



LEISHMANIOSE VISCERAL (LV) NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL. ESTUDO DOS CASOS AUTÓCTONES DE LVA CANINA NO MUNICÍPIO DE PRESIDENTE PRUDENTE.

Elivelton da Silva Fonseca¹

Lourdes Aparecida Zampieri D'Andrea²

Raul Borges Guimarães³

Renata Corrêa Yamashita⁴

Célio Nereu Soares⁵

Roberto Mitsuyoshi Hiramoto⁶

José Eduardo Tolezano⁷

RESUMO

Introdução: O presente artigo tem como objetivo analisar e caracterizar os casos autóctones de LV canina no município de Presidente Prudente/SP. **Metodologia** – A coleta de dados foi realizada na área urbana e no distrito de Montalvão, no período de janeiro/2010 a maio/2011, proveniente dos boletins dos inquéritos sorológicos caninos do Programa de Vigilância e Controle LV (PVCLV), incluindo as informações relativas aos resultados de exames laboratoriais ELISA, RIFI e, também do DPP/BioManguinhos[®], todos para o diagnóstico da LV. Nossa amostra é constituída pelos cães com resultados positivos no ELISA, que é utilizado como teste de triagem no PVCLV. Desses animais reagentes no teste de triagem foi coletada uma segunda e/ou terceira amostras de sangue para a repetição desses exames e realização de exames complementares. Foi realizada a descrição da sintomatologia, e dos resultados obtidos no teste RIFI para Erliquiose. Utilizou-se o teste qui-quadrado de Pearson, ou exato de Fisher, e estimativas de odds ratio ($p < 0,005$). **Resultados** – Dos 246 cães com ELISA reagente, 52% apresentaram-se positivos no RIFI. Dentre os cães estudados, o maior número (35.77%) reside na área 6. Os resultados observados no teste RIFI na primeira amostra estão correlacionados com a localização, e com o teste rápido BioManguinhos[®]. **Conclusão** – o presente artigo descreve resultados preliminares de uma pesquisa em andamento. Estes resultados apontam baixa positividade nos primeiros testes RIFI confirmatórios, e correlação alta do mesmo teste com a área de ocorrência, positividade do teste rápido DPP/BioManguinhos[®], o que sugere o aprimoramento das medidas de vigilância.

Palavras-chave: Leishmaniose canina; diagnóstico; distribuição espacial

1 Geógrafo, doutorando em geografia na Unesp, colaborador do Laboratório de Geografia da Saúde da FCT/UNESP/Presidente Prudente – SP. E-mail: elivelton.fonseca@gmail.com

2 Diretor Técnico do Núcleo de Ciências Biomédicas - Centro de Laboratório Regional – Instituto Adolfo Lutz – Presidente Prudente/SP. E-mail: zampieri@ial.sp.gov.br

3 Professor adjunto do Departamento de Geografia da Unesp - Presidente Prudente. Coordenador do Laboratório de Geografia da Saúde/UNESP - Presidente Prudente-SP. E-mail: raul@fct.unesp.br

4 Aprimoranda PAP/FUNDAP – Lab. de Saúde Pública na Área de Vigilância Epidemiológica-Núcleo de Ciências Biomédicas - Centro de Laboratório Regional – Instituto Adolfo Lutz – Presidente Prudente/SP. E-mail: re.yamashita@yahoo.com.br

5 Médico Veterinário – Diretor do Centro de Zoonoses. Prefeitura Municipal de Presidente Prudente/SP. E-mail: centrozoonoses@presidentepudente.sp.gov.br

6 Pesquisador Científico 5 - Diretor Técnico do Núcleo de Parasitoses Sistêmicas - Centro de Parasitologia e Micologia - Instituto Adolfo Lutz, Lab. Central e representante do Comitê de LVA - São Paulo/SP. E-mail: rmhiramoto@ial.sp.gov.br

7 Pesquisador Científico 6 - Diretor Técnico do Centro de Parasitologia e Micologia - Instituto Adolfo Lutz, Lab. Central e representante do Comitê de LVA - São Paulo/SP. E-mail: tolezano@hotmail.com



INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Americana (LV) é uma zoonose de grande relevância para a saúde pública. O agente etiológico da LV é identificado com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (MARZOCHI, MARZOCHI, 1994). A LV é considerada uma zoonose comum aos canídeos e acomete o homem (WHO, 2005). Este contrai a infecção quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito (HARISSON et al, 1986; PEARSON et al, 1992). Nas Américas a LV tem o cão como principal reservatório e fonte de infecção para os insetos transmissores, chamados flebotomíneos que, uma vez infectados, poderão transmitir pela picada a *L.(L.) infantum chagasi* (BRASIL, 2006).

Dentre as manifestações clínicas da LV destacam-se um quadro de emagrecimento, dor abdominal, ausência de apetite, apatia e febre, intermitente e crônica superior a dez dias. Nesta fase o paciente apresenta outras anomalias e, a ausência de tratamento quase sempre implica na morte do paciente (BRASIL, 2006).

No Brasil a doença é conhecida desde 1913, quando da descrição do primeiro caso humano, realizado por Migone, no Paraguai, em um paciente que se infectou na localidade de Porto Esperança, em Corumbá, Mato Grosso do Sul (MIGONE, 1913). Atualmente a LV encontra-se em processo de franca expansão pelas diferentes regiões do país, identificada como autóctone em 21 estados brasileiros. Anualmente são notificados entre 3.500 e 4.500 casos, com letalidade em torno de 6% (BRASIL, 2006). No passado, mais de 90% dos casos estavam restritos a algumas regiões do Nordeste. A partir da década de 1990, quase metade dos casos passou a ser de transmissão no Centro-Oeste, Sudeste e recentemente Sul. Em São Paulo, o primeiro caso autóctone de LV foi registrado em 1999 e, na região de Presidente Prudente em 2005, no município de Dracena. Em Presidente Prudente, detectou-se o vetor flebotomíneo no ano de 2009 e o primeiro caso canino em 2010 (BRASIL, 2006). Até o presente não foi registrada a transmissão para o homem.

A importância do diagnóstico da LV canina no Brasil reside no fato de que o registro da infecção nestes animais, geralmente precede a ocorrência de casos humanos; além do que é mais prevalente em cães do que no homem. O Programa de Vigilância e Controle da LV (PVCLV) do estado de São Paulo prioriza, de forma semelhante ao que preconiza o Ministério da Saúde, ações sobre três pilares, que são: diagnóstico e tratamento precoce de todos os casos humanos, monitoramento e



redução da densidade populacional dos flebotomíneos e controle dos reservatórios domésticos que são os cães infectados e identificados como reagentes positivos nos exames laboratoriais. Neste contexto, é relevante o estudo da condição imunológica e produção de anticorpos contra *Leishmania* na população canina. O presente artigo tem como objetivo analisar e caracterizar os casos autóctones de LV canina no município de Presidente Prudente no Estado de São Paulo, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta de dados foi realizada na área urbana do município e no distrito de Montalvão, no período de janeiro/2010 a maio/2011. Localizado no extremo oeste do estado de São Paulo, o município pertencente à área de abrangência do Departamento Regional de Saúde - DRS XI de Presidente Prudente. Possui estimativa de população humana de 207.725 habitantes, e canina de 39.800 cães (IBGE, 2011; ALVES, 2005). Situa-se nas coordenadas: latitude 22°07'32"S e longitude 51°23'20"W (IBGE, 2008). Esta região caracteriza-se pelo clima tropical típico, com um inverno seco e um verão chuvoso, cuja temperatura média anual é de 23,5°C (IBGE, 2011).

Os dados foram obtidos a partir dos boletins dos inquéritos sorológicos caninos incluídos na programação do PVCLV, fornecidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Presidente Prudente, e boletins informativos com os resultados do Ensaio Imunoenzimático (ELISA), e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), fornecidos pelo Centro de Laboratório Regional – Instituto Adolfo Lutz, Presidente Prudente. As técnicas possibilitam a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, constituindo-se num método indireto para o diagnóstico da LV canina.

Para o teste ELISA foi utilizado o Kit EIE BioManguinhos®/Fundação Oswaldo Cruz (RJ) para pesquisa de anticorpos para Leishmaniose canina. Para a RIFI foi utilizado o Kit de Imunofluorescência Indireta BioManguinhos®/Fundação Oswaldo Cruz (RJ). Para ambos os testes foram seguidas as recomendações de uso. A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é utilizada para pesquisa de anticorpos da classe IgG em conformidade com a metodologia descrita por Camargo e Rebonato (1969) e Costa et al (1991), com sensibilidade de 90% e especificidade de 80%, segundo o fabricante.

Segundo o PVCLV, a RIFI é um teste confirmatório, sendo realizado somente quando o teste ELISA, utilizado na triagem diagnóstica, for reagente. Nosso critério



de seleção da amostra foi justamente este, os cães que apresentaram-se reagentes no ELISA no período estudado. Com este critério alcançamos um total de 246 cães avaliados na primeira etapa para os dois testes. Até o momento, foram examinados, em Presidente Prudente, 2.275 cães. Portanto, 5,5% desses cães apresentaram um teste ELISA reagente, sendo submetidos ao teste confirmatório RIFI e outros testes que serão descritos no trabalho.

O Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Presidente Prudente forneceu os registros da avaliação clínica dos animais selecionados, com a descrição da sintomatologia. Segundo o manual do PVCLVA, com base nos sintomas, os cães caracterizados como assintomáticos são aqueles que não apresentam nenhuma manifestação clínica da doença, embora tenham diagnóstico sorológico reagente. Aqueles que apresentam alguns sinais ou sintomas da doença tais como: aumento do linfonodo, descamação e alopecia, onicogribose e anemia discreta são caracterizados como oligossintomáticos, e aqueles cujas manifestações são exacerbadas, incluindo hepato e esplenomegalia são caracterizados como casos graves (BRASIL, 2006).

Além dos dados clínicos, o CCZ forneceu ainda, os resultados dos exames com o teste rápido DPP/Biomanguinhos, também para LV e do teste de RIFI para Erliquiose, uma outra doença infecciosa canina transmitida por carrapatos e apontada como causa de reações cruzadas e falsos resultados positivos para LV.

Outros testes com os cães reagentes foram realizados, e a primeira etapa foi ponto de partida para uma rotina de resultados de confirmação, na qual foram recoletadas amostras de sangue para serem realizados novamente o ELISA e RIFI, para LVA além do parasitológico direto para pesquisa da *Leishmania* spp.

Os dados se apresentam espacialmente distribuídos em áreas e setores, de acordo com a sistematização de coleta do CCZ. Contudo, a amostra espacial não consiste em uma varredura sistematizada de todas as áreas da cidade. Ao menos dois testes ELISA reagente foram encontrados em cada área (ver tabela 1). A associação entre a positividade, retestagem e outros testes foi verificada por meio do teste qui-quadrado de Pearson, ou exato de Fisher, e de estimativas de odds ratio (OR). Foi adotado o nível de significância 0,05.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 246 cães com teste de ELISA reagente, 52,43% apresentaram positividade no primeiro teste de RIFI (IC95% 0,46 – 0,59) no período estudado. Portanto, 47,57% cães testados foram considerados inconclusivos. Em outro estudo realizado em Dracena, Tupi Paulista e Santa Mercedes foram obtidas concordâncias variando entre 87,7% a 100% do RIFI reagente com o ELISA (dados não publicados).

O maior número de cães testados na primeira amostra (35,77%) reside na área 6, e dentre os que residem nesta área, destaca-se o setor 3 (25,6%). O distrito de Montalvão, que fica afastado da região urbana (A101), representou 5,28% do total de animais testados para ELISA.

Na segunda etapa foram testados no teste de RIFI 32,52 % (80 cães) do total de animais, e nestes foi encontrado um índice de positividade de 15%. Alcançamos um número de 129 cães reagentes na primeira etapa, e destes, apenas 37 foram reagentes na segunda. Obtivemos amostra reagente nas duas etapas em 26 cães, que representam os que mantiveram o resultado final reagente.

Com o exame parasitológico direto (PD) foram avaliados 84 cães, sendo 54 reagentes no exame pela RIFI na primeira amostra de sangue. Apenas 6 cães apresentaram-se positivos no PD, todos reagentes na RIFI. Portanto, seis cães apresentaram tanto anticorpos para *L.(L) chagasi*, como também houve presença do parasito no esfregaço. É interessante ressaltar, que 162 animais o material não foi insuficiente para análise no PD porque não apresentaram o sintoma para coleta de material, que é o aumento do linfonodo.

Com relação à presença de sintomas, dos 96 (33%) cães avaliados em relação ao total, 56 não apresentaram sintomas, 37 apresentaram até três sintomas, e 3 apresentaram mais de três sintomas. No RIFI (129 reagentes), 34 cães não apresentaram sintomas, 28 apresentaram até três sintomas e 3 apresentaram mais de três sintomas. Na análise da associação do resultado da RIFI para a segunda amostra de sangue dos animais com os registros de sintomas, 10 cães foram diagnosticados como assintomáticos; 12 apresentaram até três sintomas, e 3 apresentaram mais de três sintomas.

Os 76 testes de RIFI para erliquiose foram categorizados em negativo (3 casos, 2 com RIFI reagentes na primeira coleta), baixo reagente (10 casos, 8 com RIFI



reagentes primeira coleta), médio reagente (29 casos, 18 com RIFI reagentes primeira coleta) e alto reagente (34 casos, 27 com RIFI reagentes primeira coleta), por meio de um score⁸ calculado com os parâmetros baseados na análise clínica. Portanto, 53 casos apresentaram possíveis reações cruzada, e/ou co-infecção com LVA.

Foram avaliados 139 cães por meio do teste rápido BioManguinhos®, e 84 do mesmo teste realizado com o sangue. Dos avaliados com o soro, 91 foram reagentes para o RIFI na primeira coleta, e 21 apresentaram resultado reagente nos dois testes. Dos avaliados com o sangue, 56 apresentaram teste reagente no RIFI primeira coleta, e apenas 4 foram reagentes nos dois testes.

Foi selecionado como desfecho para as análises estatísticas o resultado do teste RIFI – primeira coleta, com o intuito de observar sua associação com as outras variáveis. A primeira testagem utilizando o RIFI está associada com a localização, tanto por áreas (p-valor = 0,00), como na relação área/setor (p-valor = 0,002). A associação entre o RIFI na primeira com o mesmo teste na segunda coleta foi alta (p-valor = 0,000), com o OR = 6.106 (IC95% 2,315 – 16,108). Não encontramos associação do PD com o RIFI primeira coleta (p-valor = 0,007), com o OR = 1,75 (IC95% 0,33 – 9,267). Com relação a variável binária (presença/ausência) criada com os sintomas, não houve associação com o primeiro RIFI, com o OR 2,12 (IC95% 0,84 – 5,585). Os resultados do teste rápido BioManguinhos® mostraram associação com a primeira etapa do RIFI apenas para o soro (p-valor = 0,000), com o OR=6,9 (IC95% 1,544 – 30,842). O score do teste RIFI para Erliquiose apresentou baixa associação com o primeiro teste RIFI.

⁸ Adquirimos o serviço de testagem em RIFI para erliquiose de terceiros. Os resultados foram categorizados pelas fontes, sem apresentação de metadados.



TABELA 1: DISTRIBUIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO CANINA: AMOSTRA DO PRIMEIRO ELISA REAGENTE E VARIÁVEIS ASSOCIADAS AO PRIMEIRO TESTE RIFI DA AMOSTRA PARA LEISHMANIOSE CANINA NO MUNICÍPIO PRESIDENTE PRUDENTE, SP, ENTRE JANEIRO DE 2010 A MAIO DE 2011.

Característica	Categoria	RIFI 1ª coleta N = 246		OR (IC 95%)	ELISA n =246 R
		NR	R		
AREA	A1	2 (0,81)	0	-	2 (0,81)
	A2	31 (12,60)	25 (10,16)		56 (22,76)
	A3	7 (2,85)	11 (4,47)		18 (7,32)
	A4	26 (10,57)	2 (0,81)		28 (11,38)
	A5	7 (2,85)	6 (2,44)		13 (5,28)
	A6	32 (13,01)	56 (22,76)		88 (35,77)
	A7	6 (2,44)	22 (8,94)		28 (11,38)
	A101	6 (2,44)	7 (2,85)		13 (5,28)
ELISA SEGUNDA COLETA	NR	52 (21,13)	52 (21,13)	1,4 (0,259 – 7,582)	104 (42,27)
	R	41 (16,66)	41 (16,66)		82 (33,33)
RIFI SEGUNDA COLETA	NR	31 (12,60)	12 (4,88)	6,106 (2,315 – 16,108)	43 (17,48)
	R	11 (4,47)	26 (10,57)		37 (15,04)
RIFI TERCEIRA COLETA	NR	2 (0,81)	2 (0,81)	1,33 (0,113 – 15,704)	4 (1,63)
	R	3 (1,22)	4 (1,63)		7 (2,85)
PD	NEG	28 (11,38)	48 (19,51)	1,75 (0,330 – 9,267)	76 (30,89)
	POS	2 (0,81)	6 (2,44)		8 (3,25)
SONTOMATOLOGIA CATE	ASSINTOMATICO	16 (6,50)	26 (10,57)	2,12 (0,804 – 5,585)	42 (17,07)
	COM SINTOMAS	9 (3,66)	31 (12,60)		40 (16,26)
SCORE RIFI ERLIQUIOSE	NEG	1 (0,41)	2 (0,81)	-	3 (1,22)
	BAIXO REAGENTE	2 (0,81)	8 (3,25)		10 (4,07)
	MEDIO REAGENTE	11 (4,47)	18 (7,32)		29 (11,79)
	ALTO REAGENTE	7 (2,85)	27 (10,98)		34 (13,82)
SG	NR	28 (11,38)	52 (21,14)	0,65 (0,553 – 0,763)	80 (32,52)
	R	0	4 (1,63)		4 (1,63)
SOROLOGIA	NR	46 (18,70)	70 (28,46)	6,90 (1,544 – 30,842)	116 (47,15)
	R	2 (0,81)	21 (8,54)		23 (9,35)

CONCLUSÃO

O presente artigo descreve resultados preliminares de uma pesquisa em andamento. Estes resultados apontam baixa positividade nos primeiros testes RIFI realizados, mostrando a confirmação pelo RIFI apenas em 52% dos casos de reagente no ELISA. Isso ocorreu porque a primeira coleta foi realizada em setores com maior prioridade de intervenção, a exemplo da área 6, não permitindo a visualização efeito de irradiação dos resultados no espaço. A rotina de coleta dos materiais analisados é complexa, e a análise dos resultados da mesma nos permitiu uma imersão no contexto do diagnóstico de leishmaniose no município de



Presidente Prudente, permitindo também melhoria da compreensão da dinâmica da doença no município.

Nossa amostra sugere que formulemos hipóteses fundadas na questão espacial, pois houve associação dos dados com a área de ocorrência. O grande ganho do estudo foi a possibilidade de avaliar a o conjunto diagnóstico, com o intuito de aprimorar as medidas de vigilância e controle da LVA. Não obstante, destaca-se a necessidade de manter o serviço de vigilância atento, pois possui um importante fator relacionado ao ciclo da doença: a presença do cão infectado. É passível de esclarecimento a presença de 53 cães com possíveis reações cruzadas com erliquiose e/ou co-infectados com LVA.

Agradecimentos:

Ao BioManguinhos, por ter cedido o teste rápido para complementar nossa análise. Ao Centro de Laboratório Regional-Instituto Adolfo Lutz- Presidente Prudente V, por ter cedido o consolidado das informações. Ao Centro de Controle de Zoonoses de Presidente Prudente, pela avaliação dos cães e coleta das amostras.

REFERÊNCIAS

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Division of control of tropical disease. Leishmaniasis control. Geographical distribution. 2005. WHO/CTD. (<http://www.who.int/ctd/html/leisgeo.html>).

MARZOCHI MCA., MARZOCHI KBF. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil- Emerging Anthroponosis and Possibilities of their Control. *Cad. Saúde Pública*, 1994, 10, 2, 359-378.

HARISSON LH., NAIDER TG., DREW JS., DE ALENCAR JE., PEARSON RD. Reciprocal relationships between undernutrition and parasitic disease visceral leishmaniasis. *Rev. Infec. Dis.*, 1986, 8, 447-453.

PEARSON RD., COX G, JERONIMO SMB., CASCATRANE J., DREW JS, EVANS T., ALENCAR JE. Visceral Leishmaniasis: a model for infection-induced cachexia. *Amer. J. Trop. Med. Hyg*, 1992, 47, 8 -15.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Estado da Saúde. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo*. São



Paulo-SP, 2006. Disponível em Fonte: CVE/SES – <http://www.cve.saude.sp.gov.br>. Acesso em set/2011.

IBGE. Mapas Temáticos (http://www.ibge.gov.br/mapas_ibge/tem.php). Acesso em set/2011.

CAMARGO ME., REBONATO C. Cross reativity in fluorescense tests for Trypanosoma and Leishmania antibodies. *Am. J. Trop. de Med. Hyg.*, 1969, 18, 500-505.

COSTA AC., GENARO O., LANA M., MAGALHÃES PA., DIAS M., MICHALICK SMM., MELO MN., COSTA RT., MAGALHÃES-ROCHA N., MAYRINK W. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Rev. Soc. Med. Trop.*, 1991, 24, 21-25.

MIGONE, L. E., 1913. un caso de Kalazar em Assunción (Paraguay). *Bulletin Societe Pathologic Exotique*, 6: 118-120.