente (Coura-Vital *et al.*, 2013).

A presença de animais nos arredores do domicílio foi pesquisada e observou-se que os animais que mais incrementaram o risco de ocorrer LV foram: patos, roedores, pássaros e galinhas, o que demonstra o potencial das aves em atrair os flebotomíneos e a necessidade de maior atenção quanto a estas espécies no controle da doença (Borges *et al.*, 2009). A presença de mais de um cão no domicílio foi associada a maior risco de contrair a LV (Margonari *et al.*, 2006; Borges *et al.*, 2009)

Um dos fatores de risco importante na aquisição da LV é a exposição ao inseto vetor. A espécie *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da LV no Novo Mundo tem-se mostrado oportunista podendo sugar uma ampla variedade de vertebrados. A presença de animais domésticos e silvestres no peridomicílio atrai um grande número de flebotomíneos, aumentando o risco de transmissão da LV (Barata *et al.*, 2005). A prevenção de doenças transmissíveis por vetores biológicos é bastante difícil, ainda mais quando associada à existência de reservatórios domésticos e silvestres e aos aspectos ambientais, incluindo aspectos físicos de utilização do espaço habitado (Gontijo e Melo, 2004).

### **2.1.6 Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV)**

Os primeiros casos registrados da LV no Brasil datam da década de 1930 com focos no Nordeste, Planalto Baiano e região Amazônica. A doença foi identificada em todas as idades, predominantemente até os 10 anos, foi sugerida a participação do flebotomíneo na transmissão da LV e que animais silvestres poderiam ser reservatórios. Chagas (1937) e seus colaboradores acreditavam que a LV fosse esporádica, que não acometia o homem na cidade e nem os animais domésticos como reservatório da doença.

As campanhas de controle da LV no Brasil tiveram início na década de 1950 e Deane (1956) teve uma contribuição singular com pesquisas desenvolvidas no Ceará que elucidaram muitos aspectos epidemiológicos da LV. Fez a primeira descrição da doença em cães, na área urbana, além de sugerir as medidas profiláticas para a LV, mantidas até a atualidade. Relatou o *L. longipalpis* como vetor responsável na área estudada e em maior densidade durante a estação chuvosa. Associou os focos endêmicos com os cães infectados e identificou a tríade: homem, cão e raposa como hospedeiros. Sugeriu que no litoral e outras regiões do Brasil existiriam condições para manter a doença endêmica.

Nesta mesma década, Oliveira *et al.* (1959) listaram casos em MG de 1947 a 1958 distribuídos entre três grandes focos: Porteirinha, Diamantina e Vale do Rio Doce. Magalhães *et al.* (1980) atribuíram o êxito na redução

gradativa dos casos humanos na zona do Rio Doce às medidas profiláticas: eliminação dos cães positivos pela Reação de Fixação de Complemento (RFC) ou mesmo negativos com algum sinal clínico sugestivo, tratamento dos casos humanos e aplicação domiciliar e peridomiciliar do inseticida Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT). Até 1959, o diagnóstico era exclusivamente parasitológico, sendo acrescida a RFC a partir de então (Alencar e Cunha, 1963).

Em 1956, houve um caso autóctone de LVH em uma criança em Belo Horizonte e que não foi esclarecido, tanto o inquérito sorológico como a pesquisa do vetor foi negativo (Magalhães *et al.*, 1980). De 1956 a 1989 não houve registros de LVH na RMBH. Em 1989 a expansão da doença ocorreu a partir de um caso registrado no município de Sabará (Genaro *et al.*, 1990).

As campanhas de controle foram interrompidas da década de 1960 a 1980 quando foi observado aumento no número de casos de LV (Lacerda, 1994). O êxito do PCLV parte da premissa das ações realizadas de forma integrada (Manual..., 2006), o que nem sempre foi possível por diversas razões, como problemas orçamentários, escassez de recurso humano qualificado (Gontijo e Melo, 2004). Os municípios necessitam de assessoria e capacitação pelo estado para desenvolver ações específicas baseadas em critérios técnicos científicos (Neto *et al.*, 2001).

Em 2003 houve reavaliação das ações propostas pelo PCLV e além das medidas convencionais de tratamento precoce dos casos humanos, diagnóstico laboratorial e eutanásia dos cães soropositivos, manejo ambiental e controle químico quando indicado e ações educativas, foi dado novo enfoque à estratificação das áreas com transmissão da doença e inclusão de estados e municípios silenciosos (Manual..., 2003). A priorização de áreas com maior risco de LV, em detrimento daquelas com menor risco, pode contribuir para a expansão geográfica da doença, sendo fundamental a incorporação dessa última nas ações de vigilância, o que operacionalmente nem sempre é viável para os municípios (Morais *et al.*, 2008).

A prevenção da doença nos cães por meio da imunoprofilaxia, mesmo não adotada ainda pelo MS, aparece como mais uma alternativa para o

controle e duas vacinas estão sendo comercializadas no Brasil. Porém, dada a necessidade de maiores estudos elucidativos quanto à eficácia destas como medidas de controle, juntamente com o uso de coleira repelente são medidas consideradas complementares e de uso por pequena parte da população (Manual..., 2006).

A eutanásia dos cães soropositivos é um ponto polêmico, principalmente na capital mineira onde foram instituídos, inadvertidamente, protocolos de tratamentos com base no modelo europeu. Esta situação faz com que a LV seja discutida nos meios acadêmicos e pelo MS, por ser um grave problema de saúde pública e médico-veterinário (França-Silva, 1997).

Atualmente, a ocorrência de altas taxas da doença no grupo de adultos jovens (Leishmaniose..., 2006) e, também, em pessoas de classes sociais mais favoráveis economicamente reforça uma possível mudança qualitativa na história da LV (Marcelino, 2007).

A redução dos coeficientes de incidência e letalidade da LV no Brasil continua como desafio, assim como a expansão da doença e a ocorrência de focos reemergentes (Barata *et al.*, 2013). O banco de dados na área da saúde necessita, ainda, de aprimoramentos que garantam a totalidade e qualidade das informações registradas (Maia-Elkhoury *et al.*, 2007; Araújo, 2011). O uso do geoprocessamento tem permitido a reunião de bancos de dados socioeconômicos, de saúde e ambientais em bases espaciais; com isso possibilita o entendimento do contexto em que se verificam fatores determinantes de agravos à saúde (Barcellos e Bastos, 1996).

A educação participativa envolvendo as diversas camadas da população, mesmo os profissionais de saúde, pode democratizar atitudes capazes de beneficiar as práticas de controle da LV (Luz *et al.* 2005; Borges *et al.*, 2008; Magalhães *et al.*, 2009). À exemplo, a posse responsável pelos animais em respeito à vida, muitas vezes desqualificada por atitudes de violência (Boletim, 2013).

## 2.2 Métodos de diagnóstico

De um modo geral o diagnóstico da LVC ainda é considerado um problema para os serviços de Saúde Pública, principalmente pela inexistência de testes com alta sensibilidade e especificidade (Rosário *et al.*, 2005), de baixo custo e de fácil implantação e operacionalização na rotina dos serviços. Os testes sorológicos para LVH, também, apresentam resultados discordantes dependendo do antígeno utilizado (Moreno *et al.*, 2006).

### 2.2.1 Diagnóstico sorológico

Devido à maior rapidez e menor custo, os testes sorológicos são os mais empregados pelos programas de controle sendo seu uso recomendado em inquéritos caninos amostrais ou censitários para avaliar a soroprevalência canina. Até 2012, para inquérito sorológico em Saúde Pública os exames recomendados pelo MS para o diagnóstico canino eram o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a Imunofluorescência Indireta (IFI). A partir de 2013 houve a introdução do Teste Rápido Qualitativo para a Detecção de Anticorpos de Cão para *Leishmania* – TR DPP® na rotina do serviço público de saúde como triagem e o ELISA substituiu a IFI considerada teste confirmatório, até então. O teste apresenta sensibilidade de 100% e especificidade entre 87,5% a 91,7%, ambos no sangue e soro, conforme bula do fabricante. Também, apresenta vantagens como ser de fácil e rápida execução, não precisar de equipamentos e ser confiável (Diagnóstico..., 2013). O ELISA era utilizado para triagem de cães cujos níveis de anticorpos circulantes eram desconhecidos e a IFI para confirmação de resultados positivos triados pelo ELISA, e podia também ser utilizada sozinha na rotina diagnóstica (Manual..., 2006).

Na IFI, os resultados considerados positivos são aqueles que apresentam títulos iguais ou maiores à diluição de 1:40 (ponto de corte). Ferreira *et al.* (2007) observaram que a IFI apresenta reação cruzada em amostras de cães com LT, com doença de Chagas e com erliquiose. A IFI possui o inconveniente de exigir pessoal altamente treinado para leitura das lâminas, incluindo o fato de a tarefa ser demorada e o critério de interpretação dos resultados muito subjetivo, principalmente em caso de baixos títulos. O Kit



de IFI produzido por Bio-Manguinhos apresenta sensibilidade de 90,0% e especificidade de 80%. O resultado indeterminado na IFI tem sido alvo de estudos e identificação de elevada frequência de soroconversão em cães, variando de 36% (Lopes *et al.*, 2005), 54,3% (Gonçalves, 2013) e 81,7% (Menezes, 2011). Esta ocorrência remete a uma reflexão e atenção especial quanto à continuidade de uso da IFI na rotina diagnóstica da LVC (Menezes, 2011), agravada mediante estudos que demonstram a baixa sensibilidade da IFI especialmente em cães assintomáticos (Dye *et al.* 1993; Coura-Vital, 2011). Estudos mostram que a sorologia positiva é possível após 94 dias, aproximadamente, da infecção do cão com a *L. infantum* (Quinnell *et al.*, 1997). Animais doentes manifestam uma intensa resposta imune humoral, apresentando altos níveis de IgG anti-*Leishmania spp* (Silva, 2009).

O ELISA é uma técnica altamente sensível, quantitativa, automatizada, porém com algumas limitações relatadas por autores, à exemplo níveis de especificidade baixos, principalmente quando se utilizam antígenos brutos (Reed, 1996); capacidade de identificar baixos níveis de anticorpos, porém é pouco preciso na detecção de casos pré-clínicos ou assintomáticos (Coura-Vital *et al.*, 2013).

Os antígenos utilizados nesses dois testes diagnósticos são quase sempre derivados de promastigotas de cultura, parasitos totais, parasitos lisados ou antígenos recombinantes. Dependendo do antígeno empregado, a sensibilidade pode variar de 95 a 99,5% e a especificidade de 97,1 a 100% (Mancianti *et al.*, 1995; Badaró *et al.*, 1996). Além disso, o tipo de antígeno utilizado e possíveis mudanças no protocolo padrão utilizado (tempo de incubação ou tipo de microplacas utilizadas no ELISA) podem alterar os resultados referentes à sensibilidade e à especificidade desses exames. Na bula do kit comercial de ELISA/S7<sup>®</sup> (Biogene) do ano de 2011, consta que com base em estudos realizados em parceria com universidades a especificidade média encontrada foi de 94,3% podendo alcançar 100%, enquanto a sensibilidade média foi de 89% podendo alcançar 96,4%. Este kit ELISA/S7<sup>®</sup> usa peptídeo recombinante.

O ELISA produzido por Bio-Manguinhos, licenciado no Ministério da Agricultura desde

2004, até então usado como teste de triagem passa ser o teste confirmatório para a LVC em substituição à IFI, nos laboratórios da rede pública. Conforme bula do fabricante apresenta sensibilidade para amostras de soro dos cães de 94,54% e especificidade de 91,76%. Já para as amostras coletadas em papel de filtro os valores de sensibilidade e especificidade foram de 79,45% e 90,24%, respectivamente. Ao citar estes valores a bula informa que a IFI foi usada como teste padrão.

A baixa eficiência dos procedimentos diagnósticos vem sendo citada por diversos autores como uma das possíveis causas da ineficácia da eliminação canina no Programa Nacional de Controle da LV (Braga *et al.*, 1998; Costa e Vieira, 2001; Courtenay *et al.*, 2002; Alves e Bevilacqua, 2004, Morais, 2011). Alguns apontam para a necessidade de associação de técnicas capazes de minimizar os resultados falso-negativos assim como evitar reações cruzadas e consequente liberação de resultados falso-positivos (Andrade *et al.*, 2006; Silva, 2009; Queiroz *et al.*, 2010). Estudos foram realizados para verificar a concordância entre os testes sorológicos e os resultados entre diferentes laboratórios (Machado, 2004; Moraes, 2006) e apresentaram resultados que não refletem o mesmo grau de concordância relatado por outros, com valores bem menores (Queiroz *et al.*, 2010; Diagnóstico..., 2013).

### 2.2.2 Diagnóstico parasitológico

É um procedimento invasivo e inadequado para estudos epidemiológicos em larga escala, mas comumente considerado padrão-ouro para resultados positivos na comparação das demais técnicas de diagnóstico. É usado desde os primeiros inquéritos no Brasil (Alencar e Cunha, 1963). Baseia-se na visualização de formas amastigotas do parasito por punção aspirativa de órgãos-alvo (baço, fígado, linfonodos e medula óssea) ou por fragmentos de biópsia dos mesmos. Embora a especificidade seja de 100%, a sensibilidade da microscopia varia, sendo maior para baço (93-99%) do que para a medula óssea (53-86%) ou linfonodo (53-65%) (Chappuis *et al.*, 2007). Do material aspirado ou do fragmento é realizado esfregaço ou impressão em lâminas, respectivamente, coradas por derivados de Romanowsky, Giemsa ou Leishman. O diagnóstico microscópico de lâminas coradas

pode se tornar difícil se o animal apresentar baixa carga parasitária; além disso, a leitura completa da lâmina exige tempo e treinamento adequados.

Outro método de detecção do parasito é o isolamento de promastigotas em meios de cultura como o NNN (Novy-McNeal-Nicole) e o Schneider (Schneider's *Drosophila* Medium), a partir dos aspirados ou fragmentos dos órgãos. Mesmo sendo uma técnica de certeza, pois a visualização do parasito não deixa dúvida sobre a infecção, ainda assim possui limitações (Manual..., 2006), pois é um método laborioso, de alto custo, lento, além de necessitar de pessoal altamente treinado e acompanhamento sistemático.

### 2.2.3 Reação em cadeia da polimerase - PCR

O uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) desde a década de 1980 tem sido um marco importante para estudos genético-moleculares envolvendo várias espécies de seres vivos. Diversas técnicas baseadas na PCR foram descritas com a possibilidade de realização automatizada da reação (Saiki *et al.*, 1985). Rodgers *et al.* (1990) foram os pioneiros na utilização da técnica de PCR para identificação de DNA de *Leishmania*, tendo como alvo as moléculas do minicírculo do kDNA. Esses autores demonstraram a sensibilidade do método, capaz de detectar o kDNA equivalente a um único parasito. Diversos protocolos já foram descritos para detecção de *Leishmania* em amostras de humanos e cães (Ferroglio *et al.*, 2006), flebotomíneos (Michalsky *et al.*, 2007) e animais silvestres (Sastre *et al.*, 2008), tendo como alvo a região conservada do minicírculo do kDNA. Os métodos de PCR que utilizam como alvo regiões do kDNA têm demonstrado ser mais sensíveis do que os que utilizam DNA genômico. Essa maior sensibilidade parece estar relacionada ao número de cópias do alvo, que no caso do DNA dos minicírculos chega a cerca de 10.000 cópias; para o RNA ribossomal (rRNA) o número de cópias é significativamente menor, cerca de 40-200 cópias (Lachaud *et al.*, 2002).

A PCR por apresentar 100% de especificidade, alta sensibilidade (94%), principalmente em cães assintomáticos, com título de anticorpos nem sempre detectável pelos testes sorológicos convencionais tem sido sugerida em associação a

esses (Queiroz *et al.*, 2010; Coura-Vital *et al.*, 2013). Entretanto, é necessária a otimização desta técnica molecular para ser empregada em larga escala (Coura-Vital, 2011), além da redução de custos.

### PCR-RFLP kDNA

A técnica de *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP), associada à PCR, tem sido utilizada com êxito para a identificação de algumas espécies de *Leishmania* (Andrade *et al.*, 2006). Esse método utiliza uma ou mais enzimas de restrição que cortam o DNA em sítios específicos, possibilitando a diferenciação das espécies, de acordo com o tamanho dos fragmentos gerados. Após a descrição de um protocolo de PCR RFLP em *Trypanosoma cruzi*, a técnica começou a ser empregada na identificação de espécies de *Leishmania* (Ferroglio *et al.*, 2006).

### 2.2.4 Geoprocessamento e saúde

O geoprocessamento, aplicado a questões de Saúde Coletiva é uma ferramenta que permite o mapeamento de doenças, a avaliação de riscos, o planejamento e a análise de ações baseados na distribuição espacial e temporal da doença (Barcellos e Bastos, 1996, Prado *et al.*, 2011). Desde a década de 90, com a crescente disponibilização de dados e pela facilidade de acesso e análise destes através de sistemas computacionais simples, o uso do espaço como categoria de análise tem sido ressaltado em trabalhos nas áreas de epidemiologia (Barcellos e Santos, 1997; Menezes, 2011).

Estudos de análise espacial vêm demonstrando não somente o enorme potencial para o melhor conhecimento da realidade local, mas também para uma análise epidemiológica capaz de adequar recursos financeiros disponibilizados para ações de prevenção e controle (Oliveira *et al.*, 2001; Camargo-Neves *et al.*, 2001; Margonari *et al.*, 2006). O geoprocessamento foi utilizado em estudos para avaliar a distribuição espacial dos casos de LVC e LVH, mostrando a evolução e a consolidação deste processo de urbanização no município de Belo Horizonte (Oliveira *et al.*, 2001; Margonari *et al.*, 2006).

Os mapas temáticos podem representar elementos não visíveis do espaço como

densidade demográfica e outras variáveis. Essa tecnologia permitiu o mapeamento e análise de fatores ambientais que afetam a distribuição espacial e temporal de insetos, permitindo monitorar doenças como a leishmaniose (Thomson e Connor, 2000). Menezes (2011) destacou a utilidade dos mapas de *Kernel* para o monitoramento espacial dos resultados caninos e das coletas censitárias, bem como para o planejamento de novas intervenções na capital mineira, de acordo com as atividades do PCLV. Prado *et al.* (2011) identificaram, também, por meio de mapas de *Kernel*, áreas sob elevado risco de transmissão em Montes Claros, que devem ser priorizadas para vigilância da doença.

A epidemiologia espacial, também, permite reconhecer que a frequência, a distribuição e a importância dos diversos fatores que influenciam no aumento de determinados riscos para a saúde não são, necessariamente, os mesmos em todos os grupos populacionais (Barcellos e Bastos, 1996). Outras vantagens do geoprocessamento são a detecção e apresentação visual de agrupamentos, também chamados “*clusters*” (Rothman, 1990; Rothman *et al.*, 2011). Em estudo realizado no município de Juatuba, Borges (2011) identificou três *clusters* e aumento de 2,80 vezes mais chances em adquirir a LVC no *cluster* primário.

### **3- MATERIAL E MÉTODOS:**

#### **3.1. Tipo de estudo**

Foi realizado um estudo epidemiológico observacional e prospectivo de corte fechada de cães por meio de coleta de amostras sanguíneas caninas em dois intervalos semestrais, totalizando três coletas para determinação da prevalência e incidência e dos fatores de risco para leishmaniose visceral em Juatuba, nos anos 2010 e 2011.

#### **3.2. Descrição da área estudada**

##### **3.2.1. O município Juatuba**

O estudo foi conduzido no município de Juatuba em Minas Gerais, nos anos de 2010 e 2011,

sendo este, parte integrante da RMBH. Está localizado na latitude -44.34° e longitude -19.95° (IBGE, 2009). Faz divisa com os municípios de Esmeraldas, Betim, Mateus Leme, Florestal, Igarapé e São Joaquim de Bicas (Figura 1). Situa-se aproximadamente a 45 km de Belo Horizonte, às margens da BR 262 e MG 050 e a 18 km da Rodovia Fernão Dias - BR 381. É o 6º município em índice de crescimento econômico na RMBH e o 9º em Minas Gerais (Juatuba, 2010). Conta com uma população estimada de 22.221 habitantes, sendo que a maioria de 21.846 reside em área urbana; possui área de Unidade Territorial de 97 Km<sup>2</sup> e densidade de 216,4 hab./Km<sup>2</sup> (Censo..., 2011).

A emancipação política de Juatuba ocorreu em 1992, quando, então, era distrito de Mateus Leme (Juatuba, 2013). Desde então, contou com a formação de novos bairros em consequência à chegada de imigrantes trabalhadores. Atualmente, de acordo com as atividades dos agentes de saúde definidas pelo Programa Nacional de Controle da Dengue do município, a área de zoneamento encontra-se dividida em 16 setores (8 Zonas e 8 Sedes) compostos de 36 bairros, 849 quarteirões e 9.812 residências.

Com relação à vegetação, o município apresenta áreas de cultivo, pastagem, campos, cerrado, cerradão e matas. A região é caracterizada por um relevo marcado por declives acentuados de aspectos montanhosos e colinosos (Espaço Juatuba, 2008).

O clima de Juatuba, segundo a classificação de Koppen, é do tipo Aw – tropical chuvoso, com estiagem no inverno e cuja temperatura média de todos os meses é superior a 18°C. As precipitações em torno de 1.557 mm anuais registram seus índices mais elevados (cerca de 91% do total) de outubro a março. As altitudes predominantes no município situam-se entre 752 e 850 metros, diminuindo de oeste para leste e a nordeste, em direção ao vale do rio Paraopeba (Espaço Juatuba, 2008).



Fonte: IBGE, 2010.

Figura 1. Localização do município de Juatuba em relação aos municípios limítrofes da RMBH.

O município de Juatuba é classificado como área de transmissão esporádica, de acordo com os critérios de classificação de áreas para vigilância e controle da LV do MS. Por meio de análise epidemiológica, classifica-se o município de acordo com a média anual de casos ocorridos nos últimos cinco anos. Municípios com transmissão esporádica são aqueles que estão abaixo do “percentil 90 (P90)”, ou seja, com média anual de casos menor que 2,4 (Manual..., 2006). Conforme a Secretaria Municipal de Saúde

(SMS) de Juatuba, o primeiro caso de LVH ocorreu em 1999, posteriormente ocorreram mais dois casos, em 2005 (não notificado no SINAN e não considerado neste estudo) e 2007. Posteriormente ao início de execução deste estudo ocorreram mais três casos em 2011 e um em 2012. No período de 2003 a 2009, foram notificados no município, 32 casos humanos de

LTA (Comunicação pessoal)<sup>1</sup>. Nos anos seguintes, foram notificados mais 07 casos em 2010, 01 em 2011 e mais 01 em 2013, conforme informado pelo próprio Serviço de Controle de Zoonoses (SCZ) do município. As ações específicas para vigilância e controle da LV, em locais classificados como de transmissão esporádica, devem seguir as recomendações do Manual de Vigilância e Controle da LV (Anexo 02).

Não havia sido feito inquérito sorológico canino amostral ou censitário em Juatuba antes desta pesquisa. Eram coletadas amostras sanguíneas de cães para sorologia de acordo com a demanda solicitada pela população. Fazia-se o encaminhamento para o Laboratório da Prefeitura de Betim, referência para o diagnóstico da doença na Gerência Regional de Saúde (GRS) à qual o município de Juatuba está vinculado. No ano de 2007 foram encaminhadas 56 amostras para diagnóstico sorológico para LVC, sendo que, destas, 25% (14) apresentaram resultado reagente. Em 2008 e 2009 foram 34 e 102 amostras analisadas, apresentando um índice de positividade canina de 23,5% (8 cães) e 21,6% (22 cães), respectivamente.

Em dezembro de 2009 foi realizado pelo SCZ de Juatuba, captura, coleta e identificação de flebotomíneos, pela armadilha de isca luminosa onde foram encontradas as espécies: *Lutzomyia longipalpis*, *L. whitmani* e *L. sallesi* nos bairros Satélite 1, Vila Maria Regina 2 e Quinta da Boa Vista, respectivamente (Comunicação pessoal)<sup>2</sup>. As duas primeiras espécies são consideradas vetores comprovados da LV e LT, respectivamente.

### 3.3 Desenho do estudo

A partir de reunião conjunta entre a Gerência de Vigilância Ambiental da Superintendência de Epidemiologia (SE/SES-MG) e a SMS de

<sup>1</sup>Informação dada por Cristiano Martins da Cruz (Coordenador do Serviço de Controle de Zoonoses), Prefeitura Municipal de Juatuba, Secretaria Municipal de Saúde, Divisão de Vigilância à Saúde, Serviço de Controle de Zoonoses; 02 de fevereiro 2010.

<sup>2</sup>Informação dada por Patrícia de Almeida Soares (Referência Técnica das Leishmanioses), Coordenadoria de Zoonoses e Vigilância de Fatores de Risco Biológicos/Gerência de Vigilância Ambiental, Superintendência de Epidemiologia, Sub-Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Estado da Saúde/SUS-MG; 26 de janeiro 2010.

Juatuba, foi decidido realizar um trabalho prévio, com as lideranças comunitárias e profissionais da área de educação do município, para informar à população sobre a importância do trabalho a ser desenvolvido. Foram ministradas palestras para os professores da rede pública e privada sobre a LV onde foram abordados aspectos relacionados ao agente epidemiológico, reservatórios, vetores, transmissão, sinais clínicos, diagnóstico, prevenção e controle das leishmanioses, além de um tópico sobre posse responsável de animais. Ao final das palestras foram entregues folhetos informativos aos presentes, divulgação do material didático e visualização de frascos contendo o vetor, *Lutzomyia longipalpis*. Cada professor recebeu uma cópia do material utilizado para multiplicar a informação em suas respectivas escolas.

Houve, também, a capacitação das equipes de saúde da família assim como dos agentes comunitários de saúde de Juatuba sobre o tema “Leishmanioses”. Com o apoio do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) foi ministrado um curso de 4 horas sobre coleta entomológica com aula prática para os Agentes de Combate à Endemia (ACE). Foi enfatizada a importância deste profissional no repasse de conhecimento à população, estrategicamente parceira em Saúde Pública.

Este trabalho contou com a adesão da população em permitir a coleta de sangue dos cães, sem resistência, o que se deve, em parte, ao repasse de informação e conscientização da importância das ações de controle para a LV. A etapa inicial de determinação da prevalência da LVC em Juatuba fez parte da dissertação de Borges (2011).

O estudo transversal correspondente à primeira etapa foi feito por meio de coleta de amostras sanguíneas caninas, definidas aleatoriamente e por entrevista com uso de um questionário aos proprietários dos cães examinados (Anexo 03). Posteriormente ao diagnóstico sorológico foi definida a coorte de cães para o estudo observacional prospectivo, esta composta por animais com resultados negativo e indeterminado na primeira coleta. Foram realizadas mais duas coletas de sangue nos cães amostrados com novas entrevistas (Anexo 04) com os proprietários, com intervalos de seis meses, totalizando um ano de monitoramento. Na

terceira etapa do estudo foi feita coleta de sangue também nos animais com sorologia negativa e indeterminada, referente à segunda etapa.

A escolha do intervalo semestral foi determinada pela disposição do menor tempo possível no qual a equipe formada por alunos e pesquisadores pudesse realizar a coleta sanguínea dos cães, aplicar os questionários aos proprietários, processar o diagnóstico laboratorial com testes sorológicos, entregar os resultados ao SCZ de Juatuba e este aos proprietários, aguardar o recolhimento dos cães positivos, coletar nova amostra de sangue destes antes da eutanásia no Centro de Controle de Zoonoses de Betim (CCZ-Betim) para obtenção de soro para novas análises

sorológicas, realizar a necropsia, processar o exame parasitológico e PCR. Além da capacidade operacional, considerou-se o fato de Juatuba ser área de transmissão esporádica para a zoonose, conforme estratificação do MS (Manual..., 2006).

O questionário usado para entrevista aos proprietários nas duas últimas etapas do estudo foi mais reduzido e direcionado ao registro de mudanças ocorridas em relação ao reservatório e ambiente para análise posterior da soroconversão associada aos fatores de risco em Juatuba.

O desenho do estudo abrangendo as etapas do estudo está esquematizado na figura 2.

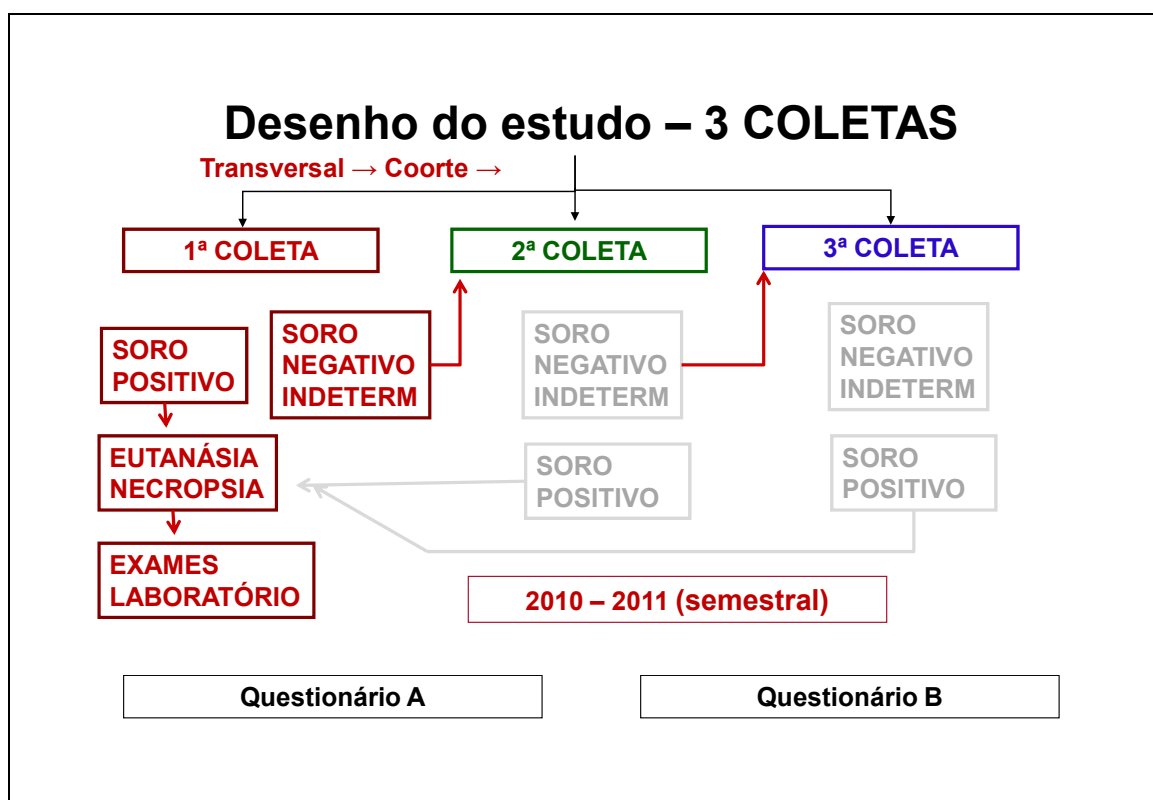


Figura 2. Esquema do estudo das três coletas de sangue canino e necropsia dos soropositivos amostrados em Juatuba, 2010 a 2011.

Para facilitar a apresentação e discussão dos resultados foi feita uma divisão em três blocos referentes à:

- Bloco I – Diagnóstico laboratorial e clínico
- Bloco II – Entrevistas - Fatores de risco e proteção (análise descritiva e analítica - questionários)

Bloco III – Análise espacial

### 3.3.1 Universo da pesquisa: população canina do município de Juatuba

A população canina foi obtida, tendo como referência dados cedidos pela SMS - Divisão de

Vigilância à Saúde – SCZ de Juatuba, levando-se em conta o censo canino realizado em 2009, registrado pelo Programa de Controle da Dengue no município de Juatuba. De acordo com o trabalho em 36 bairros foram contabilizados 5.316 cães (Comunicação pessoal)<sup>3</sup>. Neste estudo foram considerados 34 bairros devido à união de Boa Vista 1 e 2, e Satélite 2 e Parada das Velhas, por dificuldades na delimitação de áreas. Considerando a população humana estimada em 22.221 (Censo..., 2011) a razão foi de um cão para cada 4,2 habitantes.

### **3.3.2 Amostra**

#### **3.3.2.1 Tamanho da amostra**

Calculou-se a amostra de cães com base na população canina de Juatuba (5.316 cães). Considerando essa população finita, o nível de confiança de 95%, precisão esperada de 20% e prevalência esperada para LV de 8% (baseada na prevalência de Belo Horizonte em 2008), a amostra calculada foi de 914 cães. Adicionando uma taxa de recusa de aproximadamente 10%, a amostra final foi de 1.005 cães. Para este cálculo de amostragem foi utilizado o programa Epi Info versão 6.04.

#### **3.3.2.2 Seleção da amostra**

Foi utilizado o inquérito amostral por meio de sorteio – Amostra Aleatória Simples, conforme manual do MS (Manual..., 2006), baseada na divisão das áreas de acordo com as atividades dos agentes de saúde definidas pelo Programa Nacional de Controle da Dengue do município. A área de zoneamento encontra-se dividida em 16 setores (8 Zonas e 8 Sedes) compostos de 34 bairros, 849 quarteirões e 9812 residências (Anexo 06). Foram coletadas amostras em todos os bairros proporcionalmente ao tamanho da população canina residente, de acordo com o tamanho amostral (Anexo 06). Para cada zona os quarteirões foram numerados e, a partir da tabela de números aleatórios, foi feito o sorteio dos mesmos, identificando os quarteirões participantes da pesquisa (Anexo 07).

<sup>3</sup> Informação dada por Cristiano Martins da Cruz (Coordenador do Serviço de Controle de Zoonoses), Prefeitura Municipal de Juatuba, Secretaria Municipal de Saúde, Divisão de Vigilância à Saúde, Serviço de Controle de Zoonoses; 02 de fevereiro 2010.

A definição do imóvel a ser visitado em cada quarteirão selecionado foi feito de forma sistemática, onde foi coletado sangue de um animal por residência, sendo sempre o 3º imóvel à direita do início do quarteirão sorteado, intercalando 3 imóveis para coleta seguinte em caso de sorteio de mais de um cão por quarteirão. Caso não tivesse cão no domicílio sorteado ou por outro motivo não fosse possível à coleta, seguia-se para o domicílio seguinte. Nestes domicílios, com uso de questionário (Anexo 03) foi feita entrevista ao responsável pelo cão, que atendeu aos seguintes critérios: a) possuir cão com mais de 4 meses de idade b) ter idade igual ou superior a 18 anos c) ter lido e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 08), autorizando sua participação na pesquisa.

#### **3.3.2.3 Critério de seleção em domicílios com mais de um cão**

Em cada residência sorteada houve a coleta sanguínea de apenas um cão. Nos domicílios com mais de um animal procedeu-se um sorteio sistemático dos cães, após registro dos nomes de cada cão do imóvel em ordem alfabética e escolha daquele que apresentasse o nome na sequência ordenada como 3º lugar. Exemplificando, em uma residência com dois cães nomeados de Bob e Snoop, de acordo com a sequência alfabética a letra B é nº 1, a letra S nº 2 e a terceira posição reinicia na letra B, logo o Bob participaria do estudo.

### **3.3.3 Instrumento de avaliação: questionário**

Para se conhecer os fatores epidemiológicos envolvidos no risco de aquisição da infecção pelos cães em Juatuba, foi realizada uma entrevista, na primeira coleta, por meio de um questionário semiestruturado (Adaptado de Borges, 2006) - Anexo 03, com perguntas destinadas ao responsável pelo cão a ser examinado pelos pesquisadores, que estavam identificados por meio de um crachá (Anexo 05). Para cada imóvel visitado o responsável assinou um termo de consentimento livre esclarecido (Anexo 08), no qual estavam descritos os objetivos da pesquisa, a liberdade para realização de perguntas durante a visita e o compromisso dos pesquisadores para com o anonimato dos entrevistados autorizando as coletas de sangue do cão (máximo três). Ele respondeu as perguntas

referentes ao estudo, as quais abrangeram informações sobre variáveis demográficas, socioeconômicas e comportamentais, além do conhecimento sobre a doença, incluindo transmissão, vetor, reservatório e medidas de prevenção e controle. Os questionários subsequentes, ou seja, correspondentes às outras duas coletas se limitaram ao registro de mudanças ocorridas no período em relação ao cão e ao ambiente (Anexo 04). O entrevistado assinava o termo de consentimento livre e esclarecido para a segunda e se, necessária, a terceira coleta (Anexo 09), autorizando a continuidade de participação do cão na pesquisa. As entrevistas foram feitas pela mesma equipe responsável pela coleta de sangue do cão após o devido treinamento.

Cada domicílio recebeu um número de identificação e a sigla da região a que pertencia. Para identificação do cão e das amostras de sangue canino foram utilizados a data da visita, o nome do animal e o código dado ao domicílio.

Em um estudo piloto, os questionários foram usados em entrevistas a 30 proprietários de cães de Belo Horizonte, com intervalos de 15 dias.

### **3.3.4 Exame clínico do cão**

O médico veterinário responsável pela pesquisa fez avaliação clínica do animal para constatar a presença ou não de sinais clínicos sugestivos da LV. As observações foram devidamente registradas no questionário (Anexo 03, pergunta nº 24). O mesmo procedimento foi feito no momento da eutanásia do animal soropositivo.

Os animais foram classificados em assintomáticos (ausência de sinal clínico) ou sintomáticos quando se observou um ou mais sinais clínicos, à exemplo: linfadenopatia, apatia, emagrecimento, onicogribose, paresia dos membros posteriores, coriza, edema de patas, pelo opaco, ceratoconjuntivite, alterações cutâneas (alopecia, lesão de pele, hiperqueratose no focinho, dermatites e dermatoses). Outros sinais gerais também foram observados: vômito, tosse, diarreia, ascite e mioclonia. Optou-se por não usar a classificação de animal oligossintomático (Manual..., 2006).

Os sinais clínicos sugestivos de LV, observados nos animais durante exame clínico realizado nas

três etapas de coleta de sangue, foram analisados por meio da regressão logística, modelo final  $p < 0,05$ , com utilização do programa STATA (versão 12.0), que identificou aqueles que aumentam a chance de o animal estar infectado para a LV.

A avaliação clínica do animal foi feita da mesma forma nos cães sorologicamente positivos momentos antes da necropsia. Durante o procedimento as alterações viscerais eram registradas, especialmente do baço e linfonodo. Fazia-se, também, a classificação do estado corporal do animal em magro, bom e sobrepeso; e da utilidade do mesmo em cão de companhia ou trabalho.

### **3.3.5 Coleta de sangue**

Foram coletados de 3 a 5mL de sangue de cada cão, por meio de venopunção das veias cefálica ou jugular, utilizando-se seringa descartável ou sistema à vácuo e tubo sem anticoagulante para armazenar a amostra. Os tubos de sangue dos cães foram acondicionados em bolsas próprias disponibilizadas pelo SCZ do município, com o cuidado de evitar movimentos brutos internamente, e mantidos à temperatura ambiente, para posterior centrifugação, no mesmo dia, a 3.000 rpm por 5 minutos. A centrifugação era feita no final da manhã (coletas realizadas pela manhã) e no final da tarde (coletas realizadas à tarde). Os frascos contendo soro foram identificados e congelados a  $-20^{\circ}$  C até o momento da análise.

A identificação das amostras foi feita com código único para cada uma e continha até 3 letras maiúsculas referentes ao bairro e a sequência numérica iniciando do nº 1. Exemplo: CAR-01 significou que a amostra se refere ao bairro Carioca e foi a 1ª coletada. O nome do cão foi registrado juntamente em cada amostra.

### **3.3.6 Testes sorológicos**

Os exames sorológicos de LV foram realizados no Laboratório de Leishmanioses da Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sendo este um laboratório credenciado pelo MS. Para o diagnóstico sorológico em cães foram utilizados dois testes preconizados pelo MS: o ensaio imunoenzimático (ELISA), executado por meio



do kit comercial ELISA/S7® da Biogene Indústria e Comércio Ltda ME e a Imunofluorescência Indireta (IFI) executada por meio de kit produzido por Bio-Manguinhos®/FIOCRUZ e repassado pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED), sendo este considerado conclusivo na época (Manual..., 2006). Os procedimentos técnicos dos testes de ELISA e IFI foram realizados em paralelo seguindo a bula de cada fabricante.

Os resultados negativo, positivo ou indeterminado foram definidos pela IFI, independentemente do resultado obtido no ELISA feito em paralelo, e não como teste de triagem, nesta pesquisa. Os cães foram considerados positivos para LV quando apresentaram diluições  $\geq 1:40$  reagentes na IFI. As amostras foram analisadas pela IFI nas diluições de 1:40 e 1:80. A leitura das lâminas de IFI em microscópio de fluorescência foi padronizada, conforme o MS (Manual..., 2006) tendo sido realizada por dois técnicos capacitados e quando havia divergência na leitura era acionado um terceiro técnico. Os soros considerados reativo ou positivo apresentaram fluorescência intensa na membrana do parasita com uma sutil fluorescência de citoplasma; não reativo ou negativo os soros que não apresentaram fluorescência; e indeterminado a ocorrência apenas de fluorescência de citoplasma ou fraca fluorescência apenas de membrana.

A leitura espectrofotométrica do ELISA foi realizada com filtro 450 nm. O *cut-off* foi determinado segundo especificação contida no kit e o valor encontrado na zona cinza caracterizava o resultado indeterminado.

Antes da eutanásia dos animais soropositivos foi coletada nova amostra de sangue, conforme já descrito. A IFI nestas amostras foi feita com titulação completa, ou seja, em diluições sequenciais até onde a leitura foi positiva (1:40, 1:80, 1:160...).

Da primeira coleta foram identificados os cães com resultados negativo e indeterminado que foram monitorados por novas coletas e análise sorológica para avaliação da soroconversão. Foram realizadas mais duas coletas em intervalos de seis meses, aproximadamente. Os resultados dos testes foram encaminhados à SMS de Juatuba que foi a responsável pela comunicação

e entrega destes ao responsável pelo animal e, também, pelo recolhimento dos cães soropositivos. Quando da entrega do animal positivo, o proprietário assinava um termo de consentimento autorizando o recolhimento e o destino do mesmo, sob a responsabilidade do SCZ do município.

O acompanhamento dos cães com resultado indeterminado na última etapa deste estudo, com nova coleta de sangue e análise sorológica, ficou sob a responsabilidade do município.

### **3.3.7 Controle de qualidade sorológica pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED)**

Foi acordado com a FUNED, laboratório de referência nacional para o diagnóstico laboratorial da leishmaniose, o fluxo para controle de qualidade dos resultados, tendo como prioridade o envio de amostras com: resultado IFI reagente e ELISA não reagente, IFI indeterminada; além das amostras de cães considerados sintomáticos com IFI não reagente.

A IFI foi feita na FUNED com o mesmo kit (Bio-Manguinhos) procedente do MS, apesar de lotes diferentes. Para conclusão do diagnóstico laboratorial, a IFI positiva era suficiente para o recolhimento do cão para eutanásia, conforme recomendação do MS (Manual..., 2006).

### **3.3.8 Coleta de amostras na necropsia**

Em reunião conjunta com a Gerência do SCZ de Juatuba e Gerência do CCZ-Betim, este último responsável pelo recebimento dos cães de Juatuba e de municípios próximos para a eutanásia animal, foi definido o protocolo de necropsia dos animais sorologicamente positivos procedentes de Juatuba, das três coletas de sangue. Foi feito cronograma para utilização da sala de necropsia do CCZ-Betim em um dia da semana, com definição de horário e limpeza do ambiente. A logística das carcaças dos animais, devidamente ensacadas, ao aterro sanitário do município ficou sob a responsabilidade do SCZ de Juatuba.

Uma equipe formada de pesquisadores do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e do CPqRR treinou dois alunos graduandos do curso de Medicina Veterinária da UFMG e uma aluna da pós-graduação em Ciência

animal/Epidemiologia (formação: farmacêutica-bioquímica) para as atividades realizadas na necropsia. Todo o trabalho contou com a participação desta equipe qualificada.

Os cães foram devidamente alojados em canis separados para a pesquisa. A parte inicial do protocolo de eutanásia e necropsia incluía conferência da identificação animal, fotografia e exame clínico para classificação em assintomáticos e sintomáticos.

Na sequência foi coletada amostra de 5 mL de sangue periférico, por punção das veias cefálica ou jugular, em tubo sem anticoagulante para obtenção do soro após processo de centrifugação. Os animais foram tranquilizados com solução de cloridrato de xilazina (Dopaser® - Lab. Hertape Calier), na dose de 1,1 – 2,2 mg/Kg PV, por via intramuscular, músculo semitendinoso, utilizando-se seringa de 1, 3 ou 5 mL e agulha 25x8. Após apresentarem estado de relaxamento muscular os animais foram anestesiados com solução de thionembutal (Thiopentax® - Lab. Cristália), sendo 1 grama ressuscitado em 40 mL de soro fisiológico, dose de 5-15 mg/Kg PV, por via endovenosa, veia cefálica, usando scalp nº 21, 23 ou 25G, de acordo com o tamanho do animal e seringa de 3, 5 ou 10 mL, de acordo com o volume a ser administrado; foram aguardados cerca de 2-5 minutos até que o animal apresentasse plano anestésico profundo, evidenciado pela rotação de globo ocular, ausência de reflexos interdigitais profundos, superficiais e corneal e respiração abdominal. Em plano anestésico, o animal foi submetido à punção de medula óssea, na região da crista tibial, com agulha estéril de metal e seringa estéril de 20 mL; o material aspirado foi imediatamente inoculado em meio de cultura NNN contendo LIT (Liver Infusion Tryptose), dois tubos para cada cão, em microambiente estéril (bico de bunsen). A eutanásia foi realizada logo após a punção de medula óssea, utilizando-se para isso uma dose extra de thionembutal, via endovenosa e, logo após, injeção de 20 mL de solução de cloreto de potássio saturada (20% de cloreto de potássio em água bidestilada), via endovenosa. Uma vez atestado o óbito do animal foi realizada incisão no flanco esquerdo para exposição dos intestinos, para coleta de dois fragmentos de linfonodo mesentérico, e dois de borda do baço, sendo uma amostra para impressão em lâmina e outra para PCR. Da borda

distal da orelha foram retirados dois fragmentos para as mesmas técnicas. Foram preparadas oito lâminas para cada animal, sendo duas lâminas de cada amostra, para o parasitológico.

### 3.3.9 Exames parasitológicos

#### 3.3.9.1 Impressão e esfregaço em lâminas

Os fragmentos de ponta de pele de orelha, baço e linfonodo foram secados em papel toalha para retirada do excesso de sangue e logo após submetidos a impressão em lâminas de vidro. Foi feito esfregaço em lâmina, também, de amostras de medula óssea destes animais. As lâminas foram coradas pelo método Panótico e Giemsa, e visualizadas em microscópio ótico, objetiva de imersão (100X), à procura de formas amastigotas. A leitura microscópica foi realizada no CPqRR e EV-UFMG (parcial).

#### 3.3.9.2 Mielocultura

Os meios de cultura utilizados foram os de NNN e LIT. Ambos foram associados para preparação do meio difásico NNN/LIT. A atividade foi desenvolvida no Laboratório de Leishmanioses do ICB-UFMG.

As amostras de medula óssea dos animais amostrados, inoculadas em meio de cultura imediatamente após a coleta, foram armazenadas em caixa de isopor, à temperatura ambiente por dois dias e posteriormente em estufa tipo B.O.D., à temperatura de 25°C ± 1°C. Após 3 ou 4 dias as amostras foram submetidas à limpeza para retirada de coágulo, em ambiente estéril (capela de fluxo laminar). O exame foi realizado em intervalo de quatro a sete dias, em microscópio ótico, objetiva de 10x ou 40x, colocando-se uma gota sobre a lâmina. A cultura foi considerada positiva quando foi observada a presença de pelo menos uma forma promastigota de *Leishmania*. As amostras isoladas foram expandidas em meio NNN/LIT passando de tubos de ensaio para erlenmeyers de 50 a 150 mL até atingir o volume final de 100.000.000 células, em aproximadamente 40 mL de meio de cultura, para realização da PCR. A contagem dos parasitos foi realizada em câmara de Neubauer. Quando a amostra atingiu o volume de células desejado o meio líquido foi centrifugado a 3000 rpm, 4°C, por 15 minutos, para sedimentação das células, lavado e ressuscitado em PBS por 2 ou

3 vezes, posteriormente congelado a -20°C. Amostras negativas foram acompanhadas pelo menos por quatro semanas e descartadas quando não positivavam.

### 3.3.10 Testes moleculares

#### 3.3.10.1 Extração de DNA para PCR

A extração de DNA foi realizada pelo Laboratório de Leishmanioses do CPqRR. Para extração de DNA das amostras de tecido foi utilizada a técnica pelo método do fenol-clorofórmio, conforme Silva (2009). Uma pequena amostra (2 mm) do tecido (pele, baço) foi macerada em tubos tipo eppendorf de 1,5 mL, com auxílio de pistilo. A extração de DNA do linfonodo só seria feita se houvesse necessidade. Após formação de uma massa homogênea foi adicionada solução de lise (100mM de Tris-HCl, 100mM de NaCl, 25mM de EDTA, 0,5% de SDS, pH 8,0) seguida de agitação suave. Foram acrescentados 10µL de solução de proteinase K (10mg/mL) ao conteúdo, posteriormente incubado a 37°C, por 24 horas. Após a incubação, foram adicionados aos tubos 500 a 700µL de solução de fenol ultrapuro (USB®). Os tubos foram agitados manualmente até formar uma emulsão, por 10 minutos e, posteriormente, centrifugados a 14.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo, onde foi acrescentada solução de fenol-clorofórmioálcool isoamílico (25:24:1) (USB®), numa proporção de 1:1. O conteúdo foi novamente homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente retirado e transferido para novo tubo, adicionado de solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) (USB®), repetida a centrifugação e nova retirada do sobrenadante nas mesmas condições. O DNA foi precipitado utilizando-se 1/10 de volume de solução de acetato de sódio 3M, pH 5.2 e um volume de 1/50 de etanol absoluto gelado, armazenado a -20°C, por 24 horas, ou a -70°C, por uma hora. Posteriormente a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm, por 30 minutos, a 4°C, para sedimentação do DNA e descarte do sobrenadante. A amostra foi lavada com 500 µL de álcool 70% gelado e centrifugada a 14.000 rpm, por 15 minutos, por duas vezes, e o sobrenadante descartado. O DNA foi mantido à temperatura ambiente, por 24h, resuspendido em TE 1X ou água Milli Q e submetido a leitura em

espectrofotômetro (Nanodrop - Thermo Fisher Scientific Inc.), na faixa de 260 a 280nm, para avaliar grau de pureza da amostra e quantidade de DNA extraído; o DNA foi posteriormente armazenado a -20 °C.

#### 3.3.10.2 Reação em cadeia da polimerase – PCR

Todas as amostras de DNAs extraídos dos tecidos (pele de orelha e baço) e medula óssea foram utilizadas primeiramente, em reações de PCRs para identificação do gene constitutivo da β globina do cão (PCR da β globina), para confirmar o sucesso da extração e, uma vez positivas, para detecção de DNA de *Leishmania* spp. (PCR para kDNA). As análises de PCR foram realizadas no Laboratório de Leishmanioses do CPqRR e do ICB-UFMG.

#### 3.3.10.3 PCR kDNA para o gênero *Leishmania*

O par de iniciadores utilizado foi previamente desenhado para amplificar a região conservada do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) de parasitos do gênero *Leishmania*. O par de iniciadores utilizados foram o 13A: 5' GGG(G/T)AGGGGCGTTCTCT(C/G)CGAA 3' e 13B: 5' (C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT (A/T)TTACACCAACCCC 3' (Passos *et al.*, 1996) que amplificaram um fragmento de 120 pb. As reações foram preparadas para um volume final de 25µL contendo 1,0µL de DNA, sendo de 10 a 20 ng/µL para amostras de DNA da cultura de *Leishmania* isolada e de 30 a 300ng/µL para as amostras de DNA dos tecidos (pele da ponta da orelha, linfonodo mesentérico) e medula óssea, 2,5µL (5 pmol) de cada iniciador (IDT®), 10,3µL de água ultra-pura (Gibco™), 2,5 µL de 10xPCR buffer, 5µL de dNTP (1mM), 1 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM) e 0,2 µL de Taq polimerase (5U/µL). Foram usados controles positivos com DNA de *Leishmania* de cultura e controle negativo sem DNA.

A amplificação foi realizada em equipamento termociclador automático (PTC-100 MJ Research) utilizando-se o programa LEISH120 com desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; seguidos de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 65°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 30 segundos para extensão; extensão final a 72°C

por 5 minutos e 18 horas a 8°C encerrando os ciclos.

### Visualização dos resultados

Os produtos amplificados resultantes da PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 2% (cuba Bio-Rad) preparado com 2,4g de agarose, 120 mL de tampão TBE 1x e 5 mL de brometo de etídio. Foram aplicados no gel 5 µL dos produtos amplificados misturados a 2 µL de tampão de corrida 6X (BioLabs). Foram utilizados 5 µL do marcador de peso molecular (BioLabs) de 50pb. O gel foi submetido a corrente de 70V imerso em tampão TBE 1x.

Após a corrida do gel o resultado foi visualizado no transluminador para observação da banda de 120pb nas amostras positivas para *Leishmania*.

#### 3.3.10.4 PCR RFLP kDNA

A técnica de RFLP utilizou enzimas que cortaram a dupla fita de DNA pelo reconhecimento de uma pequena sequência de nucleotídeos, usualmente de quatro a seis pares de bases de tamanho. O kDNA das espécies *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* apresenta sequências suficientemente distintas para serem usadas na diferenciação destas espécies.

Para a identificação das espécies de *Leishmania* das amostras de cães “PCRs positivos” para o gênero *Leishmania* foi utilizada primeiramente a enzima Hae III, que além de apresentar a banda de 120pb para as espécies utilizadas, não digere *Leishmania (L.) amazonensis*; digere *Leishmania (V.) braziliensis* em dois fragmentos, de 80 e 40 pb; e *Leishmania (L.) infantum* em fragmentos de 80, 60 e 40 pb.

Esta técnica foi realizada usando uma mistura prévia contendo 0,2µL (10U/µL) da enzima de restrição Hae III (Promega), 2,0µL do tampão 10x (Promega), 0,2µL (10µg/µL) de BSA e 7,6µL de água ultra-pura (Gibco™). Foi posteriormente adicionado 5µL do produto amplificado pela PCR, homogeneizado e incubado a 37°C, por 3 horas, em banho-maria.

Para confirmar o resultado obtido pela enzima Hae III foi utilizada a enzima Ava I seguindo o mesmo protocolo da enzima anterior

(concentrações, digestão, preparação do gel, coloração e visualização dos resultados).

### Visualização dos resultados

A visualização das bandas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (2 mL de solução de bis-acrilamida 30%, 1,2 mL de TBE 5x, 3 mL de água q.s.p., 60µL de APS 10%, 6µL de TEMED). Foram aplicados no gel 5µL do produto amplificado digerido pela enzima, misturados a 2 µL de tampão de corrida 6X (BioLabs). O marcador de peso molecular utilizado foi o 50 pb (BioLabs). O gel foi submetido a corrente de 60V dentro da cuba de eletroforese (Bio-Rad) imerso em tampão TBE 1x.

Após a corrida, a coloração do gel pelo nitrato de prata foi feita seguindo o protocolo, sempre em agitação, iniciando com incubação em solução fixadora (10% de álcool p.a., 0,5% de ácido acético) por 20 minutos; solução de nitrato de prata 0,2% por 10 minutos; lavagem com água destilada por 2 minutos; solução reveladora (NaOH a 3%) com formol adicionado no momento do uso, até a visualização das bandas. Todas as soluções foram preparadas com água destilada.

#### 3.3.10.5 PCR SSUrRNA (Nested) para o gênero *Leishmania*

Esta análise foi realizada no Laboratório de Leishmanioses do CPqRR nas amostras positivas da mielocultura. A PCR SSUrRNA amplifica um fragmento do gene SSUrRNA sendo uma região conservada entre todas as espécies de *Leishmania* (Cruz *et al.*, 2002). A metodologia permite a amplificação inicial de um fragmento de aproximadamente 603 pb, pela utilização dos iniciadores R1: 5' GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG 3' e R2: 5' GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG 3', seguida da amplificação de um fragmento de aproximadamente 353 pb, a partir do produto amplificado da primeira reação, pela utilização dos iniciadores R3: 5' TCC CAT CGC AACCTC GGT T 3' e R4: 5' AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3'.

A primeira reação foi preparada para um volume final de 50µL contendo 10µL de DNA da amostra a ser testada, 5µL da solução tampão 10x - 15mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de dNTPs a 10mM, 1µL do

iniciador R1 a 15µM, 1µL do iniciador R2 a 15µM, 1,4 µL de Tth DNA polimerase a 1U/ µL (Biotools) e 30,6 µL de H2O destilada estéril. Em tubos contendo 1 mL de H2O foram diluídos 25 µL do produto da primeira reação, para serem utilizados como ‘template’ da segunda PCR. Esta foi preparada para um volume final de 25 µL contendo 10µL do produto amplificado da primeira reação diluído, 2,5 µL da solução tampão 10x - 15mM MgCl2, 0,5 µL de dNTPs a 10mM, 0,5µL do iniciador R3 a 15µM, 0,25 µL do iniciador R4 a 15µM, 0,7 µL de Tth DNA polimerase a 1U/ µL (Biotools) e 10,55 µL de H2O destilada estéril.

A amplificação foi processada em aparelho termociclador automático (Eppendorf® Mastercycler gradient) utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguido de 30 repetições de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, para a primeira reação e desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguido de 30 repetições de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, para a segunda reação. A extensão final foi a 72°C por cinco minutos para ambas as reações. Em todas as reações foi utilizado controle positivo com 20 ng de DNA extraído de cultura de *L. infantum*; como controle negativo foi utilizada água destilada estéril como “template”.

Os resultados foram visualizados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e examinado em exposição à luz ultravioleta (ImageQuantLAS4000 – GE Healthcare), utilizando-se os marcadores de peso molecular (PM) de 100 pb ou o Φx 174, sendo considerados positivos aqueles que apresentassem bandas de peso molecular correspondente a 353pb, na segunda reação.

### 3.3.10.6 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento foi realizado pela equipe do Laboratório de Genética da EV-UFMG em conjunto com a equipe da Valid Biotecnologia. O objetivo foi identificar espécies do gênero *Leishmania* por meio de sequenciamento de fragmento (região de aproximadamente 353 pb) do gene SSUrRNA. As amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em

aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1 (Life Technologies). Cada amostra teve seu DNA sequenciado nas duas direções.

### Análise das sequências:

As sequências obtidas foram analisadas utilizando o software SeqScape v2.7 (Life Technologies). Os eletroferogramas foram inspecionados e o valor de qualidade (Quality Value, QV) checado. Bases com QV < 15 foram manualmente avaliadas e sempre que possível descartadas. Posições mostrando mais de uma base no eletroferograma foram consideradas heterozigotas e o código de ambiguidade da IUPAC foi utilizado para denotar as possíveis bases. As fitas senso e anti-senso tiveram suas sequências confrontadas e uma sequência consenso foi gerada para cada uma das amostras.

### Análises filogenéticas:

Com auxílio do programa Mega V5.1 (Tamura *et al.*, 2011), as sequências consenso das diferentes amostras foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW. As sequências das diferentes amostras foram editadas de forma a possuírem o mesmo tamanho. Como referência, foram utilizadas sequências do gene SSUrRNA de diferentes espécies de *Leishmania* sugeridas por Marcelino (2011). A sequência do mesmo gene de *Trypanosoma cruzi* foi utilizada como grupo externo para as análises filogenéticas. Essas sequências foram verificadas a partir do banco de dados público GenBank (Benson *et al.*, 2010). As análises filogenéticas e as distâncias par a par foram computadas no programa Mega v5.1 utilizando o modelo de substituição Kimura 2 parâmetros (Kimura, 1980). As análises filogenéticas utilizaram o método neighbor-joining (Saitou e Nei, 1987). O método estatístico bootstrap (Felsenstein, 1985) foi utilizado para testar as análises geradas.

### 3.4 Análises estatísticas

#### 3.4.1 Medidas de morbidade da leishmaniose visceral canina

Para a medida da frequência da LVC no município de Juatuba foram calculados os coeficientes de prevalência e de incidência (Pereira, 2002).

$$\text{Prevalência} = \frac{\text{número de cães sororreagentes no período da 1ª coleta} \times 100}{\text{número de cães amostrados na coorte}}$$

Para o cálculo da incidência anual, os casos novos foram definidos pelos animais com sorologia negativa e indeterminada que se converteram a soropositivo durante o período estudado, após a coleta inicial. Sendo este um estudo observacional de coorte prospectivo de um grupo fechado de cães, só após as análises laboratoriais da primeira coleta e determinação

da prevalência é que foi possível quantificar a amostra para a segunda coleta, pelos resultados negativos e indeterminados pela IFI. Desta mesma maneira foi estabelecida a amostra para a terceira coleta, ambas com intervalos semestrais e com a participação exclusiva dos cães da coorte.

$$\text{Incidência} = \frac{\text{número de casos novos da 2ª e 3ª coletas} \times 100}{(0,5 \text{ ano} \times \text{nº amostras na 2ª coleta}) + (1 \text{ ano} \times \text{nº amostras na 3ª coleta})}$$

### 3.4.2 Associação entre fatores de risco e proteção com a sorologia para leishmaniose visceral em cães

As planilhas foram feitas no Excel 2007 e as análises estatísticas utilizaram o programa STATA, versão 12.0.

Foi analisada a associação dos cães positivos e negativos na IFI com as variáveis presentes nos questionários (Anexos 3 e 4): demográficas, socioeconômicas e comportamentais, além do conhecimento sobre a doença, incluindo transmissão, vetor, reservatório e medidas de prevenção e controle, para identificação dos fatores de risco ou proteção envolvidos. Foi utilizada a regressão logística (Rothman *et al.*, 2011) na comparação dos grupos de soronegativos e soropositivos com a variável tempo caracterizando as três coletas no período de estudo. As variáveis que apresentaram na análise univariada nível de significância  $p < 0,20$  prosseguiram para a análise multivariada. Diversas interações foram testadas resultando no modelo final de regressão no nível de significância de 0,05 (Medronho *et al.*, 2004). A modelagem foi testada pelo teste de Hosmer-Lemeshow com valor da probabilidade  $>0,05$ .

### 3.4.3 Concordância entre testes de diagnóstico

O teste de *Kappa* ( $k$ ) foi utilizado para comparar os resultados obtidos utilizando-se diferentes testes de diagnóstico e avaliar a concordância entre eles com nível de significância de  $p < 0,05$ . Baseado em Fleiss (1981), considerou-se concordância fraca valor de *Kappa*  $<0,4$ ,

concordância boa valor de *Kappa* entre 0,4 e 0,75 e concordância ótima acima deste último valor. A IFI foi adotada como referência para a comparação dos demais testes: ELISA, parasitológico direto e por isolamento em cultura, e PCR.

Os cálculos de sensibilidade e especificidade com intervalos de confiança de 95%, valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN), razão de verossimilhança positiva (RVP) e negativa (RVN), e acurácia foram feitos conforme Sergeant (2013).

### 3.4.4 Geoprocessamento

Com o auxílio do Sistema de Posicionamento Global (GPS), foi marcada a localização de cada residência visitada, de forma pontual, para permitir uma visualização espacial dos casos caninos de LV do município e assim verificar se existiam áreas com uma maior concentração dos mesmos. Os casos humanos foram georreferenciados, também, para avaliação da distribuição espacial em relação aos casos caninos. A análise espaço-temporal foi feita com modelo probabilístico de Poisson, mapas de densidade de *Kernel* e aplicou-se autocorrelação espacial (Índice Moran I) e análises de *clusters* e valores atípicos (Índice Moran Local), conforme Pfeiffer *et al.* (2009) e Anselin (2013). As bases de dados do IBGE e do Google Earth Pro foram utilizadas para interpretar as áreas identificadas com o maior risco. A confecção dos mapas foi feita utilizando-se os recursos do aplicativo de mapeamento ArcGis versão 9.3.

### 3.5 Aspectos éticos

O estudo foi submetido e aprovado pelos Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) e Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, inicialmente para a primeira etapa e posteriormente para as duas etapas finais.

Primeira etapa:

- COEP (Anexo 10): ETIC nº 0044.0.203.000-10 (31/03/2010)

- CETEA (Anexo 11): protocolo nº 018/10 (28/04/2010)

Segunda e terceira etapas:

- COEP (Anexo 12): ETIC nº 0325.0.203.000-10 (09/09/2010)

- CETEA (Anexo 13): nº 170/2010 (25/08/2010)

O estudo contou, também, com o apoio da SES-MG, representada pela Referência Técnica das Leishmanioses: Patrícia de Almeida Soares; e com a autorização da Secretaria Municipal de Saúde dos municípios de Juatuba e Betim, representadas em 2010, respectivamente, pelas Gestoras do SUS: Maria Cristina Alves Pereira e Conceição Aparecida Pereira Rezende.

Todas estas parcerias contam com a formalização documental disponível com o pesquisador.

### 3.6 Apoio financeiro

Esta pesquisa foi aprovada pela FAPEMIG na modalidade de Programa Pesquisa para o SUS-PPSUS, edital 24/2009, processo nº: CVZ-APQ-0345-10. Foi repassada a quantia de R\$83.720,28 para gastos com despesas de capital e custeio. Durante o desenvolvimento da pesquisa foram solicitadas e autorizadas mudanças de rubrica para adequação da metodologia com o acréscimo do sequenciamento de DNA e PCR-RFLP.

## 4. RESULTADOS

Os resultados registrados nesse estudo prospectivo são referentes a uma série histórica de 17 meses (abril de 2010 a agosto de 2011) de análises laboratoriais e epidemiológicas da LV no município de Juatuba.

Os resultados a seguir estão apresentados em três blocos. O primeiro refere-se ao diagnóstico laboratorial (sorológico, parasitológico e molecular) e clínico dos cães, o segundo apresenta a análise descritiva feita a partir das entrevistas com os responsáveis pelos cães e avaliação analítica dos fatores de risco e proteção para infecção por LV em ambas as fases do estudo (transversal e coorte), e o terceiro os resultados da análise espacial da distribuição da doença no município.

## BLOCO I DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E CLÍNICO

### 4.1 Distribuição dos animais amostrados por bairro

Foram entrevistados 957 responsáveis pelos cães (n=957) amostrados na pesquisa, representados pelos bairros de Juatuba (Tabela 1), com início em 19/04/2010 e término em 03/08/2011, quando foi finalizada a coleta de sangue animal.

O quantitativo de coletas por bairro variou de 2 a 81 amostras de acordo com a proporcionalidade da população canina do respectivo bairro. Os bairros Boa Vista, Santo Antônio e Satélite 2, principalmente, contaram com uma diferença no número de coletas previstas por erros aleatórios no mapeamento repassado pelo SCZ de Juatuba. Alguns quarteirões estavam com número superestimado de cães e apresentavam praças e áreas de matas.

Os bairros com maior porcentagem de amostras coletadas na 2ª etapa foram Coqueiro Verde (91,3%), Ilhéus (90,0%) e Dona Francisca (84,2%); e na 3ª etapa os bairros Castelo Branco (80,0%), Jardim Boa Vista (75,0%) e Cidade Nova 1 (63,5%). Esta redução no quantitativo se deu, principalmente, pela perda de animais ocorrida entre as coletas.

Os bairros Bela Vista, Castelo Branco e Diamantina apresentaram maior número de amostras coletadas na 3ª etapa quando comparado à 2ª etapa (Tabela 1). Este fato foi devido à intercorrências que impossibilitaram a coleta em um momento e não em outro.

Tabela 1: Distribuição dos cães amostrados por bairro de Juatuba, 2010 a 2011.

Bairro	1ª coleta		2ª coleta		3ª coleta	
	n		n	%	n	%
Bela Vista	34		15	44,1	16	47,1
Boa Vista	56		43	76,8	29	51,8
Canaã	81		59	72,8	42	51,9
Carioca	6		4	66,7	1	16,7
Castelo Branco	10		7	70,0	8	80,0
Centro	60		33	55,0	24	40,0
Cidade Nova 1	74		56	75,7	47	63,5
Cidade Nova 2	58		43	74,1	32	55,2
Cidade Nova 3	36		21	58,3	17	47,2
Cidade Nova 4	2		0	0,0	0	0,0
Coqueiro Verde	23		21	91,3	13	56,5
Diamantina	11		5	45,5	6	54,5
Distrito Industrial	2		1	50,0	1	50,0
Dona Francisca	19		16	84,2	10	52,6
Eldorado	24		10	41,7	8	33,3
Ilhéus	10		9	90,0	6	60,0
Jardim Baviera	45		21	46,7	12	26,7
Jardim Boa Vista	28		21	75,0	21	75,0
Maria Regina 1	42		27	64,3	19	45,2
Maria Regina 2	30		21	70,0	14	46,7
Parque Alvorada	17		9	52,9	8	47,1
Ponte Nova	16		10	62,5	2	12,5
Quintas da Boa Vista	10		5	50,0	4	40,0
Samambaia	33		18	54,5	13	39,4
Santo Antônio	45		35	77,8	19	42,2
São Gerônimo	15		7	46,7	4	26,7
Satélite 1	69		30	43,5	25	36,2
Satélite 2	42		19	45,2	17	40,5
Serra Azul	11		8	72,7	4	36,4
Sol Nascente	7		2	28,6	1	14,3
Veredas da Serra 1	8		5	62,5	2	25,0
Veredas da Serra 2	19		9	47,4	6	31,6
Vila Verne	11		3	27,3	1	9,1
Village	3		2	66,7	1	33,3
Total	957		595	62,2	433	45,2

O tempo médio de aplicação do questionário e coleta de sangue na 1ª etapa foi de 14 minutos e na 2ª e 3ª foi de 9 e 6 minutos, respectivamente. O 1º questionário continha maior número de questões que os demais e contou com a participação de um profissional médico veterinário para a coleta, com auxílio de um ACE para conter o animal; já nas etapas seguintes o trabalho foi feito por duplas de profissionais compostas por ACE do próprio município e alunos do curso de medicina veterinária da UFMG, devidamente treinados, todos sob supervisão do médico veterinário responsável. O intervalo entre as coletas foi aproximadamente semestral, com média de 185

(mediana 175) dias entre as duas primeiras e 134 (mediana 137) dias entre as duas últimas. O início da 2ª etapa começou com um mês de atraso decorrente da impossibilidade da coleta de sangue pelo médico veterinário, conforme planejado.

O quantitativo de amostras coletadas mensalmente variou em detrimento da capacidade operacional dos responsáveis pela coleta de sangue animal. A 1ª coleta foi realizada de 19/04/10 a 16/11/10 e contou praticamente com a participação do médico veterinário, também estudante do curso de pós-graduação responsável pelo trabalho de campo. Outros



alunos do curso de graduação em medicina veterinária participaram, mas com menor disponibilidade. De meados de abril a agosto/2010 foram coletadas 96% das amostras.

A 2ª coleta iniciou em 26/11/2010 e finalizou em 27/04/2011, contabilizando 99,3% das coletas até o mês de fevereiro/2011. Para resgatar cães pendentes foram visitados alguns domicílios em datas posteriores até que esta etapa foi finalizada em 03/05/2011, sem mais coletas (cão já havia morrido/desaparecido ou casa sempre fechada). Esta etapa do trabalho de campo contou com a participação de quatro ACE do SCZ de Juatuba, além da logística do município.

A 3ª coleta foi feita entre os dias 05/04 à 03/08/2011, sendo que a grande maioria (99,5%) realizada até julho/2011. Ocorreram visitas posteriores para resgate de cães pendentes, sendo a última datada de 18/08/11, porém não houve mais coleta de sangue. Os responsáveis pelas coletas foram três alunos da graduação do curso de medicina veterinária da UFMG e um ACE de Juatuba que já havia participado da etapa anterior. A média de coletas/dia foi de 15,4 na 1ª etapa, 10,8 na 2ª etapa e 8,0 na 3ª etapa. A tabela 2 mostra o quantitativo de coletas realizadas e o número de dias trabalhados no mês.

Tabela 2: Distribuição mensal do quantitativo de amostras coletadas de sangue de cão e dias trabalhados na coleta em Juatuba, 2010 a 2011.

Mês	Amostra coletada		Dia trabalhado	
	n	%	n	%
<b>1ª coleta</b>				
abr/10	135	14,1	7	11,3
mai/10	147	15,4	7	11,3
jun/10	196	20,5	13	21,0
jul/10	206	21,5	14	22,6
ago/10	231	24,1	16	25,8
set/10	11	1,1	1	1,6
out/10	14	1,5	2	3,2
nov/10	17	1,8	2	3,2
Total	957	100,0	62	100
<b>2ª coleta</b>				
nov/10	36	6,1	3	5,5
dez/10	281	47,2	16	29,1
jan/11	160	26,9	15	27,3
fev/11	114	19,2	19	34,5
mar/11	3	0,5	1	1,8
abr/11	1	0,2	1	1,8
Total	595	100,0	55	100,0
<b>3ª coleta</b>				
abr/11	98	22,6	11	20,4
mai/11	213	49,2	15	27,8
jun/11	69	15,9	17	31,5
jul/11	51	11,8	10	18,5
ago/11	2	0,5	1	1,9
Total	433	100,0	54	100

Os dias trabalhados com visitas de retorno aos domicílios que não tiveram coleta de sangue, por motivos adversos, não foram computados na tabela 2.

#### 4.2 Tamanho amostral na 2ª e na 3ª coletas – Dinâmica da população canina em Juatuba

A coorte se formou a partir de 957 cães na 1ª coleta de sangue, dos quais 595 participaram da 2ª coleta, o que representa redução de 37,8% da

amostra inicial; 433 cães na 3ª coleta com redução de 54,8% da amostra inicial e 27,2% em relação à 2ª coleta (Tabela 1).

As reduções se referem aos cães sororreagentes eutanasiados e outras causas (Gráfico 1). A morte dos animais por motivos diversos, além da eutanásia não computada no gráfico abaixo, obteve maior frequência, seguida da ausência do cão no domicílio; ambas com o triplo do valor por recusa.

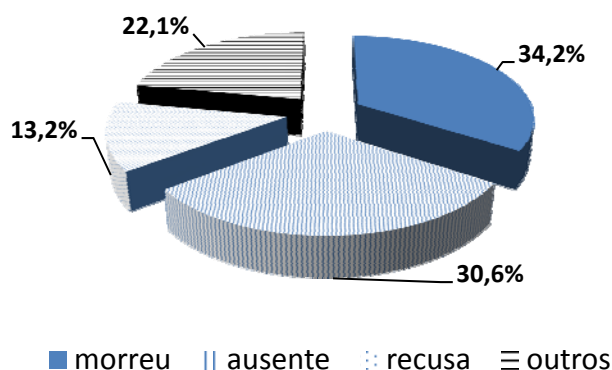


Gráfico 1: Causas da redução do número de coletas realizadas no período total de monitoramento da coorte canina, sem incluir morte dos cães soropositivos eutanasiados de Juatuba, de 2010 a 2011.

Do total de 170 óbitos caninos computados entre a 1ª e 2ª coletas, 32% (n=54) foram por eutanásia e 68% (n=116) por outras causas. Entre a 2ª e 3ª coletas as proporções foram inversas, 64% (n=79) por eutanásia e 36% (n=45) por outras causas, do total de 124 ocorrências neste período. Dentre as “outras causas” registrou-se um óbito de cão na 2ª e um óbito na 3ª coleta por LV, conforme relato dos entrevistados. Outros óbitos foram decorrentes de doenças infecciosas (leptospirose, cinomose, anemia e diarreia) e agravos como câncer, miíase e complicações do parto, e atos de violência (envenenamento, enforcamento, tiro, etc) contra a vida do animal; este último representado por 10,3% (n=12) e 31,1% (n=14) nas 2ª e 3ª coletas, respectivamente. Óbito por idade avançada ocorreu em 2 cães em ambas as coletas, o que proporcionalmente corresponde à 1,7% (2ª coleta) e 4,4% (3ª coleta).

A categoria cão “ausente” (Gráfico 2) se refere aos animais doados, vendidos, desaparecidos ou que mudaram. A recusa se caracterizou pela não autorização do proprietário para nova coleta de

sangue do cão. Em alguns casos a “recusa” aconteceu na 2ª coleta e não aconteceu na 3ª coleta. Dos 35 casos de recusa na 2ª coleta, posteriormente 5 (14,3%) proprietários permitiram nova coleta. A categoria “outros” está representada por casa fechada, endereço não localizado, presença de menor de idade ou pessoa não responsável pelo cão no momento da coleta inviabilizando a mesma, e amostra já coletada em papel filtro pelo SCZ de Juatuba. As cinco amostras coletadas em papel filtro apresentaram sorologia negativa pelo ELISA, teste este realizado pelo laboratório do CCZ-Betim por solicitação do município de Juatuba. Foram 81,1% (56) de domicílios fechados na 2ª coleta e 48,6% (17) na 3ª coleta, dentre a categoria “outros”.

Com exceção dos domicílios de recusa, os demais tiveram três visitas ou mais dos agentes na 2ª coleta. Antes de finalizar a 3ª coleta, os domicílios sempre fechados durante o dia ou sem a presença do responsável, foram visitados no sábado e mesmo à noite durante a semana para minimizar as perdas na pesquisa.

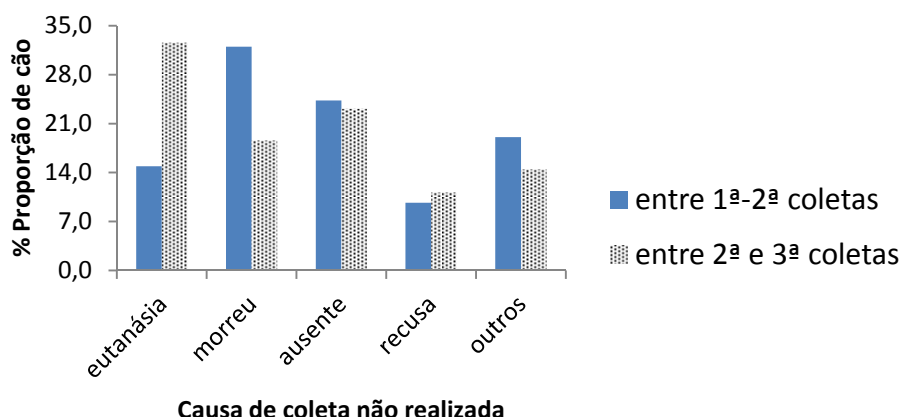


Gráfico 2: Causas da redução do número de coletas realizadas nas 2ª e 3ª visitas à coorte canina em Juatuba, em 2010 e 2011.

#### 4.3 Coeficientes de morbidade da leishmaniose visceral

##### Coeficientes de prevalência e incidência

Os testes sorológicos foram realizados em até um mês, aproximadamente, após a data da coleta de sangue. A proporção dos resultados positivo, indeterminado e negativo constam na tabela 3.

O coeficiente de prevalência obtido foi de 10,7% (IC: 8,8 – 12,8). Para o período total o coeficiente de incidência foi de

206/1000cães.ano (IC: 178 – 238). O cálculo da incidência por períodos menores foi de 207 (IC: 175 – 242) casos a cada 1.000 cães após seis meses da primeira coleta e de 65 (IC: 43 – 92) casos por 1.000 cães após seis meses da segunda coleta.

A IFI foi feita nas diluições de 1:40 e 1:80 nas análises das amostras de sangue dos cães coletadas nas três etapas. A tabela 4 mostra que dentre as 253 amostras sororreagentes 75,1% apresentaram título 40 e 24,9% título  $\geq 80$ .

Tabela 3: Distribuição da frequência dos resultados obtidos pela IFI nas amostras de sangue dos cães amostrados em Juatuba, 2010 a 2011.

Coleta	Total de amostra	Resultado					
		reagente	%	indeterminado	%	não reagente	%
1ª	957	102	10,7	50	5,2	805	84,1
2ª	595	123	20,7	57	9,6	415	69,7
3ª	433	28	6,5	41	9,5	364	84,0

Tabela 4: Soropositividade nas diluições de 1:40 e 1:80 na IFI, dos cães amostrados nas três etapas de coleta de sangue em Juatuba, de 2010 a 2011.

Coleta	DILUIÇÃO NA IFI					
	1:40		$\geq 1:80$		Total	
	N	%	N	%	N	%
1ª	67	65,7	35	34,3	102	40,3
2ª	103	83,7	20	16,3	123	48,6
3ª	20	71,4	8	28,6	28	11,1
Total	190	75,1	63	24,9	253	100,0

Na 1ª coleta em 70,6% (24/34) dos bairros foram identificados cães com sorologia positiva, na 2ª coleta em 88,2% (30/34) sendo que o Cidade Nova 4 não teve amostra coletada, e na 3ª coleta

em 44,1% (15/34) dos bairros e novamente o Cidade Nova 4 não teve coleta. Este bairro foi representado na amostragem por apenas dois cães (Tabela 5).

Tabela 5: Distribuição dos coeficientes de prevalência e incidência da leishmaniose visceral em cães por bairro de Juatuba, de 2010 a 2011.

Bairro	1ª coleta			2ª coleta			3ª coleta		
	Coeficiente Prevalência			Coeficiente Incidência/semestre			Coeficiente Incidência/semestre		
	total	n	%	total	n	1000	total	n	1000
Bela Vista	34	6	17,6	15	0	0	16	0	0
Boa Vista	56	0	0,0	43	11	256	29	1	34
Canaã	81	4	4,9	59	11	186	42	3	71
Carioca	6	0	0,0	4	3	750	1	0	0
Castelo Branco	10	0	0,0	7	1	143	8	1	125
Centro	60	9	15,0	33	2	61	24	1	42
Cidade Nova 1	74	4	5,4	56	5	89	47	5	106
Cidade Nova 2	58	2	3,4	43	6	140	32	1	31
Cidade Nova 3	36	9	25,0	21	1	48	17	0	0
Cidade Nova 4	2	1	50,0	0	0	0	0	0	0
Coqueiro Verde	23	0	0,0	21	3	143	13	0	0
Diamantina	11	1	9,1	5	1	200	6	0	0
Dist. Industrial	2	0	0,0	1	0	0	1	0	0
Dona Francisca	19	0	0,0	16	5	313	10	0	0
Eldorado	24	5	20,8	10	1	100	8	2	250
Ilhéus	10	1	10,0	9	3	333	6	0	0
Jardim Baviera	45	7	15,6	21	4	190	12	1	83
Jardim Boa Vista	28	1	3,6	21	4	190	21	1	48
Maria Regina 1	42	6	14,3	27	7	259	19	0	0
Maria Regina 2	30	1	3,3	21	6	286	14	0	0
Parque Alvorada	17	0	0,0	9	2	222	8	0	0
Ponte Nova	16	2	12,5	10	5	500	2	0	0
Quinta Boa Vista	10	1	10,0	5	3	600	4	0	0
Samambaia	33	1	3,0	18	6	333	13	1	77
Santo Antônio	45	4	8,9	35	12	343	19	5	263
São Gerônimo	15	2	13,3	7	1	143	4	1	250
Satélite 1	69	21	30,4	30	6	200	25	3	120
Satélite 2	42	9	21,4	19	1	53	17	1	59
Serra Azul	11	1	9,1	8	3	375	4	0	0
Sol Nascente	7	0	0,0	2	0	0	1	0	0
Veredas Serra 1	8	0	0,0	5	3	600	2	0	0
Veredas Serra 2	19	1	5,3	9	4	444	6	1	167
Vila Verne	11	3	27,3	3	1	333	1	0	0
Village	3	0	0,0	2	2	1000	1	0	0
Total	957	102	10,7	595	123	207	433	28	65

Observa-se heterogeneidade de valores dos coeficientes de prevalência e incidência nos bairros do município (Tabela 5). Os seis bairros que apresentaram os maiores valores de prevalência, acima de 20% foram: Cidade Nova 4 com duas amostras coletadas (50,0%), Satélite 1 (30,4%), Vila Verne (27,3%), Cidade Nova 3

(25,0%), Satélite 2 (21,4%), Eldorado (20,8%). Na 2ª coleta foram 18 bairros com valores de incidência canina  $\geq 200/1000$ cães.semestre, dos quais o Satélite 1 e Vila Verne continuaram entre os com maior número de cães. Na 3ª coleta foram identificados o Santo Antônio e Eldorado, também dentre as maiores incidências da 2ª e 1ª

coletas respectivamente, e o bairro São Gerônimo. Valores de prevalência e incidência  $\geq 10\%$  e  $< 20\%$  foram verificados em oito bairros na 1ª e 2ª coletas, respectivamente, diminuindo para quatro bairros na 3ª coleta.

Os bairros Distrito Industrial com duas amostras e Sol Nascente com sete amostras foram os únicos bairros onde não foram identificados cães soropositivos durante todo o trabalho.

No gráfico 3 observa-se a diversificação dos valores do coeficiente de prevalência (1ª coleta) nos 34 bairros de Juatuba quando comparados aos valores dos coeficientes de incidência. Na 2ª coleta houve predomínio dos valores mais altos

de incidência,  $\geq 200/1000$  cães.semestre em 53% (n=18) bairros e  $\geq 100/1000$  cães.semestre e  $< 200/1000$  cães.semestre em 24% (n=8) dos bairros. Na 3ª coleta em 56% (n=19) dos bairros não foram diagnosticados cães sororreagentes e no restante os coeficientes apresentaram distribuição mais homogênea, assim como observado na 1ª coleta, porém com proporções mais reduzidas.

O gráfico 4 mostra os valores dos coeficientes de prevalência e incidência por mês de coleta. Os maiores picos de positividade são observados no mês maio/2010 e no período entre dezembro/2010 e março/2011, este último mês com número de amostras muito pequeno.

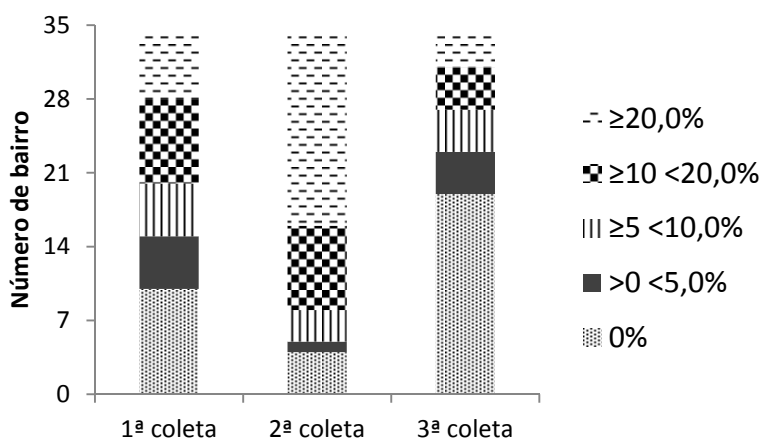


Gráfico 3: Distribuição da frequência dos coeficientes de prevalência (1ª coleta) e incidência (2ª e 3ª coletas) da leishmaniose visceral em cães de Juatuba, de 2010 a 2011.

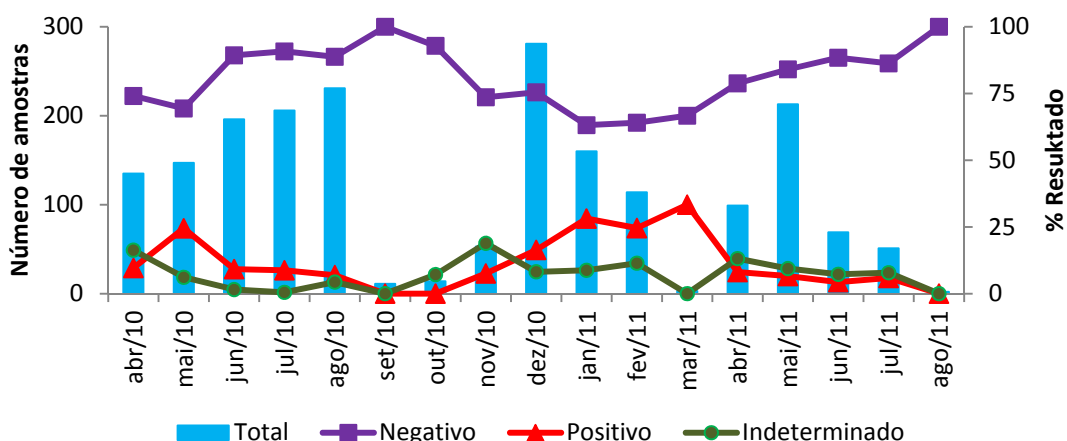


Gráfico 4: Distribuição da frequência dos resultados sorológicos na IFI por mês de coleta de sangue dos cães em Juatuba, de 2010 a 2011.

#### 4.4 Soroconversão dos cães com resultados indeterminado pela IFI

Tanto os positivos quanto os indeterminados tiveram maior frequência na 2ª coleta quando comparada às outras duas, com isto, a proporção de negativos na 2ª coleta foi menor (Gráfico 5).

O desfecho do total de cães com sorologia indeterminada detectada na 1ª e na 2ª coletas está representado no Gráfico 6. O monitoramento dos cães com resultado indeterminado, detectado somente na 3ª coleta, ficou sob a responsabilidade do município. Este monitoramento demanda nova coleta de sangue para definição do diagnóstico sorológico e providências devidas.

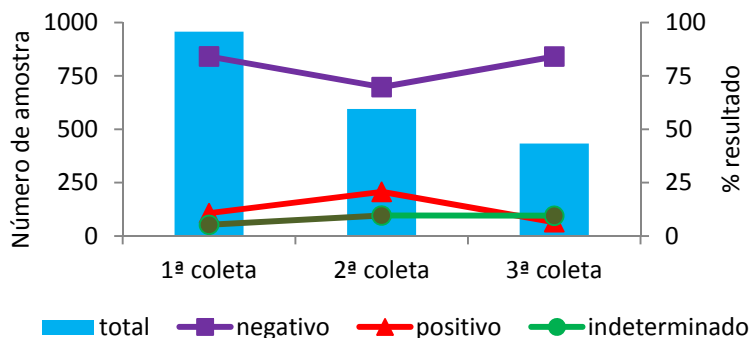


Gráfico 5: Distribuição da frequência dos resultados sorológicos nas 3 coletas de sangue dos cães amostrados em Juatuba, 2010 a 2011.

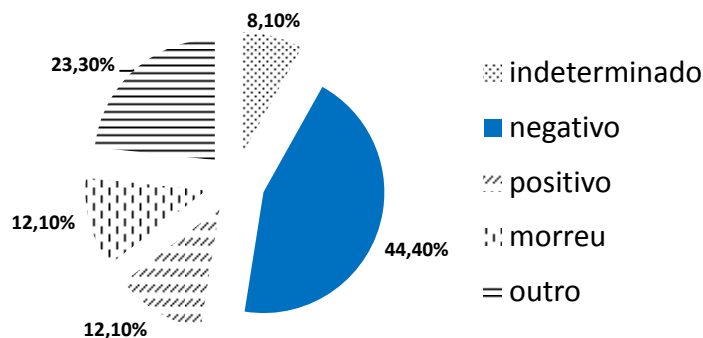


Gráfico 6: Desfecho do total de cães com sorologia indeterminada detectada na 1ª e na 2ª coletas de sangue em Juatuba, de 2010 a 2011.

Dos 50 cães com resultado indeterminado na 1ª coleta, somente 6% (n=3) mantiveram este resultado até a 3ª coleta, 14% (n=7) se soroconverteram a positivo e 18% (n=9) foram a óbito. Do restante, em 26% (n=13) dos animais ocorreu a soroconversão à negativo já na 2ª coleta.

mantiveram o resultado indeterminado na 3ª coleta, 10,2% (n=5) se soroconverteram a positivo, 6,1% (n=3) foram a óbito; 55,1% (n=27) se soroconverteram a negativo e o restante dos cães não teve nova coleta (casa fechada, cão ausente, etc).

Dos 57 cães com resultado indeterminado na 2ª coleta, 8 tinham mantido o resultado da coleta anterior (já relatado acima) e 49 foram negativos na 1ª coleta. Destes 49 animais, 10,2% (n=5)

As amostras com sorologia indeterminada nas 3 coletas apresentaram no ELISA proporções bem menores de resultado indeterminado (14,9%), a metade com resultado positivo (50,0%) e 35,1% negativos, como apresentado no gráfico 7.

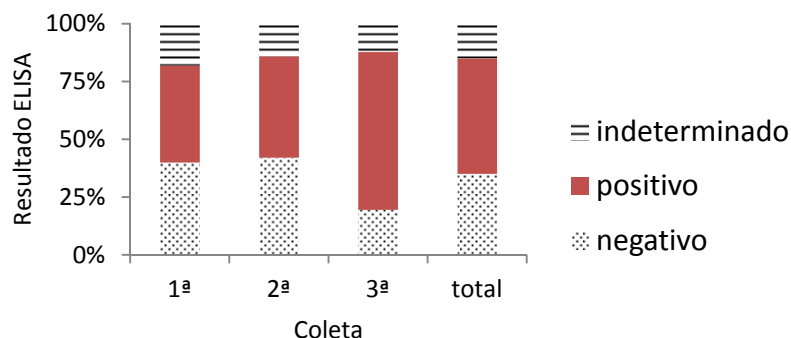


Gráfico 7: Distribuição dos resultados de ELISA das amostras caninas que apresentaram resultado indeterminado pela IFI, Juatuba, 2010 a 2011.

De seis cães com resultado anterior indeterminado e que soroconverteram a positivos na segunda coleta todos deram positivos no ELISA, mas na primeira coleta foram observados os três resultados no ELISA: 16,7% negativos, 33,3% indeterminados e 50,0% positivos. É curioso observar que seis cães também que soroconverteram de indeterminado a positivo nas duas últimas etapas o resultado de ELISA foi positivo em 83,3% e indeterminado em 16,7%, mas na etapa anterior quando a IFI foi indeterminada para todos o ELISA variou de 66,7% de negativos, 16,7% de indeterminados e 16,7% de positivos.

Ainda sobre os doze cães que soropositivaram discutidos acima, entre as duas etapas iniciais e entre as duas finais, 4 e 6 respectivamente foram inclusos no controle de qualidade realizado pela

FUNED. Nesta instituição, os primeiros tiveram resultado de IFI indeterminada em apenas um cão (25,0%) e negativa nos demais (75,0%), porém na etapa posterior dois destes cães apresentaram IFI positiva e os outros não entraram no controle de qualidade. Em relação aos outros seis cães o resultado da FUNED concordou com a IFI indeterminada em 5 deles e 1 negativo sendo que na etapa posterior somente 3 foram analisados e todos foram positivos na IFI.

Destas 148 amostras com resultado indeterminado pela IFI, 64,2% (n=95) foram processadas no controle de qualidade da FUNED, também pela IFI, e observou-se que mais da metade apresentou resultado negativo no total das análises (Gráfico 8).

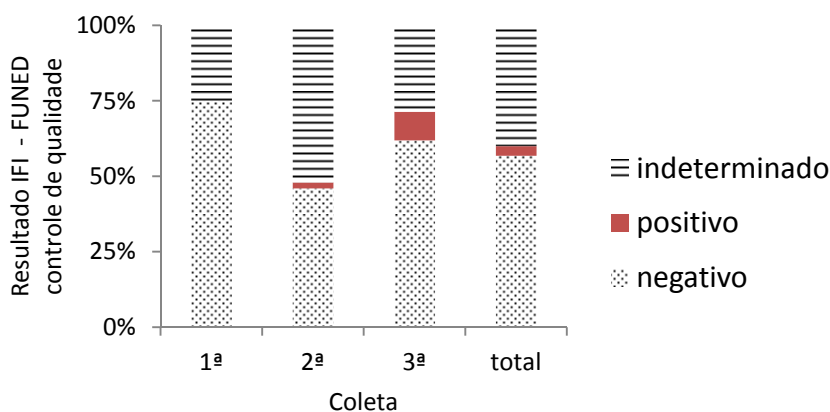


Gráfico 8: Distribuição dos resultados de IFI apresentados na FUNED de amostras de sangue canino com resultado indeterminado pela IFI no Laboratório de Leishmanioses da UFMG.

Os resultados liberados pelo laboratório de referência nacional (FUNED) para o diagnóstico da LV concordaram com a IFI indeterminada em 40,0% das amostras, do restante 56,8% foram negativas e 3,2% soropositivas. Destas soropositivas na FUNED e com resultado indeterminado no laboratório universitário, uma amostra foi da 2ª coleta e apresentou resultado negativo em ambos laboratórios na 3ª coleta; outras duas amostras foram positivas na 3ª coleta mas não foram consideradas para emissão de laudo como soropositivo por não terem apresentado nem um sinal clínico nas três etapas do trabalho e terem apresentado todos os resultados negativos no ELISA e IFI nas etapas anteriores, pelo laboratório universitário.

Na 1ª etapa dos 50 animais com sorologia indeterminada pela IFI 30,0% (15) apresentaram sinais clínicos da LV, na 2ª etapa dos 57 foram 31,6% (18) e na 3ª etapa de 41 foram 53,7% (22).

#### 4.5 Destino dos cães sororreagentes

Os resultados da sorologia foram de 96,2% (n=126) de sororreagentes e 3,8% (n=5) de indeterminados. Não foi detectado resultado negativo. Enfatizando, esta análise laboratorial refere-se aos cães necropsiados e que já tinham sorologia positiva anteriormente nas diluições de 1:40 ou 1:80.

Dos 253 cães sororreagentes nas 3 coletas, 58,9% (n=149) foram recolhidos e eutanasiados pelo Serviço, 10,3% (26) morreram antes do recolhimento e 30,8% (78) ficaram com o recolhimento pendente dos quais a maior frequência deveu-se à recusa, conforme Gráfico 9.

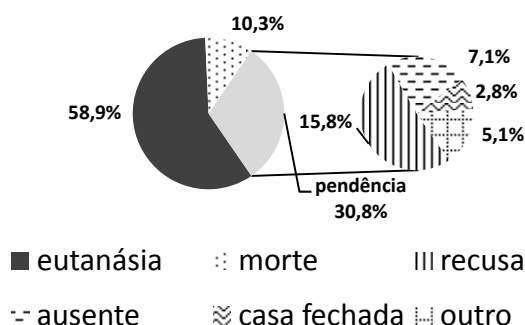


Gráfico 9: Destino dos cães sororreagentes das três coletas de sangue dos cães amostrados em Juatuba, 2010 a 2011.

9. As causas de morte destes cães não foram registradas. Dos 15 animais que morreram entre as duas etapas iniciais do estudo 53,3% (8) apresentaram sinais clínicos durante exame realizado na 1ª coleta. Dos 7 animais que morreram entre as duas últimas etapas 28,6% apresentavam sinais clínicos durante exame realizado na 2ª coleta. Dos 4 animais que foram à óbito após a última coleta todos eram sintomáticos.

Dos 149 animais eutanasiados 87,9% (n=131) foram necropsiados (1ª coleta 44/54 – 81,5%; 2ª coleta 70/78 – 89,7%; 3ª coleta 17/17 – 100%). A eutanásia foi iniciada em julho/2010 e a necropsia em outubro/2010. Dos cães soropositivos referentes à primeira coleta 8 foram eutanasiados antes de iniciar a atividade de necropsia. Da segunda coleta foram 8 cães eutanasiados em junho, julho e agosto de 2011 fora do dia designado para necropsia. Ao todo foram 16 animais recolhidos que não foram necropsiados.

Observa-se dentre as causas do não recolhimento dos cães sororreagentes que a proporção de recusas foi maior dos cães diagnosticados na 1ª coleta em comparação às demais, possivelmente, por representarem o início da atividade; com isto um quantitativo expressivo de cães positivos não foi recolhido, permanecendo no ambiente (Gráfico 10). Dentre estes cães soropositivos não entregues pelos proprietários para eutanásia a metade era de raça definida.

No gráfico 10 a categoria “outro” incluiu resgate a ser agendado com o responsável pelo cão que não estava presente e problemas com o endereço que impossibilitaram a localização do domicílio.



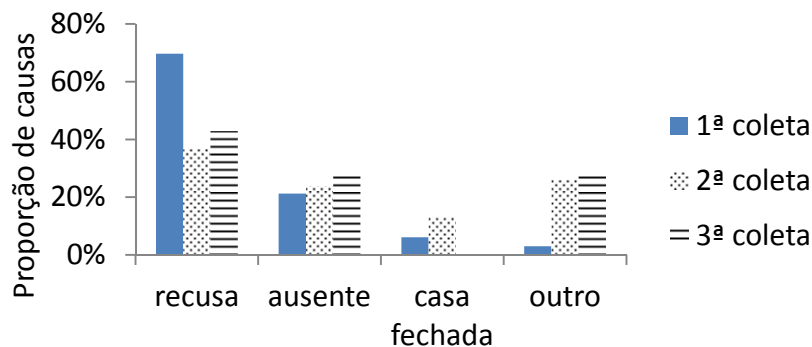


Gráfico 10: Causas do não recolhimento dos cães sororreagentes participantes da coorte fechada em Juatuba, 2010 a 2011.

A equipe de pesquisadores responsáveis pela necropsia dos animais soropositivos iniciou a atividade em meados de outubro e a finalizou em meados de dezembro de 2010, totalizando 43,1% (44) dos 102 animais soropositivos da primeira coleta. A atividade referente aos animais da segunda coleta foi iniciada em meados de abril e finalizada em início de agosto, sendo acrescida com os animais soropositivos da terceira coleta nos meses de julho e agosto de 2011. Dos 123 cães sororreagentes da segunda etapa 56,9% (70) foram necropsiados e dos 28 sororreagentes da terceira etapa 60,7% (17) foram necropsiados.

Em relação à utilidade do cão, foi observado em análise feita durante exame clínico que antecedeu à necropsia que, aparentemente, 26,7% (35) eram cães de companhia e 65,6% (86) de trabalho. Os demais estavam sem registro da informação.

#### 4.6 Resultado sorológico pelo controle de qualidade - FUNED

Devido ao quantitativo expressivo de amostras com título  $\geq 40$  na IFI, o fluxo acordado com a FUNED foi alterado, com a aprovação desta instituição, para priorizar estas amostras e outras com sorologia indeterminada. Por isso, o envio de amostras das três coletas e necropsia não seguiu uma padronização.

As amostras encaminhadas para o controle de qualidade na FUNED foram 24% ( $n=229/957$ ), 42% ( $n=248/595$ ) e 35% ( $n=150/433$ ) do total de amostras coletadas nas 1ª, 2ª e 3ª coletas, respectivamente; e 23% ( $n=30/131$ ) de amostras dos cães necropsiados (Gráfico 11).

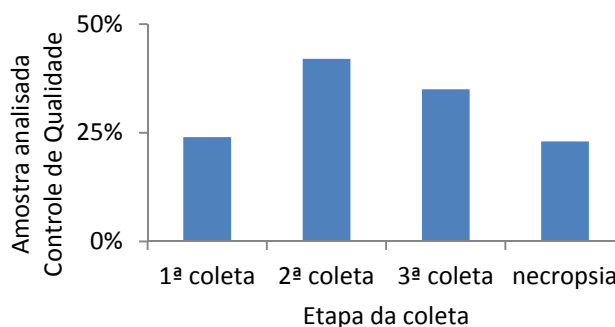


Gráfico 11: Distribuição da frequência de amostras processadas no controle de qualidade na FUNED, 2010 a 2011.

A concordância entre as análises realizadas nos laboratório da FUNED e laboratório da EV-UFMG foi satisfatória. A 1ª coleta apresentou 100% de concordância entre os positivos, a 2ª

coleta 97% e a 3ª coleta 95%. Os negativos apresentaram concordância média de 88%. A frequência de resultados indeterminados no laboratório da EV-UFMG foi 2,3 vezes maior

que a observada na FUNED, talvez por maior rigor na leitura das lâminas com o objetivo de priorizar a coleta seguinte dos respectivos cães.

Algumas amostras (16) foram reencaminhadas ao CQ para confirmação do resultado devido à falta de reprodutibilidade e também, foram observados resultados divergentes pelo laboratório de referência (dados não apresentados).

#### 4.7 Relação dos resultados sorológicos entre ELISA e IFI

Foram analisadas 1.985 amostras nas três coletas de sangue canino mais 131 amostras procedentes de cães necropsiados, totalizando 2.116 amostras. A tabela 6 apresenta a concordância entre os resultados negativo, positivo e indeterminado de ELISA e IFI nas três coletas e dos cães necropsiados.

Tabela 6: Concordância entre os resultados sorológicos de ELISA e IFI dos cães amostrados em Juatuba, 2010 e 2011.

IFI	RESULTADO DE ELISA							
	negativo		positivo		indeterminado		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>1ª coleta</b>								
negativo	581	91,5	153	68,0	71	73,2	805	84,1
positivo	34	5,4	51	22,7	17	17,5	102	10,7
indeterminado	20	3,1	21	9,3	9	9,3	50	5,2
total	635	100,0	225	100,0	97	100,0	957	100,0
<b>2ª coleta</b>								
negativo	291	86,6	78	41,9	46	63,0	415	69,7
positivo	21	6,3	83	44,6	19	26,0	123	20,7
indeterminado	24	7,1	25	13,4	8	11,0	57	9,6
total	336	100,0	186	100,0	73	100,0	595	100,0
<b>3ª coleta</b>								
negativo	238	95,2	58	53,2	68	91,9	364	84,1
positivo	4	1,6	23	21,1	1	1,4	28	6,5
indeterminado	8	3,2	28	25,7	5	6,8	41	9,5
total	250	100	109	100,0	74	100,0	433	100,0
<b>necropsia</b>								
negativo	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
positivo	28	90,3	89	98,9	9	90,0	126	96,2
indeterminado	3	9,7	1	1,1	1	10,0	5	3,8
total	31	100,0	90	100,0	10	100,0	131	100,0

Ao comparar o total de negativos entre os dois testes observa-se que o ELISA apresentou um quantitativo menor que a IFI nas três coletas, correspondente a 78,9% (1ª coleta), 81,0% (2ª coleta) e 68,7% (3ª coleta). O inverso foi observado nos resultados positivo ou indeterminado das três etapas de coletas.

Foram identificados resultados com ELISA negativo e IFI positiva nos cães das três coletas: 34 amostras na 1ª coleta, 21 na 2ª e 4 na 3ª coleta e, também, nos necropsiados (n=126), conforme tabela 6.

Na 1ª coleta, dos 102 resultados sororreagentes pela IFI, 50% (n=51) tiveram ELISA reagentes;

dos 123 sororreagentes pela IFI na 2ª coleta, 67,5% (n=83) ELISA reagentes e dos 28 da 3ª coleta, 82% (n=23); o que demonstra baixa sensibilidade do ELISA (Tabela 6).

#### 4.8 Relação dos sinais clínicos x título da IFI dos cães sororreagentes necropsiados

Foi realizada titulação completa de anticorpos na IFI das amostras dos cães necropsiados (Gráfico 12). Estes já tinham apresentado sorologia positiva em coleta anterior à necropsia, porém com processamento exclusivo nas diluições 1:40 e 1:80.

Dos 131 cães necropsiados 33,6% (44) foram sororreagentes na primeira coleta, 53,4% (70) na segunda e 13,0% (17) na terceira coleta. A tabela 7 mostra o resultado das diluições na IFI dos

cães necropsiados quando foi feita titulação completa e compara a frequência nas diluições de 1:40 e 1:80 realizadas durante as três etapas de coleta de sangue.

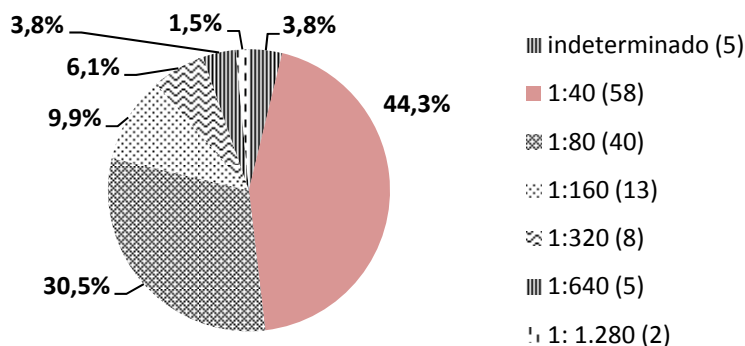


Gráfico 12: Distribuição da frequência de diluições reagentes pela imunofluorescência indireta dos cães necropsiados de Juatuba, 2010 a 2011.

Tabela 7: Titulação na IFI das amostras de cães necropsiados em comparação com os resultados das diluições de 1:40 e 1:80 durante as três etapas de coleta de sangue.

IFI NECROPSIA	IFI: 1ª, 2ª E 3ª ETAPAS DE COLETA DE SANGUE					
	1:40		≥1:80		total por coleta	
TITULAÇÃO	n	n	n	%	n	%
<b>Indeterminado</b>						
1ª coleta	1	0	1	20,0	5	3,8
2ª coleta	4	0	4	80,0		
3ª coleta	0	0	0	0,0		
<b>1:40</b>						
1ª coleta	7	0	7	12,1	58	44,3
2ª coleta	39	3	42	72,4		
3ª coleta	7	2	9	15,5		
<b>1:80</b>						
1ª coleta	16	4	20	50,0	40	30,6
2ª coleta	13	2	15	37,5		
3ª coleta	4	1	5	12,5		
<b>1:160</b>						
1ª coleta	4	4	8	61,5	13	9,9
2ª coleta	3	1	4	30,8		
3ª coleta	1	0	1	7,7		
<b>1:320</b>						
1ª coleta	2	2	4	50,0	8	6,1
2ª coleta	0	2	2	25,0		
3ª coleta	0	2	2	25,0		
<b>1:640</b>						
1ª coleta	0	3	3	60,0	5	3,8
2ª coleta	0	2	2	40,0		
3ª coleta	0	0	0	0,0		
<b>1:1280</b>						
1ª coleta	1	0	1	50,0	2	1,5
2ª coleta	1	0	1	50,0		
3ª coleta	0	0	0	0,0		
<b>Total</b>	<b>91</b>	<b>28</b>	<b>131</b>		<b>131</b>	<b>100,0</b>

Das 5 amostras com resultado indeterminado dos cães necropsiados 80% haviam apresentado resultado sororreagente na diluição de 1:40 na segunda coleta e 20% na primeira coleta. Estas amostras participaram do controle de qualidade realizado pela FUNED. As cinco amostras tiveram o resultado positivo confirmado e posteriormente, na coleta procedente da necropsia, somente duas foram analisadas pelo CQ e deram resultado negativo na IFI. As cinco amostras apresentaram resultado negativo no parasitológico direto. Todos estes cães apresentaram alteração no baço, linfadenopatia e outros sinais clínicos da LV: ceratoconjuntivite, emagrecimento e hiperqueratose no focinho (Anexo 26). Apenas um cão teve amostra de mielocultura e a mesma foi negativa.

No outro extremo do resultado sorológico está o título 1.280 positivo para dois cães necropsiados, um da primeira coleta e outro da segunda, ambos com diluição de 1:40 reagente em data anterior à necropsia, confirmados pelo CQ. Ambos tiveram resultado negativo no parasitológico direto e apresentaram sinais clínicos da LV e também alteração no baço. Um deles teve a espécie de *L. infantum* identificada pela PCR-RFLP e tinha quadro clínico típico da doença: alopecia, onicogribose, ceratoconjuntivite, hiperqueratose no focinho e linfadenopatia. Na primeira coleta foi observada lesão de pele neste cão. Os sinais clínicos do outro cão foram lesão de pele e ceratoconjuntivite no momento da avaliação

clínica da necropsia, durante a segunda coleta não foi registrada a presença de sinal clínico neste cão.

Os sinais clínicos apresentados pelos cães foram classificados em duas categorias para caracterizar o cão nominado “assintomático” e o “sintomático”. Não foram observados sinais de vômito, tosse, diarreia, coriza, edema de pata e mioclonia nos cães necropsiados.

Observou-se que dos 131 cães sororreagentes, somente 5,3% (n=7) não apresentaram qualquer sinal clínico da doença (Tabela 8). Dos 131 cães necropsiados, 84% (n=110) estavam com o estado corporal bom, 15% (n=20) estavam magros e 1% (n=1) com sobrepeso. Esta avaliação clínica foi feita exclusivamente por um pesquisador médico veterinário da equipe para padronização da observação.

Dos 124 cães com sinais clínicos sugestivos da LV em 31,5% (39) foram relatadas alterações cutâneas. Já as alterações esplênicas foram observadas em 78,6% dos cães necropsiados, dos quais 3,1% ocorreram em cães assintomáticos (Tabela 8).

A partir do título 160 todos os cães apresentaram sintomatologia compatível com a LV e a maioria com alteração esplênica, conforme gráfico 13. Os cães (n=2) com título  $\geq 1.280$  eram sintomáticos e com o baço alterado.

Tabela 8: Classificação dos animais sororreagentes quanto aos sinais clínicos e alterações esplênicas observadas durante a necropsia, Juatuba, 2010 a 2011.

Sinal clínico	baço alterado					
	não	%	sim	%	total	%
assintomático	3	2,3	4	3,1	7	5,3
sintomático	25	19,1	99	75,6	124	94,7
total	28	21,4	103	78,6	131	100,0

Dos animais necropsiados 88,2% (30/34) eram procedentes dos bairros de Juatuba e os demais de outros municípios. Eram 55% machos e 45% fêmeas; 86,3% sem raça definida; 55,7% de cor escura, 26,0% clara e 18,3% indefinida (cores mistas); 85,5% pelo curto; 48,1% porte médio, 26,7% grande e 25,2% pequeno; 64,9% entre 1 e

4 anos de idade, 16,8% entre 4 e 8 anos, 13,7% menor que 1 ano e 4,6% mais de 8 anos.

Durante o exame clínico nos cães necropsiados observou-se presença de pulga e carrapato em 9,2% (12) destes animais, dos quais 8,3% (1) eram assintomáticos e 91,7% (11) sintomáticos.

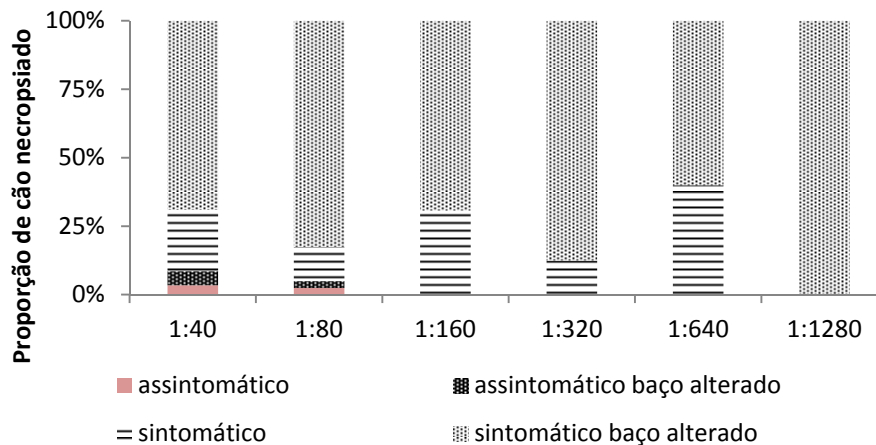


Gráfico 13: Relação do título de anticorpos na IFI dos animais sororreagentes com os sinais clínicos e alterações esplênicas observadas durante a necropsia.

#### 4.9 Resultado do parasitológico direto

A leitura do parasitológico em lâminas de tecidos (baço, pele e linfonodo) e de medula óssea foi realizada por duas pessoas com grande experiência para confirmação dos resultados.

Dos 131 animais necropsiados houve positividade em 24,4% (32) dos mesmos no exame parasitológico com a identificação de formas amastigotas da leishmania em pelo menos uma das oito lâminas de cada cão. Por não ser objetivo deste estudo, não foram feitas análises comparativas de positividade entre os tipos de amostras.

#### 4.10 Resultado - análise molecular

Os cães necropsiados referentes à sorologia positiva identificada na 1ª coleta tiveram o material da mielocultura descartado por problemas de contaminação no meio NNN/LIT. Posteriormente, de 47 amostras de mielocultura 66,0% (31) eram da 2ª coleta e 34,0% da 3ª coleta, das quais 10 foram positivas (9 amostras

da 2ª coleta e 1 da 3ª coleta). Após extração de DNA estas amostras foram submetidas a PCR – SSU e o gênero *Leishmania* foi identificado.

Das 131 amostras analisadas de tecidos (pele e baço) e de medula, 10 apresentaram PCR positiva. Estas 20 amostras positivas, 10 provenientes da mielocultura e outras 10 de tecido foram submetidas ao sequenciamento de DNA para identificação da espécie. Um cão apresentou positividade na mielocultura e tecido (pele). A extração de DNA de linfonodo não foi feita porque as demais amostras apresentaram concentração satisfatória de DNA.

No sequenciamento, fragmentos de 252 pares de bases do gene *SSUrRNA*, resultantes do alinhamento das sequências obtidas para cada amostra e exclusão de regiões contendo bases com QV < 15 (*trimming*) foram utilizados para as análises filogenéticas. As sequências-referência do gene *SSUrRNA* das diversas espécies de *Leishmania*, bem como aquela de *Trypanosoma cruzi* utilizada como grupo externo, estão descritas na tabela 9.

Tabela 9: Número de acesso no *GenBank* das sequências utilizadas nas análises filogenéticas.

Número de acesso no <i>GenBank</i>	Espécie
M80292.1	<i>Leishmania braziliensis braziliensis</i>
M80293.1	<i>Leishmania mexicana amazonensis</i>
M80295.1	<i>Leishmania donovani</i>
M81427.1	<i>Leishmania major</i>
M81430.1	<i>Leishmania infantum</i>
JN942611.1	<i>Trypanosoma cruzi</i>

A tabela 10 apresenta as espécies que mostraram maior identidade com as sequências obtidas, e as respectivas distâncias genéticas. As distâncias genéticas foram computadas no programa Mega v5.1 utilizando o modelo de substituição Kimura 2 parâmetros (Kimura, 1980).

A amostra identificada com nº 14 (SJ-12 medula) apresentou, inicialmente, a identificação da *Leishmania braziliensis*, a qual não foi confirmada com as novas análises 14b e c nas amostras de medula e pele. Nestas últimas a

espécie *Leishmania infantum* obteve maior proximidade do padrão.

No sequenciamento, a região genômica utilizada não foi capaz de diferenciar entre as espécies *L. infantum* e *L. donovani*.

Algumas amostras não tiveram sua região 5' sequenciada com êxito (Tabela 11). As mesmas foram excluídas do estudo por comprometerem a análise de distância genética das demais amostras.

Tabela 10: Relação das espécies geneticamente mais próximas das amostras analisadas.

Nº	Código	Tecido	Espécie mais próxima	Distância genética	Outras espécies (distância)
1	MR1-37	pele	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
2	MR1-37	medula	<i>L. amazonensis</i> / <i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i> / <i>L. major</i>	0,004	<i>L. braziliensis</i> (0,008)
4	CN3-33	pele	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
5	QBV-03	pele	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
6	QBV-03	medula	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
8	ELD-17	medula	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
9	DF-10	pele	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
10	DF-10	medula	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
11	CAR-05	pele	<i>L. amazonensis</i> / <i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i> / <i>L. major</i>	0,004	<i>L. braziliensis</i> (0,008)
12	CAR-05	medula	<i>L. amazonensis</i> / <i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i> / <i>L. major</i>	0,004	<i>L. braziliensis</i> (0,008)
13	SA-05	pele	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
14	SJ-12	medula	<i>L. braziliensis</i>	0,004	<i>L. donovani</i> (0,008) / <i>L. amazonensis</i> (0,008) / <i>L. major</i> (0,008) / <i>L. infantum</i> (0,008)
14b	SJ-12	medula	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
14c	SJ-12	medula	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
15	I-06	pele	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
16	STO-11	pele	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
17	ELD-04	baço	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
19	JB-10	pele	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
20	JB-16	baço	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
21	I-10	medula	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
23	STO-43	baço	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
24	SAT2- 23	pele	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
25	SJ-12	pele	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)
27	ELD-10	pele	<i>L. infantum</i> / <i>L. donovani</i>	0,000	<i>L. braziliensis</i> (0,013) / <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> (0,008)

Tabela 11: Relação das amostras que não tiveram êxito na análise filogenética.

Número da amostra	Nome da amostra	Tecido	Observação
3	DF-06	pele	Não há outra amostra igual
7	ELD-17	pele	Mesma que a amostra 8
18	VS208	pele	Não há outra amostra igual
22	ELD10	baço	Mesma amostra que a 27
26	CN3-33	medula	Mesma que a amostra 4
28	SA05	medula	Mesma que a amostra 13

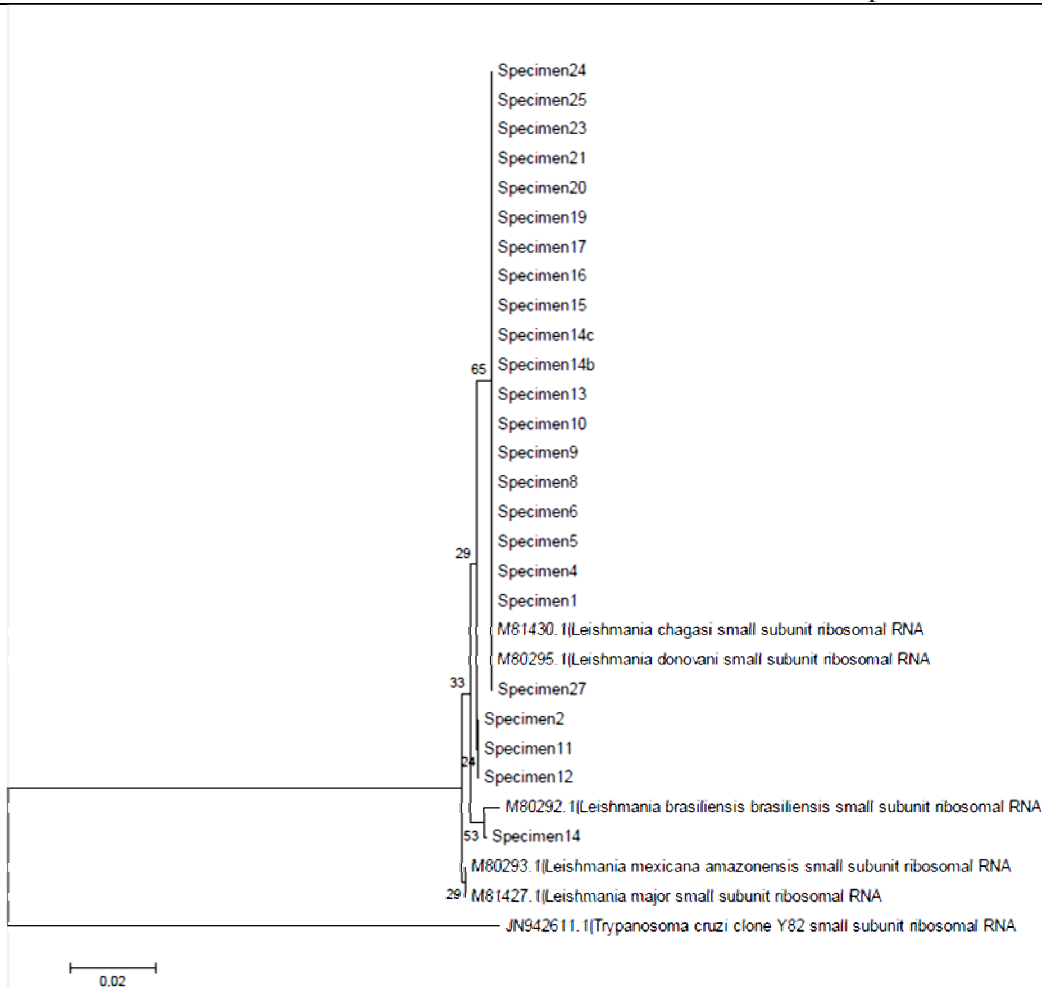


Figura 3: Árvore filogenética mostrando as distâncias entre as amostras analisadas e as sequências utilizadas como referência.

A comparação de sequências do fragmento do gene *SSUrRNA* de *Leishmania* (Figura 3) está sujeita à correta identificação e à qualidade de sequenciamento das sequências de referência utilizadas depositadas no *GenBank*. A região utilizada na análise (252 pares de bases) é pequena e pode não refletir as diferenças filogenéticas entre uma amostra e a espécie identificada do ponto de vista genômico. As distâncias genéticas encontradas são pequenas e

podem não refletir uma separação em nível de espécie. A região genômica utilizada não foi capaz de diferenciar entre as espécies *L. infantum* e *L. donovani*. Por ser uma região nuclear, o gene *SSUrRNA* pode possuir dois alelos, constituindo-se em um heterozigoto. As posições que mostraram duas bases possíveis não foram computadas como substituição de base na análise filogenética quando comparadas a sequências que possuíam uma das duas bases.

As amostras positivas na PCR de mielocultura e tecido, utilizaram iniciadores direcionados à região kDNA de *Leishmania* e foram submetidas a RFLP para caracterização das espécies. Foram utilizadas a enzima HaeIII e posteriormente a

Ava I, por apresentarem fragmentos distintos após digestão do kDNA (Tabela 12). A figura 4 mostra a identificação da espécie *Leishmania amazonensis* (quadros de 1 a 4) e a *Leishmania infantum* (quadro 5).

Tabela 12: Perfil de restrição dos fragmentos de 120 pares de bases do kDNA de *Leishmania* com as enzimas de restrição Ava I e HAE III.

Enzima	<i>Leishmania amazonensis</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>Leishmania infantum</i>
HAE III	120	40 + 80	60 + 60 40 + 80
AVA I	78 + 42	120	120

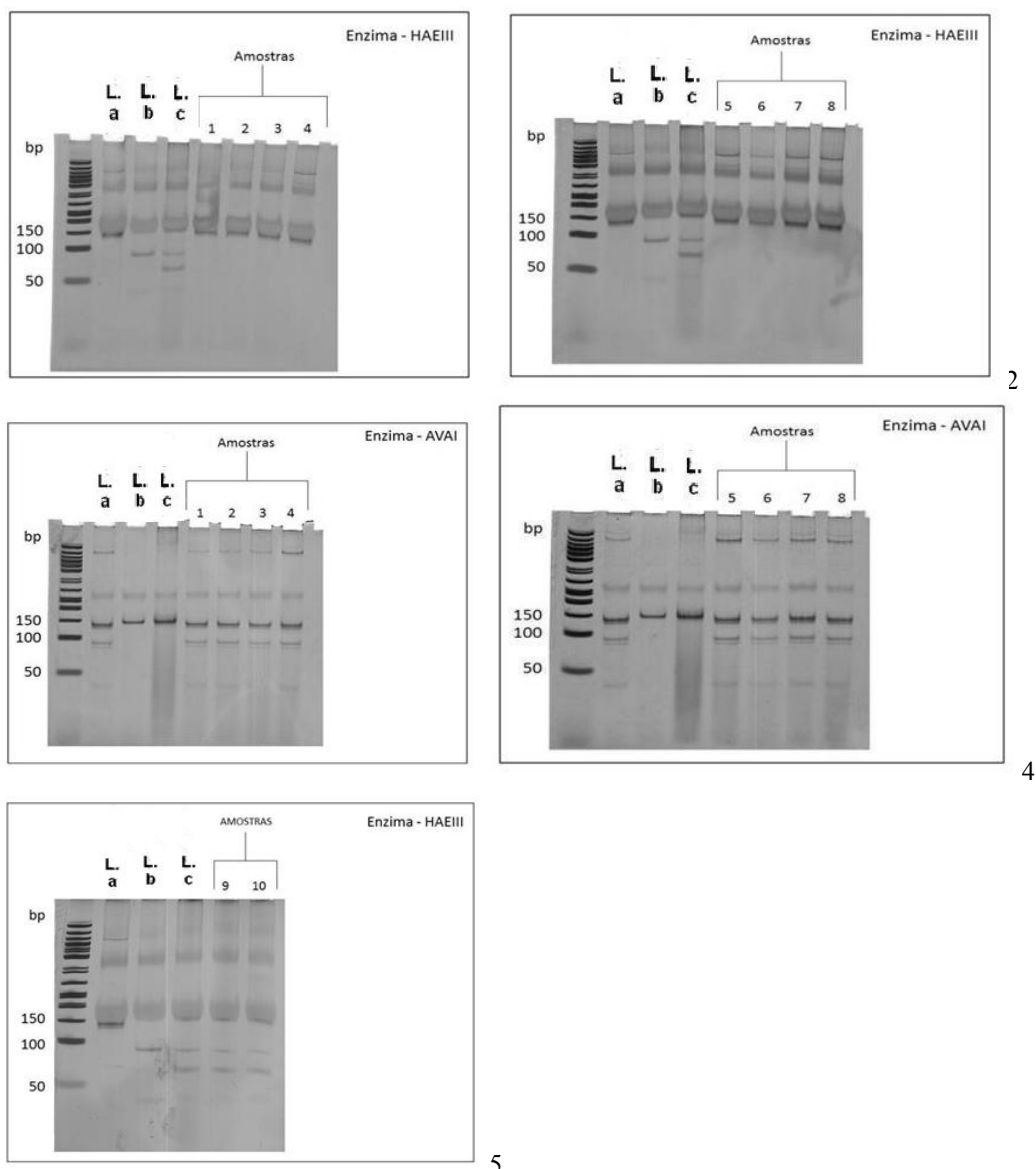


Figura 4. Visualização de produto da PCR-RFLP em amostras (1-10) de mielocultura. Pa (padrão), L.a (*Leishmania amazonensis* – IFLA/BR/1967/PH8), L.b (*Leishmania braziliensis* – MHOM/BR/1975/M2903), L.c (*Leishmania infantum* = *Leishmania chagasi* - MHO/BR/70/BH46).



As demais amostras de tecido com caracterização da espécie pela PCR-RFLP apresentaram o mesmo padrão de visualização de produto das demais e não estão representadas.

Os resultados das análises por biologia molecular, neste estudo, não deixam dúvidas quanto à identificação das espécies de *Leishmania* quando comparadas aos padrões usados.

#### 4.11 Concordância entre os testes diagnósticos

Dos 131 cães necropsiados com resultado anterior de IFI positiva 96,2% (126) confirmaram o resultado e 3,8% (5) apresentaram resultado indeterminado pela IFI. O resultado de ELISA foi negativo em 23,7% (31) destes cães (131), dos quais 48,4% (15) confirmaram resultado anterior.

De acordo com a Tabela 13 houve confirmação da sorologia positiva em 33,6% (44) dos cães por pelo menos uma técnica (parasitológico direto e PCR).

A leitura do parasitológico direto foi realizada em oito lâminas de cada um dos 131 cães e a positividade foi de 24,4% (32).

Foi feita PCR de medula e fragmentos de pele e baço dos 131 cães necropsiados e 7,6% (10) foram positivos. Já a PCR da mielocultura foi positiva em 21,3% (10) das amostras de 47 cães dentre os 131 necropsiados. A mielocultura de todos os cães necropsiados da 1ª coleta foi

descartada devido à contaminação do meio de cultura no momento do preparo.

A tabela 13 foi subdividida em dois grupos: cães que tiveram analisadas as amostras de mielocultura (47) e cães dos quais não foi possível coletar ou realizar esta análise (84). Verificou-se que de 47 cães necropsiados com sorologia positiva 31,9% (15) tiveram o resultado confirmado por pelo menos uma das técnicas utilizadas. Somente um (6,7%) cão foi positivo nas três técnicas: parasitológico, PCR de pele e PCR de mielocultura. Outros 93,3% (14) confirmaram o resultado da sorologia em uma das técnicas, com representação de 60,0% pela PCR de mielocultura e 33,3% pelo parasitológico.

Em amostras de 84 cães não foi feita a mielocultura e deste total em 34,5% (29) o resultado positivo da sorologia foi confirmado por pelo menos uma das duas técnicas: parasitológico e PCR de tecido. Os cães que apresentaram positividade nas duas técnicas somaram 20,7% (6) e em uma técnica apenas 79,3% (23). Somente 10,3% (3) cães foram positivos exclusivamente na PCR de tecido, enquanto 69,0% (20) somente no parasitológico. Estes dados constam na tabela 13.

Os testes diagnósticos foram avaliados quanto à sensibilidade e especificidade com intervalos de confiança de 95%, além do valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN), razão de verossimilhança positiva (RVP) e negativa (RVN), teste de *Kappa* e acurácia, conforme demonstrado na Figura 5.

Tabela 13: Relação dos resultados positivos pelo parasitológico, PCR de tecido e mielocultura de cães com sorologia positiva na IFI.

Número de cães	RESULTADO POSITIVO				total	
	parasitológico	PCR tecido	PCR mielocultura	n	%	
	n	n	n	n	%	
47	1	1	1	1	6,7	
	0	0	9	9	60,0	
	5	0	0	5	33,3	
Total	6	1	10	15	100,0	
84	6	6		6	20,7	
	0	3		3	10,3	
	20	0		20	69,0	
Total	26	9		29	100,0	
Total 131	32 (24,4%)	10 (7,6%)	*	44	33,6	

\*PCR mielocultura: 21,3% de positividade em 47 amostras.



O ELISA apresentou valores maiores de VPN nas três etapas de coleta de sangue canino, o que demonstra a maior sensibilidade do teste e, nas análises dos cães soropositivos da necropsia o valor de VPP foi maior, caracterizando maior especificidade. Em relação a RVP o ELISA apresentou de 2,46 a 3,87 vezes mais probabilidade do resultado positivo em cães infectados quando comparado aos não infectados. A acurácia do ELISA variou entre 0,71 e 0,76 o que corresponde a proporção de acertos de um teste diagnóstico.

Os demais testes: parasitológico direto e isolamento de cultura, e PCR apresentaram valor máximo de VPP o que confirma a alta especificidade dos testes.

#### 4.12 Relação dos resultados de sorologia, parasitológico e análise molecular das amostras com espécies de *Leishmania* identificadas

Dentre os 19 cães com caracterização da espécie de *Leishmania* (Tabelas 14 e 15), observou-se que a esplenomegalia foi frequente em 68,4% (13) dos animais necropsiados independentemente da espécie de *Leishmania* infectante, o que mostra o comprometimento visceral de cães das duas espécies, a *L. infantum* incriminada, comumente, como agente etiológico da LV e a *L. amazonensis* como agente etiológico da LT. No grupo dos cães identificados com *L. amazonensis* foi observada alteração no baço em 87,5% (7/8) dos animais e 54,5% (6/11) no grupo dos cães com *L. infantum*.

Tabela 14: Espécie de *Leishmania* identificada nas amostras PCR-RFLP positivas de mielocultura dos cães sororreagentes necropsiados.

Código	Sorologia		Sinal clínico	Parasitológico direto	PCR SSU	Sequenciamento DNA	PCR-RFLP Espécie
	IFI	ELISA					
						<i>L. infantum</i>	
CAR-05	1:40	negativo	sintomático/baço alterado	negativo	<i>Leishmania</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. amazonensis</i>
CN3-33	1:40	negativo	sintomático/baço alterado	negativo	<i>Leishmania</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>
I-06	1:40	positivo	sintomático/baço alterado	negativo	<i>Leishmania</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>
DF-06	1:80	positivo	Sintomático	negativo	<i>Leishmania</i>	excluída	<i>L. amazonensis</i>
						<i>L. infantum</i>	
MR1-37	1:80	negativo	sintomático/baço alterado	negativo	<i>Leishmania</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. amazonensis</i>
SA-05	1:80	negativo	sintomático/baço alterado	negativo	<i>Leishmania</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>
SJ-12	1:80	positivo	sintomático/baço alterado	negativo	<i>Leishmania</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>
DF-10	1:640	positivo	sintomático/baço alterado	negativo	<i>Leishmania</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>
QBV-03	1:160	positivo	sintomático/baço alterado	positivo	<i>Leishmania</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
ELD-17	1:320	positivo	sintomático/baço alterado	negativo	<i>Leishmania</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>

Tabela 15: Espécie de *Leishmania* identificada nas amostras PCR-RFLP positivas de tecido e medula dos cães sororreagentes necropsiados.

Código	Sorologia		Sinal clínico	Parasitológico direto	Sequenciamento DNA	PCR-RFLP espécie	amostra
	IFI	ELISA					
JB-10	1:80	positivo	Sintomático	negativo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	pele
VS2-08	1:80	positivo	Sintomático	positivo	excluída	<i>L. infantum</i>	pele
JB-16	1:160	positivo	Sintomático	positivo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	baço
QBV-03	1:160	positivo	sintomático/baço alterado	positivo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	pele
STO-43	1:320	positivo	sintomático/baço alterado	positivo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	baço
ELD-04	1:640	positivo	Sintomático	positivo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	baço
ELD-10	1:640	positivo	sintomático/baço alterado	negativo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	baço
SAT2-23	1:640	positivo	sintomático/baço alterado	positivo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	pele
STO-11	1:640	positivo	Sintomático	positivo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	pele
I-10	1:1.280	positivo	sintomático/baço alterado	negativo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	medula

Nas amostras caracterizadas em *L. amazonensis* foram identificados resultados negativo e positivo de ELISA. Nas amostras caracterizadas por *L. infantum* só foi identificado no ELISA resultado positivo.

As vinte amostras analisadas foram de dezenove cães porque um deles (QBV-03) apresentou PCR positiva tanto na mielocultura quanto no tecido (pele). Este cão apresentou sorologia positiva até a diluição de 1:160 e apresentava sinais clínicos da LV: onicogrifose, emagrecimento e linfadenopatia, além do comprometimento do baço.

#### 4.13 Exame clínico dos cães das três etapas de coletas de sangue

A proporção de animais sem sinais clínicos para a LV foi maior que a proporção de animais com sinais clínicos. Levando em consideração todos os cães analisados nas três etapas de coletas de sangue 71,6% (1422) não apresentaram sinal clínico sugestivo da LV, 27,5% (546) apresentaram pelo menos um sinal clínico da doença e 0,9% (17) dos questionários não tinham o registro da observação clínica do animal, todos referentes à segunda coleta.

Do total de 546 cães com presença de sinais clínicos, 16,8% (92) tinham sorologia positiva, 73,1% (399) sorologia negativa e 10,1% (55) sorologia indeterminada. Quando se avalia separadamente estas frequências por coleta é possível constatar que na segunda coleta, assim

como a proporção de cães com sorologia positiva foi maior que a primeira coleta e menor que a terceira coleta, os sinais clínicos presentes também tiveram o mesmo movimento. Tal fato é constatado ao comparar o grupo do soropositivo com presença e ausência de sinais clínicos, respectivamente: primeira coleta – 14,8% e 8,8%; segunda coleta – 24,8% e 19,1%; terceira coleta – 13,3% e 3,8%.

Já no grupo dos cães com resultado indeterminado o movimento foi diferente. Observou-se aumento na proporção de cães com sinais clínicos ao longo das três coletas e aumento da proporção dos cães sem sinal clínico da primeira para a segunda coleta, com redução na terceira coleta. Comparando, então, o grupo do resultado indeterminado com presença e ausência de sinais clínicos, verificou-se respectivamente: primeira coleta – 5,1% e 5,3%; segunda coleta: 14,0% e 8,0%; terceira coleta – 18,3% e 6,1%.

O grupo dos cães com sorologia negativa apresentou movimento diferenciado dos demais ao comparar a presença e ausência de sinais clínicos, respectivamente: primeira coleta – 80,0% e 85,9%; segunda coleta – 61,2% e 72,9%; terceira coleta – 68,3% e 90,1%.

Ao analisar a ausência de sinais clínicos nos cães em cada coleta, observa-se: 69,0% (660/957) na primeira, 75,6% (450/595) na segunda e 72,3% (313/433) na terceira, conforme gráfico 14.

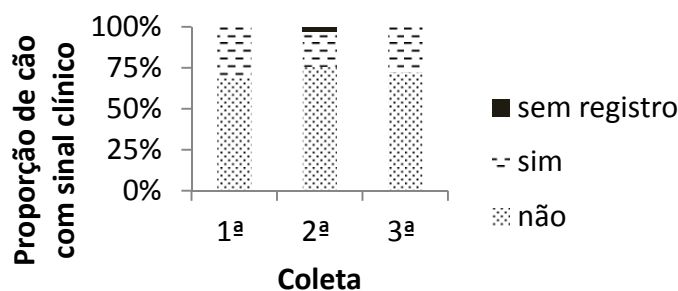


Gráfico 14: Proporção de cão com sinal clínico nas três coletas de sangue, Juatuba, 2010 a 2011.

Na 1ª coleta foram 297 os cães que apresentaram um total de 530 sinais clínicos o que representa 1,8 sinal/cão. Na 2ª coleta foram 129 os cães com 189 sinais clínicos registrados, o que

representa 1,5 sinal/cão. Na 3ª coleta foram 120 os cães com 194 sinais clínicos, o que representa 1,6 sinal/cão.

Os sinais clínicos registrados por grupo de animais com sorologia positiva, negativa e indeterminada constam na tabela 16 e as maiores frequências de cada sinal em cada coleta no gráfico 15. Observa-se que a linfadenopatia na terceira coleta obteve frequência muito acima das demais nas coletas anteriores. Todos os sinais clínicos estiveram presentes tanto no grupo de cães com resultado positivo quanto no grupo de cães com resultados negativo e indeterminado.

Observa-se que os sinais clínicos referentes a onicogribose, lesão de pele e alopecia, foram os mais frequentes tanto entre o total de cães examinados quanto em cada grupo com resultado distinto na sorologia, com a ressalva que linfadenopatia obteve a segunda maior

frequência no grupo do resultado indeterminado. Outro destaque dentre estes sinais é a lesão de pele no grupo dos soropositivos com maior frequência quando comparado aos demais.

Ao comparar os sinais clínicos presentes somente nos grupos de positivos e negativos, excluindo o grupo dos resultados indeterminados, constatou-se a alteração nos valores, mas não na sequência de maior frequência.

Ao considerar o exame clínico dos cães participantes de todas as etapas da coleta de sangue, observa-se que dentre os sinais clínicos mais presentes ocorre variação na frequência entre uma coleta e outra, conforme gráfico 15.

Tabela 16: Distribuição da frequência de cães com sinais clínicos por grupo de resultado sorológico, Juatuba, 2010 a 2011.

Sinal clínico	Resultado sorológico – IFI							
	Positivo (92) 16,8%		Negativo (399) 73,1%		Indeterminado (55) 10,1%		Total (546) 100,0%	
	n	%	n	%	n	%	N	%
onicogribose	36	39,1	141	35,3	20	36,4	197	36,1
lesão de pele	43	46,7	117	29,3	9	16,4	169	31,0
Alopecia	23	25,0	77	19,3	12	21,8	112	20,5
emagrecimento	14	15,2	57	14,3	9	16,4	80	14,7
linfadenopatia	12	13,0	52	13,0	14	25,5	78	14,3
ceratoconjuntivite	14	15,2	53	13,3	9	16,4	76	13,9
pelo opaco	11	12,0	35	8,8	5	9,1	51	9,3
Tosse	3	3,3	27	6,8	3	5,5	33	6,0
Apatia	8	8,7	13	3,3	2	3,6	23	4,2
Vômito	1	1,1	16	4,0	3	5,5	20	3,7
Hiperq. focinho*	6	6,5	11	2,8	0	0,0	17	3,1
Coriza	2	2,2	11	2,8	1	1,8	14	2,6
Diarreia	3	3,3	10	2,5	1	1,8	14	2,6
paresia trem posterior	0	0,0	12	3,0	1	1,8	13	2,4
mioclonia	1	1,1	8	2,0	1	1,8	10	1,8
edema de pata	2	2,2	4	1,0	0	0,0	6	1,1

\*Hiperq. focinho: hiperqueratose focinho

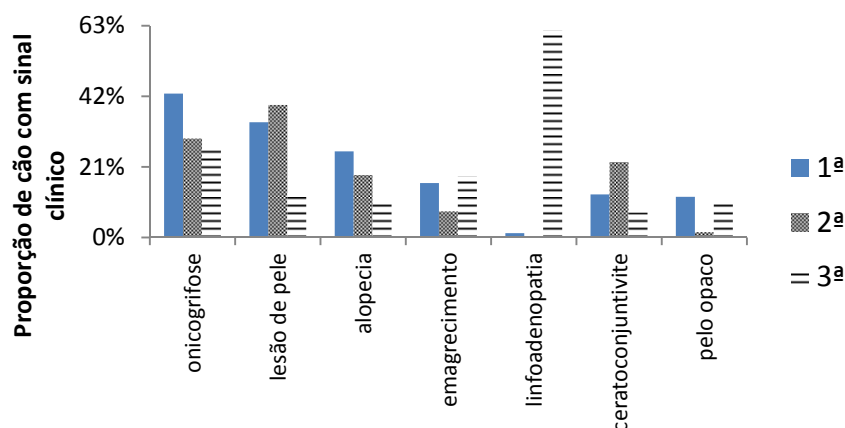


Gráfico 15: Proporção de cães com os sinais clínicos mais frequentes nas três etapas do estudo, Juatuba, 2010 a 2011.

#### 4.14 Análise multivariada dos sinais clínicos nos cães

A regressão logística foi feita comparando o quadro clínico presente nos dois grupos com resultados extremos, grupo do soropositivo e grupo do soronegativo, optando-se por não incluir o grupo dos cães com resultado indeterminado.

Os dezesseis sinais clínicos observados nos cães no momento das três coletas de sangue foram analisados pela regressão logística univariada ( $p < 0,20$ ) para a pré-seleção dos sinais clínicos que integraram o modelo multivariado, o qual empregou um nível de significância com  $p < 0,05$ . Foram identificados 253 animais positivos. A presença de vômito, tosse, diarreia, coriza, mioclonia, edema da pata e paresia não permaneceram no modelo preliminar pela sua baixa significância estatística (Tabela 17).

Tabela 17. Análise univariada dos sinais clínicos observados nos cães soropositivos e soronegativos das três etapas de coleta de sangue em Juatuba, 2010 a 2011.

Sinal clínico	Odds Ratio (OR)	p	Intervalo de Confiança 95%	
Vômito	0.358	0.323	0.047	2.743
Tosse	0.737	0.621	0.219	2.473
Diarreia	1.965	0.316	0.525	7.347
Coriza	1.037	0.963	0.223	4.817
Ceratoconjuntivite	1.591	0.140	0.859	2.945
Mioclonia	0.756	0.795	0.092	6.235
Edema de pata	2.548	0.291	0.449	14.447
Paresia*				
Apatia	4.325	0.002	1.736	10.774
Pelo opaco	2.716	0.006	1.341	5.503
Alopecia	2.078	0.004	1.262	3.421
Lesão de pele	2.565	0.001	1.739	3.782
Onicogrifose	1.943	0.001	1.295	2.913
Hiperqueratose no focinho	4.852	0.002	1.757	13.398
Linfadenopatia	3.932	0.000	1.833	8.435
Emagrecimento	1.984	0.029	1.074	3.666

\*Paresia: excluída do modelo pela baixa frequência.

A presença de apatia, pelo opaco, alopecia, lesão de pele, onicogribose, hiperqueratose no focinho, linfadenopatia, emagrecimento e ceratoconjuntivite tiveram suficiente significância para entrarem no modelo. O modelo final (Tabela 18) ficou integrado pelas variáveis hiperqueratose no focinho (OR=3,97 IC=1,40- 11,29 p = 0,010), linfadenopatia (OR=3,31 IC=1,52- 7,22 p = 0,003), apatia (OR=3,29 IC=1,28- 8,41 p = 0,013) e lesão de pele (OR=2,20 IC=1,48-3,28 p = 0,001). Esses valores significam que dentre os cães amostrados

a chance de ter um dos quatro sinais clínicos foi maior para estar presente nos cães soropositivos quando comparados aos soronegativos: hiperqueratose no focinho com chance 3,97 vezes maior, linfadenopatia com chance de 3,31 maior, apatia com chance de 3,29 maior e lesão de pele chance de 2,20 maior.

O modelo foi testado e considerado adequado pelo teste de Hosmer-Lemeshow, probabilidade 0,5079 (>0,5).

Tabela 18. Modelo final da análise multivariada com nível de significância de 0,05 dos sinais clínicos observados nos cães das três etapas de coleta de sangue em Juatuba, 2010 a 2011.

Sinal clínico	Odds Ratio (OR)	p	Intervalo de confiança 95%	
Hiperqueratose no focinho	3,977	0,010	1,401	11,290
Linfadenopatia	3,317	0,003	1,523	7,227
Apatia	3,293	0,013	1,289	8,409
Lesão de pele	2,205	0,001	1,481	3,284

#### 4.15 Quadro clínico dos cães sororreagentes

Ao analisar os 253 cães sororreagentes, 61,7% (n=156) foram assintomáticos e 36,4% (n=92) apresentaram pelo menos um dos sinais avaliados e 1,9% (n=5) estavam sem registro desta informação no questionário da segunda coleta. Na 1ª coleta foram 102 cães soropositivos dos quais 43,1% (44/102) apresentaram sinais clínicos e 56,9% (58/102) não; na 2ª coleta dos 123 cães soropositivos 26,0% (32/123)

apresentaram sinais, 69,9% (86/123) não, e na 3ª coleta dos 28 cães sororreagentes 57,1% (16/28) apresentaram sinais clínicos e 42,9% (12/28) não (Gráfico 16).

Dentre os animais sororreagentes e que apresentaram sinais clínicos (92/253) observou-se que a lesão de pele seguida da onicogribose e alopecia tiveram maior frequência, conforme gráfico 17.

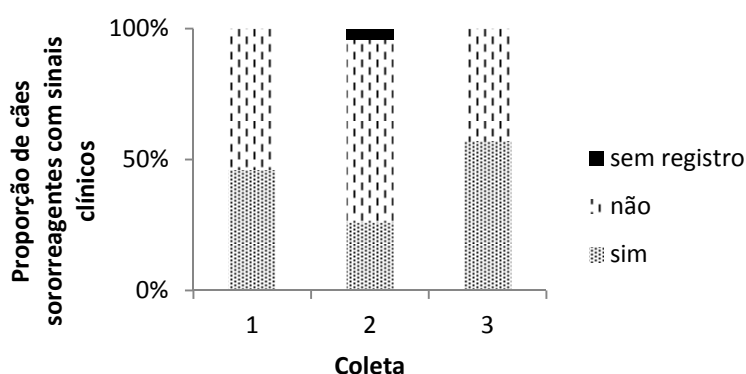


Gráfico 16: Proporção de cães sororreagentes com presença de sinais clínicos nas três etapas do estudo, Juatuba, 2010 a 2011.

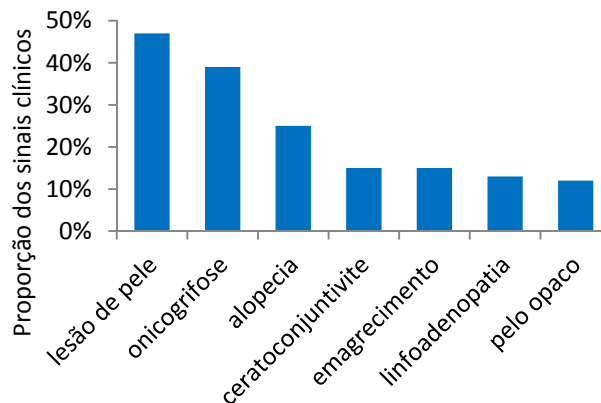


Gráfico 17: Distribuição dos sinais clínicos mais frequentes nos cães sororreagentes amostrados em Juatuba, de 2010 a 2011.

## BLOCO II ENTREVISTA – QUESTIONÁRIO DA 1ª COLETA

Foram avaliadas variáveis relacionadas aos perfis sorológicos da LVC (Anexo 14) e diversas interações foram testadas resultando no modelo final de regressão (Anexo 15), composto por seis variáveis, com nível de significância  $p < 0,05$ . A modelagem foi testada e considerada adequada pelo teste de Hosmer-Lemeshow com valor da probabilidade  $>0,05$ .

### 4.16 Características da população humana - entrevistados

Foram visitados 957 domicílios distribuídos em 34 bairros de Juatuba no momento da 1ª coleta. O critério de retorno às coletas subsequentes foi o cão inicialmente selecionado na pesquisa, por isso muitos entrevistados não foram necessariamente os mesmos que responderam ao 1º questionário, mas eram, também, responsáveis pelo animal na residência. Foram 595 e 433 os entrevistados na 2ª e 3ª etapas da coleta de sangue do cão, respectivamente.

Estas visitas foram bem aceitas pelos moradores dos domicílios amostrados que permitiram a entrada da equipe de campo em suas residências para o preenchimento dos questionários e coleta de sangue do animal participante do estudo.

### 4.16.1 Perfil demográfico e socioeconômico do entrevistado

A faixa etária predominante entre os entrevistados foi de 26 a 50 anos (49,7%  $n=476$ ), seguida das faixas de 51 a 65 anos (25,8%  $n=247$ ), de 18 a 25 (14,1%  $n=135$ ) e de 66 a 103 anos (9,8%  $n=94$ ), conforme mostra a tabela 19. A idade média foi de 43,3 anos, mediana de 44 anos e desvio padrão de 18,4. Os entrevistados com idade avançada possuíam cognição preservada.

Sobre a escolaridade destes entrevistados, verificou-se proporções aproximadas entre os 30,8% com ensino primário ( $n=295$ ), 27,4% com ensino fundamental ( $n=262$ ) e 28,1% com ensino médio ( $n=269$ ) e proporções menores entre os 7,5% ( $n=72$ ) que não possuíam algum grau de instrução e os 5,5% ( $n=53$ ) que possuíam ensino superior ou mais. Faltaram registros em 0,6% ( $n=6$ ) dos questionários. Estes dados constam na tabela 19.

Em relação ao quantitativo de moradores por imóvel visitado, verificou-se predomínio de 77% ( $n=737$ ) de 2 a 5 moradores, dos quais 37,3% com 2 e 3 moradores e 39,7% com 4 e 5 moradores; seguidos de 14% ( $n=134$ ) com 6 ou mais moradores e 7,4% ( $n=71$ ) com até 1 morador. O restante de 1,6% ( $n=15$ ) o entrevistado não soube responder ou não foi registrada a resposta no questionário (Tabela 19). Mais da metade dos imóveis (53,7%, 514/957) contou com a presença de 4 ou mais moradores.



Quanto ao nível socioeconômico, a renda familiar ficou concentrada na faixa até três salários mínimos, representada por 80,8% (n=773) dos entrevistados, sendo que 32,1% (n=307) responderam até um salário mínimo. Outros 10,4% (n=100) responderam que a família recebia entre três e cinco salários mínimos, e 5,0% (n=48) acima de cinco salários mínimos (Tabela 19). Em 2010 o salário mínimo era de R\$510,00 (quinhentos e dez reais).

Ao comparar a frequência das variáveis relacionadas aos entrevistados (idade, escolaridade, número de moradores e número de salário mínimo por imóvel) por grupo, levando em consideração o resultado sorológico do cão positivo em um grupo e no outro os cães negativos e com resultado indeterminado, não foi observada diferença significativa entre os

mesmos, com exceção da variável renda familiar. Esta, acima de um salário mínimo, juntamente com as variáveis água tratada e presença de rede de esgoto, compoem a variável nominada ERA (OR=0,46 p=0,01), apresentou 0,46 vez a chance do cão se infectar para a LV, ou incremento na chance de 2,2(1/0,46) vezes de estar protegido para LV morando em imóvel com estas características quando comparado aos outros com renda familiar inferior e sem os serviços citados de saneamento básico.

Observa-se na tabela 19 que a renda familiar até 3 salários mínimos dos entrevistados do grupo de cães positivos apresentou maior proporção (82,7%) quando comparada ao grupo dos resultados sorológico negativo e indeterminado (80,2%).

Tabela 19: Distribuição de frequências das variáveis relacionadas à idade, escolaridade e condições socioeconômicas dos entrevistados em Juatuba, 2010 a 2011.

Variável	Resultado IFI					
	positivo=26,4%		negativo + indeterminado=73,6%		Total	
	n=253	%=100,0	n=704	%=100,0	n=957	%=100,0
<b>IDADE</b>						
18-25	48	19,0	87	12,4	135	14,1
26-50	128	50,6	348	49,4	476	49,7
51-65	52	20,6	195	27,7	247	25,8
66-103	25	9,9	69	9,8	94	9,8
sem registro	0	0,0	5	0,7	5	0,5
<b>ESCOLARIDADE</b>						
analfabeto	22	8,7	50	7,1	72	7,5
primário	66	26,1	229	32,5	295	30,8
fundamental	82	32,4	180	25,6	262	27,4
Médio	70	27,7	199	28,3	269	28,1
≥ 3º grau	12	4,7	41	5,8	53	5,5
sem registro	1	0,4	5	0,7	6	0,6
<b>Nº MORADOR</b>						
≤ 1	17	6,7	54	7,7	71	7,4
2-5	197	77,9	540	76,7	737	77,0
≥ 6	37	14,6	97	13,8	134	14,0
sem registro	1	0,4	5	0,7	6	0,6
não sabe	1	0,4	8	1,1	9	0,9
<b>Nº SALÁRIO MÍNIMO</b>						
≤ 1	94	37,2	213	30,3	307	32,1
> 1 e ≤ 3	115	45,5	351	49,9	466	48,7
> 3 e ≤ 5	24	9,5	76	10,8	100	10,4
> 5	12	4,7	36	5,1	48	5,0
não sabe	8	3,2	28	4,0	36	3,8

#### 4.16.2 Conhecimento do entrevistado sobre a leishmaniose visceral

Para não influenciar nas respostas foram feitas perguntas abertas sobre o conhecimento do entrevistado em relação aos quesitos transmissão, reservatório, sintomas e medidas preventivas da LV.

Dos 957 entrevistados, 845 (88,3%) responderam que já tinham ouvido falar ou que conheciam a LV (Tabela 20). Quando perguntados sobre como se dá a transmissão da doença e quem transmite 38,0% (n=364) responderam não saber, 33,1% acertaram a resposta e 28,8% (n=276) se confundiram. Sobre o reservatório 55,6% (n=532) dos entrevistados disseram não saber, 26,2% responderam coerentemente e 18,2% (n=174) se confundiram. Sobre os sinais clínicos no cão, 66,1% (n=633) afirmaram não saber, 25,4% (n=243) responderam corretamente e 8,5% (n=81) se confundiram. Outra pergunta foi sobre as ações de prevenção e controle da doença e 72,2% (n=691) dos entrevistados disseram desconhecer, 18,6% (n=178) responderam pelo menos uma ação correta e 9,2% (n=88) se confundiram ou citaram ações inespecíficas para a LV. A maioria, 85,1% (n=814), não realizava nem uma medida de prevenção para si, 80,1% (n=767) não realizava medida de prevenção para o cão e 71,2% (n=681) também não adotava para o ambiente. Dos 14,1% (n=135) entrevistados que disseram realizar medidas de prevenção para si mesmo 0,9% (n=9) citaram o uso de repelente, 1,4% (n=13) cuidados gerais como ir ao médico e evitar o “mosquito”, 11,8% (n=113) ações inespecíficas a exemplo higienização, não entrar em contato com o cão doente e outras como uso de luvas e botas. Dos 18,9% (n=181) entrevistados que disseram realizar alguma medida de prevenção para o cão 2,0% (n=19) citaram a sorologia, 0,8% (n=8) a vacina, 3,4% (n=33) o uso de inseticida ou coleira com produto químico, 0,5% (n=5) a eutanásia dos

cães sororreagentes e os outros 11,4% (n=109) ações inespecíficas (cuidar, dar banho, não deixar ir à rua, observar) e 0,7% (n=7) equivocadas (usar raticida, cuidar da água, prender o cão). Dos 28,3% (n=271) que disseram realizar medidas de prevenção para o ambiente 6,2% (n=59) citaram aplicação de inseticida, 0,8% (n=8) retirada de lixo e matéria orgânica, 19,7% (n=189) ações inespecíficas (limpeza de modo geral) e 1,6% (n=15) ações equivocadas, como eliminar os ratos. Ao comparar os dados da tabela 20 do grupo dos positivos observam-se proporções semelhantes ao outro grupo (sorologia negativa e indeterminada), porém maiores quanto ao número de entrevistados dos cães positivos que não sabem sobre a transmissão e ações de prevenção e controle da LV, assim como respostas erradas neste grupo quanto ao reservatório e sintomatologia da doença.

As respostas foram individualmente avaliadas para comprovar o conhecimento ou não da referida doença. Observou-se que muitas respostas estavam relacionadas à leptospirose, raiva, dengue e esquistossomose. Outras citavam o ar, fezes, lixo, água contaminada e saliva como responsáveis pela leishmaniose. Sobre o agente transmissor além de flebotomíneo/mosquitopalha, foram citados: carrapato, caramujo, rato, cavalo, mico, vaca, cabrito, galinha, cão e gato. Sobre o reservatório foram registradas respostas citando água parada, larva, pernilongo, sujeira e urina. A baba foi o sinal clínico mais comum citado pelos proprietários que responderam equivocadamente sobre a sintomatologia da doença.

Foi perguntado aos 957 entrevistados sobre a ocorrência da LV e 5,1% (n=49) afirmaram já ter tido casos caninos no próprio domicílio e 8,8% (n=84) na vizinhança. Os que não souberam responder foram 63,7% (n=610) em ambos os lugares.

Tabela 20: Conhecimento do proprietário sobre a leishmaniose visceral por grupo de cães com resultados negativo, positivo e indeterminado na IFI, Juatuba, 2010 a 2011.

Variável	Resultado IFI					
	positivo=26,4%		negativo + indeterminado=73,6%		total	
	n=253	%=100,0	n=704	%=100,0	n=957	%=100,0
<b>CONHECE/OUVIU SOBRE A LV</b>						
Não	30	11,9	82	11,6	112	11,7
Sim	223	88,1	622	88,4	845	88,3
<b>SABE TRANSMISSÃO</b>						
resposta incorreta	69	27,3	207	29,4	276	28,8
resposta correta	86	34,0	231	32,8	317	33,1
disse não saber	98	38,7	266	37,8	364	38,0
<b>SABE RESERVATÓRIO</b>						
resposta incorreta	52	20,6	122	17,3	174	18,2
resposta correta	61	24,1	190	27,0	251	26,2
disse não saber	140	55,3	392	55,7	532	55,6
<b>SABE SINAL CLÍNICO NO CÃO</b>						
resposta incorreta	26	10,3	55	7,8	81	8,5
resposta correta	60	23,7	183	26,0	243	25,4
disse não saber	167	66,0	466	66,2	633	66,1
<b>SABE PREVENÇÃO/CONTROLE</b>						
resposta incorreta	19	7,5	69	9,8	88	9,2
resposta correta	45	17,8	133	18,9	178	18,6
disse não saber	189	74,7	502	71,3	691	72,2
<b>FAZ PREVENÇÃO PARA SI</b>						
Não	222	87,7	592	84,1	814	85,1
uso de repelente/mosquiteiro	2	0,8	7	1,0	9	0,9
cuidados gerais	3	1,2	10	1,4	13	1,4
ações inespecíficas para LV	24	9,5	89	12,6	113	11,8
sem registro	2	0,8	6	0,9	8	0,8
<b>FAZ PREVENÇÃO PARA O CÃO</b>						
Não	204	80,6	563	80,0	767	80,1
sorologia	4	1,6	15	2,1	19	2,0
vacina	4	1,6	4	0,6	8	0,8
inseticida/coleira	11	4,3	22	3,1	33	3,4
resposta incorreta	3	1,2	4	0,6	7	0,7
ações inespecíficas para LV	25	9,9	84	11,9	109	11,4
eutanásia de cão com LV	0	0,0	5	0,7	5	0,5
sem registro	2	0,8	7	1,0	9	0,9
<b>FAZ PREVENÇÃO PARA O AMBIENTE</b>						
Não	179	70,8	502	71,3	681	71,2
inseticida	18	7,1	41	5,8	59	6,2
retirada lixo e matéria orgânica	3	1,2	5	0,7	8	0,8
limpeza (de maneira generalizada)	47	18,6	142	20,2	189	19,7
resposta incorreta e/ou inespecífica	4	1,6	11	1,6	15	1,6
sem registro	2	0,8	3	0,4	5	0,5

#### 4.17 Características do imóvel

##### 4.17.1 Tipo e revestimento do imóvel:

Quanto ao tipo de moradia, a maioria representada por 73,7% (n=705) foi de casa, seguida de 21,3% (n=204) de barracões, 4,0% (n=38) de sítios e fazendas, 0,8% (n=8) de outras construções (posto de gasolina, ferro-velho, borracharias e depósitos) e 0,2% (n=2) de apartamentos.

Destes 957 imóveis, 90,4% (n=865) tinham reboco interno e 66,8% (n=639) reboco externo.

##### 4.17.2 Serviço de saneamento básico:

Em relação à água tratada e rede de esgoto 90,1% (n=869) e 37,5% (n=359) dos imóveis, respectivamente, eram favorecidos com estes serviços. A coleta de lixo pela Prefeitura tinha periodicidade distinta entre os bairros. Dos 88,1% (n=843) dos entrevistados que responderam contar com este serviço público 18,8% (n=180) disseram que a frequência era uma vez por semana e destes 21,1% (n=38) afirmaram queimar o lixo, também. Outros 63,8% (n=611) tinham a coleta de lixo pela Prefeitura de 2 a 3 vezes por semana e destes 8,7% (n=53) disseram queimar o lixo e 0,3% (n=2) enterrar, também. Outros 5,4% (n=52) contavam com o mesmo serviço por 4 ou mais vezes na semana e 5,8% (n=3) queimavam o lixo, também. O destino do lixo dado pelos moradores dos 11,9% (n=114) dos imóveis sem acesso à coleta de lixo municipal foi: 97,4% (n=111) queimar, 0,9% (n=1) enterrar ou 1,7%

(n=2) deixar a céu aberto. A compostagem não era uma prática realizada pelos moradores do município.

As variáveis água tratada e presença de rede de esgoto foram significativas no modelo final de regressão logística associadas à variável renda familiar com valor acima de um salário mínimo. A associação das três variáveis culminou com a única variável nominada ERA (OR=0,46  $p \leq 0,05$ ) significando fator de proteção à ocorrência da LV.

##### 4.17.3 Limpeza do peridomicílio:

Dos 957 imóveis visitados apenas 0,3% (3) entrevistados alegaram não possuir peridomicílio. Quanto ao tipo de peridomicílio, 58,2% (557) dos imóveis possuíam pisos constituídos de terra e cimento, 35,5% (340) somente de terra e 6,0% (57) somente de cimento (Gráfico 18). Foram 98,2% os proprietários que afirmaram realizar limpeza no peridomicílio. A frequência de limpeza variou de diária (22,9%), semanal (40,0%), quinzenal (5,9%) a esporádica (30,0%). O restante dos proprietários declarou não realizar limpeza (0,7%) ou as respostas não foram registradas (0,5%). A maioria dos domicílios tinha piso misto de terra e cimento e contavam com limpeza semanal.

Outra variável que compôs o modelo final da análise multivariada com significância de  $p \approx 0,05$  ( $p=0,06$  OR=0,71 IC 0,49-1,04) foi a limpeza diária do peridomicílio, com incremento na chance do cão estar protegido para LV em 1,4 vez (1/0,71).

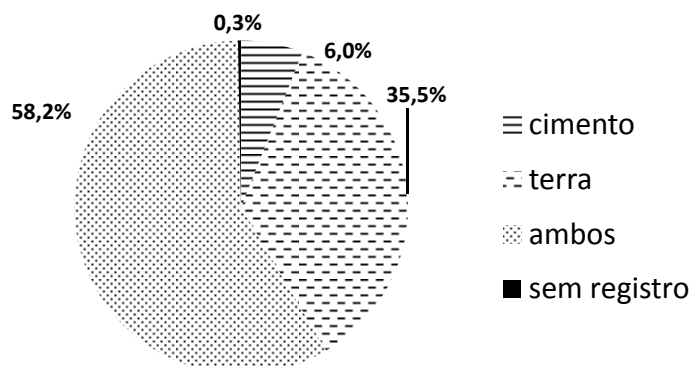


Gráfico 18: Tipo de piso dos imóveis dos proprietários dos cães do estudo, Juatuba, 2010 a 2011.

Observou-se que os mesmos 57 proprietários que disseram ter o peridomicílio somente com piso de cimento responderam ter jardim (n=34), plantas frutíferas (n=15), matéria orgânica (n=12), horta (n=9), entulho (n=6) e lixo exposto (n=2).

#### **4.17.4 Presença de plantas e outros no peridomicílio:**

A respeito do cultivo de plantas, do total de 957 imóveis, 86,4% (n=827) possuíam jardim, 57,4% (n=549) plantação de bananeiras, 77,6% (n=743) outras plantas frutíferas e 45,6% (n=436) possuíam hortas no peridomicílio. Além de plantas, os entrevistados afirmaram ter no peridomicílio: 10,0% (n=96) lixo exposto, 36,7% (n=351) entulho, 65,1% (n=623) matéria orgânica e 34,0% (n=325) mato.

#### **4.17.5 Uso de inseticida no imóvel:**

Foram 38,2% (366/957) os entrevistados que responderam fazer uso de inseticida no imóvel. Destes, 33,9% (n=124/366) disseram aplicar o produto somente no intradomicílio, 27,9% (n=102/366) somente no peridomicílio, e em ambos 36,1% (n=132/366). Um total de 2,2% (n=8/366) dos questionários não tinha o registro da resposta. Sobre a formulação do inseticida, considerando apenas os proprietários que disseram usar, 73,0% (267/366) era do tipo aerossol (spray, bomba e de tomada) e 18,8% (69/366) líquida; o restante de 8,2% (30/366) se referiu a outras formas ou associações.

#### **4.17.6 Presença de animais no imóvel:**

Em 34,6% (n=331) dos imóveis só havia o próprio cão participante da pesquisa, em outros 49,6% (n=475) dos domicílios de 2 a 3 cães, em 12,2% (n=117) de 4 a 5 cães e em 3,6% (n=34) mais de 6 cães. Quanto à presença de outros animais além do cão, em 66,4% (n=635) dos imóveis os entrevistados responderam afirmativamente. Destes, em 47,0% (450/957) havia galinha, em 26,1% (250/957) pássaro, em 21,3% (204/957) gato, em 11,5% (110/957) pato e em 4,5% (44/957) porco.

A maioria dos entrevistados, 87,5% (837/957), informou que o imóvel era visitado por animais: roedor 70,0% (n=584), gato 62,1% (n=520), cão errante 38,2% (n=320), gambá 32,4% (n=310) e

outros 9,3% (n=78), incluindo animais silvestres 5,9% (n=49), animais domésticos 2,5% (n=21) e associação destes 1,0% (n=8).

#### **4.17.7 Morte de animais no imóvel:**

Quando questionados sobre a ocorrência de morte de cães no imóvel, 56,4% (n=540) dos proprietários disseram ter ocorrido e destes 36,7% (n=351) sabiam a causa: 10,3% (n=36) por LV, 14,5% (n=51) por doenças infecciosas, 23,4% (n=82) por doenças não infecciosas, 9,5% (n=33) por idade avançada e 42,5% (n=149) por atos de violência. A classificação de doenças infecciosas ou não e de violência foi feita após avaliação do relato dos entrevistados. Cinomose, parvovirose e pneumonia foram as mais comuns dentre as doenças infecciosas. Câncer, picada de cobra, complicações pós-parto, intoxicação, infestação por pulga e carrapato foram mais citadas em doenças não infecciosas e outros agravos; e atropelamento, envenenamento, apedrejamento, enforcamento foram algumas citações dentre óbitos por violência. Destes 540 imóveis com relato de morte de animais, 27,6% (n=149) ocorreram nos seis meses que precederam a aplicação do questionário, 23,0% (n=124) entre os últimos seis meses a um ano da entrevista e 46,3% (n=250) há mais de um ano; em 1,7% (n=9) dos questionários não houve registro da data e 1,5% (n=8) dos proprietários não soube responder sobre a data.

#### **4.17.8 Características da vizinhança:**

Conforme relato dos entrevistados, dos 957 imóveis da pesquisa 90,7% (n=868) tinham terrenos baldios na vizinhança, 79,7% (n=763) muitas árvores nas proximidades e 62,7% (n=600) mata, também. Havia presença de córregos nas proximidades de 38,3% (n=367) destes imóveis. Quanto ao lixo, 39,5% (n=378) dos proprietários disseram que o mesmo ficava a céu aberto. Em relação à criação de animais na vizinhança 74,0% (n=708) dos entrevistados responderam afirmativamente com representação: galinha 88,7% (n=628), gado 44,1% (n=312), cavalo 30,6% (n=217), porco 24,7% (n=175), pato e peru 14,3% (n=101), cabrito 10,3% (n=73) e pássaro 2,0% (n=14).

O município de Juatuba não conta com o serviço de captura de cães errantes.

#### 4.18 Características do cão

##### 4.18.1 Sexo:

Houve maior frequência de cães machos (54,3%) na população canina estudada. Observa-se na

tabela 21 que esta frequência se mantém com proporções aproximadas entre os cães das duas coletas subsequentes, assim como dentre os animais sororreagentes, com variação entre 53,7% e 56,4%. A proporção de fêmeas variou de 43,6% a 46,3% nos grupos citados.

Tabela 21: Distribuição da frequência do sexo dos cães amostrados quanto às coletas realizadas e por grupo de resultado sorológico, Juatuba, 2010 a 2011.

	Sexo do cão				Total
	fêmea	%	macho	%	
<b>NÚMERO COLETA</b>					
1ª coleta	437	45,7	520	54,3	957
2ª coleta	266	44,7	329	55,3	595
3ª coleta	189	43,6	244	56,4	433
<b>SOROLOGIA</b>					
Resultado positivo	111	43,9	142	56,1	253
Resultados Negativo e indeterminado	326	46,3	378	53,7	704

##### 4.18.2 Idade

A maioria dos cães participantes deste estudo, representada por 69,5% (n=665), tinha idade até quatro anos, com predomínio da faixa etária

entre um e quatro anos (56,6%). Em 0,7% (7) dos questionários não foi registrada a idade do cão e 0,5% (5) de proprietários não soube dizer a idade dos animais, conforme gráfico 19.

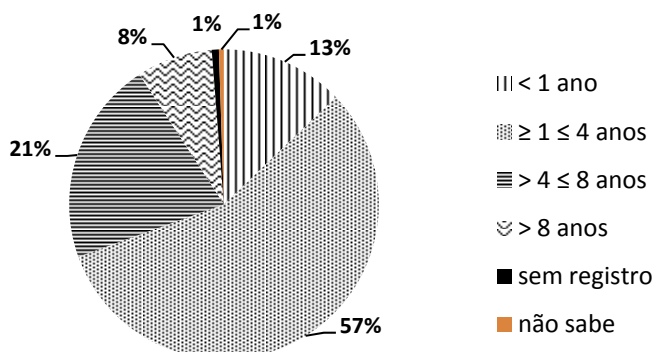


Gráfico 19: Faixa etária dos cães pesquisados, Juatuba, 2010 a 2011.

Ao avaliar a variável idade do cão com a soropositividade para a LV foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ), o que sugere que os cães acima de quatro anos possuem menos chance de se infectar ( $OR=0,53$ ), ou incremento na chance de 1,9 ( $1/0,53$ ) vez de estar

protegido para LV. Pela tabela 22 é possível verificar que os cães soropositivos entre um e quatro anos tiveram frequência relativa maior que o outro grupo, ocorrendo o inverso com a faixa etária entre quatro e oito anos.

Tabela 22: Faixa etária dos cães amostrados por grupo de resultado sorológico, Juatuba, 2010 a 2011.

Idade do Cão	IFI reagente		IFI não reagente e indeterminada		Total	
	n	%	n	%	n	%
< 1 ano	32	12,6	91	12,9	123	12,9
≥ 1 ≤ 4 anos	164	64,8	378	53,7	542	56,6
> 4 ≤ 8 anos	40	15,8	164	23,3	204	21,3
> 8 anos	16	6,3	60	8,5	76	7,9
sem registro	1	0,4	6	0,9	7	0,7
não sabe	0	0,0	5	0,7	5	0,5
Total	253	100,0	704	100,0	957	100,0

#### 4.18.3 Tipo de pelo: tamanho e cor

Observou-se a predominância de 77,6% (n=743) dos cães com pelo curto e 56,3% (n=541) de cor escura dentre os animais amostrados (Tabela 23). Foi usada a expressão “cor indefinida” em situações onde havia mistura de cor clara e escura sem registro de qual prevalecia. Os cães com cor indefinida totalizaram 15,5% (n=148) da população canina amostrada.

O estudo da variável tipo de pelo englobando tamanho e cor não apresentou relação significativa com a ocorrência da LV. Mesmo assim, observa-se na tabela 23 que a proporção de cães com pelo curto do grupo sororreagente foi maior que o grupo dos resultados negativo e indeterminado.

A cor escura também foi predominante entre os cães sororreagentes com proporção 1,9 vez maior quando comparada à cor clara (Tabela 24).

Tabela 23: Tamanho da pelagem dos cães amostrados por grupo de resultados sorológicos, Juatuba, 2010 a 2011.

Tipo de Pelo	IFI reagente		IFI não reagente e indeterminada		Total	
	n	%	n	%	n	%
Curto	206	81,4	537	76,3	743	77,6
Longo	46	18,2	165	23,4	211	22,0
sem registro	1	0,4	2	0,3	3	0,3
Total	253	100,0	704	100,0	957	100,0

Tabela 24: Cor da pelagem dos cães amostrados por grupo de resultados sorológicos, Juatuba, 2010 a 2011.

Cor do Pelo	IFI reagente		IFI não reagente e indeterminada		Total	
	n	%	n	%	n	%
Claro	71	28,1	196	27,8	267	27,9
Escuro	135	53,4	406	57,7	541	56,5
indefinido	46	18,2	102	14,5	148	15,5
sem registro	1	0,4	0	0,0	1	0,1
Total	253	100,0	704	100,0	957	100,0

#### 4.18.4 Porte

Os animais de grande porte foram minoria com representação de 24,6% (n=235), já os de pequeno e médio porte tiveram quantitativos bem próximos, 34,1% (n=326) e 36,1% (n=345), respectivamente. Observa-se na tabela 25 que no grupo dos cães sororreagentes o porte grande

apresentou proporção 1,4 vez maior que o grupo dos cães com sorologia negativa e indeterminada. Esta variável apresentou relação significativa ( $p < 0,05$ ) com a ocorrência de LVC com incremento na chance de 1,6 vez do cão se infectar quando comparado aos animais de pequeno porte.

Tabela 25: Porte dos cães amostrados por grupo de resultados sorológicos, Juatuba, 2010 a 2011.

Porte do Cão	IFI reagente		IFI não reagente e indeterminada		Total	
	n	%	n	%	n	%
pequeno	70	27,7	256	36,4	326	34,1
Médio	97	38,3	248	35,2	345	36,1
Grande	80	31,6	155	22,0	235	24,6
sem registro	6	2,4	45	6,4	51	5,3
Total	253	100,0	704	100,0	957	100,0

#### 4.18.5 Raça, tipo de alimentação e castração:

Os cães sem raça definida (SRD) somaram 75,2% (n=720) dos 957 cães amostrados. Dentre os 27,7% (236) de cães de raça, na sequência decrescente de maior frequência: pinscher 28,0% (n=66), poodle 22,9% (n=54), dachshund e pit Bull com 8,5% cada (n=20). Outras raças tiveram menor participação, totalizando 27,5% (n=65) variando de 9 a 2 animais, na sequência: rottweiler (3,8% n=9), pastor alemão (3,8% n=9), dálmata (3,4% n=8), fila (2,5% n=6), labrador (2,5% n=6), pastor belga (2,1% n=5), cocker (1,7% n=4), akita (1,3% n=3), weimaraner (1,3% n=3), pastor canadense (1,3% n=3), boxer (1,3% n=3), yorkshire (0,8% n=2), dogue alemão (0,8% n=2), sharpei (0,8% n=2). As outras raças totalizaram 4,7% (n=11) e tiveram a participação de um único animal: crista chinesa, schnauzer, fox paulistinha, doberman, chow chow, pointer, pequinês, lhasa-apso, jack terrier, mastin napolitano, spitz alemão. Um animal (0,1%) ficou sem registro da raça no questionário.

Quanto à dieta dos cães, 53% (507) se alimentavam exclusivamente de ração, 8,1% (78) de comida caseira e 38,7% (370) de ambas. Três raças foram apontadas com alimentação única por ração: pastor belga, akita e sharpei. Em dois (0,2%) questionários não foram registrados o tipo de alimentação animal.

Dos 957 cães amostrados 2,7% (n=26) eram castrados, sendo 1,1% (n=11) fêmeas e 1,6% (n=15) machos. Destes 26 animais castrados, 34,6% (9) apresentaram sorologia positiva com representação de 88,9% (8) de machos e 11,1% (1) de fêmeas.

#### 4.19 Cuidados preventivos com o cão

##### 4.19.1 Vacinação

Sobre a vacinação, 76,7% (n=734) dos proprietários responderam que os cães tomaram algum tipo de vacina; 22,1% (n=212) cães não tinham algum esquema de vacinação e 1,1% (n=11) não souberam responder. A cobertura vacinal antirrábica dentre os cães amostrados foi de 70,3% (n=673); da vacina polivalente de 18,7% (n=179) e contra a LV de 0,5% (n=5).

Dos 9 cães ditos como vacinados contra LV no questionário apenas 5 foram considerados levando em consideração as observações:

- 1 cão: vacina Leishtec, aplicadas as 3 doses iniciais e com reforço anual, sem registro das datas de aplicação no questionário;
- 4 cães: vacina Leishmune, aplicadas as 3 doses iniciais em todos,  $\frac{3}{4}$  tiveram reforço anual; um dos cães iniciou esquema em 2010 e não havia vencido o prazo para reforço. Outros dois cães iniciaram esquema de vacinação em 2009 e o outro em data anterior à este ano.
- 2 cães: proprietários não sabiam qual nome da vacina e afirmaram que os animais não receberam as 3 doses iniciais e nem foi feito reforço anual. Um foi dito ter iniciado esquema em 2009 e outro em data anterior.
- 2 registros com resposta “sim”: não constavam respostas quanto ao nome da vacina, esquema inicial, reforço e datas.

Os cinco (0,5%) animais que receberam a vacina contra LV possuíam cuidados especiais por seus donos diferenciando-os da maioria. A sorologia foi positiva em 4 animais, sendo três da primeira coleta e um da terceira coleta. Apenas um cão permaneceu soronegativo até o final do estudo. Este último, um pastor alemão residente no bairro Maria Regina 1, sem sinal clínico aparente, que já havia usado coleira, mas não



usava mais. Os demais cães, um residente no Centro, da raça schnauzer, sem sinal clínico aparente e o único a fazer uso da coleira; outros dois do bairro Satélite 1 com lesão de pele e um deles ceratoconjuntivite, das raças dogue alemão e pastor alemão; e o último cão, SRD, sem sinal clínico aparente, residente no bairro Santo Antônio. Quanto aos entrevistados, com exceção de um idoso (77 anos) os demais proprietários de cães que eram vacinados contra LV tinham entre 18 a 45 anos de idade. O entrevistado idoso possuía o primário e os demais ensino fundamental (2) e superior (2), todos com renda familiar maior que cinco salários mínimo. Todos conheciam a LV, sabiam da forma de transmissão da doença e usavam inseticida no ambiente como medida preventiva, assim como a maioria conhecia os sinais clínicos da doença. Apenas um citou cuidados gerais como medida de prevenção para si mesmo. Os domicílios eram completamente rebocados, com água tratada e apenas um tinha rede de esgoto. Em todos havia recolhimento do lixo pela prefeitura e relato de não deixar lixo exposto. Os imóveis recebiam visitas de outros animais e ao redor havia terrenos baldios. Dois entrevistados relataram morte de cães no imóvel por LV. Somente o cão com sorologia negativa era o único em seu imóvel, os demais contavam com a presença de quatro ou mais cães. Estes cães só se alimentavam de ração, não tinham acesso à rua, a maioria de porte grande, cor escura e pelo curto. Em todos era aplicado ectoparasiticida além das vacinas antirrábica e polivalente. Estes cães não viajaram e tinham resultado anterior de laboratório particular. Três destes cães deram sorologia positiva no exame particular, um resultado indeterminado e o outro sem registro.

Não foi possível o recolhimento de 80,0% (4) dos cães soropositivos e que tinham tomado vacina contra LV. Três proprietários se recusaram a entregar o cão para eutanásia e o cão residente no sítio só seria entregue pelo próprio dono que estava ausente. O retorno a este último imóvel teria de ser agendado.

#### **4.19.2 Uso de coleira repelente:**

Quanto ao uso da coleira, 1,0% (n=10) dos 957 proprietários afirmou que os cães já tinham usado, mas não usavam mais; destes, apenas 2 citaram o uso da marca Scalibor e afirmaram não ter feito a troca da coleira ao final do prazo de validade.

Foi registrado que outro 1,0% (n=10) de cães estava em uso da coleira sendo todas da marca Scalibor e, conforme relato dos proprietários, 60,0% (6) com troca trimestral e 30,0% (3) semestral. Quanto ao tempo de uso da coleira: 40,0% (4) dos cães entre 6 e 12 meses, 30,0% (3) dos cães entre 13 e 48 meses, 20,0% (2) dos cães com mais de 8 anos de uso. Em um (10,0%) questionário não havia informações sobre marca, periodicidade da troca e tempo de uso da coleira repelente.

Dos dez cães em uso da coleira um está dentre os cães que receberam a vacina contra a LV, residente no Centro. Tanto este cão citado como outros dois cães do bairro Maria Regina 1 deram sorologia positiva, dos quais dois proprietários recusaram à entrega para eutanásia e o terceiro cão havia morrido entre a coleta e a data da tentativa de recolhimento.

#### **4.19.3 Exame laboratorial**

Sobre a realização de exame laboratorial para o diagnóstico da LV em data anterior ao início da pesquisa 5,2% (n=50) das respostas foram afirmativas, 93,3% (n=893) negativas e 1,5% (n=14) os proprietários não tinham conhecimento. Dos 50 questionários com relato de exame laboratorial: 24 exames foram feitos em 2009 ou em data anterior, 14 feitos em 2010, outros 4 não sabiam a data e 8 estavam sem registro da informação. Deste total (50) de cães 36,0% (18) apresentaram algum sinal clínico. Dos 34 resultados conhecidos pelos proprietários 58,8% (20) foram negativos, 38,2% (13) positivos e 2,9% (1) indeterminado para LV; a maioria, 76,5% (26/34) processado em laboratório público (Tabela 26).

Tabela 26: Exame laboratorial para leishmaniose visceral realizado nos cães amostrados em data anterior ao início do estudo em Juatuba, 2010.

Laboratório	Resultado exame LV					total
	negativo	positivo	indeterminado	não sabe	sem registro	
Público	10	8	0	7	1	26
particular	7	4	1	1	0	13
público/particular	1	0	0	0	0	1
não sabe	1	0	0	1	0	2
sem registro	1	1	0	3	3	8
Total	20	13	1	12	4	50

#### 4.19.4 Uso de ectoparasiticida:

Os proprietários de 25,0% (239) dos cães responderam que não fazem uso de ectoparasiticida em seus animais e 75,0% (718) afirmaram o uso. A formulação para uso tópico foi a mais comum (87,9%) seguida da injetável (8,2%); ambas com predomínio de aplicação esporádica (69,4% e 98,3%, respectivamente), ou seja, com intervalos superiores a um mês.

#### 4.19.5 Local de permanência do cão:

Quanto à permanência dos cães durante o dia, 95,6% ficavam no peridomicílio, 2,5% no intradomicílio e 0,5% na rua, os outros 1,3% ficavam em mais de um lugar, conforme tabela

27. Não há diferença expressiva para a permanência do cão à noite: 96,1%, 3,3% e 0,2%, 0,3%, respectivamente. Do total de cães com permanência exclusiva no peridomicílio ou neste associado a outro local 25,6% (236/923) ficavam em canil.

Quando os entrevistados foram interrogados sobre o acesso dos cães à rua, dos 51,8% (496/957) de cães que tinham acesso à rua 55,4% (275/496) eram com frequência diária, 6,9% (34/496) semanal e 37,7% (187/496) esporádica; 22,0% (110/496) unicamente com a companhia do dono e destes um pouco mais da metade, 56,4% (62/110) usavam guia.

Tabela 27: Local de permanência diurna e noturna dos cães amostrados de Juatuba, 2010.

Local	diurno		noturno	
	sim	%	sim	%
intradomicílio	24	2,5	32	3,3
peridomicílio	915	95,6	920	96,1
ambos (intra/peridomicílio)	10	1,0	2	0,2
Rua	8	0,8	3	0,3
Total	957	100,0	957	100,0

#### 4.19.6 Tempo do cão com o proprietário:

De maneira geral, os quantitativos proporcionais entre a idade do cão e o tempo deste com o proprietário foram próximos (Tabela 28). Dos 542 cães com idade entre um e quatro anos apenas 19,1% estavam com o proprietário há menos de um ano, sendo que 71,2% estavam com o proprietário em tempo aproximado à idade

e verifica-se confundimento na resposta por 9,4% dos proprietários, por dizerem que os cães (n=51) estavam na companhia deles em tempo superior (> 4anos) à idade dos animais. Os cães com idade superior a quatro anos somaram 280 e destes 243 (86,8%) estavam com os proprietários a mais de quatro anos, também.

Tabela 28: Relação entre a idade e tempo com o proprietário dos cães amostrados de Juatuba, 2010.

Tempo com o cão (ano)	Idade do cão				sem registro	não sabe	total
	< 1	≥ 1 e ≤ 4	> 4 e ≤ 8	> 8 anos			
< 1	120	104	12	0	2	2	240
≥ 1 e ≤ 4	2	386	25	0	4	2	419
> 4	1	51	167	76	0	0	295
não sabe	0	1	0	0	1	1	3
Total	123	542	204	76	7	5	957

#### 4.20 Trânsito dos animais:

Em relação à procedência dos cães 74,1% (n=709) eram de bairros de Juatuba e 23,4% (n=224) de outros municípios, o restante de 2,5% (n=24) os proprietários não souberam responder (Tabela 29).

Dos 224 cães adquiridos fora de Juatuba:

- 38,4% (86) eram de Belo Horizonte,
- 30,4% (68) dos municípios limítrofes à Juatuba: Betim 16,5% (37/224), Mateus Leme 8,5%

- (19/224), Esmeraldas e Florestal 4,4% (10/224) com mesmo quantitativo, São João de Bicas 0,9% (2/224), Igarapé não houve registro,
- 28,6% (64) de outros municípios do estado de Minas Gerais, tendo Contagem a maior proporção equivalente a 12,1% (27/224). Os outros 27 municípios do estado contribuíram com 1 ou 2 cães.
- 2,2% (5) dos outros estados da região Sudeste (Rio de Janeiro, São Paulo e Espírito Santo),
- 0,4% (1) do estado do Pará na região Norte do Brasil.

Tabela 29. Município de procedência dos cães amostrados por bairro de Juatuba, 2010.

Bairro	Procedência do cão							Total
	Juatuba	BH	Limítrofes	outros MG	SP, RJ,		não sabe	
					ES	Pará		
Bela Vista	24	5	1	2	1	0	1	34
Boa Vista	40	5	5	4	0	0	2	56
Canaã	64	4	8	3	0	0	2	81
Carioca	3	1	1	1	0	0	0	6
Castelo Branco	8	2	0	0	0	0	0	10
Centro	44	5	2	7	1	1	0	60
Cidade Nova 1	60	3	3	7	0	0	1	74
Cidade Nova 2	44	5	5	2	0	0	2	58
Cidade Nova 3	31	1	0	4	0	0	0	36
Cidade Nova 4	1	1	0	0	0	0	0	2
Coqueiro Verde	18	2	2	0	0	0	1	23
Diamantina	5	2	3	1	0	0	0	11
Distrito industrial	1	0	0	1	0	0	0	2
Dona Francisca	16	1	2	0	0	0	0	19
Eldorado	18	1	4	1	0	0	0	24
Ilheus	7	3	0	0	0	0	0	10
Jardim Baviera	35	4	1	2	0	0	3	45
Jardim Boa Vista	21	4	1	0	0	0	2	28
Maria Regina 1	24	6	7	2	1	0	2	42
Maria Regina 2	22	3	2	2	0	0	1	30
Parque Alvorada	11	3	1	2	0	0	0	17
Ponte Nova	10	1	2	1	0	0	2	16
Quintas Boa Vista	5	1	2	2	0	0	0	10
Samambaia	27	4	0	2	0	0	0	33
Santo Antônio	37	1	2	4	0	0	1	45
São Gerônimo	15	0	0	0	0	0	0	15
Satélite 1	48	7	7	6	1	0	0	69
Satélite 2	26	3	4	6	0	0	3	42
Serra Azul	7	1	1	1	1	0	0	11
Sol Nascente	7	0	0	0	0	0	0	7
Veredas da Serra 1	7	1	0	0	0	0	0	8
Veredas da Serra 2	14	4	0	1	0	0	0	19
Vila Verne	7	2	2	0	0	0	0	11
Village	2	0	0	0	0	0	1	3
Total	709	86	68	64	5	1	24	957

Ao observar a procedência dos 664 cães de bairros de Juatuba as maiores proporções foram dos bairros: Centro (11,0% n=73), Canaã (10,0% n=67), Satélite 1 (8,4% n=56), Santo Antônio (7,1% n=47), Cidade Nova 1 (6,9% n=46) e Boa Vista (6,0% n=40). Outros 6,8% (45) dos proprietários desconheciam o bairro de procedência do cão.

Dentre os 957 cães amostrados 5,6% (n=54) viajaram antes do início da pesquisa, sendo o deslocamento para: BH 31,5% (n=17), municípios limítrofes de Juatuba: Betim, Mateus Leme e São Joaquim de Bicas, 9,3% (n=5); outros municípios do estado de MG 53,7% (n=29), Espírito Santo e São Paulo 3,7% (n=2) e Bahia 1,9% (n=1).

#### ENTREVISTA – QUESTIONÁRIOS DAS 2ª E 3ª COLETAS

Foram avaliadas mudanças ocorridas no período entre uma coleta e outra, em média seis meses, principalmente em relação ao ambiente e ao cão, mediante as respostas dos entrevistados.

#### 4.21 – Alterações relacionadas ao imóvel

##### 4.21.1 – Tipo de piso no peridomicílio

Em relação ao peridomicílio, na 1ª coleta 57 imóveis tinham o piso constituído exclusivamente de cimento e destes 37 participaram da 2ª coleta e 32 da 3ª coleta e não tiveram alteração. Dos 340 imóveis com piso de terra na 1ª coleta 54,4% (185) se mantiveram inalterados na 2ª coleta e outros 2,6% (9) tiveram modificação com a colocação de cimento em

parte do piso. Na 3ª coleta 34,0% (116) dos imóveis permaneceram com piso de terra e mais, 2,1% (7) incrementaram parte da área com cimento. Em termos de proporção, considerando o quantitativo de imóveis visitados nas 3 coletas e o quantitativo de piso com área total ou parcial de terra foram 93,7% (897/957) na 1ª coleta, 89,9% (535/595) na 2ª e 88,9% (385/433) na 3ª coleta. A alteração ocorrida foi a mudança do piso exclusivamente de terra para terra e cimento juntos.

##### 4.21.2 – Uso de inseticida no imóvel

Quanto ao uso de inseticida no imóvel, 591(61,8%) dos 957 entrevistados na 1ª coleta responderam não utilizar o produto. Destes, 17,0% (101) dos 595 entrevistados responderam na 2ª coleta que aplicaram o produto e 4,2% (18) em 433 mantiveram o uso entre a 2ª e 3ª coleta. Dos 38,2% (366) de entrevistados que desde o início da pesquisa afirmaram usar inseticida no imóvel, 21,7% (129/595) não o fizeram entre a 1ª e 2ª coletas e 12,5% (54/433) também não entre a 2ª e 3ª coletas. Proporcionalmente, houve um aumento na porcentagem dos imóveis em que não era aplicado inseticida, passando de 61,8% na 1ª coleta e 65,7% na 2ª coleta para 73,2% na 3ª coleta. Observa-se diminuição no uso de inseticida no imóvel.

Dos 199 entrevistados na 2ª coleta e 109 da 3ª coleta que disseram usar inseticida no imóvel, 151 e 90, respectivamente, souberam informar a frequência de uso, com predomínio (79,7%) de intervalos superiores a um mês (Tabela 30). Este detalhamento não constava no questionário da 1ª coleta.

Tabela 30 - Frequência de uso de inseticida nos imóveis entre as coletas de sangue em Juatuba, 2010 a 2011.

Frequência inseticida	Uso de inseticida no imóvel					
	2ª coleta	%	3ª coleta	%	Total	%
Diária	14	9,3	2	2,2	16	6,6
Semanal	6	4,0	8	8,9	14	5,8
quinzenal	5	3,3	3	3,3	8	3,3
Mensal	6	4,0	5	5,6	11	4,6
> mensal	120	79,5	72	80,0	192	79,7
Total	151	100,0	90	100,0	241	100,0

#### 4.21.3 – Introdução de cães no domicílio

Quanto à presença de cães observa-se na tabela 31 que aproximadamente metade dos domicílios visitados nas 3 coletas possuíam de 2 a 3 cães, seguido dos domicílios com apenas o cão da pesquisa, com variação de 32,1% a 34,7%. Faltaram 22 registros do quantitativo de cães na

2ª coleta e 9 na 3ª coleta. Na aplicação do 2º questionário 114 entrevistados e no 3º questionário 88 entrevistados informaram sobre o número de cães introduzidos no domicílio entre uma coleta e outra. Em ambos os momentos observou-se o predomínio de acréscimo de 1 cão, com proporções de 62,3% (71/114) e 75% (66/88), respectivamente.

Tabela 31: Quantitativo de cães presentes nos domicílios visitados nas três coletas de sangue em Juatuba, 2010 a 2011.

Nº Cão	1ª coleta		2ª coleta		3ª coleta	
	Frequência	%	frequência	%	Frequência	%
1	331	34,6	199	34,7	136	32,1
2 a 3	475	49,6	273	47,6	221	52,1
4 a 5	117	12,2	64	11,2	45	10,6
≥ 6	34	3,6	37	6,5	22	5,2
Total	957	100,0	573	100	424	100

#### 4.21.4 – Morte de cães no domicílio

No 1º questionário 56,4% (540) dos entrevistados afirmaram ter havido morte de cães no domicílio, destes 65,0% (351) sabiam a causa e 27,6% (149) ocorreram nos últimos seis meses. No 2º questionário 11,4% (68) dos entrevistados

relataram óbito de cães no domicílio depois da 1ª coleta e destes 58,8% (40) sabiam a causa. No 3º questionário dos 8,8% (38) entrevistados que disseram ter ocorrido óbito de cães após a 2ª coleta 63,2% (24) relataram a causa. A causa dos óbitos de cães domiciliados junto aos cães da pesquisa consta na tabela 32.

Tabela 32: Causa de morte de outros cães do domicílio da pesquisa em Juatuba, 2010 a 2011.

Causa da morte	Nº de óbito de cão no domicílio					
	1ª coleta		2ª coleta		3ª coleta	
		%		%		%
eutanásia	10	2,8	0	0,0	0	0,0
LV	26	7,4	2	5,0	3	12,5
doença infecciosa	51	14,5	7	17,5	5	20,8
doença não infecciosa	82	23,4	8	20,0	6	25,0
velhice	33	9,4	2	5,0	1	4,2
violência	149	42,5	21	52,5	9	37,5
Total	351	100,0	40	100,0	24	100,0

#### 4.21.5 – Introdução de outros animais no domicílio

Na 2ª coleta, ao serem questionados sobre a introdução de outros animais além do cão, 13,1% (57) dos entrevistados responderam afirmativamente sobre a aquisição de gatos, galinhas, pássaro, coelho, faisão, peru, pato, porco, papagaio, porquinho-da-índia e hamster. Na 3ª coleta 7,2% (31) dos entrevistados

disseram ter adquirido novos animais nos últimos 6 meses, os mesmos citados no questionário anterior, com exceção do faisão, peru e hamster não citados, e a inclusão de codorna.

Foi feita classificação dos animais presentes nos domicílios visitados além do cão participante da pesquisa por domicílio: 1º questionário (957): 9,0% (86 mamíferos), 38,7% (370) aves, 18,7% (179) ambos; 2º questionário (595): 10,4% (62

mamíferos), 37,3% (222 aves), 18,5% (110) ambos; 3º questionário (433): 9,0% (39) mamíferos, 35,8% (155) aves, 18,2% (79) ambos.

#### 4.21.6 – Contato do cão da amostra com outros animais

Dos 595 e 433 entrevistados na 2ª e 3ª coletas, 79,2% (471) e 64,7% (280) disseram que o cão

da pesquisa tinha contato com outros animais além dos que existiam no domicílio. Os entrevistados que responderam afirmativamente citaram contato do cão da pesquisa principalmente com cães errantes e da vizinhança, 88,7% e 89,3% da 2ª e 3ª coletas, respectivamente, conforme tabela 33. Esta pergunta não foi feita durante a entrevista do 1º questionário.

Tabela 33. Frequência de contato do cão do estudo com outros animais além do domicílio, Juatuba, 2010 a 2011.

Animais de contato	2ª coleta		3ª coleta	
	n	%	n	%
outros cães	418	88,7	250	89,3
Gato	4	0,8	7	2,5
Aves	7	1,5	7	2,5
associação (cães/gato/ave e outros mamíferos)	42	8,9	16	5,7
Total	471	100,0	280	100,0

#### 4.22 – Alterações relacionadas ao cão da amostra

##### 4.22.1 – Consulta com médico veterinário

Nos 2º e 3º questionários foi perguntado ao entrevistado se o cão havia ido ao veterinário no período entre as coletas, sendo que 10,3% (61) e 9,9% (43) responderam que sim, respectivamente. As causas foram avaliadas e classificadas em três categorias: exame de LV, devido a sinais clínicos sugestivos de LV e outros motivos como vacina de rotina e outros. Nas 2ª e 3ª etapas as causas foram respectivamente por: 1,6% (1/61) e 4,7% (2/43) procuraram o profissional veterinário para realização de exame de LV, 4,9% (3/61) e 7,0% (3/43) devido a sinais clínicos no cão sugestivos da doença, 82% (50/61) e 83,7% (36/43) por motivos diversos. Os demais não constam a causa por desconhecimento do entrevistado. Todos os cães que fizeram exame para LV e os que apresentaram algum sinal sugestivo deram sorologia negativa.

##### 4.22.2 – Vacina contra leishmaniose visceral

No 1º questionário constava que 5 cães receberam a vacina contra LV e um deles constava, também, no 2º questionário, o que deve

ter sido por confundimento do proprietário porque o cão já havia tomado as 3 doses iniciais e não tinha dado o prazo para reforço anual. No intervalo entre a 2ª e 3ª coleta não houve vacinação contra LV nos cães da pesquisa.

##### 4.22.3 – Uso de coleira repelente

Durante a 1ª coleta 1,0% dos entrevistados relatou que os cães já tinham usado coleira repelente mas não usavam mais. Estes mesmos cães continuaram a não usar a coleira nas coletas subsequentes. Foi observado que 2 cães que usavam a coleira na 1ª coleta com tempo de uso maior (8 a 12 anos) não continuaram a usá-la, o que foi constatado na 2ª e 3ª coletas.

Na 2ª coleta 1,8% (11) dos cães usavam a coleira sendo que 36,4% (4) usavam desde a coleta anterior e 63,6% (7) eram iniciantes. Na 3ª coleta 0,9% (4) dos cães usavam a coleira, destes 50,0% (2) eram iniciantes, outro (25,0%) usava desde a 1ª coleta e o outro (25,0%) desde a 2ª coleta.

Em relação ao resultado sorológico destes cães, 10,0% (1/10) na 1ª coleta foram soropositivos e 27,2% (3/11) na 2ª coleta, dos quais 66,7% (2/3) já usavam coleira desde a etapa anterior e 33,3%

(1) eram iniciantes. Não houve cão soropositivo dentre os cães com uso da coleira na 3ª coleta.

Foram dezoito os cães que faziam uso da coleira no momento da coleta de sangue em alguma das três etapas deste estudo. Estes eram residentes em dez bairros distintos: Centro (1), Diamantina (1), Jardim Baviera (1), Jardim Boa Vista (3), Maria Regina 1 (6), Eldorado (1), Quinta da Boa Vista (1), Samambaia (1), Santo Antônio (2), Satélite 2 (3). Quanto ao perfil dos entrevistados destes cães 5,5% (1) eram analfabetos, 27,8% (5) tinham o primário, 33,3% (6) o ensino fundamental, 11,1% (2) ensino médio e 22,2% (4) curso superior. Metade dos entrevistados respondeu morar apenas uma pessoa no domicílio, 38,9% (7) de 2 a 5 moradores e 11,1% (2) seis ou mais moradores. A maioria (94,4%) destes entrevistados disse conhecer ou ter ouvido falar da LV, mas somente 55,5% (10) sabiam sobre a transmissão, 27,8% (5) sobre o reservatório da doença, 33,3% (6) sobre os sinais clínicos e 16,7% sabiam como prevenir a doença. O uso de inseticida no ambiente foi citado por 22,2% (4) dos entrevistados, além de 5,5% (1) que citaram o exame de sangue e o cão tinha exame anterior para LV. A moradia era na maioria (66,7%) casa, sítios somaram 11,1% (2) e barracos, ferro-velho ou depósito 22,2% (4). Algumas casas não tinham reboco interno (11,1%) e nem externo (27,8%). Em 22,2% (4) dos imóveis não tinha água tratada, em 88,9% não tinham rede de esgoto, em 11,1% não tinham coleta de lixo pela prefeitura sendo estes os bairros Diamantina e Quinta da Boa Vista, na maioria (72,2%) dos imóveis ocorria visita de outros animais. Foi relatada morte de cães no domicílio por 27,8% (5) dos entrevistados. Em relação à vizinhança 94,4% disseram ter terreno baldio, 72,2% relataram a presença de muitos animais, 38,9% afirmaram ter lixo exposto. Destes 18 cães 55,5% (10) eram fêmeas, 5,5% (1) tinha menos de um ano de idade, 55,5% (10) tinham até 4 anos de idade, 33,3% (6) entre 4 e 8 anos de idade e apenas 5,5% acima de 8 anos. Quanto à cor 61,1% (11) tinham cor clara e esta mesma proporção foi registrada para animal de porte grande, 94,4% (17) de pelo curto e 22,2% castrados. Os entrevistados disseram que 77,8% dos animais alimentavam-se exclusivamente de

ração. Dos 18 cães a metade era SRD e o restante das raças rotweiler, pit Bull, fila, schnauzer, weimaraner e labrador. Foram 16,7% os cães com acesso à rua, 44,4% (8) já estavam com o cão por mais de 3 anos. Foram 83,3% (15) os entrevistados que disseram usar ectoparasiticida no cão, 72,2% (13) deram vacina antirrábica, 38,9% a polivalente e somente 5,5% (1) vacina contra LV, 16,7% tinham feito exame anterior para LV, um com resultado indeterminado pelo laboratório particular (mesmo cão vacinado contra LV e com sorologia positiva neste estudo) e dois com resultado negativo pelo laboratório público. Os cães procedentes de Juatuba eram 44,4%, o restante era de Belo Horizonte, Betim, Mateus Leme e Rio de Janeiro. Em 27,8% (5) dos animais foram observados sinais clínicos e destes, 40,0% (2) eram soropositivos: um cão que havia morrido antes do recolhimento e outro de recusa. O cão soropositivo da primeira coleta e que havia morrido era da raça weimaraner procedente do Rio de Janeiro e que já estava com o dono a mais de cinco anos. Ele apresentava lesão de pele, mioclonia, onicogribose, paresia do trem posterior. O outro cão soropositivo que o proprietário recusou-se a entregá-lo era da raça fila e apresentou soroconversão entre as duas primeiras coletas. Desde o início já apresentava onicogribose e ceratoconjuntivite. Começou a usar a coleira após a primeira coleta de sangue. Este cão também estava com o dono há mais de cinco anos. Os outros dois cães assintomáticos e soropositivos os proprietários também se recusaram a entregá-los.

#### **4.22.4 – Exame laboratorial para leishmaniose visceral**

Além do exame laboratorial realizado nos três momentos da coleta de sangue dos cães os entrevistados informaram sobre exame sorológico extra, em laboratório particular e público para o diagnóstico da LV, conforme tabela 34. Os proprietários que sabiam do resultado laboratorial do cão informaram que 38,2% (13/34) foram positivos em data anterior à 1ª coleta, 11,1% (1/9) de positivos entre a 1ª e 2ª coletas e nenhum sabidamente positivo entre a 2ª e 3ª coletas.

Tabela 34: Exame laboratorial extra pesquisa para leishmaniose visceral em cães de Juatuba, 2010 a 2011.

Exame LV		Data de realização-exame extra de LV			
		< 1ª coleta	entre a 1ª e 2ª coleta	entre a 2ª e 3ª coleta	Total
Laboratório Resultado	particular	13	4	3	20
	público	26	8	0	34
	Ambos (part/pub)	1	0	0	1
	negativo	20	8	2	30
	positivo	13	1	0	14
	indeterminado	1	0	0	1
	sem registro	0	3	1	4

Os cães (13) que foram positivos antes da primeira coleta tinham exames realizados, a maior parte (61,5%), em laboratório público e destes 30,8% apresentavam sinais clínicos. Neste estudo, 38,5% (5) também apresentaram resultado positivo, sendo 40,0% (2) na primeira coleta, 20,0% (1) na segunda coleta e 40,0% (2) na terceira coleta; a maioria (60,0% 3) com positividade na diluição de 1:40. Estes cães eram residentes dos bairros Satélite 1 (4) e Santo Antônio (1). Apenas um cão do Satélite 1 foi necropsiado; os demais: um morreu, um o dono se recusou a entregar e outros dois foram solicitados agendamentos para contato com o próprio dono do cão.

Os 2,0% (12) de cães com diagnóstico laboratorial extra entre a primeira e segunda coletas realizaram o exame, a maioria (66,7%) em laboratório público. Um cão com resultado soropositivo pelo laboratório particular foi eutanasiado pelo Serviço Público, à pedido do proprietário. Foi registrada a presença de onicogribose no exame clínico da primeira coleta deste cão. Em 66,7% (8/12) destes cães houve registro de pelo menos um resultado indeterminado na IFI em alguma etapa do estudo, sem soroconversão detectada posteriormente. Em 25,0% (3) foram observados sinais clínicos sugestivos da LV.

O total de 0,7% (3) de cães com diagnóstico laboratorial extra entre a segunda e terceira coletas não apresentaram resultado positivo, todos feitos em laboratório particular e não apresentaram sinal clínico. No estudo foram soronegativos, também.

#### 4.22.5 – Reprodução

Na 2ª e 3ª coletas foi perguntado se a cadela estava prenha ou se havia dado cria nos intervalos semestrais das coletas. Foram registradas 14 cadelas prenhas e 37 que tinham dado cria referentes ao 2º questionário e 8 prenhas e 38 que deram cria referentes ao 3º questionário. Observou-se confundimento nas datas de observação das ocorrências pelos entrevistados.

#### 4.22.6 – Viagem do cão

Quanto às viagens, 5,7% (55/957) dos cães viajaram antes da 1ª coleta para 26 municípios, 1,3% (8/595) entre a 1ª e 2ª coletas para pelo menos 4 municípios porque alguns entrevistados desconheciam o local e 0,7% (3/433) para municípios distintos entre a 2ª e 3ª coletas. Os municípios relatados foram: Belo Horizonte, Betim, Contagem, Mateus Leme, Ibirité, Itaúna, São Joaquim de Bicas, Poços de Caldas, Lagoa Santa, Santa Luzia, Ribeirão das Neves, Rio Acima, Rio Casca, Luz, Nova Serrana, Confins, Bom Despacho, Macacos, Três Marias, Pedro Leopoldo, Pitangui, Itacarambi, São José dos Salgados, Esmeralda, Pequi. Os estados de destino foram São Paulo, Espírito Santo e Bahia.

#### 4.23 Análise multivariada – variáveis dos questionários

A distribuição das variáveis na análise univariada, referente ao perfil socioeconômico demográfico do entrevistado, conhecimento e práticas sobre a LV e características do cão e do ambiente foi feita levando em consideração a significância de  $p \leq 0,20$  e as pré-selecionadas constam na tabela 35.



Tabela 35. Variáveis pré-selecionadas na análise univariada com  $p \leq 0,20$  do questionário da primeira etapa do estudo em Juatuba, de 2010 a 2011.

Variável	Odds Ratio (OR)	p	Intervalo de confiança 95%	
Renda >1 sal.mín.	0,7037851	0,016	0,529344	0,9357125
Moradia (casa/apt.)	0,7542569	0,088	0,545679	1,042562
Reboco interno	0,6866652	0,100	0,438718	1,074743
Reboco externo	0,8215537	0,178	0,617169	1,093624
Água tratada	0,5634813	0,007	0,372662	0,8520084
Esgoto	0,6415925	0,003	0,479635	0,8582378
Retirada de lixo 2 e 3x/semana	0,748846	0,094	0,534043	1,050048
Retirada de lixo $\geq 4x$ /semana	0,6117197	0,184	0,296069	1,263897
Limpeza diária peridomicílio	0,6620554	0,020	0,467757	0,9370617
Peridomicílio de terra	1,861878	0,079	0,930835	3,724169
Peridomicílio terra/cimento	1,617962	0,165	0,819896	3,192843
Presença de entulho	1,211884	0,172	0,919764	1,596781
Presença matéria orgânica	1,212233	0,193	0,907454	1,619376
Ter ave e mamífero no imóvel além do cão	1,495934	0,019	1,068857	2,093657
Tempo $\geq 1$ ano de morte de cão no imóvel	0,6693474	0,032	0,463824	0,9659406
Saber causa da morte de cão no domicílio	0,6079375	0,008	0,421987	0,8758271
Ter $\geq 4$ cães no domicílio	1,271383	0,172	0,90069	1,794641
Ter introduzido mais cão no domicílio	1,64129	0,020	1,082478	2,48858
Ter mata nos arredores	1,322202	0,055	0,99452	1,757852
Ter muitas árvores nos arredores	1,600421	0,014	1,101857	2,324571
Ter animais nos arredores	1,283579	0,124	0,934075	1,763859
Ter galinha nos arredores	1,235093	0,161	0,919259	1,659439
Ter gado nos arredores	1,478293	0,007	1,115052	1,959863
Cão acima de 4 anos de idade	0,5404409	0,001	0,392465	0,7442094
Cor mista no cão (clara e escura)	1,401161	0,109	0,927839	2,11594
Porte médio do cão	1,443697	0,033	1,029943	2,023666
Porte grande do cão	1,672081	0,005	1,170435	2,388731
Pelo longo	0,718827	0,061	0,509074	1,015005
Alimentação comida caseira	0,6020944	0,112	0,321914	1,126132
Ficar no canil à noite	1,292478	0,094	0,957015	1,745532
Estar com o cão $\geq 3$ anos	0,650	0,003	0,490	0,861
Estar com o cão $\geq 5$ anos	0,507	0,000	0,353	0,727
Cão adquirido em Juatuba	0,8138276	0,192	0,59736	1,108738
Uso diário de ectoparasiticida	4,49554	0,108	0,718168	28,14088
Ter tomado vacina antirrábica	0,6279134	0,038	0,404706	0,9742259
Vacina contra LV	3,116	0,106	0,785	12,365
Uso de coleira repelente	2,144	0,153	0,753	6,106
Exame anterior de LV	2,713	0,003	1,396	5,273

As variáveis que se apresentaram como fator de proteção na análise univariada ( $p < 0,20$ ) foram: renda do proprietário maior que um salário mínimo; morar em casa ou apartamento quando comparados à barracos ou sítios e fazendas ou barracharia, ferro-velho e outras construções semelhantes; moradia com reboco interno e externo, com serviço de coleta de esgoto e água tratada, além da retirada de lixo 2 ou mais vezes na semana e limpeza diária do peridomicílio; tempo superior à um ano de morte de cão no domicílio e o proprietário saber a causa; cão com

idade superior à quatro anos; cão com pelo longo; cão com alimentação exclusiva de comida caseira; estar com o cão há mais de três anos; ter adquirido o cão em Juatuba e cão ter sido vacinado contra raiva animal.

As variáveis que se apresentaram como fator de risco (Tabela 35) na análise univariada ( $p < 0,20$ ) foram: ter o peridomicílio com a presença de terra, presença de entulho e matéria orgânica; ter outros animais no domicílio além do cão do estudo; ter introduzido cães no domicílio,

presença de quatro ou mais cães; ter nos arredores mata, muitas árvores, animais principalmente galinha e gado; cão com cores mistas (clara e escura), porte médio e grande; cão que fica no canil à noite. As variáveis que refletem cuidados do proprietário em relação ao cão e consagradas na literatura como fatores de risco apresentaram baixo valor de frequência inviabilizando a detecção de associação: uso diário de ectoparasiticida (0,3%), ter vacinado contra LV, usar coleira repelente e ter feito exame anterior para LV.

A análise de regressão logística (Tabela 36), com significância de  $p < 0,05$ , realizada no

Tabela 36. Modelo final das variáveis com  $p \approx 0,05$  sobre condições socioeconômicas dos entrevistados, características do cão e medida preventiva no ambiente para leishmaniose visceral em Juatuba, de 2010 a 2011.

Variável	Odds Ratio (OR)	p	Intervalo de confiança 95%	
ERA: coleta de esgoto, água tratada e renda $\geq 1$ salário mínimo	0,462017	0,012	0,252714	0,844670
cão > 4 anos de idade	0,531044	0,001	0,37891	0,744258
Porte grande	1,568489	0,016	1,086387	2,264532
Limpeza diária do peridomicílio	0,711190	0,065	0,494990	1,021822

O modelo foi testado e considerado adequado pelo valor encontrado de probabilidade  $> 0,05$  pelo teste de Hosmer-Lemeshow, probabilidade 0,1398.

### BLOCO III

#### 4.24 Análise espacial

A análise espaço-temporal relacionou o quantitativo de 253 cães soropositivos com a população canina de cada localidade, com a variável tempo em meses (Anexo 16) e identificou um *cluster* ( $p < 0,01$ ).

Os mapas de densidade de *Kernel* identificaram esta mesma área como sendo de alta concentração de casos, pouca densidade populacional canina e alta concentração dos valores da taxa de positividade (número de cães positivos/população canina de cada localidade) - figura 6. A autocorrelação espacial, Índice Moran Global para população ( $IM=0,66$ ;  $p < 0,01$ ) e para a taxa de positividade ( $IM=0,24$ ;  $p=0,01$ ) indicaram também a presença de *cluster* com alta significância (Anexo 17). As análises de

presente estudo obteve um modelo final composto por seis variáveis significativas: porte grande ( $OR=1,6$ ) identificado como fator de risco e a variável idade do cão superior a 4 anos ( $OR=0,5$ ), limpeza diária do peridomicílio ( $OR=0,7$ ) e melhores condições socioeconômicas, variável nominada ERA ( $OR=0,5$ ), incluindo renda  $\geq 1$  salário mínimo, água tratada e presença de rede de esgoto, como fatores de proteção. A variável limpeza diária do peridomicílio manteve-se no modelo final por ser uma variável de relevância e os valores de  $p$  e do intervalo de confiança estarem próximos do limite considerável.

*cluster*, valores atípicos e Índice Moran Local identificaram este *cluster* e foi encontrada, também, concordância com a análise espaço-temporal (Figura 7). A área identificada nas três análises foi interpretada utilizando imagens das bases de dados do programa Google Earth Pro. Esta área foi identificada como de recente expansão urbana, expressando grandes mudanças ambientais entre os anos 2005 e 2013 (Anexo 23).

Além deste *cluster* identificado na análise dos cães soropositivos (253) das três etapas de coleta de sangue outras três áreas foram observadas, porém sem significância estatística ( $p > 0,05$ ) - anexo 18.

Na figura 6 no quadro C a taxa de positividade refere-se ao número de cães soropositivos dividido pela população canina de cada localidade. A parte inferior do *cluster* engloba os bairros Samambaia, Dona Francisca, Carioca, Diamantina e Vila Verne. Este aglomerado apresentou risco relativo de 11,1 ( $p < 0,001$ ) - Anexo 16.

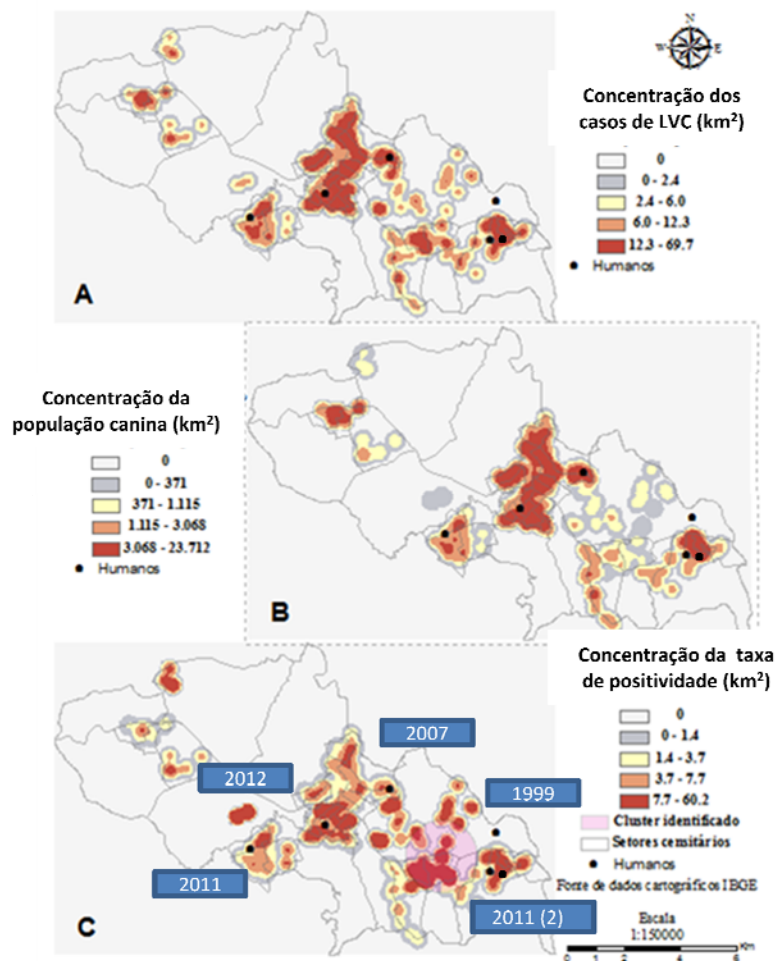


Figura 6. Estimativa das densidades, pelo método de *Kernel*, por casos caninos positivos (A), população canina (B) e taxa de positividade (C) da leishmaniose visceral em cães em Juatuba, 2010 e 2011.

As etapas (1, 2, e 3) foram analisadas individualmente, assim como o grupo representado pelas etapas 2 e 3 referente aos cães soropositivos que soroconverteram ao longo do acompanhamento da coorte. Somente o *cluster* referente à primeira coleta foi significativo com  $p < 0,01$  (Anexo 19) e apresentou resultado semelhante ao *cluster* referente ao conjunto de todas as etapas. Os demais não apresentaram significância estatística ( $p > 0,05$ ), conforme anexos 19, 20, 21 e 22.

Os bairros identificados com altas (HH) taxas de positividade da LVC foram: Carioca (3), Castelo Branco (1), Diamantina (2), Iheus (4), Serra Azul

(4), Veredas da Serra (3), Vila Verne (4) e Village (2). O *cluster* foi formado pelos bairros: Carioca (3), Castelo Branco (1), Diamantina (2), Iheus (3), Serra Azul (4).

O município de Juatuba possui áreas com características rurais e presença de extensa área de vegetação (Figura 8). A divisão geográfica do município por bairros consta no anexo 01.

O caso índice de LVH em Juatuba foi notificado no ano de 1999 e posteriormente foram registrados mais cinco casos até o ano de 2012 (Tabela 37).

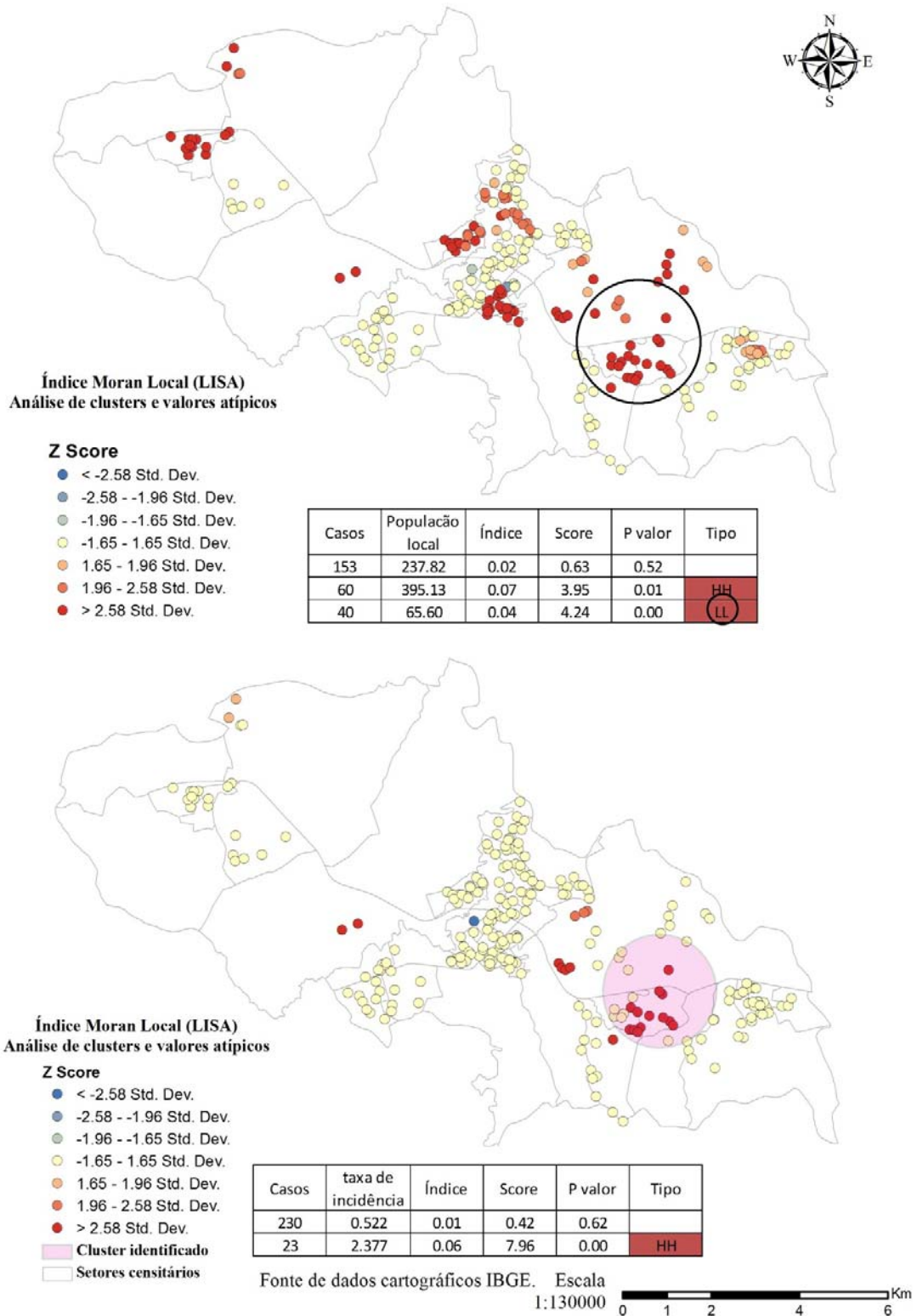


Figura 7. Índice Moran Local (LISA), análise de *clusters* e valores atípicos para população e para a taxa de positividade em cães, Juatuba, 2010 a 2011.

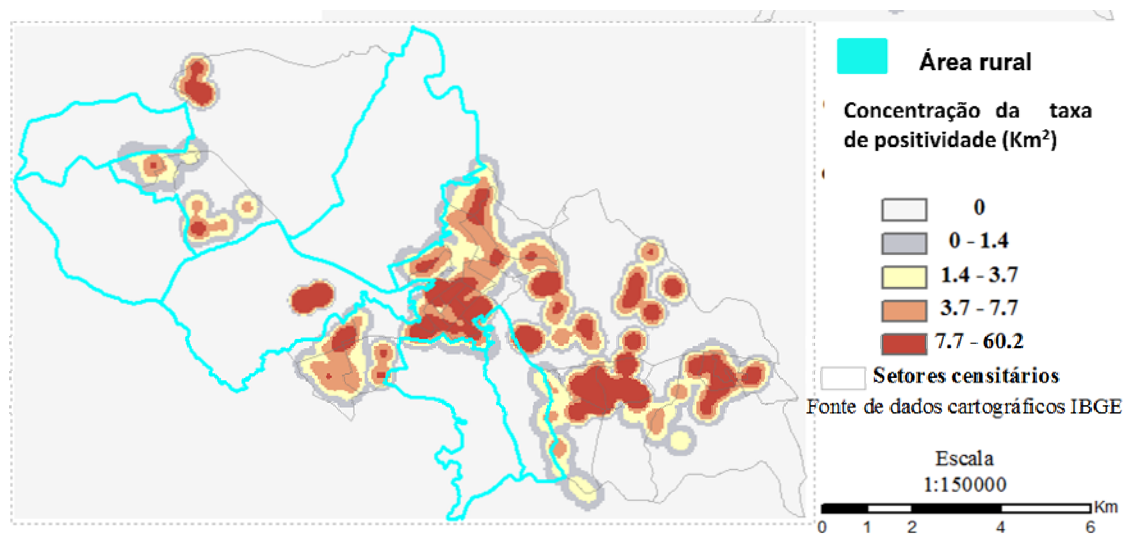


Figura 8. Delimitação do espaço geográfico em área rural (delimitada de azul) e área urbana (fora da delimitação de azul) em mapa de *Kernel* com taxas de positividade (número de cães soropositivos/população canina local) da LVC do município de Juatuba, de 2010 a 2011.

Tabela 37. Distribuição dos casos humanos de leishmaniose visceral notificados em Juatuba, de 1999 a 2012.

Ano	Gênero	Idade	Evolução do caso	Bairro
1999	feminino	25	cura	Santo Antônio
2007	masculino	37	cura	Satélite 1
2011	masculino	42	óbito	Eldorado
2011	masculino	59	cura	Maria Regina 2
2011	masculino	41	sem informação	Eldorado
2012	masculino	26	cura	Canaã

## 5. DISCUSSÃO

### BLOCO I

#### 5.1 Diagnóstico laboratorial e clínico

##### 5.1.1 Sorologia: coeficientes de morbidade: prevalência e incidência

Os resultados demonstraram valores altos nos coeficientes de prevalência em 10,7% e de incidência em 206 casos por 1.000 cães para o período anual de acompanhamento da coorte canina. Este achado retrata o dinamismo intenso na inter-relação dos fatores determinantes da LV em curto espaço de tempo em Juatuba. Em

estudo de coorte recente na capital mineira, área endêmica para a LV, autores registraram coeficiente de incidência com valores bem menores de 6,5/1000 cães e 11,2/1000 cães, ao usar ELISA com dois antígenos diferentes (Coura-Vital *et al.*, 2013).

Já foi constatado que a infecção em cães precede a doença em humanos (Oliveira *et al.*, 2001) e que, também, a presença de cães positivos em área próxima, além da presença de cães no domicílio, condições socioeconômicas desfavoráveis e áreas altamente vegetadas foram associadas com infecção por *L. infantum* (Borges, 2006; Belo *et al.*, 2013). Este panorama

epidemiológico da LV reforça a vulnerabilidade do município por apresentar características favoráveis à manutenção e expansão da doença.

Juatuba, de acordo com a proposta de classificação epidemiológica do MS, é considerado área de transmissão esporádica para LV (Manual..., 2006). O caso índice foi registrado em 1999 e as ações de controle desenvolvidas pelo município, desde então, consistiram no diagnóstico laboratorial de um pequeno quantitativo de cães representado por 192 amostras de sangue, por solicitação dos próprios proprietários; eutanásia dos soropositivos e a realização de um levantamento entomológico em 2009, com cobertura parcial do município, quando já se havia constatado mais dois casos humanos (2005 e 2007) de LV. Posteriormente, foram notificados mais três casos em 2011 e outro em 2012. O caso de 2005 relatado pelo SCZ-Juatuba não será considerado por não ter sido notificado no SINAN. Este problema não é apenas local, ocorre mundialmente mesmo em países em que a doença é de notificação compulsória (Leishmaniasis, 2013). Maia-Elkhoury *et al.* (2007) detectaram elevada subnotificação de casos e óbitos de LV no Brasil, o que influencia diretamente na classificação das áreas em transmissão esporádica, moderada e intensa. Araújo (2011) reconhece a importância do SINAN e a necessidade de melhoria na qualidade dos dados, subnotificação e consistência dos bancos de dados.

Os seis casos considerados de LVH ocorreram em pacientes adultos e 83,3% do gênero masculino, com faixa etária entre 25 e 59 anos de idade, com média de 38,3 anos, o que corresponde à fase produtiva de trabalho. Nas Américas, em 2011, o maior número de casos foi registrado em homens, a faixa etária mais acometida foi crianças abaixo de cinco anos seguida da faixa etária de 20 a 50 anos de idade (Leishmaniasis, 2013). Nem todos os casos possui registro da evolução da doença, dado este de fundamental importância para mensurar a letalidade da doença e planejar ações devidas de intervenção imediata (Leishmaniasis, 2013). O óbito por LV em Juatuba ocorreu em paciente com 41 anos de idade. Tanto o tratamento, quanto complicações clínicas e óbitos trazem prejuízos ao indivíduo, família e sociedade com gastos hospitalares, diminuição da produção e

custos previdenciários (Boletim..., 2013) medido em anos potenciais de vida perdidos, devido à maior ocorrência de óbitos em grupos etários mais jovens (Desjeux, 2004), o que não foi diferente para o óbito ocorrido em Juatuba.

Se a taxa de letalidade fosse estimada para Juatuba seria de 16,7%. Como ocorreu um óbito em seis casos a taxa será considerada somente para efeito de comparação, pela possibilidade do valor estar superestimado pelo tamanho da amostra, neste caso. Este valor está muito acima do encontrado no Brasil nos últimos anos, variando de 5,5 a 6,7% (Letalidade ..., 2013) e abaixo dos valores registrados em Belo Horizonte de 17,2% em 2011 e de 23,6% em 2012 (Leishmaniose..., 2012). Na capital mineira a letalidade foi maior em indivíduos acima de 60 anos, seguida da faixa etária de 30-39 anos, o que chama atenção para suspeita, diagnóstico e tratamento, incluindo a possibilidade da presença de comorbidades (Araújo, 2011). O MS adverte quanto à necessidade da identificação precoce dos pacientes com possibilidades de agravamento do quadro de LV, principalmente por complicações infecciosas e hemorrágicas, a tempo de instituir medidas terapêuticas e profiláticas eficazes capazes de reduzir a mortalidade (Leishmaniose..., 2006). A capital mineira mesmo após quase duas décadas de desafio no controle da LV, ainda registra uma das mais altas taxas de letalidade no país (Leishmaniose..., 2012).

De modo geral, os primeiros anos da LVH e LVC, em Juatuba, foram marcados por grandes dificuldades do município em operacionalizar as ações de controle da doença devido à inexperiência com esta zoonose, insuficiência de infraestrutura técnico-operacional e mesmo pela heterogeneidade da ocupação territorial, o que favoreceu a instalação da doença. Estas dificuldades, também, foram relatadas por municípios de grande porte (Morais *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2010) o que demonstra a complexidade para execução do PCLV. O município não dispõe do serviço de retirada dos cães errantes, não possui área própria com canis destinados aos cães que são levados para eutanásia no CCZ de Betim e nem transporte suficiente para esta atividade.

O inquérito sorológico amostral neste estudo foi o marco inicial de ações de controle realizadas

sistematicamente e com planejamento apoiado pelo município. Quando se avalia o tempo de coleta das amostras nas três etapas do trabalho é possível verificar que a primeira coleta teve duração mais longa quando comparada às demais. Já a segunda coleta, mesmo correspondendo ao período chuvoso e com maior quantidade de cães que a terceira coleta, demandou tempo semelhante de trabalho. Possivelmente, a maior colaboração de ACE na segunda coleta facilitou o trabalho devido ao conhecimento dos bairros e dos próprios proprietários.

A população canina amostrada teve representatividade de todos os bairros de Juatuba e a prevalência da LVC se distribuiu de forma variada entre eles. O coeficiente de prevalência com valor médio de 10,7% variou de 3,0% a 50,0% (Cidade Nova 4, n=2 amostras). Barata *et al.* (2013) registraram taxas de prevalência variando entre 13,6% e 53,4% em Governador Valadares considerado município mineiro de transmissão intensa para LV. Os valores próximos encontrados em Juatuba tornam-se relevantes por ser este município de transmissão esporádica.

Em 70,6% dos bairros foram identificados cães com sorologia positiva para LV na primeira etapa, aumentando para 88,2% na segunda etapa e reduzindo para 44,1% na terceira etapa. Somente dois bairros não apresentaram nem um cão sororreagente nas três etapas. A infecção canina está amplamente distribuída pelos bairros de Juatuba e é significativamente mais alta que a doença em humanos com seis casos notificados de 1999 a 2012, conforme já mencionado, registrados em cinco bairros: Santo Antônio (1999), Satélite 1 (2007), Eldorado com dois casos (2011), Maria Regina 2 (2011) e Canaã (2012). Estes bairros apresentaram valores altos nos coeficientes de morbidade, com prevalência variando de 3,3% a 30,4%, incidência no semestre seguinte de 100 a 343/1000 cães e no semestre final de 71 a 263/1000 cães. Somente o bairro Maria Regina 2 não apresentou cão soropositivo na terceira etapa do estudo.

À semelhança de outras áreas endêmicas da LV no Brasil, este fato é considerado intrigante desde os estudos iniciais, especialmente para municípios com prevalência canina alta e sem registro de caso humano (Deane, 1956;

Magalhães *et al.*, 1980). Em Belo Horizonte autores sugerem que a forma de ocupação do espaço urbano influencia na diferenciação do risco de ocorrência da LV em humanos e cães (Lopes *et al.*, 2010).

A frequência da soroconversão de cães na segunda etapa do trabalho foi maior em números absoluto e relativo quando comparada às demais etapas, inicial e final. É possível que o longo tempo gasto na retirada dos cães sororreagentes da primeira coleta, por dificuldades de recurso humano e logístico do município, sem experiência com inquéritos amostrais ou censitários anteriores, tenha contribuído. Vários autores atribuem à morosidade e à retirada parcial de cães destinados à eutanásia, assim como a descontinuidade das ações de controle as principais causas na baixa resolutividade do programa em vigência (Lopes *et al.* 2010; Gonçalves, 2013; Barata *et al.*, 2013).

Foi observado que os valores mais altos de incidência coincidiram com o período chuvoso e todos referentes à segunda etapa do trabalho com incidência média na coorte canina de 207/1000cães.semestre, valor este muito acima da incidência na terceira etapa de 65/1000cães.semestre e, também, da prevalência de 10,7% na primeira etapa. Talvez este evento seja decorrente do período de incubação no cão de 3 a 7 meses em média (Manual..., 2006) com maior transmissão do vetor ao reservatório canino ocorrido durante e logo após o período chuvoso (França-Silva *et al.*, 2005). Foi observada, por outros autores (Quinnell *et al.*, 1997), grande variação no período de soroconversão em cães naturalmente infectados por *L. infantum* de 94 dias até um ano.

Os valores de incidência deste estudo permitem melhor compreensão da dinâmica epidemiológica da LV na população canina estudada com intensa atividade de transmissão. De acordo com os resultados da análise descritiva é perceptível a presença de variáveis facilitadoras do ciclo biológico do parasito e do vetor, além do processo de transmissão do parasito aos hospedeiros, o que representa relevantes fatores de risco para as populações envolvidas de humanos e cães.

É mais comum o encontro de estudos de prevalência na literatura do que incidência, tanto

em população humana quanto canina. Alguns autores que fizeram este tipo de estudo epidemiológico registraram valor de incidência menor do que o encontrado neste trabalho. A exemplo, Moreira Jr. *et al.* (2003) registraram incidência de 118/1000 cães em estudo de coorte canina realizado em Jequié na Bahia, assim como França-Silva *et al.* (2003) de 64/1000 cães em Montes Claros e Barboza *et al.* (2006) de 174/1000 cães em Lauro de Freitas e 185/1000 cães em Camaçari, ambos municípios da Região Metropolitana de Salvador. A incidência da infecção canina é um importante parâmetro epidemiológico a considerar na priorização de áreas para medidas de controle.

Em estudo recente, de 2008 a 2011 autores registraram prevalência canina de 30,2% (4992/16529) no município mineiro de Governador Valadares, considerado foco reemergente da LV (Barata *et al.*, 2013). O município faz parte da zona do Rio Doce onde as ações de controle foram intensamente trabalhadas resultando no desaparecimento da doença em humanos no final da década de 1970. Autores já alertavam para a necessidade de medidas complementares tais como educação sanitária e saneamento das habitações para sustentabilidade de áreas tidas como controladas para LV (Magalhães *et al.*, 1980).

Na RMBH e nos municípios limítrofes de Juatuba autores retrataram a expansão geográfica da LV a partir de um caso humano em 1989 em Sabará (Genaro *et al.*, 1990). Na capital mineira, nas áreas que fazem divisa com este município foram identificados casos caninos em 1992 e humanos em 1994, alcançando todas as regionais de Belo Horizonte nos anos seguintes (Oliveira *et al.* 2001). Apesar das intensificações nas ações de controle, Belo Horizonte alcançou prevalência de 9,6% em 2006 (Lopes *et al.*, 2010), tendo reduzido para 3,2% em 2012 (Leishmaniose..., 2012).

Em Minas Gerais, além da RMBH e da região sudeste, a LV é endêmica, também, no norte do estado. Montes Claros é um dos municípios mais estudados e apresentou prevalência com valor médio de 4,9% sendo que em alguns bairros chegou a 9,9% em 2002 (Monteiro *et al.*, 2005). Em outros municípios de grande porte da região sudeste do Brasil, também, foram encontrados valores altos de prevalência logo no início da

epidemia, como o Rio de Janeiro-RJ com 7,4% em 1982 (Marzochi *et al.*, 1985) e Araçatuba-SP com 12,1% em média, nos anos de 1998 e 1999 (Camargo-Neves *et al.*, 2001).

Na região sudeste, Minas Gerais é o estado que apresenta maior coeficiente de incidência de LVH (Coeficiente..., 2013). Os municípios mineiros Belo Horizonte, Montes Claros, Ribeirão das Neves, Janaúba, Santa Luzia e Paracatu juntos somaram 56% das notificações no período de 2000 a 2006 (Resende, 2007).

Ao considerar a redução na coorte apenas pela retirada dos cães soropositivos esta teria a representatividade na etapa final de 73,6% da amostra inicial. No entanto, na última etapa de coleta de sangue a coorte fechou com menos da metade (45,2%) dos cães da amostra de origem. Este fato se explica pelo grande número de morte de animais nos intervalos das coletas de sangue, assim como pela ausência do cão no domicílio e recusa do proprietário em permitir a continuidade do cão com nova coleta de sangue. Em estudo semelhante conduzido em Belo Horizonte, autores verificaram representação da coorte em 61,5% da amostra inicial (Coura-Vital *et al.*, 2013).

Foi observado que do total de óbitos caninos computados entre a primeira e segunda coletas 32% foram por eutanásia e 68% por outras causas. Proporções inversas foram observadas entre a segunda e terceira coletas com 64% dos óbitos por eutanásia e 36% por outras causas. Este resultado implica em estudo detalhado da dinâmica desta população canina em Juatuba neste intervalo de dezessete meses de monitoramento. Tanto para tentar entender os fatores de risco envolvidos na soroconversão dos animais quanto para explicar a redução da coorte em maiores proporções por causas diversas quando comparada a redução pela retirada dos soropositivos.

Então, além da retirada dos cães soropositivos da coorte houve um quantitativo expressivo de perdas do animal da amostra entre as duas etapas finais da coleta de sangue. Atribui-se à morte o maior peso (34,2%) seguido de cães ausentes por desaparecimento, doação ou venda (30,6%), motivos diversos como casa fechada e endereço não encontrado (22,1%), e recusa do proprietário



em permitir nova coleta de sangue no cão (13,2%).

A morte dos animais, não considerando a eutanásia, foi maior entre as duas etapas iniciais do trabalho, o que pode ter ocorrido pelo atraso na retirada dos cães soropositivos identificados na primeira coleta de sangue iniciada em meados de abril de 2010, por dificuldades de recurso humano e logístico do município. A causa de morte mais relatada pelos proprietários foi por doenças, em especial a LV tanto na segunda etapa quanto na terceira. Óbito por idade avançada foi relatado pelos proprietários em dois cães em ambas as etapas. Uma observação de destaque é feita para o quantitativo de 10,3% e 31,1% de animais mortos por motivos de violência na segunda e terceira etapas do trabalho, respectivamente, dentre o total de óbitos por causas diversas (sem computar os eutanasiados). Foram muitos os relatos de enforcamento, envenenamento, atropelamento, tiro e outros. É interessante observar que mortes por agravos de violência têm sido motivo de preocupação do SUS na capital mineira, com registro de 12,0% do total de óbitos de residentes no município por causas externas em 2000, das quais as mais relatadas foram agressões, lesões por arma de fogo e acidentes de transporte com aumento da ocorrência até 2007 (Boletim..., 2013). Fica uma reflexão para a era pós-moderna sobre o valor creditado à vida humana e animal, os valores morais e éticos; assim como à necessidade de posse responsável pelos proprietários.

O cão ausente, considerado a segunda causa de maior peso dentre as perdas da coorte se refere aos animais doados, vendidos, desaparecidos ou que mudaram. Este acontecimento pode favorecer a expansão da LV de um local para outro pelo deslocamento físico do cão. O mesmo foi observado ao perguntar ao proprietário sobre a procedência do animal. Além da diversidade de bairros de Juatuba também foram relatados municípios limítrofes, municípios da RMBH, outros em Minas Gerais e estados distintos. Para este trânsito de animais não há barreira epidemiológica que impeça a disseminação da LV. O processo migratório de pessoas com seus cães infectados do norte de Minas Gerais para Sabará foi incriminado como causa do caso índice de LV neste município (Genaro *et al.*, 1990).

A recusa de proprietários em permitir nova coleta de sangue nos cães da amostra foi considerável (13,2%), fato este também relatado por outros autores em trabalho desenvolvido em Montes Claros (Prado *et al.*, 2011). O impacto causado na população com a entrega dos cães soropositivos possivelmente explica o maior quantitativo de recusas entre a segunda e terceira etapas. É importante considerar que do total de recusas na segunda etapa, 14,3% dos proprietários permitiram a coleta do animal na terceira etapa. A recusa é um dos fatores limitantes em estudo de coorte (Belo *et al.*, 2013). A intensificação das ações de educação em saúde é necessária para conscientizar o cidadão da importância do cão na dinâmica da transmissão da LV, como também aumentar a adesão da população às atividades de controle preconizadas pelo PCLV (Borges *et al.*, 2009; Gonçalves, 2013).

Perdas na coorte por casa fechada, endereço não localizado em visita posterior à primeira coleta, presença de menor de idade ou pessoa não responsável pelo cão representaram uma elevada proporção de pendências, as quais foram relatadas, também, por outros autores (Coura-Vital *et al.*, 2013).

A média de coletas/dia foi de 15,4 na 1ª etapa, 10,8 na 2ª etapa e 8,0 na 3ª etapa. Esta redução, possivelmente, foi devido a dificuldades com disponibilidade de transporte e, também, por recusas, casas fechadas e endereços não localizados. Bairros mais distantes, com características rurais, dificultavam não somente a logística, mas o encontro dos endereços e a produção diária de coletas. Os dias trabalhados com visitas de retorno aos domicílios que não tiveram coleta de sangue por motivos adversos não foram computados, o que tornaria o quantitativo maior. Nas duas últimas etapas as coletas foram feitas por duplas, o que não ocorreu na maioria das coletas da primeira etapa realizada por um médico veterinário. Outra diferença foram os questionários com quantitativo de perguntas muito maior na primeira etapa.

As ações educativas em Juatuba, algumas em data anterior ao início das atividades de campo, desde palestras com profissionais das Secretarias de Educação e Saúde às capacitações dos agentes de endemias e distribuição de material impresso

aos munícipes e estudantes, possivelmente contribuíram para melhor desenvolvimento do estudo.

Logo após a conclusão da primeira etapa do trabalho, os pesquisadores envolvidos reuniram-se com a Secretaria Municipal de Saúde de Juatuba, juntamente com o SCZ para repasse dos primeiros resultados e sensibilização da importância da continuidade das atividades com o apoio do município. O impacto desta reunião refletiu positivamente na disponibilização de ACE e logística para a realização da segunda etapa do trabalho. Neste ínterim foi realizado outro treinamento dos profissionais de saúde, em parceria com pesquisadores do CPqRR, sobre a coleta entomológica. Além de valorizar o profissional e envolvê-lo nas etapas subsequentes de campo, objetivou-se ampliar os conhecimentos repassados e alertar para atividades necessárias e ainda sem estrutura suficiente para implementação no município.

Divulgação de informações sobre a LV em uma campanha educativa utilizando materiais informativos pode ser uma ferramenta valiosa como um complemento aos protocolos de serviços de saúde e programas de controle (Luz *et al.*, 2005).

Todo este trabalho pode ter facilitado a adesão da população às ações desenvolvidas uma vez que as visitas foram bem aceitas, de modo geral, pelos moradores da amostra que permitiram a entrada da equipe em suas residências para o preenchimento do questionário e coleta de sangue dos cães ao longo dos dezessete meses de trabalho de campo.

### **5.1.2 Resultado sorológico indeterminado pela IFI**

Ao avaliar o desfecho dos cães com resultado sorológico indeterminado na IFI registrou-se proporção menor no estudo transversal quando comparada às etapas subsequentes do estudo de coorte. Foi constatada a soroconversão em 12,1% dos cães ao final do estudo. A maioria negativou e 8,1% mantiveram o resultado indeterminado. Os cães que morreram antes de nova coleta de sangue tiveram a mesma proporção (12,1%) dos animais que soroconverteram e em outros 23,2% não foi possível realizar a coleta de sangue por

motivos diversos (recusa, casa fechada, endereço não encontrado, etc).

Em Belo Horizonte, foi constatada soroconversão de resultado indeterminado na IFI em 38,36% dos cães acompanhados no período de 1999 a 2003 (Lopes *et al.*, 2005); aumentando para 81,7% neste município no período de 2006 a 2010 (Menezes, 2011) e de 54,3% na regional noroeste deste município de 2006 a 2011, ocorrendo em 104 dias em média e com mediana de 54 dias (Gonçalves, 2013). O não monitoramento destes cães implica na permanência de um quantitativo expressivo deles no campo como reservatório da doença. Fato este preocupante por ser o cão apontado como o mais importante reservatório devido ao intenso parasitismo cutâneo e grande número de casos de LVC (Abranches *et al.*, 1991).

Autores sugerem que em casos de resultados negativos ou mesmo discordantes entre ELISA e IFI, o método parasitológico com uso da imunohistoquímica deve ser empregado devido à baixa sensibilidade destes testes sorológicos, especialmente em cães assintomáticos (Queiroz *et al.*, 2010). Outros autores alertam para o monitoramento, também, dos cães com PCR positiva devido à possibilidade de soroconversão, detectada precocemente pelo método molecular quando comparado ao sorológico utilizado na rotina, também com destaque para os cães assintomáticos (Coura-Vital *et al.*, 2013). Esta técnica tem se aprimorado e difundido por ser comprovadamente mais sensível, sendo eleita para o diagnóstico da LVC, mas ainda necessita ser menos onerosa e estar padronizada pelo MS para inquéritos epidemiológicos (Queiroz *et al.*, 2010).

Este amplo espectro de variações no resultado da IFI entre intervalos semestrais reforça a complexidade do diagnóstico sorológico atrelado tanto à qualidade do kit, ao rigor na execução da técnica, como também aos níveis de anticorpos detectáveis diretamente ligados ao tipo de resposta imunológica expressa pelo cão, além da possibilidade de reações cruzadas com outras doenças, como LTA, Chagas e erliquiose (Ferreira *et al.*, 2007). Autores observaram cão assintomático com IFI positiva sem confirmação da LV pelos testes parasitológico e molecular (Dias *et al.*, 2010). No acompanhamento dos cães com IFI indeterminada, foi observado que a

maioria destes animais nas duas primeiras etapas e praticamente a metade na terceira etapa não apresentou sinal clínico sugestivo de LV, o que dificulta a concordância do diagnóstico pelas diferentes técnicas disponíveis, assim como o inverso também é verdadeiro.

É importante ressaltar que a qualidade do kit utilizado sofreu variações nos diversos lotes repassados pela FIOCRUZ. Coincidentemente, nas duas últimas etapas com maior frequência de resultados indeterminados houve devolução de kit de IFI à FUNED por má qualidade, o que foi confirmado por este laboratório de referência nacional. Algumas amostras reenviadas à instituição para controle de qualidade apresentaram resultados divergentes.

Morais (2011) identificou grande discordância entre as técnicas utilizadas nos inquéritos caninos em Belo Horizonte, com quantitativo de 190.000 cães analisados em média anualmente.

Como o objetivo deste estudo de coorte foi avaliar a soroconversão dos animais, além do rigor na padronização de todos os procedimentos da técnica de IFI, também a execução do teste e uma das leituras realizadas nas lâminas de microscopia foram todas feitas por uma profissional bioquímica. No caso de divergência na leitura havia discussão do grupo técnico e em alguns casos optava-se por repetir a análise.

Em relação ao resultado de ELISA feito em paralelo com a IFI observou-se que a minoria apresentou resultado também indeterminado (14,9%), a metade foi de resultado positivo e 35,1% de negativo. Ao se avaliar unicamente os cães com resultado de IFI indeterminada e que se soroconverteram na etapa seguinte, constatou-se o resultado de ELISA diversificado chegando a apresentar negatividade na maioria dos cães. Ou seja, nestes casos a IFI mostrou maior sensibilidade que o ELISA na detecção precoce de títulos de anticorpos. Quando, porém, houve a soroconversão e a IFI foi positiva o ELISA, também, foi positivo em 91,7% dos casos. Uma possível explicação seria o aumento no título de anticorpos decorrido o tempo entre as análises laboratoriais.

Dentre as amostras enviadas à FUNED para controle de qualidade foram priorizadas as que apresentavam IFI indeterminada e reagente com

diluição de 1:40. Das amostras com resultado indeterminado registrado pelo Laboratório de Leishmanioses da EV-UFMG 64,2% participaram do controle de qualidade, ou seja, mais da metade. Os resultados liberados pelo laboratório de referência nacional (FUNED) para o diagnóstico da LV concordaram com a IFI indeterminada em 40,0% das amostras, do restante 56,8% foram negativas e 3,2% soropositivas.

Destas soropositivas na FUNED e com resultado indeterminado no laboratório universitário, uma amostra foi da 2ª coleta e apresentou resultado negativo em ambos laboratórios na 3ª coleta; outras duas amostras foram positivas na 3ª coleta mas não foram consideradas para emissão de laudo como soropositivo por não terem apresentado nem um sinal clínico nas três etapas do trabalho e terem apresentado todos os resultados negativos no ELISA e IFI nas etapas anteriores, pelo laboratório universitário. De maneira geral, o resultado da FUNED foi considerado oficial para liberação do laudo, com poucas exceções como nestes casos. Este evento exemplifica a dificuldade de se trabalhar com títulos próximos ao ponto de corte, possíveis de alterações metodológicas intra e interlaboratoriais. No caso da IFI foi usado o mesmo kit procedente de Bio-Manguinhos e com lotes variados.

Assim como o título da IFI em humanos foi alterado da diluição de 1:40 para 1:80 (Manual..., 2003) o título considerado ponto de corte para a LVC deveria ser reconsiderado pelo PCLV. Existem outras lacunas que poderiam ser priorizadas, como o uso de técnicas de diagnóstico mais sensíveis e específicas, intensificação nos estudos entomológicos para combate ao vetor, maior agilidade entre diagnóstico e ações sequenciais no campo.

Em estudo comparativo da proporção de resultado indeterminado entre laboratório universitário e municipal observou-se maior proporção no laboratório universitário de 13,1%, enquanto o municipal apresentou taxa de 2,5%. Os autores destacaram a importância da maior permanência dos cães com o resultado indeterminado culminando na manutenção da doença (Lopes *et al.*, 2008). Machado (2004) comparou os resultados sorológicos (ELISA e IFI) da LVC entre cinco dos oito laboratórios em

Belo Horizonte que o realizavam e encontrou alto grau de concordância entre eles. No entanto, as amostras apresentaram maior frequência nos títulos de 320 a 1280, o que favorece a maior concordância entre laboratórios, uma vez que os títulos menores, principalmente de 40 e 80 são os que causam maiores divergências.

### 5.1.3 Retirada de cães sororreagentes

A retirada dos cães soropositivos foi feita pelo próprio SCZ de Juatuba com a participação do médico veterinário na entrega do resultado e diálogo com o responsável pelo cão para encaminhamento à eutanásia. Esta atividade não ficou vinculada ao início da atividade de necropsia pela equipe responsável deste estudo.

Dos 253 cães sororreagentes 58,9% foram eutanasiados e destes 87,9% necropsiados. Estes resultados demonstram o intenso esforço da equipe em necropsiar o máximo de animais soropositivos recolhidos. Nem todos os cães recolhidos puderam ser necropsiados devido à restrição de horário e uso do espaço físico do CCZ-Betim, local onde a atividade era realizada e que também atendia aos outros 13 municípios integrantes da sua regional de saúde. A necropsia iniciou em outubro/2010, decorridos seis meses do início das coletas de sangue, seguindo as normas e autorizações dos comitês de ética e conclusão dos acertos finais entre as diversas instituições parceiras envolvidas.

De maneira geral, a grande maioria dos cães soropositivos foi recolhida após o término da coleta de sangue tanto na primeira quanto na segunda etapa. Somente na terceira etapa foi possível o recolhimento logo após a emissão do laudo positivo, ainda sendo feitas as demais coletas de sangue.

Esta morosidade entre o diagnóstico laboratorial e o recolhimento dos animais soropositivos para eutanásia pode ter influenciado no quantitativo de 10,3% de cães que já tinham morrido. Para agravar este quadro favorável à manutenção do ciclo de transmissão da LV no ambiente soma-se o quantitativo expressivo de 30,8% de cães não recolhidos e vivos na época. A principal causa registrada em mais da metade das ocorrências foi a recusa dos proprietários em entregar o cão, mesmo com os devidos esclarecimentos pelo próprio médico veterinário. Uma possível

explicação seria pelo fato da metade do número de recusas ser representada por cães de raça definida. Outra hipótese poderia ser cogitada pela utilidade do cão como animal de trabalho/segurança, o que foi constatado em mais da metade dos animais necropsiados. Em Belo Horizonte, na regional Noroeste, registrou-se 7,8% de recusa na entrega dos cães soropositivos (Gonçalves, 2013), mesmo este município contando com a atuação da Vigilância Sanitária para estes casos.

As atividades de educação em saúde são imprescindíveis para a população ter conhecimento da gravidade da doença e da importância das ações de prevenção e controle. No momento das entrevistas quando os proprietários foram questionados sobre o conhecimento da doença mais de 80% responderam que tinham algum ou que pelo menos já tinham ouvido falar da LV. Mas, quando perguntados sobre a transmissão, reservatório e sintomatologia o número de acertos variou de 25 a 33%, reduzindo para 18% sobre o conhecimento de pelo menos uma das ações de prevenção e controle. Luz *et al.* 2005 também relataram acertos sobre o conhecimento inicial da LV com valores baixos, variando de 45,0 a 77,0%, sendo maior entre os agentes de zoonoses (90,0%). Autores salientam a importância dos estudantes na divulgação do conhecimento (Magalhães *et al.*, 2009).

Dentre os 30,8% de cães soropositivos não recolhidos 7,1% não estavam presentes no domicílio no momento da visita do médico veterinário para entrega do laudo. Esta ausência se refere aos cães que desapareceram, que foram doados ou vendidos ou mesmo que mudaram juntamente com a família para outro local. Este movimento contribui para a expansão da LV. Em Belo Horizonte, no ano 2012, dentre os cães soropositivos 79,9% foram recolhidos, 2,0% fugiram ou foram doados ou mudaram e 7,1% não foram entregues pelos proprietários caracterizando a recusa (Controle..., 2013).

Gonçalves (2013) observou que entre a coleta de sangue e a emissão do resultado laboratorial foram gastos em média 18,1 dias e daí à remoção do cão soropositivo mais 51,7 dias em média, em estudo feito na capital mineira entre 2006 a 2011. A retirada dos cães soropositivos é a medida mais polêmica do PCLV, dada à controvérsia

entre os estudos sobre a sua real efetividade, somado ao valor emotivo creditado ao cão na atualidade muito mais caracterizado como ente familiar que animal de trabalho. Mesmo assim a posse responsável pelo animal ainda é um desafio.

Juatuba, assim como outros municípios, não possuem a estrutura suficiente para a execução do PCLV. O trabalho contribuiu para a contratação do profissional médico veterinário para compor a equipe do SCZ, que até então não tinha esta categoria no quadro de recurso humano. Outra dificuldade vivida pelo município era em relação a veículo próprio para a atividade, o que confirma a necessidade de recursos que viabilizem a devida operacionalização das atividades inerentes ao controle da LV.

#### **5.1.4 Concordância entre os resultados sorológico, parasitológico e molecular**

Até início de 2013, nos laboratórios da rede pública, o teste sorológico ELISA era feito como triagem e somente os resultados positivos ou dentro da faixa cinza, considerados indeterminados eram encaminhados para confirmação pela IFI. Com este fluxo, pelos resultados obtidos neste trabalho vários resultados seriam falso-negativos. Isto porque foi observado em todas as etapas que amostras com resultado negativo no ELISA positivaram na IFI, o que demonstra lacunas na sensibilidade do teste tido como triagem, até então. A ressalva é feita para o uso de kit comercial neste estudo e não o kit de Bio-Manguinhos repassado pelo MS. Porém, em estudos realizados com os kits de Bio-Manguinhos para ELISA e IFI não foram observados resultados concordantes em níveis satisfatórios (Queiroz *et al.*, 2010; Morais, 2011).

Foram apresentados dados comparativos da FUNED (Diagnóstico..., 2013) referentes aos testes sorológicos e constatou que de janeiro a julho de 2011 (mesmo período de análise laboratorial deste estudo), de 1394 amostras positivas no ELISA a IFI foi concordante em 44%, com kits de Bio-Manguinhos.

Verifica-se a importância da utilização de mais de uma técnica para o diagnóstico da LVC, a fim de minimizar os resultados falso-negativos e falso-positivos (Alves e Bevilacqua, 2004; Andrade *et al.*, 2006; Silva, 2009; Coura-Vital *et*

*al.*, 2013). Uma mesma técnica pode apresentar valores nos coeficientes de incidência bem diferentes com o uso de antígenos distintos, foi o que ocorreu com o teste imunoenzimático ELISA com antígeno *L. major*-like (6,5/1000 cães), do kit produzido por Bio-Manguinhos, e outro antígeno solúvel *L. infantum* (11,2/1000 cães) com produção *in house* (Coura-Vital *et al.*, 2013).

De acordo com Dye *et al.* (1993) cerca de 20% de casos de infecção por LV podem passar despercebidos pela IFI especialmente em cães na fase de incubação da doença ou soroconversão. Durante estas fases, os níveis de anticorpos em circulação podem ser altamente variáveis e isso pode explicar o baixo nível de concordância entre os ensaios quando os cães assintomáticos são avaliados. Andrade *et al.* (2006) relataram que em 62,5% de amostras com IFI negativas a PCR foi positiva.

Uma maior associação entre técnicas laboratoriais foi feita com os animais soropositivos necropsiados. Foi possível realizar nova sorologia e comparar a positividade entre diluições usadas na titulação completa de anticorpos com as duas diluições de 1:40 e 1:80 usadas nas três etapas de coleta de sangue. Além da sorologia, foram associados os resultados do parasitológico direto, isolamento em cultura, da PCR de mielocultura, medula e de tecidos.

Mais da metade dos cães necropsiados foram soropositivos na segunda coleta e a minoria na terceira coleta, coincidindo com os valores proporcionais de incidência.

Em relação à sorologia dos cães necropsiados observou-se que quase metade apresentou IFI positiva na diluição de 1:40 e a medida que a diluição aumentava a frequência de positividade diminuía. Tanto o resultado indeterminado como a diluição de 1:40 eram na grande maioria de cães com sorologia positiva da 2ª coleta de sangue. Da diluição 1:80 a 1:640 foi observada maior proporção de cães positivos, procedentes da 1ª coleta.

Foi observado que 75% dos cães soropositivos na IFI das três etapas de coleta de sangue apresentaram título no ponto de corte, ou seja, positivo na diluição de 1:40 e o restante na outra diluição feita de 1:80. E, a mesma observação foi

feita ao constatar que dentre os cães necropsiados, com resultado variando de indeterminado a positivo na diluição de 1:1280, a maior proporção registrada foi de IFI positiva na diluição de 1:40 e destes a grande maioria tinha sorologia com este mesmo título na segunda etapa.

Possivelmente, pode-se explicar o resultado indeterminado e soropositivo na menor diluição de 1:40 na sorologia dos cães necropsiados procedentes da segunda coleta levando em consideração o intervalo semestral para a soroconversão. Já na terceira etapa, também com intervalo semestral, a proporção de cães que soroconverteram foi bem menor, ou seja, um terço do quantitativo da coleta anterior. Talvez a retirada dos cães soropositivos até o momento desta última coleta tenha influenciado positivamente neste resultado. A maior diluição positiva dos cães necropsiados da terceira etapa foi de 1:320, diferentemente das primeiras etapas com diluição positiva até 1:1280.

Os baixos títulos de anticorpos dos cães necropsiados podem explicar a baixa positividade do exame parasitológico (apenas 24,4% dos animais), mesmo com a presença de alterações cutâneas em um terço dos cães com sinais clínicos observados durante a necropsia. O diagnóstico microscópico de lâminas coradas pode se tornar difícil se o animal apresentar baixa carga parasitária. Silva (2009) relatou positividade no parasitológico direto em 61% e 74% em cães assintomáticos e sintomáticos, respectivamente, e não observou diferença estatística entre a pele, baço, linfonodo e medula óssea.

Os dois únicos cães com título de 1.1280 não apresentaram positividade no parasitológico direto e não tiveram amostra em meio de cultura. Ambos eram polissintomáticos, com lesões de pele e com alteração no baço. Um deles teve a espécie *L. infantum* caracterizada em amostra de medula. Queiroz *et al.* (2010) observaram 100% de positividade da PCR mesmo em amostras de pele sadia, assim como observaram PCR negativa em amostra de lesão de pele de um mesmo cão com PCR positiva de pele íntegra. Estes autores relataram que, com exceção dos animais polissintomáticos, as análises comparativas revelaram baixa concordância entre os testes sorológicos dificultando a replicação

entre elas no diagnóstico da LVC, diretamente dependente do estado evolutivo da doença e da resposta imune do hospedeiro. No estudo que desenvolveram (Queiroz *et al.*, 2010), a positividade de ELISA e IFI no grupo dos assintomáticos foi de 12,5%, passando para 78,6% e 57,1%, respectivamente, no grupo dos oligossintomáticos e chegando a 83,3% para ambos os testes no grupo dos polissintomáticos, tendo como padrão-ouro o resultado sorológico anterior.

A PCR de tecidos foi positiva em 7,6% de todas as amostras de necropsia, diferentemente da PCR de miocultura com 100,0% de positividade. O isolamento em cultura teve positividade em 21,3% das amostras que puderam ser concluídas, porque todo o material biológico dos cães necropsiados da primeira etapa teve o meio de cultura contaminado e, portanto descartado. Esta taxa de positividade foi baixa quando comparada à alta sensibilidade da PCR por outros autores (Andrade *et al.*, 2006; Queiroz *et al.*, 2010; Coura-Vital *et al.*, 2013). Silva (2009) relatou positividade do isolamento em miocultura de 58,0% e da PCR de 36,4% para o baço, 27,3% para linfonodo e 50,0% para pele, em cães de três municípios mineiros – Janaúba, Montes Claros e Paracatu. Andrade *et al.* (2006) observaram maior positividade da PCR em relação à IFI e ao parasitológico direto, e este teste molecular embora tenha tido maior frequência no grupo dos cães sintomáticos especialmente em amostra de pele, não apresentou diferença significativa entre os grupos clínicos ou órgãos examinados. Coura-Vital *et al.* (2013) relataram que os cães que foram PCR positivos tinham aproximadamente o dobro do risco de soroconversão quando comparados aos cães com PCR- negativa, reforçando a hipótese de que estes animais com sorologia negativa e PCR positiva tiveram contato anterior com o parasita e podem desenvolver a doença.

A PCR associada à RFLP foi capaz de identificar as espécies de *Leishmania* em dezenove cães com amostras oriundas da miocultura (10) e de tecidos (10). Um único cão teve a espécie *L. infantum* caracterizada em amostra de medula óssea (sangue e cultura) e de tecido (pele). Em relação à sorologia, a metade dos cães com *L. amazonensis* identificada apresentou resultado negativo no ELISA e todos com *L. infantum*

resultado apenas positivo. Conforme bula do fabricante o antígeno de ELISA/S7<sup>®</sup> é recombinante, produzido por engenharia genética e que permite a detecção de anticorpos na fase mais precoce da infecção, apresentando sensibilidade média de 89% e especificidade média de 94,3% (a bula não cita reação cruzada). A IFI apresenta o inconveniente de reações cruzadas, inclusive com a LTA, que também é notificada em Juatuba. Já os valores de sensibilidade e especificidade são em média de 90,0% e 80,0%, respectivamente, conforme citado na bula.

Os títulos da IFI variaram de 40 a 640 no grupo de animais com *L. amazonensis*, mas o maior título foi encontrado em um único animal, os demais foram de 40 e 80. Tolezano *et al.* (2007) identificaram *L. amazonensis* em cães urbanos com comprometimento visceral e quadro típico de LV com sorologia negativa para IFI. No grupo dos animais com *L. infantum* os títulos variaram de 80 a 1.280 sendo que mais da metade apresentou título igual ou superior a 320. Por esta análise verificam-se títulos maiores dentre os animais com *L. infantum*, cuja resposta dos linfócitos T é que exerce a maior influência sobre a infecção e a produção de anticorpos é abundante, porém deletéria e não protetora (Manual..., 2006).

Courtenay *et al.* (2002) observaram correlação positiva entre grau parasitário, infectividade, nível de anticorpos anti-*Leishmania* sp., detecção de DNA do parasita por PCR e presença de sinais clínicos. A evidência de maior possibilidade de concordância entre testes diagnósticos em cão polissintomático foi observada em diversos estudos (Silva, 2009; Queiroz *et al.*, 2010; Coura-Vital, 2011).

Foram observados sinais clínicos em 94,6% dos cães necropsiados. Em relação aos cães com as espécies caracterizadas, observou-se a presença de sinais clínicos em todos e maior comprometimento visceral no grupo da *L. amazonensis* (87,5%) quando comparado ao grupo de *L. infantum* (54,5%). Este resultado não corresponde ao tropismo clássico relatado na literatura e que diferencia a LT da LV. Silva (2009) identificou, também, as duas espécies de *Leishmania* em cães em Paracatu e sugeriu que fossem feitos estudos posteriores da fauna flebotômica, contemplando investigação

natural por *L. amazonensis* e estudos de infectividade de cães para as espécies de flebotômicos do complexo *flaviscutellata* ou outras. Desde a década de 1990 foi observada a expansão tanto da LTA quanto da LV na RMBH (Luz *et al.*, 2001).

Outros autores observaram resultados díspares em seus estudos. Barral *et al.* (1986) isolaram *L. amazonensis* de medula óssea de um caso de LVH na Bahia. Martinez *et al.* (2002) identificaram coinfeção por *L. amazonensis* e *L. infantum* em um caso de leishmaniose cutânea difusa numa criança. Esse foi o primeiro relato de infecção mista onde foram encontradas duas espécies distintas de *Leishmania* na mesma lesão. Estes autores atribuem melhor crescimento da *L. amazonensis* em cultura quando comparada a *L. infantum*. Tolezano *et al.* (2007) identificaram *L. amazonensis* em cães urbanos de Araçatuba-SP diagnosticados clinicamente como LV e com alteração no baço. Dias *et al.* (2010) também identificaram cães de Paracatu-MG com *L. amazonensis* e comprometimento visceral, sem o encontro do vetor típico desta espécie na área.

Mediante a circulação das duas espécies de *Leishmania* no município mais estudos são necessários para possibilitar maior entendimento da epidemiologia da LV e LT, especialmente quanto à evidência que a espécie *L. amazonensis* possa demonstrar comportamento viscerotrópico nos cães. Em Juatuba são registrados casos de LV e LTA e o estudo bem elaborado no município com levantamento da fauna flebotômica e sua dispersão é essencial para que se proponha medidas de controle mais específicas e eficientes. Para cada área de transmissão, são necessários estudos epidemiológicos para investigar a(s) espécie(s) de *Leishmania* circulante(s), bem como os vetores e reservatórios presentes (Ferreira *et al.*, 2012).

Ao comparar os resultados do sequenciamento com a PCR-RFLP observa-se que em apenas dois cães dentre os oito identificados com *L. amazonensis*, tanto na pele quanto na medula, esta espécie apresentou a mesma proximidade genética da *L. infantum*. Os demais, apesar da distância mínima consideraram a *L. infantum* como espécie mais próxima.

Na PCR-RFLP foram utilizadas a enzima HaeIII e posteriormente Ava I, por apresentarem fragmentos distintos após digestão do kDNA e os resultados não deixaram dúvidas quanto à identificação das espécies de *Leishmania* quando comparadas aos padrões usados, o que já foi constatado por outros autores (Andrade *et al.*, 2006).

Os testes diagnósticos foram avaliados tendo a IFI como padrão-ouro, teste este considerado até início de 2013 como de escolha pelo MS para confirmação dos animais soropositivos por reunir as características essenciais de valores considerados satisfatórios de sensibilidade e de especificidade (Alves e Bevilacqua, 2004), mesmo sendo questionado por outros autores (Rosário *et al.*, 2005). O teste de *Kappa* apresentou fraca concordância do ELISA em relação a IFI e não foi significativo nos demais testes comparados à IFI, também. Como esperado, o ELISA foi mais sensível e o parasitológico direto e por isolamento em cultura, e o PCR foram 100% específicos, demonstrados pelos valores de sensibilidade e especificidade e de VPP e VPN. A acurácia apresentou valores mais altos para o ELISA do que os outros testes, possivelmente por apresentar valores mais próximos entre sensibilidade (valor médio 68%) e especificidade (valor médio 79%) quando comparado aos demais.

Mesmo com todos os avanços os testes sorológicos, ainda, se constituem um desafio para o PCLV na realização de inquéritos censitários. Estudos têm comprovado que as técnicas sorológicas (ELISA e IFI) subestimam o número de cães infectados (Coura-Vital, 2011). Autores sugerem análises de viabilidade para possível inclusão de testes imunocromatográficos (Moraes, 2006), técnicas moleculares no PCLV do Brasil (Andrade *et al.*, 2006; Coura-Vital, 2011). Outros apontam para associação do DAT (Teste de aglutinação direta) e ELISA em substituição à IFI (Ferreira *et al.*, 2007) ou a imuno-histoquímica para confirmação da sorologia negativa ou discordante e a PCR restrita apenas à confirmação dos casos ainda suspeitos (Queiroz *et al.*, 2010).

## 5.1.5 Exame clínico

### 5.1.5.1 Cães das três etapas de coleta de sangue da coorte com resultado sorológico negativo, indeterminado e positivo

Quase dois terços do total de 1985 cães participantes das três etapas de coleta de sangue não apresentaram sinal clínico da LV. Dentre os que apresentaram pelo menos um sinal clínico a grande maioria tinha sorologia negativa na IFI. Todos os sinais clínicos estiveram presentes tanto no grupo de cães com resultado positivo quanto no grupo de cães com resultados negativo e indeterminado, o que evidencia a complexidade de se fazer o diagnóstico diferencial da LVC com outras doenças.

As manifestações clínicas da LVC dependem da resposta imunológica de cada animal infectado o que possibilita um amplo espectro de sinais clínicos que varia de aparente estado sadio a um severo quadro clínico (Costa-Val *et al.*, 2007). Outros fatores como as dermatoses e desnutrição podem mascarar o quadro clínico o que aumenta a dificuldade do diagnóstico (Manual..., 2006).

Os sinais clínicos: onicogribose, lesão de pele e alopecia, foram os mais frequentes tanto no total dos cães examinados quanto em cada grupo com resultado distinto na sorologia pela IFI (negativo, indeterminado e positivo), com a ressalva que linfadenopatia obteve a segunda maior frequência no grupo do resultado indeterminado. Outro destaque dentre estes sinais é a lesão de pele no grupo dos soropositivos com maior frequência quando comparado aos demais.

Ao comparar os dezesseis sinais clínicos observados entre o grupo dos animais soropositivos com o grupo dos animais soronegativos, nove sinais obtiveram significância na análise univariada ( $p < 0,20$ ): apatia, pelo opaco, alopecia, lesão de pele, onicogribose, hiperqueratose no focinho, linfadenopatia, emagrecimento e ceratoconjuntivite. Estes sinais clínicos são comumente observados em cães com LV. No entanto, após os devidos ajustes na análise multivariada ( $p < 0,05$ ) foram observados sinais clínicos que aumentam a chance de o animal estar infectado para a LV: hiperqueratose no focinho, apatia, linfadenopatia e lesão de pele.



A presença de vômito, tosse, diarreia, coriza, mioclonia, edema da pata e paresia dos membros posteriores não conseguiram ficar dentro do modelo preliminar pela sua baixa significância estatística ( $p > 0,20$ ). A paresia, que geralmente é mais observada na fase terminal da infecção (Manual..., 2006) não foi registrada dentre os animais soropositivos e sim em cães com sorologia negativa e indeterminada, o que provavelmente está associada a outras patologias e não a LV.

### 5.1.5.2 Cães sororreagentes das três coletas

Entre os 253 cães soropositivos das três etapas de coleta de sangue, verificou-se que mais da metade não apresentava algum sinal clínico sugestivo da LV. Esta observação é contrária ao que foi observado nos cães necropsiados inclusos neste grupo no momento da coleta de sangue em uma das três etapas. A prevalência da infecção em área endêmica pode muitas vezes ser subestimada quando os animais assintomáticos não são incluídos em grupos para serem considerados para as medidas de controle (Ferreira *et al.*, 2007). Outro grupo de interesse inclui indivíduos infectados por *L. infantum* e que são assintomáticos, demonstrando a existência de infecções temporárias na população humana (Moreno *et al.*, 2006). Sendo a LV uma doença oportunista, a senilidade, a depressão e a associação com doenças concomitantes possibilitam a transição da doença de fase assintomática para sintomática.

Alteração cutânea (lesão de pele e alopecia) seguida de onicogribose foram os sinais clínicos com maiores proporções nos cães soropositivos. A linfadenopatia não foi tão observada quanto nos cães necropsiados, mas se destaca dentre os cães da terceira coleta com registro em 61,7%. Talvez porque o exame clínico nesta etapa tenha sido feito por graduandos em medicina veterinária, devidamente treinados para a atividade. A segunda etapa contou com a participação de ACE do município e o sinal clínico não foi registrado nem uma vez. A primeira coleta feita praticamente por um profissional médico veterinário contou com a observação em apenas 1,3% dos cães.

Os cães soropositivos diagnosticados na segunda etapa apresentaram a maior proporção de IFI reagente na diluição de 1:40 e, também, a maior

proporção de animais assintomáticos, quando comparados aos outros das demais etapas. A soroconversão ocorrida nos cães no momento da segunda coleta teve um perfil diferenciado dos extremos representados pela primeira e terceira coletas. Uma possível explicação seria um intervalo curto entre as coletas para o aumento considerável de anticorpos e manifestação clínica. Já na terceira coleta a manifestação clínica foi mais proeminente, mesmo os anticorpos permanecendo em título baixo. Abranches *et al.* (1991) não encontraram correlação entre a forma clínica da doença e título de anticorpos, mas observaram tendência entre os níveis de anticorpos e o agravamento do quadro clínico.

Alencar e Cunha (1963) em inquéritos caninos realizados no Ceará de 1953 a 1962 com taxa de infecção de 1,9% observaram que 14% dos cães infectados apresentavam sinais clínicos da doença. Barata *et al.* (2013) em inquérito canino em Governador Valadares-MG identificaram prevalência canina de 30,2% (4992/16529) de 2008 a 2011, com 49,9% de cães sintomáticos cujos principais sintomas foram úlceras localizadas e onicogribose.

Cães soropositivos, mesmo assintomáticos, apresentam intenso parasitismo cutâneo por formas amastigotas (Reis *et al.*, 2006) e podem ser fonte de infecção para flebotomíneos (Costa-Val *et al.*, 2007; Michalsky *et al.*; 2007), o que reforça a necessidade de inquéritos censitários e retirada dos cães infectados, até que outras alternativas sejam consideradas mais efetivas para o controle da LV. Em estudo de infecção em *L. longipalpis* alimentadas em cães infectados com *L. infantum*, observou-se diferença entre as taxas de infecção ao comparar animais assintomáticos (5,4%) e sintomáticos (28,35%) quando o xenodiagnóstico foi feito (Michalsky *et al.*, 2007).

Silva *et al.* (2001) identificaram 17,0% de positividade em cães da Sociedade Protetora dos Animais na capital mineira e destes 60% eram assintomáticos e um animal inclusive com IFI positiva na diluição de 1:640.

### 5.1.5.3 Cães da necropsia

O exame clínico foi feito minuciosamente por médicos veterinários da equipe. A grande

maioria dos cães apresentou algum sinal clínico sugestivo da LV, mas estes animais aparentavam bom estado corporal. Este estado pré-clínico muitas vezes leva o proprietário a duvidar do resultado do exame e não querer entregar o cão para a eutanásia, especialmente quando se trata de diagnóstico feito por laboratório da rede pública. Uma hipótese seria a gratuidade do exame e a não credibilidade pelo proprietário, o que não justifica.

Não foram observados vômito, tosse, diarreia, coriza, edema de pata e mioclonia nos cães necropsiados. A linfadenopatia foi o sinal clínico mais frequente observado nestes cães seguido da onicogribose e alteração cutânea (lesão de pele, hiperqueratose no focinho, alopecia e lesão típica na ponta da orelha).

A maioria destes cães considerados sintomáticos tinha alteração no baço. Esta ocorrência foi vista também no grupo dos cães assintomáticos.

Os assintomáticos apresentaram sorologia com título baixo (40 e 80) e a partir do título 160 todos os cães já apresentavam pelo menos um sinal clínico sugestivo da LV, além da alteração no baço pela maioria. Foram verificados títulos mais elevados na IFI em cães que apresentaram comprometimento visceral em estudo no Rio de Janeiro (Marzochi *et al.*, 1985). Estes mesmos autores não observaram nítida relação entre a presença e a intensidade dos sinais clínicos observados com o encontro de parasitas em víscera e/ou pele normal.

Os cães necropsiados foram procedentes de trinta (88,2%) dos trinta e quatro bairros de Juatuba o que demonstra uma boa representação dos mesmos dentre os animais soropositivos.

#### **5.1.6 Controle de qualidade da sorologia pela FUNED**

Um quantitativo expressivo de amostras foi enviado para o controle de qualidade na FUNED tanto nas três etapas de coleta de sangue como nas amostras de necropsia, variando de 23% a 42% do total analisado/etapa. Isto porque a sorologia apresentou título predominante no ponto de corte (diluição de 1:40) e foi identificado um quantitativo grande de sorologia indeterminada. A concordância entre os resultados foi satisfatória, com valores médios de

97,3% para os exames soropositivos e 88,0% para os soronegativos pela IFI, com o mesmo kit procedente de Bio-Manguinhos.

O resultado indeterminado apresentou menor concordância entre os laboratórios, com proporção de 2,3 vezes maior que a observada na FUNED. A leitura microscópica foi feita com maior rigor na tentativa de priorizar os cães com resultado indeterminado na coleta seguinte. Talvez, possa se atribuir à própria expressão imunológica do cão e à qualidade do kit o registro de valores mais altos nas proporções de resultado indeterminado, principalmente na segunda e terceira etapas.

A IFI até poucos meses atrás, quando se deu início à implantação gradativa do teste rápido nos laboratórios da rede pública, era o teste confirmatório de ELISA positivo ou teste conclusivo para o diagnóstico da LV mesmo sem associação com outra técnica. Apesar da menor sensibilidade quando comparada ao ELISA a IFI apresenta maior especificidade. Uma das dificuldades de se trabalhar com a IFI é a leitura subjetiva das lâminas para definição do resultado, o que exige pessoa qualificada para a atividade, o que foi fato neste estudo.

## **BLOCO II**

### **5.2 Fatores de risco e proteção**

Para compreender a expansão e urbanização da LV se faz necessária a identificação dos fatores de risco associados à infecção humana e canina. O estudo epidemiológico de coorte, utilizado neste trabalho, é considerado o mais adequado desenho observacional para estabelecer inferência causal.

A coleta de dados permitiu avaliar informações sobre o responsável pelo cão, seu conhecimento sobre a LV e cuidados com o animal, características do cão, sobre o imóvel e vizinhança, e informações relacionadas a outros reservatórios. Uma variável identificada como fator de proteção para o cão englobou melhores condições socioeconômicas do proprietário. Belo *et al.* (2013) em estudo de revisão dos fatores associados à LV nas Américas concluíram que a presença de cães em casa, cães soropositivos em áreas próximas, menor *status* socioeconômico e áreas altamente vegetadas foram associados com a infecção por *L. infantum*.

O município de Juatuba apresenta em sua formação bairros com características rurais e outros já urbanizados. Possui edificações horizontais o que caracteriza imóveis com peridomicílio, muitas plantações e animais em quase sua totalidade territorial. À vizinhança acrescentam-se matas, animais de criação, córregos e mesmo animais silvestres. Este cenário propício ao desenvolvimento do ciclo de transmissão da LV é constatado pela ampla representatividade dos cães com sorologia positiva em quase todos os bairros do município.

Tão importantes neste contexto são o conhecimento e atitudes da população em relação à doença. A população entrevistada apresentou-se predominantemente adulta e um pouco mais da metade disse ter estudado até o ensino fundamental, o que caracteriza um baixo nível de instrução. O município de Juatuba possui 12 escolas municipais, 2 estaduais e 1 instituto universitário. Borges *et al.* (2008) observaram em relação à escolaridade que uma pessoa que nunca frequentou uma escola, ou que se classifica como analfabeto, tem oito vezes mais chances de ser acometido por LV do que um indivíduo alfabetizado. A educação em saúde, praticada em diversos momentos durante a formação estudantil, tem forte potencial de controle epidemiológico (Magalhães *et al.*, 2009).

A população representada apresentou-se com baixo poder aquisitivo, agravado ao fato de contar com um número expressivo de pessoas no mesmo imóvel. A renda familiar com valor acima de um salário mínimo juntamente com as variáveis água tratada e presença de rede de esgoto se apresentaram como uma única variável de fator de proteção. No entanto, estas condições são comumente existentes para uma pequena minoria da população entrevistada. O serviço de água tratada é mais ofertado que o tratamento de esgoto, ainda tão deficiente no município, privilegiando pouco mais de um terço dos entrevistados. A complexidade torna-se maior com a retirada do lixo pela Prefeitura com periodicidades distintas entre os bairros e ainda inexistente em 12% dos mesmos, cujos moradores optam por queimar o lixo não recolhido. Com raras exceções, todos os domicílios tinham peridomicílio e estes constituídos de terra, com maior frequência de limpeza semanalmente. Barata *et al.* (2013)

relataram que os casos humanos de LV em Governador Valadares ocorreram em condições precárias de habitação, saneamento básico e coleta de lixo, além do acúmulo de matéria orgânica e presença de outros animais.

A variável limpeza diária do peridomicílio foi identificada como fator de proteção. No entanto, aproximadamente um quinto dos entrevistados realizava a limpeza com frequência diária. E, muitos afirmaram ter entulho, muita matéria orgânica e mato no peridomicílio. A matéria orgânica é fonte de alimento para as larvas das fêmeas do vetor. A presença de esterco e ou folhas secas no quintal foi associada com aproximadamente 3 vezes o risco de soroconversão para LV em estudo de coorte realizado por Coura-Vital *et al.* (2013). Estes autores constataram associação significativa entre o uso de inseticidas e a redução na soroconversão canina. Neste estudo, aproximadamente um terço dos entrevistados disse fazer uso de inseticida tanto no intra como no peridomicílio com preferência pela formulação em aerossol.

Praticamente na metade dos domicílios amostrados havia de dois a três cães. Esta constatação torna-se de maior relevância por ser o cão considerado o mais importante reservatório de infecção em zonas urbanas. Borges *et al.* (2009) identificaram o risco de contrair LV maior 1,87 vez para moradores com um cão e 3,36 vezes para moradores com dois cães, quando comparados a pessoas que não possuem esse animal. É uma variável polêmica entre autores, mas outros observaram esta associação positiva com a LV (Silva *et al.*, 2001; Margonari *et al.*, 2006; Belo *et al.*, 2013).

Além dos cães, havia a presença de outros animais, sendo os mais citados galinha, pássaro, gato, pato e porco. Ter estes animais no domicílio aumentava a chance do cão contrair a LV quando comparado a domicílios sem estes animais, o que foi observado na análise univariada neste estudo e de outros autores (Borges *et al.*, 2009). Foi observado em outros estudos que cães que viviam próximos a suínos tiveram um risco relativo maior que 4 vezes de serem infectados pelo parasito, em comparação aos cães que não tinham essa proximidade (Moreira Jr *et al.*, 2003; Barboza *et al.*, 2006), apesar dos autores chamarem atenção para o

número reduzido de registros desta variável no estudo.

Um quantitativo maior de domicílios, ainda, era visitado por roedores, gatos, cães errantes, gambás e outros animais, em menor proporção, conforme relato dos próprios moradores. A presença de animais domésticos e silvestres no peridomicílio atrai um grande número de flebotomíneos e conseqüentemente algumas espécies que são vetores de leishmanioses, o que contribui para o aumento no risco de transmissão da doença (Sherlock *et al.*, 1984; Moreira Jr *et al.*, 2003). Barata *et al.* (2005) observaram pelo teste de precipitina que fêmeas de *L. longipalpis* se alimentavam preferencialmente em galinhas e cavalos (26,3%), roedores (15,8%), cães (13,2%), bois (10,5%) e homem (5,3%). Conhecer os possíveis reservatórios e a ecologia detalhada assim como a dinâmica das populações dentro de cada sistema é fundamental para determinar as medidas de controle para LV (Ashford, 1996).

O município não possui o serviço de captura de cães errantes, o que pode favorecer a maior circulação animal nas ruas com exposição às situações adversas com a própria população. Como foi mencionado pelos entrevistados, um grande número de animais visitam os domicílios, inclusive cães errantes ou mesmo domiciliados com acesso à rua, também relatado por muitos proprietários. Além disso, a maioria dos imóveis é cercada por terrenos baldios e matas, possibilitando a criação de gado, cavalo, galinha e outros, o que representa oferta de alimento para os animais errantes e outros, com facilidades de manutenção em ambiente externo. Outro atrativo seria o lixo a céu aberto, também relatado em grande proporção.

O conhecimento da doença é uma premissa para a corresponsabilização da população pelas ações de prevenção e controle da doença. Mas, foi observado maior confundimento dos entrevistados com outras doenças como dengue, leptospirose (Luz *et al.*, 2005) e raiva. Aproximadamente um terço dos entrevistados soube responder coerentemente sobre a transmissão da LV e um número menor sobre o reservatório e sinais clínicos, reduzindo ainda mais em relação às ações de prevenção e controle da doença, tanto para si mesmo, quanto para o cão e o ambiente. Os sinais clínicos mais

relatados pelos poucos entrevistados que souberam responder foram onicogribose e lesão de pele, possivelmente por estes apresentarem maior frequência dentre os cães com LV. Qualquer conhecimento sobre a LV foi identificado como fator de proteção, capaz de minimizar o risco de ocorrência da LV em 2,24 vezes em estudo conduzido por Borges *et al.* (2008).

A LV não conta com a divulgação das ações de educação em saúde em meios de comunicação maciça que alcançam a população, como é feito frequentemente no caso da dengue. A raiva animal é lembrada pelo quadro clínico atípico e grave. Já a leptospirose é citada em meio às tragédias de períodos chuvosos e divulgada pelo jornalismo. Com isso, principalmente os municípios do interior desconhecem sobre a LV, mesmo estando tão próximos da capital mineira e no caso de Juatuba, fazer parte da RMBH, onde a doença é endêmica.

O conhecimento inespecífico e superficial da LV pode ter colaborado na manutenção e expansão da doença no município, assim como relatado por autores em diversas localidades estudadas (Luz *et al.*, 2005, Borges *et al.*, 2009). Este desconhecimento se estende muitas vezes aos próprios profissionais da saúde. Em estudo educativo realizado autores verificaram que o menor número de acertos sobre conhecimento da LV foi sobre os sintomas, incluindo os profissionais de saúde (Luz *et al.*, 2005) o que pode comprometer o tratamento precoce e contribuir para altas taxas de letalidade em humanos. O repasse de informações aos escolares pode ser estrategicamente uma medida de alcance à população (Magalhães *et al.*, 2009), assim como a participação de médicos e veterinários, durante consultas, professores e agentes de saúde em palestras e durante as visitas domiciliares (Borges *et al.*, 2008).

A maioria dos cães do estudo era macho, tinha pelo curto, cor escura e sem raça definida. Estas características, também, foram mais frequentes no grupo dos cães com sorologia positiva para a LV. Pelo curto já foi constatado como fator de risco para ocorrência da LV por alguns autores (França-Silva *et al.*, 2003; Moreira Jr *et al.*, 2003; Coura-Vital *et al.*, 2013) e outros não (Barboza *et al.*, 2006). Animais com pelo curto estariam mais expostos à infecção, uma vez que

o vetor teria menos dificuldade de efetuar o repasto sanguíneo. Alguns autores que observaram altas taxas de positividade em cães de raça sugeriram que a transmissão estivesse vinculada ao local de permanência dos mesmos (Costa *et al.*, 1996). Outros autores verificaram que qualquer raça de cães é susceptível à *L. infantum*, independentemente do sexo ou idade (França-Silva *et al.*, 2003).

Tanto a idade como o porte físico do cão apresentou significância estatística neste estudo. Os cães apresentaram maior concentração na faixa etária de um a quatro anos tanto na população estudada quanto no grupo com resultado soropositivo. Foi observado, ao comparar a idade entre os soropositivos e soronegativos, que os cães acima de quatro anos possuíam menos chance de se infectar. Segundo Ashford (1996) a maioria dos cães torna-se infectados durante as fases iniciais da vida. No entanto, em outros estudos não foi observada associação entre idade com a soroconversão do cão (França-Silva *et al.*, 2003; Barboza *et al.*, 2006) ou foi observada tendência crescente da infecção por *L. infantum* a medida que a idade do cão avançava (Alencar e Cunha, 1963). O porte grande do cão representou, neste estudo, um quarto dos cães amostrados com maior proporção observada dentre os animais soropositivos. Esta variável apresentou relação significativa ( $p < 0,05$ ) com a ocorrência da LV com incremento na chance do cão se infectar de 1,6 vez quando comparado aos animais de porte pequeno. Coura-Vital (2011) observou que cão com porte físico grande, com PCR<sup>+</sup> e residente em domicílio com precárias condições de higiene no peridomicílio possui maior risco de soroconversão.

Metade dos entrevistados respondeu tratar os cães exclusivamente com ração, sendo que estes incluem a metade dos cães SRD. Este relato não condiz com a situação socioeconômica também relatada por eles.

Dentre as medidas de cuidado com o cão a cobertura vacinal antirrábica foi representada por 70,3% dos cães, o que não foi observado para a vacina polivalente (18,7%) e principalmente da LV, esta última aplicada em 0,5% dos cães amostrados. As vacinas Leishmune e Leishtec foram citadas e o esquema vacinal com três doses iniciais e de reforço anual foi cumprido, com registro de anos bem recentes. Esses

proprietários se destacam pela abrangência de cuidados específicos e gerais com estes cães, a maioria com renda familiar acima de cinco salários mínimo e todos com conhecimento sobre a LV. No entanto, com exceção de um cão (sem registro da informação), três tinham resultado soropositivo e um resultado indeterminado realizados em data anterior a este estudo, todos em laboratório particular. Destes cães, somente um permaneceu soronegativo até o final da coorte e ele já havia feito uso da coleira repelente antes do estudo; três animais foram soropositivos desde a primeira coleta e outro soroconverteu entre a segunda e terceira coletas. O único cão a fazer uso da coleira é o que apresentou resultado indeterminado em exame particular. Somente o cão soronegativo era o único no domicílio, os demais soropositivos conviviavam com 4 ou mais cães. Dois cães tinham lesão de pele e um destes ceratoconjuntivite. Os proprietários se recusaram a entregar os animais, mesmo com o resultado positivo sendo confirmado.

Ao conferir as datas informadas pelos proprietários, observou-se que a vacina foi aplicada em data posterior ao exame particular. À este fato fica o questionamento sobre possível confundimento pelos proprietários, uma vez que a vacina só pode ser aplicada após o diagnóstico laboratorial negativo dos cães; e, a discussão de resultado sorológico com detecção dos anticorpos vacinais e não da infecção por LV. Dentre os animais vacinados com sorologia positiva na IFI, 75% apresentaram ELISA reagente, também. Conforme bula do fabricante, pelo fato do kit de ELISA/S7<sup>®</sup> ter como base um peptídeo recombinante, não reage cruzadamente com os anticorpos vacinais e a positividade só ocorre se o animal estiver realmente infectado. Todo este relato reafirma a fragilidade do serviço público na operacionalização das ações de vigilância e controle da LV.

Um total de 5,2% dos proprietários, antes do início do estudo, realizou exame laboratorial no cão por iniciativa própria e optavam na maioria das vezes pelo laboratório público, mas não entregavam o cão para eutanásia quando este apresentava resultado soropositivo. Dentre os cães com exame extra e com resultado soropositivo em 38,5% este resultado se confirmou neste estudo. Foi observado título no ponto de corte para a maioria destes cães e alguns ainda tiveram a soroconversão entre as

duas últimas etapas de coletas de sangue. A minoria foi eutanasiada ou o cão morreu, a maioria permanecia no ambiente decorrente da recusa do proprietário. Estes cães de recusa pelo proprietário residiam nos bairros Satélite 1 com 30,4% de prevalência e Santo Antônio com 8,9% de prevalência e incidência acima de 263/1000cães.semestre nas duas últimas etapas. O contrário, também, foi observado em cão com resultado negativo no estudo e positivo por laboratório particular e o proprietário o entregou para eutanásia.

A maioria dos cães com resultado laboratorial extra não apresentava sinais clínicos da doença, não sendo este, então, o único fator relevante para influenciar o proprietário a buscar o diagnóstico por iniciativa própria. O número de cães com diagnóstico extra entre as duas últimas etapas do estudo foi bem reduzido comparado à primeira. A divergência entre os resultados extras e que deram soropositivos sejam de laboratório particular ou público confirmam a complexidade do diagnóstico com título na diluição de 1:40.

Cão em uso de coleira impregnada com deltametrina a 4%, representou 1,0% dos amostrados cujos proprietários relataram troca tri e semestral do produto. Outro 1,0% já tinha usado coleira anteriormente ao estudo e não usava mais, fato este comprovado até o final do estudo. Dois proprietários informaram que seus cães usavam a coleira há mais de oito anos e foi observado que nas duas últimas etapas estes animais já não estavam mais com a coleira, contrariando a expectativa de que o estudo desenvolvido em três etapas promovesse atitudes de cuidado do proprietário em relação ao animal. O uso da coleira repelente como medida complementar tem sido sugerida (Chappuis *et al.*, 2013).

Constatou-se a dificuldade do próprio município fazer o recolhimento dos cães diagnosticados em laboratório da rede pública favorecendo a manutenção do ciclo de transmissão da LV e sua expansão. Esta expansão vai além do espaço local de Juatuba quando se leva em consideração um número expressivo de cães que viajaram com seus donos para outros municípios do estado de Minas Gerais e para outros estados do Brasil. Os entrevistados que souberam responder informaram destino para vinte e cinco

municípios mineiros e dois estados da região Sudeste e um da região Norte, antes da primeira etapa do estudo.

Este movimento inverso foi verificado em relação às diversas localidades de procedência do animal representando quase um quarto dos mesmos. A maior frequência foi de cães adquiridos na capital mineira, seguido de municípios limítrofes de Juatuba e da RMBH, com destaque para Betim e Contagem, respectivamente. Os outros três estados da região sudeste também foram citados, Rio de Janeiro, São Paulo e Espírito Santo, e o Pará na região Norte.

O contexto atual da LV demanda ao setor de políticas públicas intervenções na infraestrutura urbana capazes de possibilitar melhores condições socioeconômicas aos cidadãos com serviços básicos de saneamento e melhores condições de moradia, além de promover ações educativas que conscientizem a população sobre a participação ativa e permanente na consolidação da vigilância das ações de controle da LV. A proposição de novos conceitos de convivência entre homem e animais domésticos torna-se eminente perante as relações cada vez mais estreitadas entre estes.

### **5.2.1 Mudanças ocorridas com o ambiente e o cão: 2ª e 3ª etapas**

Em relação às mudanças ocorridas no ambiente após a primeira etapa do estudo observou-se o aumento de condições favoráveis à transmissão da doença. Em relação ao peridomicílio mesmo com inclusão de parte cimentada no piso mantinha-se o restante em terra.

Nas duas últimas etapas do estudo menos de um terço dos proprietários responderam fazer uso de inseticida no imóvel e a maioria destes com intervalos superiores a um mês. Observou-se diminuição no uso de inseticida no imóvel comparado à primeira coleta.

Nas três etapas do estudo verificou-se que na metade dos domicílios havia de 2 a 3 cães presentes. Nas duas últimas etapas em aproximadamente 20,0% dos domicílios amostrados houve introdução de cão, a maioria (68,0%) de um animal. Chama a atenção o fato de domicílios já com seis ou mais cães terem

adquirido mais cães nas 2ª e 3ª etapas. É notória a reposição animal, fato este verificado por outros autores em porcentagens elevadas de 39,0% e 50,0% (Nunes *et al.*, 2008; Morais, 2011) e muitos já infectados (Moreira *et al.*, 2004).

Além da introdução de novos cães nos domicílios nas duas etapas da coorte, 10,0% dos proprietários, em média, responderam ter adquirido outros animais. Em paralelo, outros 10,0% em média, responderam ter ocorrido morte de cães no domicílio, 7,8% devido à LV e 46,9% por atos de violência. Mais da metade dos entrevistados disseram que os cães mantinham o acesso à rua, a grande maioria com frequência diária, confirmando outra pergunta sobre contato com outros animais em que responderam cães errantes, da vizinhança e outros.

Após a primeira etapa, 10,0% dos proprietários levaram o cão ao veterinário, a pequena minoria por suspeita de LV. Estes animais eram assintomáticos e apresentaram exame laboratorial negativo. De qualquer maneira, verificam-se atitudes de cuidado com o animal e alerta para a possibilidade de LV por uma pequena parcela de proprietários do estudo. Esta zoonose, também, é um problema médico-veterinário significativo e deve contar com a ética da classe profissional para repasse devido de conhecimentos aos proprietários de animais (França-Silva, 1997).

Quanto ao uso da coleira foi observado um pequeno aumento na proporção de cães em uso de 1,0% na primeira etapa para 1,3% em média nas etapas posteriores. No entanto, tanto na segunda quanto na terceira etapa, metade dos animais era iniciante, o que demonstra o uso do material por pouco tempo. Talvez esta inconstância possa explicar a soropositividade destes animais nos valores de 10,0% na primeira coleta e 27,2% na segunda coleta, sendo que destes últimos a maioria já usava coleira desde a etapa anterior. Não houve soroconversão dos cães em uso de coleira na terceira etapa. Metade dos cães que fizeram uso de coleira em alguma etapa era de raça definida. Os cães em uso de coleira e com resultado soropositivo foram quatro, dos quais um morreu (sintomático) e os outros três os proprietários se recusaram a entregá-los, mesmo um destes também sendo sintomático. Este comportamento foi observado,

ainda, dentre os cães vacinados e soropositivos e confirma a fragmentação das ações de controle, que de acordo com o MS teriam de ocorrer de forma integrada para alcançar êxito (Manual..., 2006).

Apesar de poucos proprietários colocarem coleira repelente nos cães este quantitativo foi o dobro dos proprietários cujos cães foram vacinados contra a LV. Ao comparar o perfil dos dois grupos, observou-se que os proprietários dos cães em uso de coleira possuíam condições socioeconômicas menos favoráveis, menor grau de instrução, menos conhecimento sobre a LV e cuidados menos rígidos que os proprietários dos cães vacinados.

Nas duas últimas etapas do estudo houve redução no quantitativo de exames extras realizados por iniciativa do proprietário o que representou 1,5% dos cães amostrados nestas etapas, com um resultado soropositivo não confirmado neste estudo. Possivelmente, em decorrência à realização de coletas de sangue neste estudo.

Quanto às viagens, também houve redução na proporção de cães, porém deve-se considerar o curto espaço de tempo entre as etapas de seis meses aproximadamente. Antes da 1ª etapa os cães que viajaram representaram 5,7%, no intervalo entre a 2ª etapa 1,3% e no intervalo da 3ª etapa 0,7%.

### **BLOCO III**

#### **5.3 Análise espacial**

O processo de urbanização da LVC continua sendo um grave problema de saúde pública em muitas localidades do Brasil. A doença apresenta comportamentos na sua distribuição dependentes de particularidades socioeconômicas e ambientais de cada município (Gontijo e Melo, 2004).

A maioria da população de Juatuba reside na área urbana do município com ocupação horizontal onde se observa, também, maior concentração de cães. Muitos bairros possuem, ainda, características rurais que favorecem a manutenção da LV. O crescimento de Juatuba ocorreu na década de 1970, ainda distrito de Mateus Leme na época, quando se observou o início da expansão, também, da LV para os centros urbanos. A possibilidade de expansão da

LV para centros urbanos já havia sido alertada por Deane (1956).

O desenvolvimento se deu, principalmente, no setor agropecuário com plantação de eucaliptos e de café, além da criação de gado e implantação da Cervejaria Brahma (Juatuba, 2013). Mesmo com a municipalização, em 1992, Juatuba conservou muitas de suas características tradicionais, mas começou a receber imigrantes à procura de empregos, o que ocasionou a formação de novos bairros e extensas áreas de invasão.

O conhecimento da distribuição espacial da LV na região e nas suas micro áreas constitui uma apropriada estratégia para o direcionamento das atividades de prevenção e controle (Rothman, 1990; Marcelino, 2007; Borges, 2011; Rothman *et al.*, 2011), além da preparação de ações de emergência (Barcellos e Bastos, 1996). O comportamento da doença não é estático e requer monitoramento permanente com combinação de abordagens estatística, espacial e temporal cada vez mais elaboradas.

As análises de geoprocessamento possibilitaram a identificação de *cluster* em áreas de elevada concentração das taxas de positividade, porém com baixa densidade populacional canina quando comparada a outras áreas dentro do município. Este *cluster* representou todos os cães soropositivos das três etapas ao longo dos dezessete meses de estudo. O risco de infecção canina por LV nesta área é de 11,1 vezes. Pelo mapa de *Kernel* foram localizados os bairros pertencentes ao *cluster*: Samambaia, Dona Francisca, Carioca, Diamantina, Vila Verne, Castelo Branco, Ilhéus e Serra Azul. A técnica de *Kernel* é aplicada aos resultados para identificação das áreas com concentrações de cães positivos. Com o uso desta técnica Oliveira *et al.* (2001) observaram aparente correlação entre a prevalência canina e incidência humana em Belo Horizonte. Também, orienta espacialmente a alocação de recursos para intervenção ambiental e outras ações intersetoriais. (Morais *et al.*, 2008).

Estes bairros integrantes do *cluster* estão às margens da BR 262, apresentam relevo acidentado, caracterizados por ruas não pavimentadas, deficiência de saneamento básico, com extensas áreas de invasão em condições

precárias de habitação e convívio com animais. Esta área conta, ainda, com a presença do aterro sanitário municipal. A população possui baixo poder aquisitivo e escolaridade, sendo que dos entrevistados mais da metade tinha apenas ensino primário. Com exceção do bairro Samambaia os demais não possuem escola pública.

Ao analisar os coeficientes de morbidade da LV nestes bairros, observa-se uma área de foco ativo da doença em expansão com destaque para a ocorrência de soroconversão dos cães em todos os bairros após seis meses do início do estudo com valores altos no coeficiente de incidência variando de 143/1000cães.semestre a 750/1000cães.semestre. Este quadro explica o risco elevado de 11,1 vezes dos cães presentes no *cluster* tornarem-se infectados. Não foi registrado caso humano nesta área. A própria geografia da área se constitui em fator limitante às ações de promoção à saúde devido às adversidades de deslocamento tanto para o munícipe quanto para o profissional. É uma área que exige intervenção imediata das autoridades municipais. Ao comparar as fotos do local de 2005/2013 (Anexo 23) observa-se áreas de desmatamento com recente ocupação humana, o que influencia diretamente no habitat natural do vetor da LV, atualmente tão bem adaptado à diferentes ambientes e temperaturas.

Com exceção do caso índice de LVH em 1999, ocorrido em uma fazenda, os demais casos ocorreram na região central ou próximo ao *cluster*, em áreas com concentração de cães positivos e alta densidade populacional canina. Autores concordam que a infecção canina precede a ocorrência da LVH (Oliveira *et al.*, 2001).

Borges (2011) identificou um *cluster* dos cães soropositivos da primeira etapa na região central de Juatuba com aumento no risco de infecção canina de 2,80 vezes, abrangendo os bairros: Satélite 1 e 2, Centro, Bela Vista e Cidade Nova 1 (Anexo 24). Os maiores coeficientes foram registrados no Satélite 1 com 30,4% de prevalência, incidência nos seis meses seguintes de 200/1000 cães e de 120/1000 cães no último semestre. Neste bairro, em 2007 foi registrado o segundo caso de LVH de Juatuba e em 2009 foi identificada a presença do *L. longipalpis*, o que sugere a participação deste vetor na transmissão da LV em Juatuba. A ocorrência desta espécie



dentro e nos arredores da casa demonstra que ela se encontra bastante adaptada aos mais diversos ambientes (Barata *et al.*, 2005). Este fator acrescido do grande número de cães infectados, do grande número de animais domésticos, presença abundante de matéria orgânica, precárias condições sanitárias e baixo nível socioeconômico podem estar influenciando a coepidemiologia da LV em Juatuba.

Existe a necessidade de assessoria e capacitação do município pelo estado para que as ações específicas de atuação sobre o vetor sejam baseadas em critérios técnicos científicos (Neto *et al.*, 2001). O controle de vetores é proposto como prioridade no programa de controle da transmissão da LV em vez da ênfase conferida ao controle de reservatórios (Costa e Vieira, 2001).

Nos bairros Satélite 2, Centro e Bela Vista os valores do coeficiente de prevalência variaram de 15,0 a 21,4% com redução em todos eles no coeficiente de incidência nas etapas seguintes. Uma possível explicação é a intervenção do município nestas áreas prioritárias logo após a conclusão da primeira etapa do estudo. Já o bairro Cidade Nova 1 teve o menor valor de prevalência neste *cluster* de 5,4%, porém apresentou aumento nos valores do coeficiente de incidência canina nas etapas seguintes de 89/1000cães.semestre (2ª etapa) e 106/1000cães.semestre (3ª etapa). Possivelmente esta área não foi trabalhada como as demais possibilitando aumento na soroconversão dos cães.

Os outros casos humanos notificados, além do caso no Satélite 1 em 2007 (1), foram dos bairros: Santo Antônio em 1999 (1), Eldorado em 2011 (2), Maria Regina 2 em 2011 (1) e Canaã em 2012 (1). Com base nos coeficientes de morbidade pode-se observar a dinâmica do ciclo de transmissão da LV nestes bairros, também caracterizados como prioritários para intervenção do município. O Santo Antônio apresentou valor de prevalência canina de 8,9%, valores de incidência canina nas etapas seguintes de 343/1000cães.semestre (2ª etapa) e 263/1000cães.semestre (3ª etapa). Os coeficientes encontrados nos demais bairros, respectivamente, foram de – Eldorado: 20,8%, 100 e 250/1000cães.semestre; Maria Regina 2: 3,3%, 286/1000cães.semestre e zero na terceira

etapa; Canaã: 4,9%, 186 e 71/1000cães.semestre, referentes aos cães amostrados.

Tanto os inquéritos sorológicos na população de cães quanto os levantamentos entomológicos (Thomson e Connor, 2000) nas áreas endêmicas têm revelado que altas taxas de prevalência de LVC e presença predominante e abundante do vetor ocasionam elevado risco de transmissão para o homem (Marzochi *et al.*, 1985; França-Silva *et al.*, 2005; Barata *et al.*, 2013).

Mediante a dinâmica da LV em Juatuba é iminente a necessidade de melhor estruturação do município para atuar devidamente nas ações de prevenção e controle da doença conforme diretrizes nacionais do PCLV.

## 6. CONCLUSÃO

- Foi observada elevada transmissão da LV em curto espaço de tempo em Juatuba, o que demonstra o dinamismo intenso na inter-relação dos fatores determinantes da doença.

- A morosidade e a retirada parcial dos cães sororreagentes, principalmente por recusa dos proprietários, podem ser fatores determinantes na incidência da LV em Juatuba.

- A população entrevistada se caracterizou por condições socioeconômicas desfavoráveis, baixo índice de escolaridade, pouco conhecimento sobre a LV, além de confundimento com outras doenças, refletindo na ausência de ações de prevenção e controle da doença pela grande maioria dos proprietários de cães.

- Os sinais clínicos que aumentam a chance de o animal estar infectado para a LV foram hiperqueratose no focinho, apatia, linfadenopatia e lesão de pele.

- Entre os animais necropsiados, os assintomáticos apresentaram os menores títulos na IFI (40 e 80), e a partir do título 160 os cães apresentaram pelo menos um sinal clínico, tendo a maioria comprometimento visceral.

- A complexidade do diagnóstico laboratorial e clínico foi confirmada pela observação na maioria dos cães soropositivos do menor título na IFI e ausência de sinais clínicos sugestivos da LV.

- A concordância dos testes diagnósticos em relação à IFI, considerada teste de referência, foi fraca; e somente o ELISA apresentou concordância significativa ( $p < 0,05$ ).

- O monitoramento do cão com resultado indeterminado é necessário para detecção da soroconversão precoce e recolhimento do animal positivo.

- Juatuba apresenta condições ambientais favoráveis à manutenção da LV com predomínio de peridomicílio e arredores com presença abundante de vegetação, matéria orgânica, diversidade de animais e deficiência de saneamento básico.

- O panorama epidemiológico de Juatuba apresenta certa homogeneidade favorável à ocorrência de LV que dificulta a identificação de fatores de risco e proteção, o que explica o pequeno número de associações com a positividade canina na análise multivariada.

- A avaliação da distribuição espacial da LV nas três etapas do estudo identificou um *cluster* em áreas de elevada concentração das taxas de positividade, porém com baixa densidade populacional canina quando comparada a outras áreas dentro do município.

- Os casos humanos de LV não estão localizados dentro do *cluster* e coincidiram com áreas de alta densidade populacional canina e maior número de cães positivos. Sugere-se atenção para a possibilidade emergente da área do *cluster* canino anteceder à doença em humanos.

- Foram identificadas as espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis* em cães com comprometimento visceral, o que demanda a continuidade de estudos para possibilitar melhor entendimento da epidemiologia da LV e LT.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

- A IFI, embora não seja mais utilizada como teste de rotina do serviço público, não deveria ser descartada, especialmente nos laboratórios de referência e de pesquisa. Poderia ser incluída com os testes de rotina em realização paralela numa fase inicial, para avaliação da concordância entre os resultados.

- Deveria ser feita avaliação da mudança do ponto de corte da IFI da diluição 1:40 para 1:80 para evitar possíveis resultados falso-positivos e possibilitar maior reprodutibilidade do resultado.

- O *cluster* identificado na avaliação espacial da distribuição da LV deve ser considerado foco emergente para priorização de ações de intervenção pelo município.

- São necessários novos estudos acerca das espécies de flebotomíneos existentes em Juatuba que contemplem a investigação de infecção natural por *Leishmania amazonensis* e estudos de infectividade de cães para as espécies de *Lutzomyia*.

- Ações de educação em saúde devem ser intensificadas aos munícipes de Juatuba tanto para levar maior conhecimento quanto para alcançar maior adesão da população como corresponsável pela prevenção e controle da LV.

- A partir dos dados apresentados neste estudo, possível pela integração entre academia e serviço, a expectativa é que o município possa ser estruturado o suficiente para operacionalizar de forma sistemática as ações propostas pelo PCLV visando a Saúde Pública.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M.C.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.M. *et al.* Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *The J. Parasitol.*, v.77, p.557-561, 1991.

ALENCAR, J.E. ; CUNHA, R.V. Inquérito sobre calazar no Ceará - Novos resultados. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.*, v.15, p. 391-403, 1963.

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad. Saúde Publ.*, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

ANDRADE, H.M.; REIS, A.B.; SANTOS, S.L. *et al.* Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet. Parasitol.*, v.140, p. 231-238, 2006.

- ANSELIN, L. Spatial Cluster Detection. GeoDa Center For Geospatial Analysis and Computation. 2013. Disponível em: <<http://geodacenter.asu.edu>> Acessado em 01/10/2013.
- ARAÚJO, V.E. *Análise da distribuição espaço-temporal da leishmaniose visceral e perfil clínico-epidemiológico dos casos e óbitos, Belo Horizonte, Minas Gerais, 1994 a 2009*. 2011. 208f. (Tese de Doutorado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- ASHFORD, RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.*, v.14, n.5, p. 523-532, 1996.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging Zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, v.30, p. 1269-1281, 2000.
- BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULÁLIO, M.C. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect. Dis.*, v.173, n. 3, p. 758-61, 1996.
- BARATA, R.A.; FRANÇA-SILVA, J.C.; MAYRINK, W. *et al.* Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.38, n.5, p.421-425, 2005.
- BARATA, R.A.; PEIXOTO, J.C.; TANURE, A. *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais state, Brazil. *Rev. BioMed Res. Internat.*, p.1-6, 2013.
- BARBOZA, D. C. P. M.; GOMES NETO, C. M. B.; LEAL, D. C. *et al.* Estudo de coorte em áreas de risco para leishmaniose visceral canina, em municípios da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, v.7, n.2, p. 152-163, 2006.
- BARCELLOS, C.; BASTOS, F.I. Geoprocessamento, ambiente e saúde: uma união possível? *Cad. Saúde Publ.*, v.12, cap.3, p.389-397, 1996.
- BARCELLOS, C.; SANTOS, S.M. Colocando dados no mapa: a escolha da unidade espacial de agregação e integração de bases de dados em saúde e ambiente através do geoprocessamento. *Inf. Epidemiol. do SUS*, v.1, p.21-29, 1997.
- BARRAL, A.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETO, M. *et al.* Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of american visceral leishmaniasis. *The Am. Soc. of Trop. Med. Hyg.*, v. 35, n. 4, p. 732-734, 1986.
- BELO, V.S.; WERNECK, G.L.; BARBOSA, D.S. *et al.* Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS Neglected Trop. Dis.*, v. 7, n. 4, e2182, p. 1-12, 2013.
- BENSON, D. A., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D.J. *et al.* GenBank. *Nucleic acids research*, 39(Database issue), D32–D37. 2010.
- BOLETIM da Vigilância em Saúde. SUS. Belo Horizonte: Prefeitura Municipal, 2013. 12p.
- BORGES, B.K.A. *Fatores de risco para leishmaniose visceral em Belo Horizonte*, 2006. 2006. 65f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- BORGES, B.K.A.; SILVA, J.A.; HADDAD, J.P.A. *et al.* Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Cad. Saúde Publ.*, v.24, n.4, p.777-784, 2008.
- BORGES, B.K.A.; SILVA, J.A.; HADDAD, J.P.A. *et al.* Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.5, p.1035-1043, 2009.
- BORGES, L.F.N.M. *Prevalência e fatores de risco para leishmaniose visceral em cães de Juatuba, Minas Gerais, 2010*. 2011. 78f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Escola de veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

- BRAGA, M.D.; COELHO, I.C.; POMPEU, M.M. *et al.* Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 31, n.5, p. 419-424, 1998.
- CAMARGO-NEVES, V.L.; KATZ, G.; RODAS, L.A.C. *et al.* Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de Leishmaniose Visceral Americana-Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. *Cad. Saúde Publ.*, v. 17, n.5, p.1263-1267, 2001.
- CASOS confirmados de leishmaniose visceral, segundo UF de residência. Brasil, grandes regiões e unidades federadas, 1990 a 2011. 2013. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012\\_11\\_casos\\_de\\_lv\\_entre\\_1990\\_e\\_2011\\_final.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_casos_de_lv_entre_1990_e_2011_final.pdf)> Acessado em 09/05/13.
- CENSO demográfico 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística –2011 – Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acessado em: 06 de janeiro de 2011.
- CHAGAS, E. Leishmaniose visceral americana, causada pela *Leishmania chagasi*. *Brasil-Médico*, n.37, p.956-957, 1937.
- CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*, v.5, p.873-882, 2007. Disponível em: [http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n11\\_supp/pdf/nrmicro1748.pdf](http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n11_supp/pdf/nrmicro1748.pdf) Acessado em 19 outubro 2013.
- COEFICIENTE de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2011. 2013. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012\\_11\\_incidencia\\_de\\_lv\\_entre\\_1990\\_e\\_2011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_incidencia_de_lv_entre_1990_e_2011.pdf)> Acessado em 09/05/13.
- CONTROL of the LEISHMANIASSES. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva: WHO, 2010. p.1-185.
- CONTROLE de leishmaniose visceral: a experiência de Belo Horizonte. 2013. Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte. Apresentação na Escola de Veterinária em 09/10/2013.
- COSTA, R.T.; GENARO, O; FRANÇA-SILVA, J.C. *et al.* Urban visceral leishmaniasis in Minas Gerais: a Picture about the infection in dogs attended in veterinarian clinics in the metropolitan área of Belo Horizonte and Montes Claros, MG. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.9, p.154, 1996.
- COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no combate de leishmaniose no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.34, n.2, p. 223-228, 2001.
- COSTA-VAL, A.P.; CAVALCANTI, R.R.; GONTIJO, N.F. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *The Vet. J.*, v.174, p.636–643, 2007.
- COURA-VITAL, W. *Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por Leishmania (Leishmania) infantum e identificação de biomarcadores de infecção*. 2011. 167f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- COURA-VITAL, W; REIS, AB; FAUSTO, MA. Risk factors for seroconversion by *Leishmania infantum* in a cohort of dogs from an endemic area of Brazil. *Plos one*, v.8, n.8, p.1-9, 2013.
- COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J.; GARCEZ, L.M. *et al.* Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J. Infect. Dis.*, v.186, p.1314-1320, 2002.
- CRUZ, I.; MORALES, M.A.; NOGUER, I. *et al.* *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet.*, v.359, n.9312, p.1124-1125, 2002.
- CUNHA, A.M.; CHAGAS, E. Estudos sobre o parasito. Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 32, p. 329-337, 1937.

- DEANE, L.M. *Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará*. 1956. 162f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, v.27, p.305-318, 2004.
- DIAGNÓSTICO sorológico da leishmaniose visceral canina. 2013. Apresentação na Escola de Veterinária em 09/10/2013.
- DIAS, S.E.; REGINA-SILVA, S.; FRANÇA-SILVA, J.C. *et al.* Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasit.*, v. 176, p. 101-111, 2010.
- DUPREY, Z.H.; STEURER, F.J.; ROONEY, J.A. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: United States and Canada, 2000–2003. *Emerg. Infect. Dis.*, v.12, p.440-446, 2006.
- DYE, C.; KILLICK-KENDRICK, R.; VITUTIA, M.M. *et al.* Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basic reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. *Parasitology*, v.105, p.35-41, 1992.
- DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol. Infect.*, v.103, p. 647-656, 1993.
- ESPAÇO Juatuba – cidade – Conhecendo Juatuba. Disponível em: <<http://www.espacojuatuba.com.br>>. Acessado em: 21 de Outubro de 2008.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, v.39, p.783-791, 1985.
- FERREIRA, E.C.; LANA, M.; CARNEIRO, M. *et al.* Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animal presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol.*, v.146, p. 235-241, 2007.
- FERREIRA, E.C.; MELO, L.A.; GONTIJO, C.M.F. Estudo de hospedeiros não humanos e sua importância para a compreensão da ecoepidemiologia da doença. Leishmaniose visceral. *Cad. Tec. Vet. e Zootec.*, v.65, p.9-27, 2012.
- FERROGLIO, E.; ROMANO, A.; TRISCIUOGGIO, A. *et al.* Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.100, n.7, p.636-41, 2006.
- FLEISS, J.L. The measurement of interrater agreement. In: STATISTICAL methods for rates and proportions. 2ed. New York: John Wiley & Sons, 1981, p.212-304.
- FRANÇA-SILVA, J.C. *Leishmaniose visceral canina no município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil*. 1997.133f. Tese (Mestrado em Parasitologia Veterinária) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais.
- FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M. *et al.* Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.111, p. 161-173, 2003.
- FRANÇA-SILVA, J.C.; BARATA, R.A.; COSTA, R.T. *et al.* Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.131, p.213-220, 2005.
- GALATI, E.A.; NUNES, V.L.; REGO JÚNIOR, F.A. *et al.* Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Saúde Publ.*, v.31, n.4, p.378-90, 1997.
- GENARO, O.; COSTA, C.A.; WILLINS, P. *et al.* Ocorrência de calazar em área urbana da grande Belo Horizonte, MG. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.23, n.2, p.121, 1990.
- GONÇALVES, S. *Leishmaniose visceral canina na regional noroeste de Belo Horizonte, 2006-2011*. 2013.75f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v.7, n.3, p.338-349, 2004.
- GUIA de vigilância epidemiológica. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009. Caderno 11, Leishmanioses.

- HEALTH topics Leishmaniasis, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>>. Acessado em 21/out. 2013.
- IBGE cidades. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2009. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php>>. Acessado em 21 de novembro de 2009.
- JUATUBA – Prefeitura de Juatuba. Disponível em: <<http://www.juatuba.mg.gov.br/historia.php>>. Acessado em 13 de maio de 2010.
- JUATUBA – Prefeitura de Juatuba. Disponível em: <[http://198.57.177.159/~juatuba/?page\\_id=12#UfLIGI2Hs-c](http://198.57.177.159/~juatuba/?page_id=12#UfLIGI2Hs-c)>. Acessado em 26 de julho de 2013.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Molec. Evolut.*, v.16, p. 111–120, 1980.
- LACERDA, M.M. The brazilian leishmaniasis control program. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.89, n.3, p.489-495, 1994.
- LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P. *et al.* Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology.*, v.125, pt 3, p.197-207, 2002.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W., KILLICK-KENDRICK, R. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London, Academic Press., 1987, p.1-20.
- LAVERAN, A.; MESNIL, F. Sur un protozoaire nouveau (Piroplasma donovani Laveran e Mesnil). *Parasite d'une fièvre de l'Inde. Comp. R. Hébd. Séanc. Acad. Sci.*, v.137, p.957-61, 1903.
- LEISHMANIASIS: epidemiological report of the Americas. *Report Leishmaniasis*, n. 1, 2013.
- LEISHMANIASIS. Pan American Health Organization. World Health Organization. Americas. 2013. Disponível em <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=3835&Itemid=4098&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3835&Itemid=4098&lang=en)>. Acessado em 21 de out. 2013.
- LEISHMANIOSE visceral grave: normas e condutas. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006. 59p.
- LEISHMANIOSE Visceral no Estado do RS. Centro Estadual de Vigilância em Saúde, 2009. (Nota Técnica). Disponível em: <<http://www.saude.rs.gov.br>>. Acessado em: 08 de Fevereiro de 2010.
- LEISHMANIOSE visceral 2012. Belo Horizonte: Prefeitura Municipal, 2013. Disponível em: <[http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=27220&lang=pt\\_BR&pg=5571&taxp=0&](http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=27220&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&)>. Acessado em 14 de outubro 2013.
- LETALIDADE de leishmaniose visceral, segundo UF de residência. Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1990 a 2011. 2013. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012\\_11\\_letalidade\\_por\\_lv\\_entre\\_1990\\_e\\_2011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_letalidade_por_lv_entre_1990_e_2011.pdf)>. Acessado em 09/05/13.
- LEWIS, D.J. Phlebotomid sandflies. *Bull. World Health Organization*, v.44, n.4, p. 535:551, 1971.
- LOPES, E.G.P.; FONSECA, J.G.; PAGLIONI, D.N. *et al.* Histórico das amostras de sangue canino com resultado inconclusivo para leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1999/2003. In: CONGRESSO MINEIRO DE EPIDEMIOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA, 3., 2005, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Associação Mineira de Epidemiologia, 2005. CD-ROM.
- LOPES, E.G.P.; BORGES, L.F.N.M.; ARAÚJO, M.O. *et al.* Diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral em cães realizado no Laboratório de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte e Escola de Veterinária da UFMG, 2005 a 2008 (1º semestre). In: REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS, 24., REUNIÃO APLICADA EM LEISHMANIOSES, 12., 2008, Uberaba. *Anais...* Uberaba, MG: Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2008. p.278.
- LOPES, E.G.P.; MAGALHÃES, D.F.; SILVA, J.A. *et al.* Distribuição temporal e espacial da Leishmaniose Visceral em humanos e cães em Belo Horizonte- MG, 1993 a 2007. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, n.5, p.1062-1071, 2010.
- LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.4, p.84-95, 1912.

- LUZ, Z.M.P.; PIMENTA, D.N.; CABRAL, A.L.V. *et al.* A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.34, n.3, p.249-254, 2001.
- LUZ, Z.M.P.; SCHALL, V.; RABELLO, A. Evaluation of a pamphlet on visceral leishmaniasis as a tool for providing disease information to healthcare professionals and laypersons. *Cad. Saúde Publ.*, v. 21, p. 608-621, 2005.
- MACHADO, J.G. *Comparação do diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina entre laboratórios de Belo Horizonte, 2003-2004.* 2004. 48f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- MAGALHÃES, P.A.; MAYRINK, W.; COSTA, C.A. *et al.* Calazar na Zona do Rio Doce – Minas Gerais: resultados de medidas profiláticas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.22, n.4, p.197-202, 1980.
- MAGALHÃES, D.F.; SILVA, J.A.; HADDAD, J.P.A. *et al.* Dissemination of information on visceral leishmaniasis from schoolchildren to their families: a sustainable model for controlling the disease. *Cad. Saúde Publ.*, v.25, n.7, p.1642-1646, 2009.
- MAIA-ELKHOURY, A.N.S.; CARMO, E.H.; SOUSA-GOMES, M.L.S. *et al.* Análise dos registros de leishmaniose visceral pelo método de captura-recaptura. *Rev. Saúde Publ.*, v.41, n.6, p.931-7, 2007.
- MANCIANTI, F.; FALCONE, M.L.; GIANNELLI, C. *et al.* Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v.59, n.1, p.13-21, 1995.
- MANUAL de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, DF. Ministério da Saúde, 2003. 120 p.
- MANUAL de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, DF. Ministério da Saúde, 2006. 120 p.
- MANUAL de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, DF. Ministério da Saúde, 2007. 177 p.
- MARCELINO, A.P. *Leishmaniose visceral e áreas de vulnerabilidade à saúde em Belo Horizonte, 2001-2005.* 2007. 72f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- MARCELINO, A. P. *Deteção de Leishmania (Ross, 1903) em Rattus norvegicus (Berkenhout, 1769) em Belo Horizonte, Minas Gerais, 2007 e 2008.* Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
- MARGONARI, C.; FREITAS, C.R.; RIBEIRO, R.C. *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n.1, p. 31-38, 2006.
- MARTINEZ, E. MOLLINEDO, S. TORREZ, M. *et al.* Co-infection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum/L. chagasi* in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. *Trop. Med. Hyg.*, v. 96, p. 529-532, 2002.
- MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SABROZA, P.C. *et al.* Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro – Brasil. *Cad. Saúde Publ.*, v.1, n.4, p. 432-446, 1985.
- MAURÍCIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today*, v.16, p.188-189, 2000.
- MEDRONHO, R.A.; CARVALHO, D.M.; BLOCH, K.V. *et al.* *Epidemiologia.* São Paulo: Atheneu, 2004. 493p.
- MENEZES, F. C. *Sistema de Informação de Leishmaniose Visceral (LV) em Belo Horizonte – Minas Gerais: avaliação do subcomponente Inquérito Canino no período de 2006 a 2010.* 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências – Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, MG.

- MICHALSKY, E.M.; ROCHA, M.F.; DA ROCHA LIMA, A.C. *et al.* Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol.*, v.147, n.1-2, p.67-76, 2007.
- MONTEIRO, E.M.; SILVA, J.C.F.; COSTA, R.T. *et al.* Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 38, n.2, p.147-152, 2005.
- MORAES, J.R.C. *Imunocromatografia, imunofluorescência indireta, Elisa e exame parasitológico "post mortem" no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.* 2006. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- MORAIS, M.H.F.; MAGALHÃES, D.F.; ARAÚJO, V.E.M. *et al.* Sustentabilidade das ações de controle da leishmaniose visceral e as implicações da priorização de áreas de risco na expansão da doença no distrito sanitário noroeste de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006 a 2008. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.41, s. III, p. 77-81, 2008.
- MORAIS, M.H.F. Avaliação das atividades de controle da leishmaniose visceral na Regional Noroeste de Belo Horizonte, 2006 a 2010. 2011. 217 f. Tese (Doutorado) -Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- MOREIRA JR, E.D.; DE SOUZA, V.M.; SREENIVASAN, M. *et al.* Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 69, p. 393-397, 2003.
- MOREIRA, E.D.; MENDES DE SOUZA, V.M.; SREENIVASAN, M. *et al.* Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine Leishmania transmission. *Vet Parasitol*, v.122, p. 245-252, 2004.
- MORENO, E.C.; MELO, M.N.; LAMBERTUCCI, J.R. *et al.* Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.39, n.5, p.421-427, 2006.
- NETO, A.N.G.; LEITE, A.P.N.; RABELLO, A. *et al.* Carta ao editor. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.*, v. 34, n. 5, p. 495, 2001.
- NICOLLE, C. Nouvelles acquisitions sur le kala-azar: cultures inoculations au chien, étiologi. *CR Hebd Séances et l'Acad Sci*, v.146, p.498- 499. 1908.
- NUNES, C.M.; LIMA, V.M.; PAULA, H.B. *et al.* Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.153, p.19-23, 2008.
- OLIVEIRA, C.A.; BATISTA, S.M.; FALCÃO, A.L. Calazar em Minas Gerais. *O Hospital*, v.56, n.4, p.71-84, 1959.
- OLIVEIRA, C.L.; ASSUNÇÃO, R.M.; REIS, I.A. *et al.* Spacial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1997. *Cad. Saúde Publ.*, v.7, p.1231-1239, 2001.
- PASSOS, V.M.; ANDRADE, A.C.; SILVA, E.S. A canine survey in a recent focus of cutaneous Leishmaniasis in the city of Sabará, the metropolitan area of Belo Horizonte. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 29, p.323–329, 1996.
- PEREIRA, M.G. *Epidemiologia teoria e prática.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2002. 595p.
- PFEIFFER, D.U.; ROBINSON, T.; STEVENSON, M. *et al.* *Spatial analysis in epidemiology.* New York: Oxford Biology. University Press Inc., 2009, 142p.
- PRADO, P. F.; ROCHA, M. F.; SOUSA, J. F. *et al.* Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 44, n. 5, p. 561-566, 2011.
- QUEIROZ, N.M.G.P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T.M.F.S. *et al.* Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 19, n. 1, p. 34-40, 2010.
- QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology*, v. 115, n.2, p. 143-156, 1997.



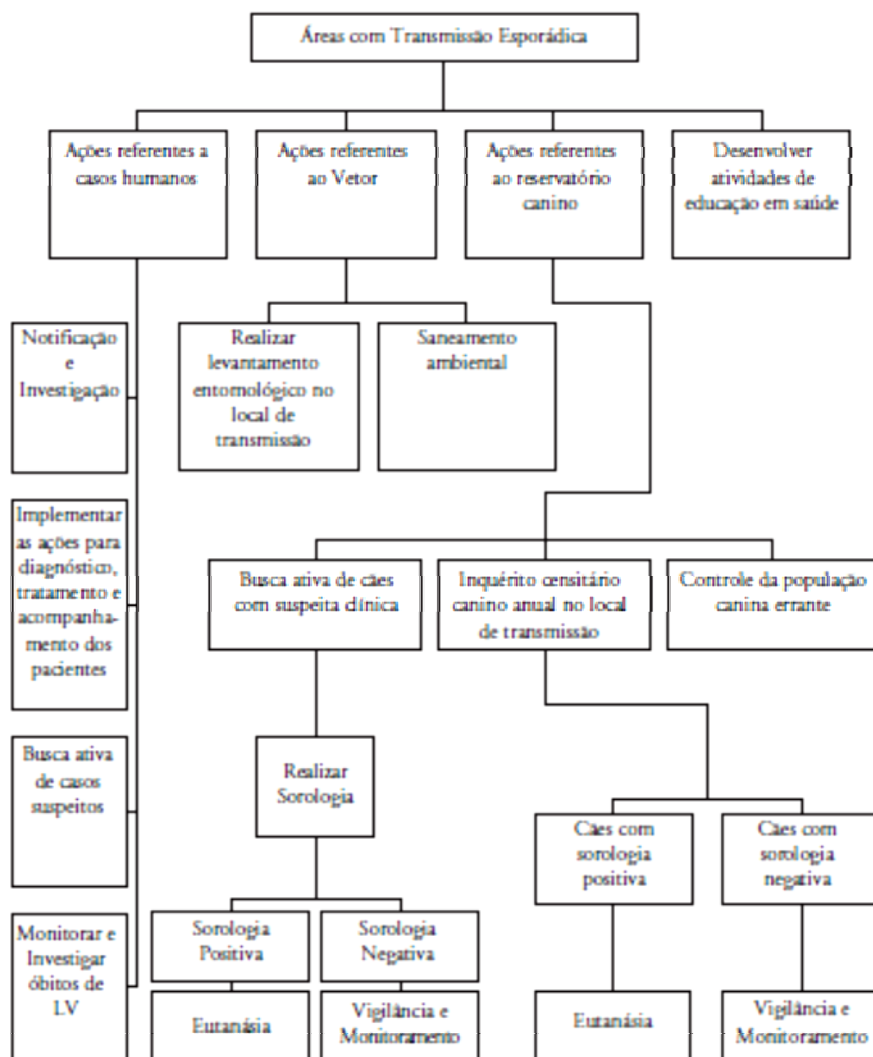
- REED, S.G. Diagnosis of leishmaniasis. *Clin. Dermatol.*, v.14, n.5, p.471-8, 1996.
- REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. *et al.* Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.*, v.81, n.1, p.68-75, 2006.
- RESENDE, S.M. Leishmaniose visceral em Minas Gerais. *Bol. Epidemiol.*, v.10, n.1, p.1-4, 2007.
- RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasitol.*, v.71, p.267-75, 1990.
- ROSÁRIO, E.Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J.C. *et al.* Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.100, p.197-203, 2005.
- ROSS, R. (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. (2) Further notes on Leishman's bodies. *Brit. Med. J.*, v.2, p.1261,1401, 1903.
- ROTHMAN, K. J. A sobering start for the cluster buster's conference. *Am. J. Epidemiol.*, v.132, p.s6-s13, 1990.
- ROTHMAN, K.J.; GREENLAND, S.; LASH, T.L. *Epidemiologia moderna*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2011, 887p.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.*, v.230, n.4732, p.1350-4, 1985.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evolut.*, v.4, p.406-425, 1987.
- SASTRE, N.; FRANCINE, O.; RAMÍREZ, O. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. *Vet Parasitol.*, v.158, p.117-20, 2008.
- SERGEANT, E.S.G. Epitools epidemiological calculators. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease. Available at: <http://epitools.ausvet.com.au>. Acesso em 01/09/2013.
- SHERLOCK, I.A.; MIRANDA, J.C.; SADIGURSKY, M. *et al.* Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.79, n.4, p.511, 1984.
- SILVA, E.S.; ROSCOE, E.H.; ARRUDA, L.Q. *et al.* Leishmaniose visceral canina: estudo clínico-epidemiológico e diagnóstico. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.23, n.3, p.111-116, 2001.
- SILVA, S.R. *Análise comparativa de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares na confirmação do diagnóstico em cães com sorologia positiva para leishmaniose visceral canina*. 2009.110f. Dissertação (Mestrado em Doenças Parasitárias e Infeciosas) – Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, MG.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evolut.*, v.28, n.10, p. 2731–2739, 2011.
- THOMSON, M.C.; CONNOR, S. Environmental information systems for the control of arthropod of vectors of disease. *Med. Vet. Entomol.*, v.14, p.227-244, 2000.
- TOLEZANO, J.E., ULIANA, S.R., TANIGUCHI, H.H. *et al.* The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State. Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.149, p.280–284, 2007.
- WORKING to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. In WHO Geneva: WHO, 2010. p.184.



## ANEXO 02

Recomendações para o controle da leishmaniose visceral em áreas classificadas como de transmissão esporádica, segundo o Ministério da Saúde, 2006.

### Vigilância e Controle em áreas com transmissão esporádica de Leishmaniose Visceral (LV)



Obs.: A confirmação do exame parasitológico canino não será obrigatória em áreas com transmissão esporádica, moderada ou intensa.

Fonte: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. *Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde*, 2006. Brasília-DF, pág 75.

### ANEXO 03

Questionário a ser aplicado aos proprietários dos cães examinados na primeira coleta de sangue em Juatuba, Minas Gerais, 2010.

QUESTIONÁRIO N° \_\_\_\_\_ HORA INÍCIO / TÉRMINO

#### CARACTERÍSTICAS DO RESPONSÁVEL PELO CÃO

1. Idade: \_\_\_\_\_ anos

2. Grau de instrução ( escolaridade) do entrevistado:

- ( ) nunca freqüentou escola ( ) primário ( ) 1º grau incompleto  
( ) 1º grau completo ( ) 2º grau incompleto ( ) 2º grau completo  
( ) 3º grau incompleto ( cursando) ( ) 3º grau (superior) completo ( ) pós-graduação  
( ) não soube responder

3. Número de moradores no seu imóvel:

- ( ) 1 morador ( ) 2 a 3 moradores ( ) 4 a 5 moradores ( ) 6 ou mais moradores  
( ) não soube responder

4. Renda do grupo familiar (vou te dar as opções em faixas):

- ( ) sem renda ( ) menos que 1 salário ( ) 1 salário ( ) entre 1 e 3 salários  
( ) entre 3 e 5 salários ( ) acima de 5 salários ( ) não soube responder

#### CARACTERÍSTICAS DO IMÓVEL

5. ( Ler opção) Tipo de moradia: ( ) casa ( ) apartamento ( ) barracão

6. ( Ler opção) Tipo de revestimento da área do seu imóvel ? 6.1 Interno: ( ) com reboco ( ) sem reboco  
6.2 Externo: ( ) com reboco ( ) sem reboco

7. No seu imóvel tem água tratada? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe/ Não respondeu

7.1 Possui rede de esgoto? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe/ Não respondeu

8. ( Ler opção) Qual o destino do lixo em seu imóvel?

( ) acumula a céu aberto ( ) queima ( ) enterra ( ) compostagem ( ) coletado pela Prefeitura

8.1 Qual a frequência? \_\_\_\_\_ vezes por semana

9. ( Ler opção) Você aplica ou usa inseticida no seu imóvel ? ( ) Sim ( ) Não

9.1 Onde? ( ) dentro do imóvel ( ) fora do imóvel ( ) ambos

9.2 Qual a forma de uso do inseticida?

( ) spray ( ) de tomada ( ) na bomba ( ) Joga com balde/garrafa

9.3 Qual nome produto? \_\_\_\_\_

10. ( Ler opção) O seu imóvel possui peridomicílio (terreiro)? ( ) Sim ( ) Não

10.1 É constituído de: ( ) chão de terra ( ) cimento ( ) ambos ( ) Não sabe/ Não respondeu

10.2 No peridomicílio (terreiro) se encontra:

( ) plantas ornamentais/jardim ( ) bananeiras ( ) plantas frutíferas ( ) horta

( ) lixo exposto ( ) mato ( ) entulho

( ) matéria orgânica ( fezes, folhas, frutas, outros) Circular a opção de matéria orgânica presente

10.3 Faz limpeza do quintal ? ( ) Sim ( ) Não

10.3.1 Qual frequência ? ( ) diária ( ) semanal ( ) quinzenal ( ) esporádico (acima de 15 d)

11. ( Ler opção) O imóvel é visitado por:

( ) gato ( ) roedores ( ) gambás ( ) cães errantes ( ) não é visitado

( ) não soube responder outros \_\_\_\_\_

12. Quantos cães tem na casa?

( ) 1 cão ( ) 2 a 3 cães ( ) 4 a 5 cães ( ) 6 ou mais cães

13. Você possui outros animais? ( ) Sim ( ) Não

( ) gato ( ) pássaro ( ) galinha ( ) pato ( ) porco ( ) outros \_\_\_\_\_

14. Houve morte de cães no seu imóvel? ( ) Sim ( ) Não 14.1 Quando? \_\_\_\_\_

14.2 Sabe por qual doença ou o diagnóstico? ( ) Sim ( ) Não 14.2.1 Qual? \_\_\_\_\_

14.3 Lembra dos sinais clínicos do cão na época? ( ) Sim ( ) Não 14.3.1 Qual? \_\_\_\_\_

15. Em sua rua existe captura de cães soltos? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe responder

16. **[ Ler opção ]** Nos quarteirões ao redor do imóvel há:

( ) terreno baldio ( ) mata ( ) muitas árvores ( ) lixo exposto ( ) córrego

( ) criações de animais (*galinha, porco, cabrito, cavalo, passarinho, gado, outros*) **Circular a opção presente**

### INFORMAÇÕES SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL

17. O que você conhece ou já ouviu falar da leishmaniose visceral ou calazar? ( ) Sim ( ) Não

17.1 Qual a forma de transmissão?

17.2 Quem transmite a doença ?

17.3 Quem mantém a doença no ambiente ?

17.4 Quais são os sintomas ?

17.5 Quais são as medidas de prevenção e controle? \_\_\_\_\_

18. Já existiu cão com leishmaniose visceral na:

( ) vizinhança ( ) no próprio domicílio ( ) não existiu ( ) não soube responder

19. Você realiza alguma medida de prevenção, voltada a:

19.1 Seu animal ( ) Sim ( ) Não – O que?

19.2 Ambiente ( ) Sim ( ) Não – O que?

19.3 A você mesmo ( ) Sim ( ) Não – O que?

### CARACTERÍSTICAS DO CÃO

20. Nome do cão: \_\_\_\_\_ 20.1. Sexo: ( ) Fêmea ( ) Macho

20.2. Idade \_\_\_\_\_ 20.3. Raça \_\_\_\_\_ 20.4 Cor: \_\_\_\_\_

21 Porte do cão: ( ) pequeno ( ) médio ( ) grande

**[ Escreva um sinal que identifique o animal dos demais, caso haja \_\_\_\_\_ ]**

22. Pêlo: ( ) curto ( ) longo ( ) tosado

23. O animal é castrado? ( ) Sim ( ) Não

24. Aspecto / Sinal clínico do cão **[observação entrevistador e resposta do proprietário]:**

( ) vômito ( ) tosse ( ) queda de pelo mais que o normal

( ) lesão de pele ( ) apatia ( ) tique nervoso(Mioclonia)**Tremor**

( ) diarreia ( ) pêlo opaco ( ) unha grande

- coriza                       ceratoconjuntivite       paresia trem posterior  
 edema patas                 sem sinal aparente  
 outro \_\_\_\_\_

**25. [ Ler opção ]** Qual é a alimentação básica do cão?  ração  comida caseira  ambos

**26. Animal já foi vacinado? [ pedir para ver o cartão se houver ]**

- Sim                       Não                       Não soube responder

26.1 A da Prefeitura -Raiva data \_\_\_\_\_ (nome lab. Se for particular) data e nome \_\_\_\_\_

26.2. A do veterinário ou casa de ração - Polivalente (data e lab) \_\_\_\_\_

**27. Animal já foi vacinado para LV?**  Sim                       Não                       Não soube responder

27.1 Qual vacina? \_\_\_\_\_ 27.2 Desde quando? \_\_\_\_\_

27.3 Tomou as 3 doses iniciais?  Sim       Não                       Não soube responder

27.4 Faz reforço anual?                       Sim       Não                       Não soube responder

**28. O cão usa coleira contra leishmaniose visceral?**  Sim       Não       Já usou mas não usa

atualmente 28.1 Qual? \_\_\_\_\_ 27.2 Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ 27.3 Qual período de troca? \_\_\_\_\_

**29. [ Ler opção ]** Há quanto tempo você tem este cão?

menos de um ano       entre 1 a 2 anos       entre 2 a 3 anos       entre 3 a 4 anos

entre 4 a 5 anos       mais de 5 anos       não soube responder

**30. O cão foi adquirido em Juatuba?** 30.1  Não Onde? \_\_\_\_\_

30.2  Sim Bairro \_\_\_\_\_  não sei

**31. [ Ler opção ]** Onde fica o cão durante o dia?  dentro residência       fora da residência       rua

**32. Onde o cão fica durante a noite?**  dentro residência       fora da residência       rua

32.1 Em canil?  Sim       Não                      32.2 É telado com malha fina para inseto?  Sim       Não

**33. [ Ler opção ]** O cão tem acesso à rua?  Sim       Não

33.1  sem o proprietário  com o proprietário

33.1.1  na guia  sem a guia  ambos

33.1.2 Qual frequência?  diário  semanal  esporádico

**34. [ Ler opção ]** Faz uso de algum produto ectoparasiticida no cão, por exemplo, para pulga, carrapato, inseto?

Sim       Não                      34.1 Que tipo?       shampoo/sabão       pour on       spray       via oral

34.2 Qual frequência?  diário       semanal       quinzenal       mensal       esporádico

**35. [ Ler opção ]** Seu cão já tinha feito exame anteriormente para leishmaniose?  Sim       Não

35.1 Quando? \_\_\_\_\_ 35.3 Qual laboratório?  particular       prefeitura

35.4 Qual resultado?  negativo       positivo       indeterminado       não soube responder

**36. O cão já viajou com alguém?**  sim       não       não soube responder

36.1 Quais os locais a partir do início de 2009?

---

#### **OBSERVAÇÕES:**

Total de cães: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## ANEXO 04

Questionário a ser aplicado aos proprietários dos cães examinados na segunda e terceira coletas de sangue em Juatuba, Minas Gerais, 2010 e 2011.

**QUESTIONÁRIO N° \_\_\_\_\_**      **HORA INÍCIO / TÉRMINO**

Endereço: \_\_\_\_\_


Nome do cão: \_\_\_\_\_ Sinal de identificação \_\_\_\_\_

### CARACTERÍSTICAS DO CÃO

1. Cão presente? ( ) Sim ( ) Não - 1.1 Por que? ( ) morreu ( ) desapareceu ( ) mudou
  2. Proprietário permitiu nova coleta? ( ) Sim ( ) Não
  - 2.1 Por que não? \_\_\_\_\_
  3. Aspecto / Sinal clínico do cão **(observação entrevistador e resposta do proprietário):**  
( ) vômito                      ( ) tosse                      ( ) queda de pelo mais que o normal  
( ) lesão de pele              ( ) apatia                      ( ) tique nervoso(Mioclonia)**Tremor**  
( ) diarréia                      ( ) pêlo opaco              ( ) unha grande  
( ) coriza                      ( ) ceratoconjuntivite      ( ) paresia trem posterior  
( ) edema patas              ( ) sem sinal aparente  
( ) outro \_\_\_\_\_
  4. O cão foi ao veterinário? ( ) Não ( ) Sim - 4.1 Por que sim? \_\_\_\_\_
  5. O cão tomou alguma vacina? ( ) Não ( ) Sim ( ) Não soube responder
  - 5.1 Qual? \_\_\_\_\_ 5.2 Quando? \_\_\_\_\_ 5.3 Quantas doses? \_\_\_\_\_
  6. O cão está usando coleira? ( ) Não ( ) Sim - 6.1 Há quanto tempo? \_\_\_\_\_
  7. Se cadela, a mesma está prenha? ( ) Não ( ) Sim
  8. O cão viajou? ( ) Não ( ) Sim - 8.1 Quando? \_\_\_\_\_ 8.2 Onde? \_\_\_\_\_
- ### CARACTERÍSTICAS DO IMÓVEL
9. Houve mudança no peridomicílio? ( ) Não ( ) Sim 9.1 Qual \_\_\_\_\_
  10. Fez uso de inseticidas? ( ) Não ( ) Sim - 10.1 Qual frequência? \_\_\_\_\_
  11. Houve morte de cães no seu imóvel? ( ) Não ( ) Sim 11.1 Quando? \_\_\_\_\_
  - 11.2 Sabe por qual doença ou o diagnóstico? ( ) Não ( ) Sim 11.2.1 Qual? \_\_\_\_\_
  - 11.3 Lembra dos sinais clínicos do cão na época? ( ) Não ( ) Sim 11.3.1 Qual? \_\_\_\_\_
  12. Houve introdução de cães no domicílio? ( ) Não ( ) Sim 12.1 Quantos? \_\_\_\_\_
  13. Houve introdução de outros animais no domicílio? ( ) Não ( ) Sim - 13.1 Qual? \_\_\_\_\_
  14. O cão teve contato com outros animais? ( ) Não ( ) Sim - 14.1 Qual? \_\_\_\_\_

## ANEXO 05

Modelo de identificação (crachá) utilizado pelos estudantes da Escola de Veterinária da UFMG.

 Escola de Veterinária UFMG
<b>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva</b>
Dinâmica da leishmaniose visceral em uma coorte de cães em Juatuba-MG, de 2010 a 2011.
foto 3x4
Nome: RG: Orientador: Curso: Matrícula:



## ANEXO 06

Distribuição dos cães amostrados de acordo com os bairros, zonas de Juatuba, Minas Gerais, 2009.

ZONA	BAIRRO	QUARTEIRÕES	RESIDÊNCIAS	CÃES	COLETAR CÃES (1029)
Z1	COQUEIRO VERDE	35	460	118	22,74
	CASTELO BRANCO	19	100	48	9,26
Z2	ELDORADO	18	148	136	26,23
	SANTO ANTONIO	20	365	343	66,37
Z3	SAMAMBAIA	43	471	216	41,77
	SOL NASCENTE	4	29	33	6,38
Z4	RES. ILHÉUS	22	99	48	9,26
	RES. DONA RANCISCA	25	109	97	18,72
	RES. SERRA AZUL	16	104	57	11,01
	JARDIM BAVIERA / BRAUNAS	24	355	266	51,45
Z5	VEREDAS I	10	54	50	9,67
	VEREDAS II	22	221	99	19,13
	VILA VERNE	17	90	58	11,31
	DIAMANTINA	18	121	55	10,60
	CARIOCA	14	66	28	5,35
Z6	VILA M. REGINA I	73	470	236	45,68
	VILA M. REGINA II	26	281	153	29,63
Z7	QUINTA DA BOA VISTA	5	79	67	12,96
	JARDIM BOA VISTA	41	479	148	28,81
Z8	BOA VISTA I	30	557	245	47,44
	BOA VISTA II	9	139	189	36,63
S1	CENTRO	57	655	309	59,70
S2	SATÉLITE I	54	666	355	68,94
S3	SATÉLITE II	32	332	161	31,17
	PARADA DAS VELHAS	4	32	56	10,80
S4	CIDADE NOVA II	47	831	299	57,83
S5	BELA VISTA	25	366	173	33,44
	CONDOMÍNIO VILLAGE	9	56	20	4,10
	PONTE NOVA	5	48	86	16,67
S6	CIDADE NOVA I	25	761	380	73,57
S7	CANAÃ	38	510	418	81,00
	SÃO GERÔNIMO	13	162	79	15,33
S8	CIDADE NOVA IV	8	18	12	2,26
	PARQUE ALVORADA	13	108	81	15,64
	CIDADE NOVA III	18	456	187	36,10
	DISTRITO IND. II	10	14	10	2,05
<b>TOTAL</b>	<b>36 BAIRROS</b>	<b>849</b>	<b>9812</b>	<b>5316</b>	<b>1029</b>

## ANEXO 07

Sorteio dos quarteirões de cada bairro de Juatuba, de acordo com a tabela de números aleatórios.

ZONA	BAIRRO	QUART.	CÃES	QUARTEIRÓES SORTEADOS
<b>Z1</b>	COQUEIRO VERDE	35	22,74	(N=23) 33, 28, 25, 01, 06, 31, 16, 17, 34, 33, 07, 09, 13, 13, 10, 27, 31, 32, 23, 34, 06, 03, 13.
	CASTELO BRANCO	19	9,26	(N=9) 13, 17, 06, 11, 02, 07, 05, 08, 17.
	<b>Z2</b> ELDERADO	18	26,23	(N=26) 25, 10, 04, 10, 12, 15, 12, 01, 14, 13, 02, 08, 01, 18, 07, 02, 18, 09, 02, 07, 17, 10, 13, 01, 02, 01. (N=67) 16, 01, 11, 02, 03, 16, 10, 07, 17, 09, 18, 19, 04, 19, 19, 06, 17, 03, 01, 20, 06, 17, 17, 08, 03, 04, 04, 05, 15, 17, 16, 01, 12, 09, 01, 13, 16, 03, 16, 10, 07, 06, 18, 18, 19, 05, 13, 17, 06, 20, 11, 02, 07, 05, 08, 17, 16, 15, 12, 13, 08, 06, 02, 11, 06, 16. (N=42) 02, 07, 18, 22, 21, 01, 18, 16, 19, 20, 36, 43, 36, 22, 07, 24, 22, 07, 38, 27, 30, 07, 07, 38, 27, 05, 42, 01, 10, 10, 27, 08, 34, 40, 22, 32, 09, 27, 39, 05, 15, 25.
SANTO ANTONIO	20	66,37	(N=19) 07, 13, 15, 20, 21, 19, 04, 21, 10.	
<b>Z3</b>	SAMAMBAIA	43	41,77	(N=19) 23, 03, 23, 23, 01, 06, 18, 09, 07, 15, 21, 08, 07, 21, 18, 14, 14, 10, 06.
	SOL NASCENTE	4	6,38	(N=6) 04, 01, 03, 02, 04, 04.
<b>Z4</b>	RES. ILHÉUS	22	9,26	(N=11) 01, 01, 14, 02, 14, 12, 04, 10, 10, 14, 06.
	RES. DONA RANCISCA	25	18,72	(N=51) 13, 15, 04, 15, 15, 09, 22, 06, 07, 13, 15, 20, 21, 04, 21, 10, 24, 19, 07, 04, 04, 03, 22, 10, 19, 24, 03, 21, 02, 17, 09, 13, 23, 03, 23, 23, 01, 06, 16, 18, 09, 07, 15, 21, 08, 07, 23, 21, 18, 14, 14.
<b>Z5</b>	JARDIM BAVIERA / BRAUNAS	24	51,45	(N=10) 01, 09, 03, 09, 06, 05, 04, 01, 07, 05.
	VEREDAS 1	10	9,67	(N=19) 06, 20, 09, 06, 21, 10, 16, 08, 13, 20, 21, 10, 08, 18, 10, 03, 10, 09, 02.
	VEREDAS 2	22	19,13	(N=11) 15, 16, 01, 11, 02, 03, 16, 10, 07, 17, 09.
	VILA VERNE	17	11,31	(N=11) 08, 07, 08, 18, 04, 18, 05, 08, 07, 14, 03.
	DIAMANTINA	18	10,60	(N=5) 05, 08, 07, 14, 03. (N=46) 05, 52, 27, 25, 63, 46, 19, 68, 66, 66, 73, 13, 55, 45, 61, 66, 28, 56, 67, 64, 29, 01, 70, 24, 57, 10, 48, 18, 19, 20, 20, 69, 04, 34, 19, 24, 19, 12, 36, 38, 61, 14, 17, 25, 25, 26. (N=30) 22, 03, 23, 20, 23, 10, 12, 03, 19, 02, 08, 07, 26, 23, 18, 24, 26, 07, 19, 20, 22, 24, 21, 22, 12, 04, 19, 16, 05, 05. (N=13) 01, 02, 01, 01, 02, 03, 04, 03, 01, 03, 04, 04, 05.
CARIOCA	14	5,35	(N=29) 30, 09, 15, 28, 13, 24, 04, 37, 14, 40, 14, 08, 23, 26, 03, 16, 11, 11, 20, 15, 37, 14, 17, 33, 23, 35, 21, 09, 15. (N=47) 19, 19, 06, 28, 17, 03, 01, 20, 06, 17, 17, 17, 08, 03, 27, 21, 04, 28, 27, 04, 05, 27, 15, 24, 17, 16, 27, 01, 12, 23, 09, 01, 13, 16, 03, 16, 10, 07, 06, 28, 18, 19, 29, 28, 23, 05, 13. (N=37) 05, 05, 06, 03, 08, 01, 08, 05, 08, 01, 06, 02, 06, 01, 07, 01, 02, 03, 07, 09, 04, 06, 03, 01, 06, 03, 04, 04, 05, 01, 09, 01, 03. (N=60) 52, 30, 11, 28, 47, 16, 30, 46, 17, 48, 43, 09, 13, 12, 52, 04, 43, 20, 53, 48, 39, 06, 04, 52, 31, 40, 02, 07, 07, 35, 44, 39, 30, 08, 04, 46, 29, 21, 10, 01, 03, 15, 10, 53, 41, 49, 28, 41, 55, 50, 16, 24, 14, 02, 15, 45, 19, 35, 13, 59. (N=69) 15, 04, 45, 40, 43, 41, 15, 15, 43, 25, 46, 09, 52, 22, 51, 31, 06, 07, 13, 44, 26, 15, 20, 29, 45, 45, 21, 32, 19, 54, 38, 40, 04, 40, 21, 48, 52, 10, 24, 47, 32, 50, 19, 52, 07, 26, 04, 42, 04, 03, 22, 10, 19, 30, 35, 32, 30, 24, 03, 36, 41, 21, 43, 43, 02, 17, 26, 09, 13. (N=31) 14, 29, 20, 06, 07, 09, 08, 09, 32, 01, 01, 08, 02, 20, 18, 06, 16, 29, 13, 03, 31, 07, 13, 13, 30, 15, 30, 10, 09, 20, 31. (N=11) 02, 03, 01, 01, 03, 04, 03, 01, 03, 02, 02. (N=58) 44, 35, 30, 23, 36, 41, 46, 41, 15, 16, 01, 45, 28, 30, 11, 27, 47, 40, 02, 34, 42, 03, 16, 10, 07, 25, 17, 27, 34, 44, 09, 18, 19, 04, 19, 33, 19, 06, 28, 17, 45, 03, 01, 20, 35, 06, 17, 17, 38, 17, 08, 03, 32, 27, 32, 21, 04, 28. (N=33) 12, 10, 13, 01, 06, 02, 11, 20, 23, 15, 21, 06, 01, 20, 07, 12, 23, 15, 16, 01, 11, 02, 03, 16, 10, 07, 25, 17, 09, 18, 19, 04, 06. (N=4) 01, 07, 08, 05.	
<b>Z6</b>	VILA M. REGINA 1	73	45,68	(N=17) 02, 01, 05, 02, 01, 02, 05, 03, 03, 05, 03, 01, 05, 01, 03, 02, 04. (N=74) 02, 15, 03, 18, 14, 21, 14, 23, 11, 15, 19, 10, 24, 17, 10, 13, 15, 19, 09, 01, 19, 12, 03, 12, 22, 09, 06, 17, 23, 20, 20, 14, 02, 09, 16, 25, 14, 10, 24, 18, 03, 14, 02, 12, 12, 23, 07, 14, 07, 15, 11, 25, 19, 04, 17, 25, 25, 20, 19, 13, 21, 01, 22, 04, 09, 17, 20, 04, 07, 16, 21, 19, 04, 10. (N=81) 30, 10, 09, 20, 31, 01, 01, 14, 20, 02, 34, 13, 06, 26, 28, 14, 27, 10, 31, 36, 04, 12, 36, 14, 22, 04, 09, 19, 29, 34, 16, 28, 15, 03, 06, 10, 19, 06, 18, 26, 24, 07, 07, 31, 17, 03, 08, 06, 23, 12, 17, 32, 19, 18, 31, 26, 17, 31, 25, 04, 15, 13, 26, 33, 10, 16, 23, 08, 12, 05, 09, 11, 29, 23, 21, 35, 18, 16, 32, 16, 38. (N=15) 03, 13, 04, 03, 01, 02, 10, 01, 15, 08, 07, 11, 14, 03, 02. (N=2) 06, 01 (N=16) 02, 08, 03, 01, 03, 01, 13, 04, 07, 03, 01, 05, 03, 07, 12, 07. (N=36) 03, 13, 14, 01, 12, 15, 12, 10, 04, 10, 14, 02, 08, 01, 18, 07, 02, 18, 09, 02, 07, 06, 01, 01, 02, 01, 13, 10, 17, 04, 11, 18, 18, 06, 04, 05. (N=2) 03, 07.
	VILA M. REGINA 2	26	29,63	(N=13) 01, 02, 01, 01, 02, 03, 04, 03, 01, 03, 04, 04, 05.
<b>Z7</b>	QUINTA DA BOA VISTA	5	12,96	(N=29) 30, 09, 15, 28, 13, 24, 04, 37, 14, 40, 14, 08, 23, 26, 03, 16, 11, 11, 20, 15, 37, 14, 17, 33, 23, 35, 21, 09, 15. (N=47) 19, 19, 06, 28, 17, 03, 01, 20, 06, 17, 17, 17, 08, 03, 27, 21, 04, 28, 27, 04, 05, 27, 15, 24, 17, 16, 27, 01, 12, 23, 09, 01, 13, 16, 03, 16, 10, 07, 06, 28, 18, 19, 29, 28, 23, 05, 13. (N=37) 05, 05, 06, 03, 08, 01, 08, 05, 08, 01, 06, 02, 06, 01, 07, 01, 02, 03, 07, 09, 04, 06, 03, 01, 06, 03, 04, 04, 05, 01, 09, 01, 03. (N=60) 52, 30, 11, 28, 47, 16, 30, 46, 17, 48, 43, 09, 13, 12, 52, 04, 43, 20, 53, 48, 39, 06, 04, 52, 31, 40, 02, 07, 07, 35, 44, 39, 30, 08, 04, 46, 29, 21, 10, 01, 03, 15, 10, 53, 41, 49, 28, 41, 55, 50, 16, 24, 14, 02, 15, 45, 19, 35, 13, 59. (N=69) 15, 04, 45, 40, 43, 41, 15, 15, 43, 25, 46, 09, 52, 22, 51, 31, 06, 07, 13, 44, 26, 15, 20, 29, 45, 45, 21, 32, 19, 54, 38, 40, 04, 40, 21, 48, 52, 10, 24, 47, 32, 50, 19, 52, 07, 26, 04, 42, 04, 03, 22, 10, 19, 30, 35, 32, 30, 24, 03, 36, 41, 21, 43, 43, 02, 17, 26, 09, 13. (N=31) 14, 29, 20, 06, 07, 09, 08, 09, 32, 01, 01, 08, 02, 20, 18, 06, 16, 29, 13, 03, 31, 07, 13, 13, 30, 15, 30, 10, 09, 20, 31. (N=11) 02, 03, 01, 01, 03, 04, 03, 01, 03, 02, 02. (N=58) 44, 35, 30, 23, 36, 41, 46, 41, 15, 16, 01, 45, 28, 30, 11, 27, 47, 40, 02, 34, 42, 03, 16, 10, 07, 25, 17, 27, 34, 44, 09, 18, 19, 04, 19, 33, 19, 06, 28, 17, 45, 03, 01, 20, 35, 06, 17, 17, 38, 17, 08, 03, 32, 27, 32, 21, 04, 28. (N=33) 12, 10, 13, 01, 06, 02, 11, 20, 23, 15, 21, 06, 01, 20, 07, 12, 23, 15, 16, 01, 11, 02, 03, 16, 10, 07, 25, 17, 09, 18, 19, 04, 06. (N=4) 01, 07, 08, 05.
	JARDIM BOA VISTA	41	28,81	(N=17) 02, 01, 05, 02, 01, 02, 05, 03, 03, 05, 03, 01, 05, 01, 03, 02, 04. (N=74) 02, 15, 03, 18, 14, 21, 14, 23, 11, 15, 19, 10, 24, 17, 10, 13, 15, 19, 09, 01, 19, 12, 03, 12, 22, 09, 06, 17, 23, 20, 20, 14, 02, 09, 16, 25, 14, 10, 24, 18, 03, 14, 02, 12, 12, 23, 07, 14, 07, 15, 11, 25, 19, 04, 17, 25, 25, 20, 19, 13, 21, 01, 22, 04, 09, 17, 20, 04, 07, 16, 21, 19, 04, 10. (N=81) 30, 10, 09, 20, 31, 01, 01, 14, 20, 02, 34, 13, 06, 26, 28, 14, 27, 10, 31, 36, 04, 12, 36, 14, 22, 04, 09, 19, 29, 34, 16, 28, 15, 03, 06, 10, 19, 06, 18, 26, 24, 07, 07, 31, 17, 03, 08, 06, 23, 12, 17, 32, 19, 18, 31, 26, 17, 31, 25, 04, 15, 13, 26, 33, 10, 16, 23, 08, 12, 05, 09, 11, 29, 23, 21, 35, 18, 16, 32, 16, 38. (N=15) 03, 13, 04, 03, 01, 02, 10, 01, 15, 08, 07, 11, 14, 03, 02. (N=2) 06, 01 (N=16) 02, 08, 03, 01, 03, 01, 13, 04, 07, 03, 01, 05, 03, 07, 12, 07. (N=36) 03, 13, 14, 01, 12, 15, 12, 10, 04, 10, 14, 02, 08, 01, 18, 07, 02, 18, 09, 02, 07, 06, 01, 01, 02, 01, 13, 10, 17, 04, 11, 18, 18, 06, 04, 05. (N=2) 03, 07.
<b>Z8</b>	BOA VISTA 1	30	47,44	(N=29) 30, 09, 15, 28, 13, 24, 04, 37, 14, 40, 14, 08, 23, 26, 03, 16, 11, 11, 20, 15, 37, 14, 17, 33, 23, 35, 21, 09, 15. (N=47) 19, 19, 06, 28, 17, 03, 01, 20, 06, 17, 17, 17, 08, 03, 27, 21, 04, 28, 27, 04, 05, 27, 15, 24, 17, 16, 27, 01, 12, 23, 09, 01, 13, 16, 03, 16, 10, 07, 06, 28, 18, 19, 29, 28, 23, 05, 13. (N=37) 05, 05, 06, 03, 08, 01, 08, 05, 08, 01, 06, 02, 06, 01, 07, 01, 02, 03, 07, 09, 04, 06, 03, 01, 06, 03, 04, 04, 05, 01, 09, 01, 03. (N=60) 52, 30, 11, 28, 47, 16, 30, 46, 17, 48, 43, 09, 13, 12, 52, 04, 43, 20, 53, 48, 39, 06, 04, 52, 31, 40, 02, 07, 07, 35, 44, 39, 30, 08, 04, 46, 29, 21, 10, 01, 03, 15, 10, 53, 41, 49, 28, 41, 55, 50, 16, 24, 14, 02, 15, 45, 19, 35, 13, 59. (N=69) 15, 04, 45, 40, 43, 41, 15, 15, 43, 25, 46, 09, 52, 22, 51, 31, 06, 07, 13, 44, 26, 15, 20, 29, 45, 45, 21, 32, 19, 54, 38, 40, 04, 40, 21, 48, 52, 10, 24, 47, 32, 50, 19, 52, 07, 26, 04, 42, 04, 03, 22, 10, 19, 30, 35, 32, 30, 24, 03, 36, 41, 21, 43, 43, 02, 17, 26, 09, 13. (N=31) 14, 29, 20, 06, 07, 09, 08, 09, 32, 01, 01, 08, 02, 20, 18, 06, 16, 29, 13, 03, 31, 07, 13, 13, 30, 15, 30, 10, 09, 20, 31. (N=11) 02, 03, 01, 01, 03, 04, 03, 01, 03, 02, 02. (N=58) 44, 35, 30, 23, 36, 41, 46, 41, 15, 16, 01, 45, 28, 30, 11, 27, 47, 40, 02, 34, 42, 03, 16, 10, 07, 25, 17, 27, 34, 44, 09, 18, 19, 04, 19, 33, 19, 06, 28, 17, 45, 03, 01, 20, 35, 06, 17, 17, 38, 17, 08, 03, 32, 27, 32, 21, 04, 28. (N=33) 12, 10, 13, 01, 06, 02, 11, 20, 23, 15, 21, 06, 01, 20, 07, 12, 23, 15, 16, 01, 11, 02, 03, 16, 10, 07, 25, 17, 09, 18, 19, 04, 06. (N=4) 01, 07, 08, 05.
	BOA VISTA 2	9	36,63	(N=60) 52, 30, 11, 28, 47, 16, 30, 46, 17, 48, 43, 09, 13, 12, 52, 04, 43, 20, 53, 48, 39, 06, 04, 52, 31, 40, 02, 07, 07, 35, 44, 39, 30, 08, 04, 46, 29, 21, 10, 01, 03, 15, 10, 53, 41, 49, 28, 41, 55, 50, 16, 24, 14, 02, 15, 45, 19, 35, 13, 59. (N=69) 15, 04, 45, 40, 43, 41, 15, 15, 43, 25, 46, 09, 52, 22, 51, 31, 06, 07, 13, 44, 26, 15, 20, 29, 45, 45, 21, 32, 19, 54, 38, 40, 04, 40, 21, 48, 52, 10, 24, 47, 32, 50, 19, 52, 07, 26, 04, 42, 04, 03, 22, 10, 19, 30, 35, 32, 30, 24, 03, 36, 41, 21, 43, 43, 02, 17, 26, 09, 13. (N=31) 14, 29, 20, 06, 07, 09, 08, 09, 32, 01, 01, 08, 02, 20, 18, 06, 16, 29, 13, 03, 31, 07, 13, 13, 30, 15, 30, 10, 09, 20, 31. (N=11) 02, 03, 01, 01, 03, 04, 03, 01, 03, 02, 02. (N=58) 44, 35, 30, 23, 36, 41, 46, 41, 15, 16, 01, 45, 28, 30, 11, 27, 47, 40, 02, 34, 42, 03, 16, 10, 07, 25, 17, 27, 34, 44, 09, 18, 19, 04, 19, 33, 19, 06, 28, 17, 45, 03, 01, 20, 35, 06, 17, 17, 38, 17, 08, 03, 32, 27, 32, 21, 04, 28. (N=33) 12, 10, 13, 01, 06, 02, 11, 20, 23, 15, 21, 06, 01, 20, 07, 12, 23, 15, 16, 01, 11, 02, 03, 16, 10, 07, 25, 17, 09, 18, 19, 04, 06. (N=4) 01, 07, 08, 05.
<b>S1</b>	CENTRO	57	59,70	(N=69) 15, 04, 45, 40, 43, 41, 15, 15, 43, 25, 46, 09, 52, 22, 51, 31, 06, 07, 13, 44, 26, 15, 20, 29, 45, 45, 21, 32, 19, 54, 38, 40, 04, 40, 21, 48, 52, 10, 24, 47, 32, 50, 19, 52, 07, 26, 04, 42, 04, 03, 22, 10, 19, 30, 35, 32, 30, 24, 03, 36, 41, 21, 43, 43, 02, 17, 26, 09, 13. (N=31) 14, 29, 20, 06, 07, 09, 08, 09, 32, 01, 01, 08, 02, 20, 18, 06, 16, 29, 13, 03, 31, 07, 13, 13, 30, 15, 30, 10, 09, 20, 31. (N=11) 02, 03, 01, 01, 03, 04, 03, 01, 03, 02, 02. (N=58) 44, 35, 30, 23, 36, 41, 46, 41, 15, 16, 01, 45, 28, 30, 11, 27, 47, 40, 02, 34, 42, 03, 16, 10, 07, 25, 17, 27, 34, 44, 09, 18, 19, 04, 19, 33, 19, 06, 28, 17, 45, 03, 01, 20, 35, 06, 17, 17, 38, 17, 08, 03, 32, 27, 32, 21, 04, 28. (N=33) 12, 10, 13, 01, 06, 02, 11, 20, 23, 15, 21, 06, 01, 20, 07, 12, 23, 15, 16, 01, 11, 02, 03, 16, 10, 07, 25, 17, 09, 18, 19, 04, 06. (N=4) 01, 07, 08, 05.
	<b>S2</b> SATÉLITE 1	54	68,94	(N=69) 15, 04, 45, 40, 43, 41, 15, 15, 43, 25, 46, 09, 52, 22, 51, 31, 06, 07, 13, 44, 26, 15, 20, 29, 45, 45, 21, 32, 19, 54, 38, 40, 04, 40, 21, 48, 52, 10, 24, 47, 32, 50, 19, 52, 07, 26, 04, 42, 04, 03, 22, 10, 19, 30, 35, 32, 30, 24, 03, 36, 41, 21, 43, 43, 02, 17, 26, 09, 13. (N=31) 14, 29, 20, 06, 07, 09, 08, 09, 32, 01, 01, 08, 02, 20, 18, 06, 16, 29, 13, 03, 31, 07, 13, 13, 30, 15, 30, 10, 09, 20, 31. (N=11) 02, 03, 01, 01, 03, 04, 03, 01, 03, 02, 02. (N=58) 44, 35, 30, 23, 36, 41, 46, 41, 15, 16, 01, 45, 28, 30, 11, 27, 47, 40, 02, 34, 42, 03, 16, 10,

## ANEXO 08

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a primeira coleta de sangue canino.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO N° \_\_\_\_\_

### “Prevalência e fatores de risco da Leishmaniose Visceral em cães em Juatuba, MG, 2010.”

#### Informação ao Voluntário:

Você está sendo convidado a participar da pesquisa que deseja saber sobre a prevalência e os fatores de risco relacionados com a ocorrência da leishmaniose visceral (calazar). É nosso objetivo estimar a prevalência da leishmaniose visceral e verificar quais são os fatores de risco na população canina amostrada por meio dos métodos sorológicos (ELISA e IFI), em Juatuba - MG, no ano de 2010. Este trabalho está sendo desenvolvido através de uma parceria entre a Escola de Veterinária da UFMG com a Secretaria Estadual de Saúde e Secretaria Municipal de Saúde – Centro de Controle de Zoonoses de Juatuba.

Sua participação consiste em permitir a coleta sanguínea de um cão de sua residência e em responder a um questionário com 36 questões. Para respondê-lo você receberá a visita de um pesquisador do projeto (aluno da UFMG) que lhe fará as perguntas. Peça ao entrevistador que se identifique. O nome do senhor (a), seu endereço e todas as suas respostas serão mantidos em sigilo, garantindo a sua privacidade.

O(a) senhor (a) tem total liberdade em recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa sem penalidade alguma e sem prejuízo ao seu cuidado, mas contamos com a sua compreensão já que essas informações serão de extrema importância para auxiliar as ações de controle da leishmaniose visceral (calazar) em toda a cidade, inclusive em seu bairro.

Caso o resultado do exame seja positivo, a Gerência de Zoonoses será notificada. Segundo o Ministério da Saúde, nestes casos recomenda-se o recolhimento do animal devido ao risco que o mesmo representa à saúde pública.

O seu nome e seu endereço não aparecerão em nenhum momento da pesquisa. Se você estiver de acordo em participar e contribuir com o desenvolvimento da pesquisa, assine ou marque com sua digital no espaço abaixo.

Este trabalho faz parte do estudo de campo do aluno Luiz Felipe Nunes Menezes Borges (matrícula 2009663319) do Programa de Pós Graduação da Escola de Veterinária da UFMG: Mestrado em Ciência Animal, área de concentração em Epidemiologia, da Escola de Veterinária da UFMG.

#### Para qualquer informação ou reclamação sobre o estudo :

Luiz Felipe N. M. Borges: fones: (31) 32224629, (31) 92533892 [felilitoveter@yahoo.com.br](mailto:felilitoveter@yahoo.com.br)

Danielle F. Magalhães Soares: [daniellef@ufmg.br](mailto:daniellef@ufmg.br)

Cristiano M. Cruz (Serviço de Controle Zoonoses Juatuba): 35358404 [zoonoses.juatuba@gmail.com](mailto:zoonoses.juatuba@gmail.com)

Secretaria de Saúde de Juatuba - 35359417

Endereço: Escola de Veterinária - Av. Antônio Carlos n°:6.627, CP 567. CEP 30161-970. BH/MG- Campus Pampulha

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG: (31) 3409-4592 [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br)

Endereço: Av. Carlos Luz, 6627 – Unidade Administrativa II, 2º andar, SL 2005. CEP: 31270-901. BH/MG

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO N° \_\_\_\_\_

Se o (a) senhor (a) está de acordo em participar e contribuir com o desenvolvimento da pesquisa, respondendo ao questionário, por gentileza, assine ou marque com sua digital no espaço abaixo.

Eu, \_\_\_\_\_, RG/ CPF, abaixo assinado, concordo em participar do Projeto de Leishmaniose, permitindo a(s) coleta(s) sanguínea canina e respondendo a(s) entrevista(s). Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador \_\_\_\_\_ sobre a pesquisa e os procedimentos nela envolvidos. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Nome completo: \_\_\_\_\_

Assinatura/Local e data: \_\_\_\_\_

Assinatura pesquisador: \_\_\_\_\_

## ANEXO 09

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a segunda e terceira coletas de sangue canino.

---

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO N° \_\_\_\_\_

---

### Dinâmica da leishmaniose visceral em uma coorte de cães em Juatuba, de 2010 a 2011.

#### Informação ao Voluntário:

Você está sendo convidado a participar da continuidade da pesquisa que determinou a prevalência e os fatores de risco relacionados com a ocorrência da leishmaniose visceral (calazar). É nosso objetivo estimar a incidência da leishmaniose visceral canina em uma coorte de grupo fechado de cães e avaliar os fatores epidemiológicos envolvidos na transmissão desta doença em Juatuba-MG. O diagnóstico laboratorial será feito inicialmente pelos métodos sorológicos (ELISA e IFI) e, posteriormente, pelo exame parasitológico dos cães sororreagentes. Este trabalho está sendo desenvolvido através de uma parceria entre a Escola de Veterinária da UFMG com a Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais, Secretaria Municipal de Saúde/Centro de Controle de Zoonoses de Juatuba e Secretaria Municipal de Saúde/Centro de Controle de Zoonoses de Betim.

Sua participação consiste em permitir a coleta sanguínea do mesmo cão de sua residência eleito para a pesquisa na etapa anterior e em responder a um questionário com 14 questões. Para respondê-lo você receberá a visita de um pesquisador do projeto (aluno da UFMG) que lhe fará as perguntas. Peça ao entrevistador que se identifique. O nome do senhor (a), seu endereço e todas as suas respostas serão mantidos em sigilo, garantindo a sua privacidade.

O(a) senhor (a) tem total liberdade em recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa sem penalidade alguma e sem prejuízo ao seu cuidado, mas contamos com a sua compreensão já que essas informações serão de extrema importância para auxiliar as ações de controle da leishmaniose visceral (calazar) em toda a cidade, inclusive em seu bairro.

Caso o resultado do exame seja positivo, a Gerência de Zoonoses será notificada. Segundo o Ministério da Saúde, nestes casos recomenda-se o recolhimento do animal devido ao risco que o mesmo representa à saúde pública. Caso o resultado seja negativo ou indeterminado o(a) senhor(a) poderá ser visitado novamente para nova coleta de sangue do mesmo cão e aplicação de questionário, concluindo assim o monitoramento e avaliação da soroconversão do animal em um período de um ano.

O seu nome e seu endereço não aparecerão em nenhum momento da pesquisa. Se você estiver de acordo em participar e contribuir com o desenvolvimento da pesquisa, assine ou marque com sua digital no espaço abaixo.

Este trabalho faz parte do estudo de campo da aluna Eliane Gonçalves Paiva Lopes (matrícula 2010655294) do Programa de Pós Graduação da Escola de Veterinária da UFMG: Doutorado em Ciência Animal, área de concentração em Epidemiologia, da Escola de Veterinária da UFMG.

#### Para qualquer informação ou reclamação sobre o estudo:

Eliane Gonçalves Paiva Lopes: fones: (31) 8811-1315 [lizirol@terra.com.br](mailto:lizirol@terra.com.br)

Prof. João Paulo Amaral Haddad: [jphaddad@vet.ufmg.br](mailto:jphaddad@vet.ufmg.br)

Cristiano M. Cruz (Serviço de Controle Zoonoses Juatuba): 35358404 [zoonoses.juatuba@gmail.com](mailto:zoonoses.juatuba@gmail.com)

Secretaria Municipal de Saúde de Juatuba - 35359417

Endereço: Escola de Veterinária - Av. Antônio Carlos, 6.627, CP 567. CEP 30161-970. BH/MG- Campus Pampulha

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG: (31) 3409-4592 [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br)

Endereço: Av. Carlos Luz, 6627 – Unidade Administrativa II, 2º andar, SL 2005. CEP: 31270-901. BH/MG

---

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO N° \_\_\_\_\_

Se o (a) senhor (a) está de acordo em participar e contribuir com o desenvolvimento da pesquisa, respondendo ao questionário, por gentileza, assine ou marque com sua digital no espaço abaixo.

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do Projeto de Leishmaniose, permitindo a(s) coleta(s) sanguínea canina e respondendo a(s) entrevista(s). Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador \_\_\_\_\_ sobre a pesquisa e os procedimentos nela envolvidos. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Nome completo: \_\_\_\_\_

Assinatura/Local e data: \_\_\_\_\_

## ANEXO 10

Autorização do COEP para primeira etapa do estudo



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0044.0.203.000-10

Interessado(a): **Profa. Danielle Ferreira de Magalhães**  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva  
Escola de Veterinária - UFMG

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 31 de março de 2010, o projeto de pesquisa intitulado "**Prevalência e fatores de risco da Leishmaniose Visceral em cães em Juatuba, MG, 2010**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
Coordenadora do COEP-UFMG

## ANEXO 11

Autorização do CETEA para primeira etapa do estudo



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

### CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 18/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Prevalência e fatores de risco da Leishmaniose visceral em cães em jutuba, MG, 2010**", que tem como responsável(is) **Danielle Ferreira de Magalhães Soares**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **28/ 04/2010**.

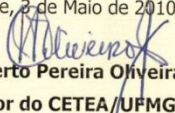
Este certificado expira-se em **28/ 04/ 2015**.

### CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 18/2010**, related to the project entitled "**Prevalence and risk factors of visceral leishmaniasis in dogs in jutuba, MG, 2010**", under the supervisors of **Danielle Ferreira de Magalhães Soares**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 28, 2010**.

This certificate expires in **April 28, 2015**.

Belo Horizonte, 2 de Maio de 2010.

  
**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
**Coordenador do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516

[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

(Mod.Cert. v1.0)



## ANEXO 12

Autorização do CETEA para conclusão do estudo



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0325.0.203.000-10

Interessado(a): Prof. João Amaral Haddad  
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva  
Escola de Veterinária - UFMG

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 09 de setembro de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "Dinâmica da leishmaniose visceral em uma coorte de cães em Juatuba-MG, de 2001 a 2011" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Prof.ª Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG

## ANEXO 13

Autorização do COEP para conclusão do estudo



### UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - C E T E A -

#### CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 170/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Dinâmica da Leishmaniose visceral em uma coorte de cães em Juatuba - MG, de 2010 a 2011**", que tem como responsável(is) **João Paulo Amaral Haddad**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **25/ 08/2010**.

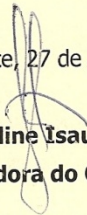
Este certificado expira-se em **25/ 08/ 2015**.

#### CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 170/2010**, related to the project entitled "**Dynamics of visceral leishmaniasis in a cohort of dogs in Juatuba-MG, from 2010 to 2011**", under the supervisors of **João Paulo Amaral Haddad**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 25, 2010**.

This certificate expires in **August 25, 2015**.

Belo Horizonte, 27 de Agosto de 2010.

  
**Prof.ª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
**Coordenadora do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpg.ufmg.br](mailto:cetea@prpg.ufmg.br)

(Mod.Cert. v1.0)



## ANEXO 14

Análise univariada, referente ao perfil socioeconômico demográfico do entrevistado, conhecimento e práticas sobre a LV e características do cão e do ambiente, analisadas com nível de significância de 0,20 ( $p < 0,20$ ).

Variável		Odds Ratio (OR)	Erro padrão	z	p > z	Intervalo de confiança de 95%	
Renda	<1 sal.mín.						
	1-3	0,725	0,111	-2,100	0,036	0,536	0,979
	>3 a 5	0,639	0,159	-1,800	0,072	0,392	1,040
	>5	0,654	0,217	-1,280	0,201	0,341	1,254
Renda	<1 sal.mín.						
	>1	0,704	0,102	-2,420	0,016	0,529	0,936
Moradia	Barracão, depósitos						
	casa/apt	0,754	0,125	-1,710	0,088	0,546	1,043
	sítio/fazenda	1,152	0,385	0,420	0,673	0,598	2,218
Reboco interno		0,687	0,157	-1,640	0,100	0,439	1,075
Reboco externo		0,822	0,120	-1,350	0,178	0,617	1,094
Água tratada		0,563	0,119	-2,720	0,007	0,373	0,852
Esgoto		0,642	0,095	-2,990	0,003	0,480	0,858
ERA: renda >1, água tratada, rede esgoto							
	1 presente	0,666	0,186	-1,460	0,145	0,385	1,151
	2 presentes	0,493	0,132	-2,650	0,008	0,292	0,831
	3 presentes	0,386	0,110	-3,360	0,001	0,221	0,673
Lixo retirada	1 vez						
	2-3 vezes	0,749	0,129	-1,680	0,094	0,534	1,050
	≥ 4 vezes	0,612	0,226	-1,330	0,184	0,296	1,264
Limpeza peridomicílio	esporádica						
	diária	0,816	0,168	-0,980	0,325	0,545	1,223
	semanal	1,311	0,219	1,620	0,104	0,946	1,819
	quinzenal	2,062	0,567	2,630	0,008	1,204	3,534
Limpeza peridomicílio (esp., quinz., sem.)							
	diária	0,662	0,117	-2,330	0,020	0,468	0,937
Tipo_peridomicílio	cimento						
	terra	1,862	0,659	1,760	0,079	0,931	3,724
	ambos	1,618	0,561	1,390	0,165	0,820	3,193
Entulho (sim)		1,212	0,171	1,370	0,172	0,920	1,597
Mat_ orgânica (sim)		1,212	0,179	1,300	0,193	0,907	1,619
Morte de cão	< 6 meses						
	6-12	1,070	0,265	0,270	0,785	0,658	1,739
	>12	0,691	0,153	-1,670	0,094	0,448	1,065
Sabe causa (sim)		0,608	0,113	-2,670	0,008	0,422	0,876
Total de cães	1 cão						
	2-3 cães	1,117	0,177	0,700	0,484	0,819	1,523
	4-5 cães	1,446	0,323	1,650	0,099	0,933	2,242
	≥ 6 cães	1,171	0,377	0,490	0,625	0,623	2,200
Introdução de cão		1,641	0,349	2,330	0,020	1,082	2,489
Mata (sim)		1,322	0,192	1,920	0,055	0,995	1,758
Muita árvore (sim)		1,600	0,305	2,470	0,014	1,102	2,325
Tem animais (sim)		1,284	0,208	1,540	0,124	0,934	1,764
Galinha (sim)		1,235	0,186	1,400	0,161	0,919	1,659
Gado (sim)		1,478	0,213	2,720	0,007	1,115	1,960
Idade do cão	< 1 ano						

	1-4	0,987	0,173	-0,070	0,941	0,701	1,391
	> 4 a 8	0,504	0,113	-3,060	0,002	0,325	0,781
	>8	0,635	0,195	-1,480	0,139	0,348	1,159
Idade do cão < 1 ano							
	>1	0,796	0,133	-1,370	0,172	0,574	1,104
Idade do cão 4 meses a 4 anos							
	>4	0,540	0,088	-3,770	0,000	0,392	0,744
Raca	SRD						
	definida	0,873	0,142	-0,830	0,405	0,635	1,201
Cor							
	clara						
	escura	0,969	0,155	-0,200	0,845	0,708	1,326
	indefinida	1,401	0,295	1,600	0,109	0,928	2,116
Porte	pequeno						
	médio	1,444	0,249	2,130	0,033	1,030	2,024
	grande	1,672	0,304	2,820	0,005	1,170	2,389
Pelo	longo	0,719	0,127	-1,880	0,061	0,509	1,015
Alimentação	ração						
	comida	0,602	0,192	-1,590	0,112	0,322	1,126
	ambos	1,156	0,165	1,020	0,308	0,875	1,528
Cão no canil a noite	sim	1,292	0,198	1,670	0,094	0,957	1,746
Tempo do cão com o dono	< 1 ano						
	1-3	0,965	0,173	-0,200	0,841	0,679	1,370
	>3 a 5	0,860	0,181	-0,720	0,474	0,569	1,300
	>5	0,480	0,105	-3,350	0,001	0,313	0,738
Tempo do cão com o dono <3 anos	>3	0,650	0,093	-3,000	0,003	0,490	0,861
Tempo do cão com o dono <5 anos	>5	0,507	0,093	-3,690	0,000	0,353	0,727
Adquirido em Juatuba (sim)		0,814	0,128	-1,310	0,192	0,597	1,109
Uso de ectoparasiticida	esporádico						
	diário	4,496	4,207	1,610	0,108	0,718	28,141
	Semanal	1,093	0,294	0,330	0,741	0,645	1,852
	Quinzenal	0,901	0,252	-0,370	0,709	0,521	1,558
	mensal	0,879	0,260	-0,440	0,662	0,493	1,568
Vacina antirrábica		0,628	0,141	-2,080	0,038	0,405	0,974
Vacina anti-LV		3,116	2,191	1,620	0,106	0,785	12,365
Uso de coleira repelente		2,144	1,145	1,430	0,153	0,753	6,106
Exame laboratorial extra		2,713	0,920	2,940	0,003	1,396	5,273

## ANEXO 15

Modelo final de regressão logística com significância de 0,05.

Variável	Odds Ratio	Std. Err.	z	p > z	[95% Conf. Interval]	
ERA (coleta de esgoto, água tratada e renda)	0.721962	0.217823	-1.08	0.28	0.399667	1.304.157
	0.59029	0.170724	-1.82	0.068	0.334873	1.040.521
≥1 sal.mín.+ água tratada +rede esgoto	0.462017	0.142225	-2.51	0.012	0.252714	0.84467
cão >4 anos de idade	0.531044	0.091456	-3.68	0.001	0.37891	0.744258
Porte						
médio	125.995	0.221812	1.31	0.189	0.892279	1.779.121
grande	1.568.489	0.293901	2.4	0.016	1.086.387	2.264.532
Limpeza diária do peridomicílio	0.71119	0.131501	-1.84	0.065	0.49499	1.021.822
Grupo						
1	2.505.841	0.388639	5.92	0	1.849.005	3.396.011
2	0.661277	0.151955	-1.8	0.072	0.421488	1.037.484
cons	0.214318	0.066649	-4.95	0	0.116507	0.394244

**TESTE DE ADEQUAÇÃO DO MODELO - CONSIDERADO ADEQUADO.**

O modelo é adequado quando a probabilidade é maior que 0.05

Logistic model for IFI, goodness-of-fit test	
number of observations	1684
number of groups	10
Hosmer-Lemeshow chi2(8)	12.26
Prob > chi2	0.1398

IFI	Odds Ratio	Std. Err.	z	P>z	[95% Conf. Interval]	
Renda2	0.733047	0.112213	-2.03	0.042	0.543041	0.989536
ldadec3	0.560664	0.097147	-3.34	0.001	0.399222	0.787393
Porte						
1	1.312899	0.231941	1.54	0.123	0.928658	1.856125
2	1.739985	0.32817	2.94	0.003	1.202277	2.518176
Fre_limp2	0.715057	0.133263	-1.8	0.072	0.496255	1.030329
Grupo						
1	2.486165	0.390959	5.79	0	1.826735	3.383643
2	0.675531	0.155764	-1.7	0.089	0.429908	1.061489
_cons	0.151413	0.02888	-9.9	0	0.104186	0.220048

IFI	Odds Ratio	Std. Err.	z	P>z	[95% Conf. Interval]	
Aguatra	0.676994	0.153337	1.72	0.085	0.4343	1.055307
ldadec3	0.528287	0.090686	3.72	0	0.377357	0.739584
Porte						
1	1.295471	0.226945	1.48	0.139	0.918991	1.826183
2	1.648582	0.306214	2.69	0.007	1.145526	2.372553
Fre_limp2	0.694788	0.128192	1.97	0.048	0.483951	0.997477
Grupo						
1	2.469742	0.381636	5.85	0	1.8244	3.34336
2	0.645584	0.148036	1.91	0.056	0.411877	1.011901
_cons	0.181052	0.047304	6.54	0	0.108495	0.302132

IFI	Odds Ratio	Std. Err.	z	P>z	[95% Conf. Interval]	
Esgoto	0.692807	0.108937	-2.33	0.02	0.509061	0.942877
ldadec3	0.508872	0.08806	-3.9	0	0.362501	0.714346
Porte						
1	1.308932	0.2305	1.53	0.126	0.926877	1.848468
2	1.590472	0.299607	2.46	0.014	1.099461	2.300765
Fre_limp2	0.703292	0.129887	-1.91	0.057	0.489702	1.010043
Grupo						
1	2.487076	0.386104	5.87	0	1.834614	3.371578
2	0.65297	0.149915	-1.86	0.063	0.416357	1.024047
_cons	0.146451	0.025713	10.94	0	0.10381	0.206606

## ANEXO 16

Cluster primário - Cães soropositivos das três etapas do estudo (253).

Modelo probabilístico de Poisson –

```

                                SaTScan v9.1.1
                                _____

Program run on: Thu Jun 20 14:55:48 2013

Prospective Space-Time analysis
scanning for clusters with high rates
using the Discrete Poisson model.
-----

SUMMARY OF DATA

Study period.....: 2010/4/1 to 2011/7/31
Number of locations.....: 253
Total population.....: 525
Total number of cases.....: 253
Annual cases / 100000.....: 36170.7
-----

MOST LIKELY CLUSTER

1.Location IDs included.: 151, 36, 231, 128, 189, 149, 188, 127,
                          187, 129, 221, 61, 147, 155, 154, 148,
                          153, 150, 192, 146, 99, 222, 130
Coordinates / radius..: (572302,7.79135e+006) / 1276.30
Time frame.....: 2010/12/1 to 2011/7/31
Population.....: 5
Number of cases.....: 20
Expected cases.....: 1.94
Annual cases / 100000.: 372886.7
Observed / expected...: 10.31
Relative risk.....: 11.11
Log likelihood ratio...: 29.266276
P-value.....: 0.00000000053
Recurrence interval...: 157214908 years

```

SATSCAN

MOST LIKELY CLUSTER

```

1.Location IDs included.: 151, 36, 231, 128, 189, 149, 188, 127, 187, 129, 221, 61, 147, 155, 154, 148, 153, 150, 192,
146, 99, 222, 130
Coordinates / radius..: (572302,7.79135e+006) / 1276.30
Time frame.....: 2010/12/12 to 2011/7/9
Population.....: 5
Number of cases.....: 20
Expected cases.....: 2.10
Annual cases / 100000.: 372886.7
Observed / expected...: 9.54
Relative risk.....: 10.27
Log likelihood ratio...: 27.853570
P-value.....: 0.00000000037
Recurrence interval...: 220482720 years

```

## ANEXO 17

### Índice Moran da variável população

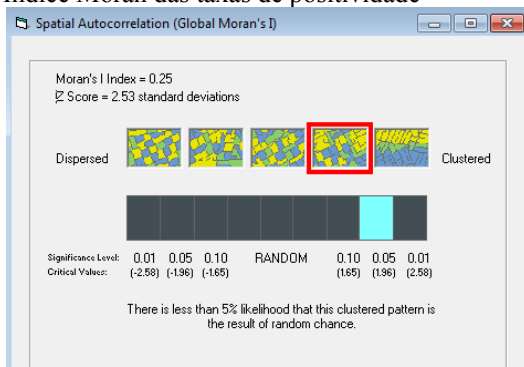


```
Executing: SpatialAutocorrelation Pontos Populacao false "Inverse Distance"  
"Euclidean Distance" None # # 0 0 0  
Start Time: Fri Jun 21 17:03:13 2013  
Running script SpatialAutocorrelation...  
WARNING 000853: The default neighborhood search threshold was 679.671521264949.
```

```
Global Moran's I Summary  
Moran's Index: 0.660008  
Expected Index: -0.003968  
Variance: 0.011480  
Z Score: 6.197031  
p-value: 0.000000
```

```
Completed script SpatialAutocorrelation...  
Executed (SpatialAutocorrelation) successfully.  
End Time: Fri Jun 21 17:03:16 2013 (Elapsed Time: 3.00 seconds)
```

### Índice Moran das taxas de positividade



```
Executing: SpatialAutocorrelation Pontos Taxa false "Inverse Distance"  
"Euclidean Distance" None # # 0 0 0  
Start Time: Fri Jun 21 17:04:55 2013  
Running script SpatialAutocorrelation...  
WARNING 000853: The default neighborhood search threshold was 679.671521264949.
```

```
Global Moran's I Summary  
Moran's Index: 0.248867  
Expected Index: -0.003968  
Variance: 0.009993  
Z Score: 2.529203  
p-value: 0.011432
```

```
Completed script SpatialAutocorrelation...  
Executed (SpatialAutocorrelation) successfully.  
End Time: Fri Jun 21 17:04:56 2013 (Elapsed Time: 1.00 seconds)
```

## ANEXO 18

*Cluster* secundário - Cães soropositivos das três etapas do estudo  
Modelo probabilístico de Poisson  
(253).

### SATSCAN

#### SECONDARY CLUSTERS

1. Location IDs included.: 175, 173, 172, 57, 164, 171, 174, 166, 176, 165, 178, 53, 216, 54, 56, 217

Coordinates / radius.: (566321,7.79228e+006) / 1275.40

Time frame.....: 2011/1/11 to 2011/7/9

Population.....: 23

Number of cases.....: 4

Expected cases.....: 0.50

Annual cases / 100000.: 312841.5

Observed / expected...: 8.00

Relative risk.....: 8.11

Log likelihood ratio...: 4.842389

P-value.....: 0.329

Recurrence interval...: 91 days

2. Location IDs included.: 100, 101, 102, 225, 253, 223

Coordinates / radius.: (570023,7.79197e+006) / 877.05

Time frame.....: 2011/1/11 to 2011/7/9

Population.....: 1

Number of cases.....: 3

Expected cases.....: 0.27

Annual cases / 100000.: 428018.6

Observed / expected...: 10.95

Relative risk.....: 11.07

Log likelihood ratio...: 4.467774

P-value.....: 0.421

Recurrence interval...: 71 days

3. Location IDs included.: 184, 185, 186

Coordinates / radius.: (562571,7.79753e+006) / 349.41

Time frame.....: 2011/1/11 to 2011/7/9

Population.....: 1

Number of cases.....: 3

Expected cases.....: 0.54

Annual cases / 100000.: 218055.2

Observed / expected...: 5.58

Relative risk.....: 5.63

Log likelihood ratio...: 2.705709

P-value.....: 0.925

Recurrence interval...: 32 days

## ANEXO 19

Cães soropositivos da primeira etapa do estudo (102).

Modelo probabilístico de Poisson –

### SATSCAN

Type of Analysis > Prospective > Space-Time.

Probability Model > Discrete Sacan Statistics > Poisson.

Scan for areas with: High Rates.

Time aggregation: Day > Length: 30 day

Resultado:

#### SUMMARY OF DATA

Study period.....: 2010/4/19 to 2010/8/27

Number of locations.....: 101

Total population.....: 595

Total number of cases.....: 101

Annual cases / 100000.....: 47344.6

---

#### MOST LIKELY CLUSTER

1.Location IDs included.: 99, 102, 36, 101, 59, 100, 43, 44, 78, 61, 74, 79, 42

Coordinates / radius.: (571380,7.7921e+006) / 1854.29

Time frame.....: 2010/7/29 to 2010/8/27

Population.....: 37

Number of cases.....: 9

Expected cases.....: 1.77

Annual cases / 100000.: 241349.7

Observed / expected...: 5.10

Relative risk.....: 5.50

Log likelihood ratio...: 7.695002

P-value.....: 0.0054

Recurrence interval...: 15 years

#### SECONDARY CLUSTERS

2.Location IDs included.: 27, 28, 26, 29

Coordinates / radius.: (567876,7.79236e+006) / 243.66

Time frame.....: 2010/6/29 to 2010/8/27

Population.....: 17

Number of cases.....: 4

Expected cases.....: 0.97

Annual cases / 100000.: 195316.8

Observed / expected...: 4.13

Relative risk.....: 4.25

Log likelihood ratio...: 2.684651

P-value.....: 0.485

Recurrence interval...: 62 days

3.Location IDs included.: 53, 54, 56

Coordinates / radius.: (565975,7.79135e+006) / 418.90

Time frame.....: 2010/6/29 to 2010/8/27

Population.....: 5

Number of cases.....: 3

Expected cases.....: 0.92

Annual cases / 100000.: 154763.8

Observed / expected...: 3.27

Relative risk.....: 3.34

Log likelihood ratio...: 1.492900

P-value.....: 0.875

Recurrence interval...: 34 days

## ANEXO 20

Cães soropositivos da segunda etapa do estudo (123).  
Modelo probabilístico de Poisson –

### SATSCAN

Type of Analysis > Prospective > Space-Time.  
Probability Model > Discrete Sacan Statistics > Poisson.  
Scan for areas with: High Rates.  
Time aggregation: Day > Length: 30 day

Resultado:

#### SUMMARY OF DATA

Study period.....: 2010/11/16 to 2011/3/3  
Number of locations.....: 124  
Total population.....: 783  
Total number of cases.....: 124  
Annual cases / 100000.....: 53570.1

---

#### MOST LIKELY CLUSTER

1.Location IDs included.: 184, 185, 186  
Coordinates / radius.: (562571,7.79753e+006) / 349.41  
Time frame.....: 2011/2/2 to 2011/3/3  
Population.....: 5  
Number of cases.....: 3  
Expected cases.....: 0.74  
Annual cases / 100000.: 218055.2  
Observed / expected...: 4.07  
Relative risk.....: 4.15  
Log likelihood ratio..: 1.969188  
P-value.....: 0.58  
Recurrence interval...: 52 days

#### SECONDARY CLUSTERS

2.Location IDs included.: 222, 221, 223, 224, 183, 149, 218, 225  
Coordinates / radius.: (571446,7.79223e+006) / 1216.25  
Time frame.....: 2011/2/2 to 2011/3/3  
Population.....: 10  
Number of cases.....: 2  
Expected cases.....: 0.53  
Annual cases / 100000.: 203477.7  
Observed / expected...: 3.80  
Relative risk.....: 3.84  
Log likelihood ratio..: 1.204502  
P-value.....: 0.87  
Recurrence interval...: 34 days

3.Location IDs included.: 164, 172, 173, 171, 174, 166, 165, 175, 176, 178  
Coordinates / radius.: (566234,7.7918e+006) / 709.95  
Time frame.....: 2011/2/2 to 2011/3/3  
Population.....: 84  
Number of cases.....: 2  
Expected cases.....: 0.57  
Annual cases / 100000.: 188755.8  
Observed / expected...: 3.52  
Relative risk.....: 3.56  
Log likelihood ratio..: 1.094881  
P-value.....: 0.90  
Recurrence interval...: 34 days

NOTE: The sequential Monte Carlo procedure was used to terminate the calculations after 86 replications.



## ANEXO 21

Cães soropositivos da terceira etapa do estudo (28).  
Modelo probabilístico de Poisson –

### SATSCAN

Type of Analysis > Prospective > Space-Time.  
Probability Model > Discrete Sacan Statistics > Poisson.  
Scan for areas with: High Rates.  
Time aggregation: Day > Length: 30 day  
Resultado:

### SUMMARY OF DATA

Study period.....: 2011/4/8 to 2011/7/9  
Number of locations.....: 28  
Total population.....: 471  
Total number of cases.....: 28  
Annual cases / 100000.....: 23347.0

---

### MOST LIKELY CLUSTER

1. Location IDs included.: 240, 242, 231, 253

Coordinates / radius...: (570786,7.78937e+006) / 3050.53

Time frame.....: 2011/6/10 to 2011/7/9  
Population.....: 9  
Number of cases.....: 2  
Expected cases.....: 0.23  
Annual cases / 100000.: 200132.9  
Observed / expected...: 8.57  
Relative risk.....: 9.15  
Log likelihood ratio...: 2.587778  
P-value.....: 0.078  
Recurrence interval...: 1.0 year

NOTE: The sequential Monte Carlo procedure was used to terminate  
the calculations after 638 replications.

---

## ANEXO 22

Cães soropositivos da segunda e terceira etapas do estudo (123+ 28=151).

Modelo probabilístico de Poisson –

### SATSCAN

Type of Analysis > Prospective > Space-Time.  
Probability Model > Discrete Sacan Statistics > Poisson.  
Scan for areas with: High Rates.  
Time aggregation: Day > Length: 30 day  
Resultado:

### SUMMARY OF DATA

Study period.....: 2010/11/16 to 2011/7/9  
Number of locations.....: 152  
Total population.....: 635  
Total number of cases.....: 152  
Annual cases / 100000.....: 37060.2

---

### MOST LIKELY CLUSTER

1. Location IDs included.: 221, 222, 149, 223, 187, 151, 231,  
150, 188, 147, 253, 148, 146, 183,  
189, 224, 225, 128, 153, 154, 159,  
155, 130, 127, 182, 129, 218, 220,  
219, 181, 192, 156, 244, 179, 180,  
191, 190, 195, 193, 152, 123, 242,  
158, 212, 240, 203, 247  
Coordinates / radius.: (571588,7.79182e+006) / 2610.68  
Time frame.....: 2011/5/11 to 2011/7/9  
Population.....: 85  
Number of cases.....: 5  
Expected cases.....: 1.21  
Annual cases / 100000.: 152565.8  
Observed / expected...: 4.12  
Relative risk.....: 4.22  
Log likelihood ratio...: 3.337749  
P-  
Recurrence interval...: 99 days

NOTE: The sequential Monte Carlo procedure was used to terminate the calculations after 165 replications.

## ANEXO 23

Vista aérea de Juatuba referente aos anos-calendário 2005 e 2013.  
Programa Google Earth Pro

*2005*

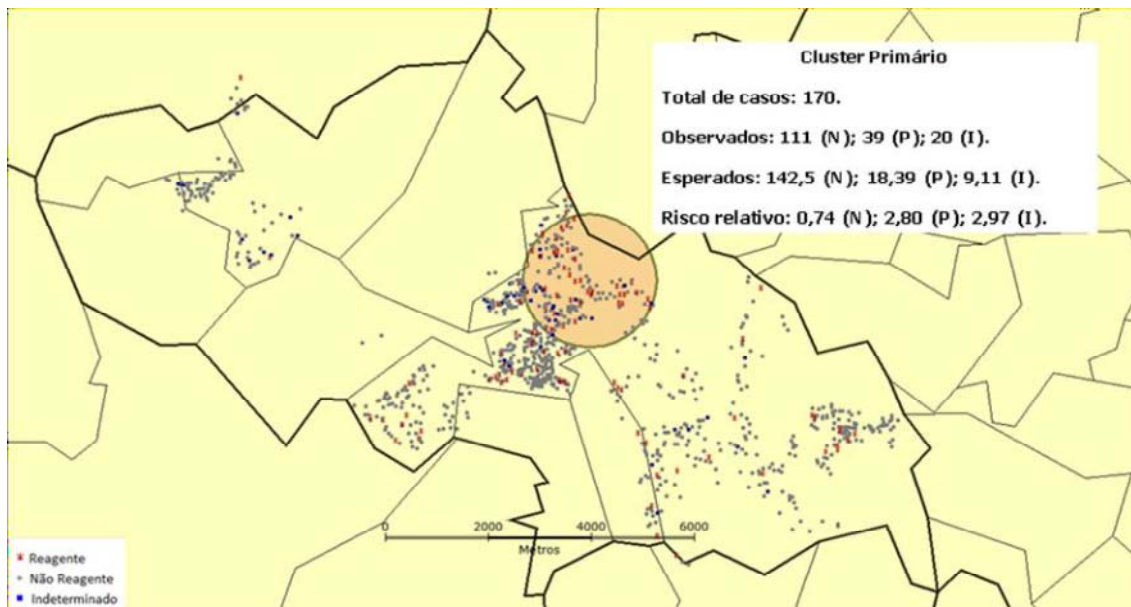


*2013*



## ANEXO 24

Distribuição e intensidade dos casos de leishmaniose visceral canina no *Cluster Primário*, Juatuba, Minas Gerais, 2010 (Borges, 2011).



## ANEXO 25

Fotos dos bairros de Juatuba, 2011.  
Fotos: BORGES, L.F.N.M.



Presença abundante de vegetação



Saneamento básico deficiente



Peridomicílio com criação de animais



## ANEXO 26

Alterações observadas nos cães soropositivos necropsiados, Juatuba 2010 a 2011.  
Fotos: LOPES, E.G.P.



Foto 1. Alteração no baço



2. Foto 2. Linfadenopatia



Foto 3. Ceratoconjuntivite



Foto 4. Onicogribose



Foto 5. Hiperqueratose no focinho e opacidade da córnea



Foto 6. Hiperqueratose no focinho