

# Vigilancia de la leishmaniasis visceral en localidades epidemiológicamente diferentes en Juruti, municipio minero del Estado de Pará (Brasil)

Vigilância da leishmaniose visceral em localidades epidemiologicamente distintas em Juruti, um município minerário do Estado do Pará, Brasil

Surveillance of visceral leishmaniasis in epidemiologically distinct locations in Juruti, a mining municipality in Pará State, Brazil

Lourdes Maria Garcez

*Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil  
Universidade do Estado do Pará, Belém, Pará, Brasil*

Joyce Favacho Cardoso

*Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil*

Anadeiva Portela Chagas

*Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil*

Jefferson Francisco Correia Miranda

*Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil*

Gilberto César Rodrigues de Souza

*Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil*

Daniela Cristina Soares

*Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil  
Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará, Belém, Pará, Brasil*

Lucilândia Maria Bezerra

*Universidade Federal do Tocantins, Palmas, Tocantins, Brasil*

Habib Fraiha

*Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil*

Jeffrey Jon Shaw

*Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil*

Hiro Goto

*Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil*

---

## RESUMEN

Se realizaron actividades de vigilancia para la leishmaniasis visceral humana (LVH) en Juruti, un municipio minero en el Estado de Pará. Se seleccionaron zonas periurbanas (Santa Maria-SM) y rurales (Capiroanga-CA), con y sin LVH respectivamente, para cuatro estudios serológicos semestrales (ELISA lisado) en la población canina (SM = 94, CA = 45) y tres encuestas entomológicas (trampas de luz CDC, 18-6hx4). Posteriormente, se investigó el estado clínico y la infección por *Leishmania* en 53 perros (SM = 28, CA = 25) con diagnóstico parasitológico (médula ósea o linfa, Giemsa), molecular (leucocitos de sangre periférica, kDNA-PCR) y serológico (ELISA), evaluando diferentes antígenos (Lysate, k39, Hsp83 - screen test, curva ROC). La seroprevalencia varió en SM (45; 40; 15; 15%) y CA (22; 30; 8.5; 0%), con media creciente de IgG en SM (320; 378; 951; 1866;  $p < 0,05$ ), a pesar de la eutanasia en los perros después de la segunda encuesta, y estable CA (100; 159, 141; 0), en que no hubo eutanasia. La frecuencia de *Lutzomyia longipalpis/Lutzomyia* spp difiere en SM (279/296) y CA (4/6). Los resultados clínicos y de laboratorio se asemejan para perros de SM y AC, respectivamente, respecto a la infección (parásitos: 86 y 84%, kDNA-PCR: 100%), situación clínica (asintomática: 43, 56%; sintomáticas: 57, 44%) y especificidad en ELISA (100%), pero se registró variación en la sensibilidad (lisado: 44 y 18; Hsp83: 48 y 27%; k39: 48 y 41%) y en los niveles de IgG ( $\leq 6.400$ ;  $\leq 200$ ). El perfil de la infección canina en las localidades con y sin transmisión de la LVH difería sólo en los niveles o en la evolución de IgG, que hace necesaria la temporalidad de las investigaciones, principalmente en zonas tranquilas y aisladas, de baja densidad del vector, donde sería innecesaria la eutanasia en perros. La mejor prueba serológica fue ELISA-k39.

**Palabras clave:** Leishmaniasis Visceral; Perro; Prueba ELISA; Reacción en Cadena de la Polimerasa; Insectos Vectores; Vigilancia Epidemiológica.

---

## Correspondencia / Correspondência / Correspondence :

Lourdes Maria Garcez  
Instituto Evandro Chagas  
Seção de Parasitologia, Laboratório de Imunologia e Epidemiologia  
Rodovia BR316, km 07, s/nº, Bairro: Levilândia  
CEP: 67030-000 Ananindeua-Pará-Brasil  
E-mail: lourdesgarcez@iec.pa.gov.br

## Traducido por / Traduzido por / Translated by:

Rocio Tamara (resumen) y Lota Moncada (artículo)

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis visceral humana (LVH) es una enfermedad grave y potencialmente fatal sin diagnóstico ni tratamiento precoces. En el continente americano es causada por el protozooario *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, cuya transmisión a hospederos vertebrados es hecha por la especie *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), el vector más definido de la LVH en las Américas. El zorro cangrejero (*Cerdocyon thous*) actúa como reservorio del parásito en la mantención de un ciclo silvestre<sup>14,11</sup>, pero el perro doméstico (*Canis familiaris*) tiene gran importancia epidemiológica en la transmisión a los humanos, por ser el reservorio en el ciclo doméstico del protozooario y la principal fuente de infección al vector<sup>15</sup>.

La leishmaniasis visceral está en expansión, con tendencia a la urbanización en el Estado de Pará. Algunas áreas de transmisión intensa de la enfermedad comprende municipios del oeste del Estado. En esta región, Juruti se clasifica como municipio de transmisión esporádica para LVH; no en tanto, tiene límite, al este, con Santarém, segunda mayor ciudad del Estado y área de transmisión intensa de la enfermedad. El gran potencial mineral (bauxita) de Juruti ha atraído emprendimientos que, a pesar de contribuir al desarrollo económico de la región, provocan veloces transformaciones ambientales, con impactos en la salud pública.

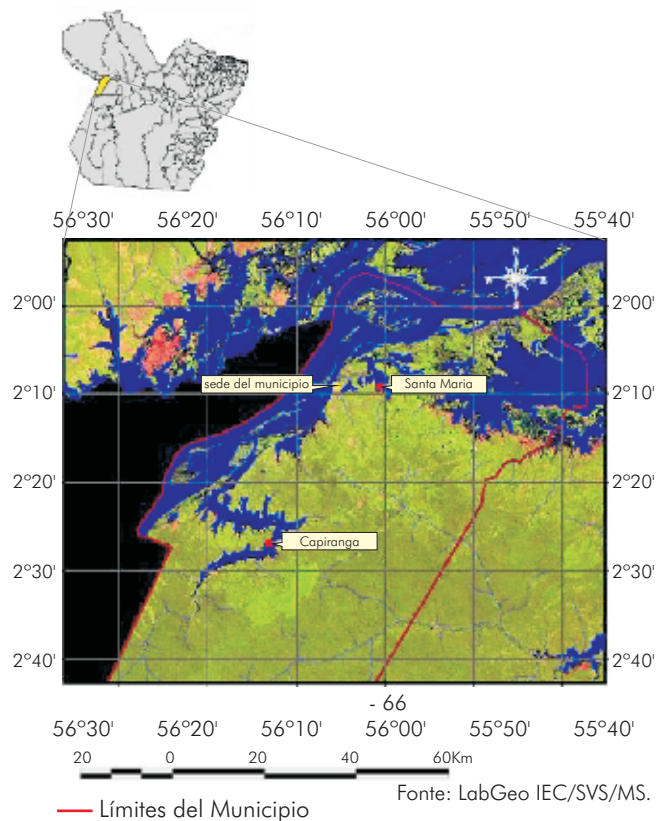
Las características socio económicas y ambientales influyen la efectividad de las estrategias operadas en los municipios brasileños para el control de la LVH<sup>20,7</sup>. Por ese motivo, la comprensión de la evolución de la enfermedad en el contexto de grandes transformaciones, orientaría las acciones dirigidas a la vigilancia, prevención y control de la leishmaniasis visceral<sup>20,4</sup>.

En un acompañamiento de 18 meses, se analizaron factores de riesgo para LVH (reservorio doméstico y vector) en dos microambientes de Juruti, representados por localidades rurales centinelas, con y sin transmisión de LVH y bajo influencia directa e indirecta de un emprendimiento minero. En seguida, se investigó el perfil de perros infectados en cada localidad, con el uso de métodos de diagnóstico clínico y de laboratorio (parasitológico, molecular y serológico). El desempeño de antígenos, bruto y recombinantes, en el ensayo inmunoenzimático (ELISA) para el diagnóstico serológico en esas áreas epidemiológicamente distintas, fue establecido. Se debatieron además, las implicaciones de la eutanasia de perros en las acciones de control.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ÁREAS DE ESTUDIO

La investigación sobre leishmaniasis visceral canina (LVC) se realizó en dos localidades centinelas, Santa Maria y Capiroanga, del Municipio de Juruti/Pará, distantes del centro urbano, respectivamente, 12 y 60 km (Figura 1). En la localidad rural Capiroanga, situada en el entorno del sitio de prospección mineral, no hay casos de LVH relatados por la comunidad residente ni tampoco notificados en los últimos cinco años investigados. En Santa Maria, periurbana y clasificada como localidad de transmisión de la enfermedad, había un caso de LV humana notificado hace tres años, conforme lo informado por la Secretaría de



**Figura 1** – Áreas de estudio en el Municipio de Juruti, Estado de Pará. Localidades centinelas: Santa Maria, a los márgenes del lago Curumucuri y próxima a la sede del municipio cerca de 12 km y Capiroanga, localizada al margen del lago Juruti Grande y distante 60 Km. de la sede. Capiroanga se sitúa en posición adyacente al área de impacto de la minera de bauxita, correspondiente a la gran mancha clara observada al sur del referido lago. Límites del Municipio

Salud del Municipio de Juruti.

### POBLACIÓN CANINA

A população canina correspondia a 30% da população humana, tanto em Santa Maria (94/303) quanto em CA (45/149) no início do estudo (11/2006).

### DISEÑO DEL ESTUDIO Y MUESTRA

Dos grupos de muestra se utilizaron en las dos localidades. El primero (G1), para el acompañamiento de la LVC por medio de averiguaciones serológicas, y el segundo (G2) para la determinación del perfil de la LVC y del desempeño diagnóstico de diferentes antígenos en pruebas serológicas. La muestra del G1 consistió apenas de plasmas. Así siendo, en un acompañamiento temporal de 18 meses se realizaron cuatro averiguaciones serológicas a intervalos semestrales: noviembre/2006, abril/2007, octubre/2007 y abril/2008. El número de animales varió a cada averiguación, dependiendo del tamaño de la población canina y de encontrar los perros en los alrededores de las residencias. En Santa Maria, las muestras de la primera a la cuarta averiguación sumaron, 217 plasmas (55, 57, 47 y 58), mientras que en Capiroanga totalizaron 90 (27, 10, 23 y 30). La muestra del G2 estaba compuesta de distintos especímenes: plasma, leucocitos de l sangre periférica (LSP) y aspirado medular/linfático de 53 perros (Santa Maria: 28 y Capiroanga: 25), obtenidos dos meses después de la conclusión del acompañamiento serológico. En esa muestra se investigó el perfil de la LVC en

las dos localidades, considerando criterios clínicos y de laboratorio para determinar infección y/o enfermedad.

#### COLECTA DE ESPECÍMENES Y EXÁMENES LABORATORIALES

Un total de 5 mL de sangre (para G1 o G2) fue colectado de cada animal por venopunción cefálica en tubo al vacío conteniendo EDTA (Shandong, USA). El plasma se obtuvo por centrifugación a temperatura ambiente (3700g/10'/TA) y fue mantenido a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análisis por medio del ensayo inmunoenzimático (ELISA) con uso de antígeno bruto de *Leishmania*, que consistió en lisis de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*<sup>18</sup>. Para G2 se utilizaron en el ELISA, además del antígeno bruto de *Leishmania*, antígenos recombinantes Hsp83<sup>2</sup> y k39<sup>23</sup>. El desempeño de las pruebas serológicas para el diagnóstico de la LVC con los tres antígenos fue comparado en las distintas áreas en relación al patrón oro establecido. Para este grupo (G2), también se obtuvieron LSP, que fueron preservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del uso y se destinaron al diagnóstico por kDNA-PCR<sup>13</sup>. Muestras de linfonodo (preescapular y/o poplíteo) o médula ósea se obtuvieron también de los mismos perros, por punción aspirativa, y el material se destinó al preparo de los frotis coloreadas por Giemsa y examinados al microscopio óptico (40x) para la investigación de amastigotas<sup>16</sup>.

#### EXAMEN CLÍNICO DE LOS PERROS

Los perros del G2 fueron examinados para la búsqueda de seis señales de la enfermedad: alopecia, dermatitis, úlceras cutáneas, conjuntivitis, onicogriposis y linfadenopatía. Cada señal fue puntuada en una escala semicuantitativa de 0 (ausente) a 3 (severo) y la suma reveló el total del puntaje clínico. Perros con puntaje total de 0 a 2 fueron arbitrariamente clasificados como asintomáticos, de 3 a 6 oligosintomáticos y de 7 a 18 polisintomáticos<sup>19</sup>.

#### PATRÓN ORO PARA COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS

En la muestra obtenida luego del acompañamiento, el examen parasitológico directo y el ELISA-lisis fueron utilizados en asociación para determinar un cuadro de muestras patrón oro. Fue establecido un consenso entre las dos pruebas, en el cual, los plasmas positivos para, por lo menos uno de ellos, y los negativos para ambos, fueron considerados los grupos patrón oro positivo y negativo, respectivamente.

#### ESTADÍSTICAS

Se utilizó el test exacto de Fisher y el análisis de variancia (ANOVA) para comparar los grupos, con nivel de significancia igual a 5%. Como parte del análisis del perfil de la infección/enfermedad en muestra de perros de Santa Maria (28) y Capianga (25), los resultados de los test de ELISA con los tres antígenos de esa muestra fueron comparados a los obtenidos con el patrón oro para la determinación del desempeño del test con cada antígeno (ELISA-lisis, ELISA-Hsp83 y ELISA-k39). Así, se utilizó el *screen test*, en el cual: a = verdaderos positivos, b = falsos positivos, c = falsos negativos y d = verdaderos negativos. Fueron calculadas la sensibilidad ( $a/a+c \times 100$ ), especificidad ( $d/b+d \times 100$ ) y los valores de predicción positivo ( $a/a+b \times 100$ ) y negativo ( $d/d+c \times 100$ ), además de la prevalencia ( $a+c/a+b+c+d$ ). El contrabalanceado entre

sensibilidad y especificidad se expresó en la curva ROC (del inglés, *receiver operator characteristic*) para definición del test con mejor poder discriminatorio en cada localidad<sup>8</sup>.

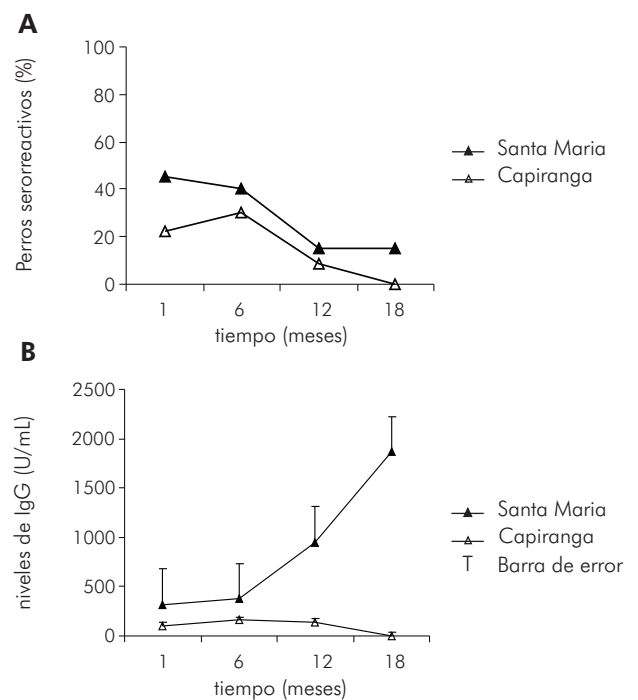
#### LEVANTAMIENTOS ENTOMOLÓGICOS

Se realizaron tres levantamientos entomológicos con trampas luminosas CDC en períodos de verano (abril y julio/2007) e invierno amazónicos (enero /2008). Cinco estaciones de colecta entomológica fueron utilizadas por localidad, y cada captura duró cuatro noches (18 - 6 h x 4), completando un esfuerzo de captura igual a 144 h en cada localidad. Las trampas luminosas (CDC) fueron establecidas en pares dentro de las casas y fuera de ellas, en las proximidades de anexos abrigando animales en un rayo inferior a 20 m. La identificación de los flebotomíneos se hizo por el método morfológico<sup>22</sup>.

#### RESULTADOS

Los resultados obtenidos por medio de la vigilancia del reservorio canino (*Canis familiaris*) y del vector flebotomíneo (*Luzomyia longipalpis*) en Santa Maria y Capianga revelaron factores de riesgo para leishmaniasis visceral humana en ambas localidades.

El acompañamiento de perros de las poblaciones de Santa Maria y Capianga durante 18 meses, por medio de averiguaciones serológicas, reveló frecuencias de seropositividad para LVC (ELISA-Lisis) más altas en Santa Maria que en Capianga, especialmente en los dos primeros puntos de colecta (Figura 2A). Los niveles de anticuerpos IgG también fueron elevados para los perros de Santa Maria ( $\leq 6400$ ), con nítido ascenso de su promedio geométrico a lo largo del tiempo (320, 378,



**Figura 2** — Leishmaniasis visceral canina en el Municipio de Juruti, Estado de Pará, Brasil. Perros serorreactivos (A) y promedio geométrico de los títulos de anticuerpos IgG (B) en localidades periurbana y rural, Santa Maria y Capianga, con y sin transmisión de leishmaniasis visceral humana, respectivamente. Se utilizó el ELISA con antígeno lisis de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Barra de error.

**Tabela 1** – Flebotomíneos capturados en localidades distintas para la transmisión de leishmaniasis visceral humana en el Municipio de Juruti, Pará, durante el verano (abril y julio/2007) y el invierno amazónicos (enero/2008)

ESPECIE	Santa Maria*			Capiranga <sup>†</sup>		
	♀	♂	n (%)	♀	♂	n (%)
1. <i>Lu. longipalpis</i>	119	160	279 (94)	1	3	4 (67)
2. <i>Lu. complexa</i>		1	1 (0,4)			
3. <i>Lu. paraensis</i>	1		1 (0,4)			
4. <i>Lu. davisii</i>				1		1 (16,5)
5. <i>Lu. walkeri</i>	8	5	13 (4,4)			
6. <i>Lu. castanheirai</i>				1		1 (16,5)
7. <i>Lu. furcata</i>		1	1 (0,4)			
8. <i>Lu. shannoni</i>		1	1 (0,4)			
TOTAL	128	168	296 (100)	3	3	6 (100)

Leishmaniasis visceral humana/localización:

\*con transmisión/periurbana; <sup>†</sup>sin transmisión/rural.

951, 1866; p<0,05). En los animales de Capiranga se detectaron bajos niveles de IgG (≤ 200), sin alteraciones significantes durante todo el acompañamiento (100, 159, 141, 0; p>0,05), como muestra la figura 2B.

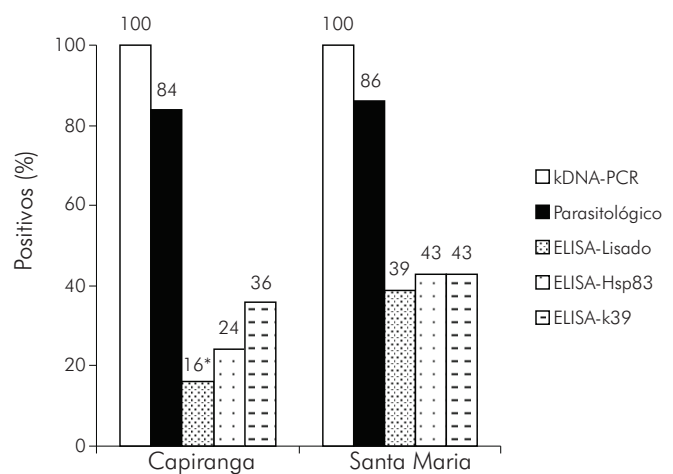
Las capturas entomológicas simultáneas al acompañamiento de los perros, dos en el verano y una en el invierno amazónico, revelaron la presencia de flebotomíneos sinantrópicos en las dos localidades, con predominancia de *Lutzomyia longipalpis* longipalpis en relación a *Lutzomyia* spp. La frecuencia de esa especie en la muestra fue mayor en Santa Maria (279/296) que en Capiranga (4/6), con densidad más elevada en el peridomicilio. Al intradomicilio la especie se capturó en baja frecuencia en las dos localidades (Santa Maria: 3/279 y Capiranga: 2/4). El cuadro 1 presenta las ocho especies identificadas y sus respectivas frecuencias en la muestra. Ningún espécimen presentó infección natural por *Leishmania*.

El abordaje transversal para comparación del perfil de la infección/ enfermedad indicó semejanzas entre los perros de Santa Maria (28) y Capiranga (25). La mayoría, aproximadamente un 80%, tenía edad igual o inferior a cuatro años, en ambas localidades (Tabela 2). Tampoco fue distinto ente las localidades, el número de animales en las diferentes categorías clínicas: asintomáticos (SM: 12 y CA: 14), oligosintomáticos (SM: 11 y CA 9) y polisintomáticos (SM: 5 y CA: 2), siendo el porcentaje de asintomáticos (SM: 43% y CA: 56%) y de sintomáticos (SM: 57% y CA = 44%) semejantes en ambas. La frecuencia de infección confirmada parasitológicamente fue igualmente alta en Santa Maria

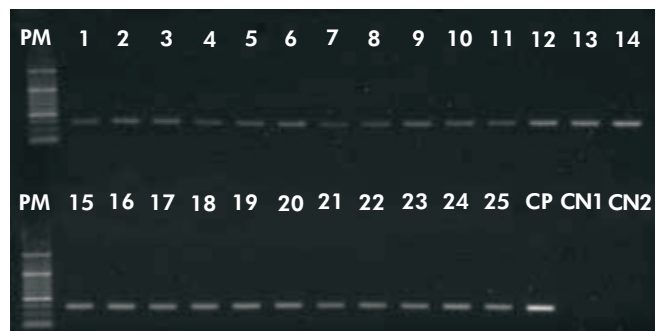
**Tabela 2** – Edades de los perros muestreados para determinar el perfil de la leishmaniasis visceral canina en las localidades de Capiranga y Santa Maria, Municipio de Juruti, Estado de Pará, 2008

Edades*	Capiranga (rural)		Santa Maria (periurbana)	
	n	(%)	n	(%)
0  — 2	13	52	11	39
2  — 4	7	28	11	39
4  — 6	4	16	3	11
6  — 8	0	0	3	11
8  — 10	0	0	0	0
10  — 12	1	4	0	0
TOTAL	25	100	28	100

\* Edades de machos y hembras (no lactantes) ≥ 6 meses.



**Figura 3** – Leishmaniasis visceral canina en el Municipio de Juruti, Pará. Frecuencia de infección determinada por varios métodos de diagnóstico en las localidades rural, Capiranga, y periurbana, Santa Maria, con y sin transmisión de leishmaniasis visceral humana, respectivamente (\*p<0,05)



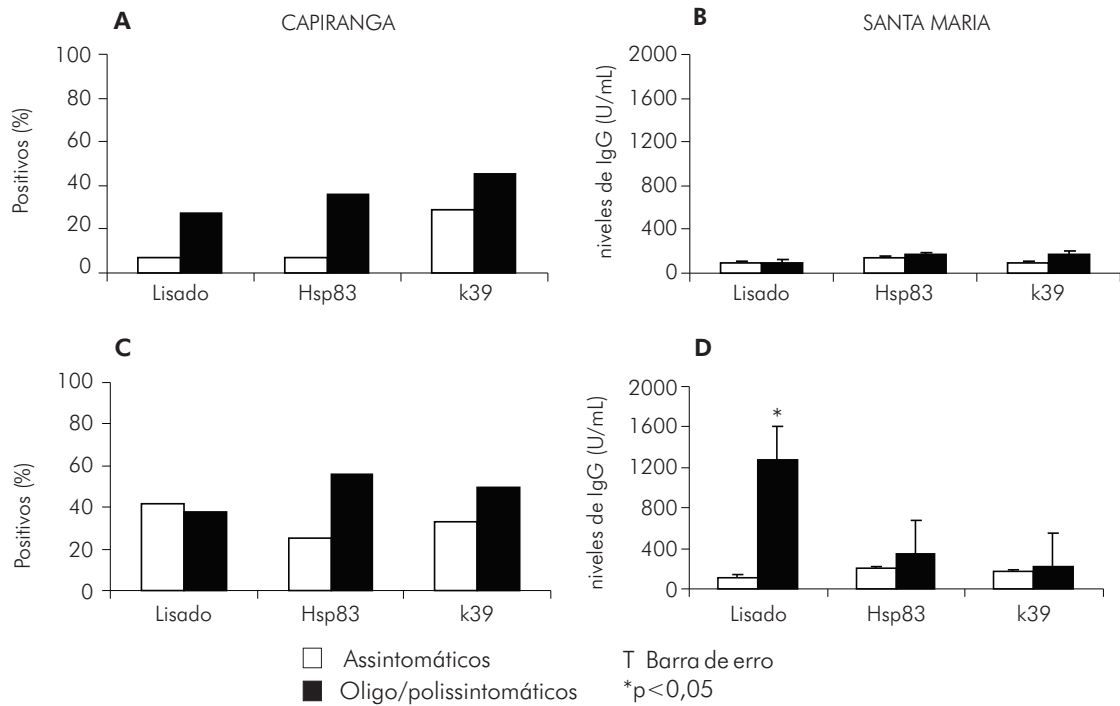
**Figura 4** – Producto de kDNA-PCR (RV1-RV2) revelado por electroforesis en gel de agarosa (1,5%) para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral canina en el Municipio de Juruti, Estado de Pará. Se utilizó DNA extraído de leucocitos de sangre periférica (LSP) de perros residentes en las localidades Capiranga (1-14) y Santa Maria (15-25). La banda específica para el complejo *Leishmania donovani* sensu lato presenta 145 pb, de acuerdo con Lachaud et al<sup>13</sup>. Marcador de peso molecular a 50pb (PM); Control positivo (CP: *Leishmania infantum chagasi*) y controles negativos (CN1: LSP de perro infectado; CN2: agua)

(86%) y Capiiranga (84%) y alcanzó un 100% cuando se usó el kDNA-PCR (Figura 3). La amplificación específica del DNA (145 pares de bases) confirmó que se trataba de infección por *L. (L.) infantum chagasi* (Figura 4).

Alas diferencias entre el perfil de infección/enfermedad para los perros de Santa Maria y Capiiranga fueron apenas observadas en la respuesta humoral de anticuerpos IgG a la infección por *Leishmania*. La frecuencia de perros serorreactivos fue diferente en las dos áreas, en la dependencia del antígeno usado para el ELISA (Figura 3). El k39 fue más sensible que la lisis y el Hsp83 en la detección de perros infectados asintomáticos, siendo el

único que reveló semejanza entre las frecuencias seropositivas asintomáticas de las dos localidades, visto que los demás se mostraron sensibles para perros infectados asintomáticos solamente en Santa Maria (Figura 5A y 5C). Los niveles de IgG en perros, a semejanza de lo observado en las averiguaciones serológicas realizadas durante el acompañamiento, fueron más elevados en los animales de Santa Maria que en los de Capiiranga, sobre todo cuando utilizado el ELISA-Lisis (Figura 5B y 5D).

El tabela 3 presenta el desempeño de las pruebas de diagnóstico en relación al patrón oro, destacando la



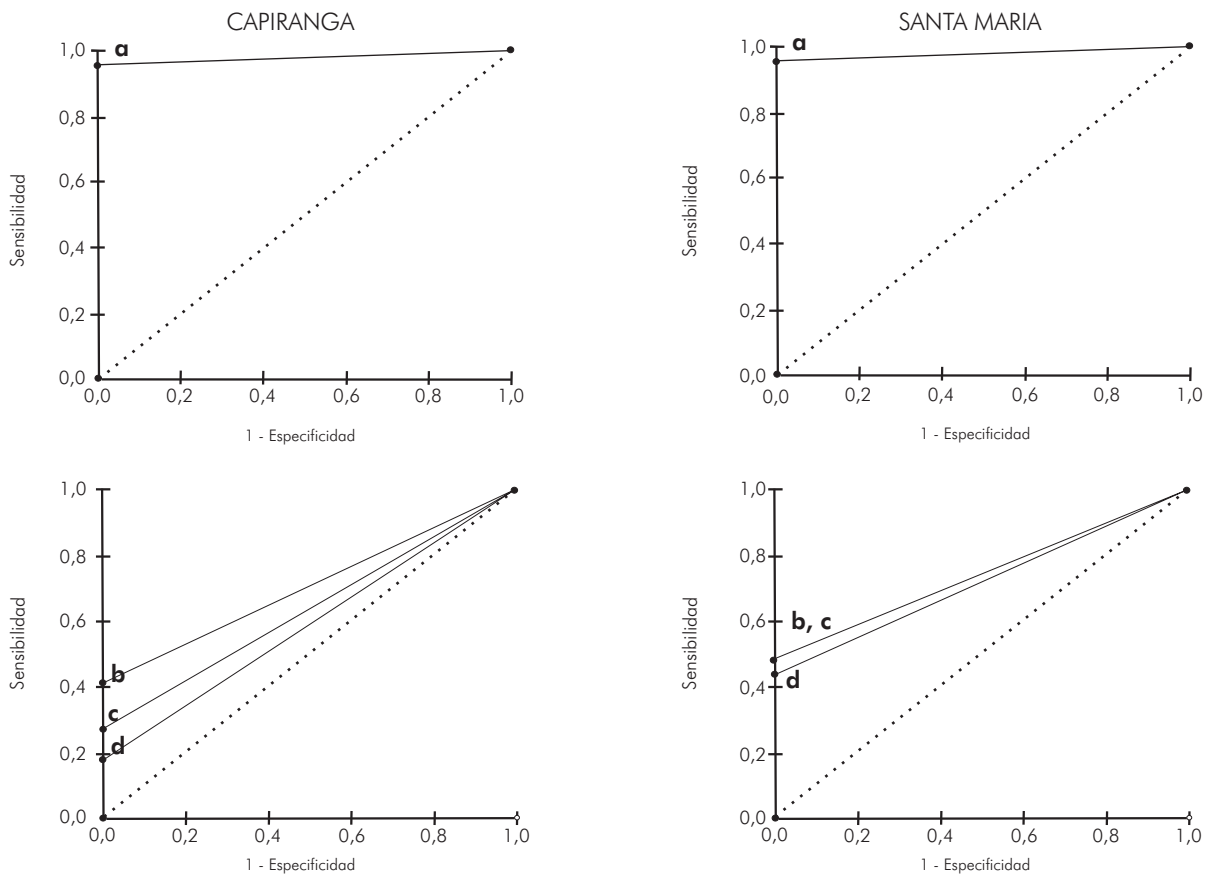
**Figura 5** – Leishmaniasis visceral canina en el Municipio de Juruti, Pará. Frecuencia de positividad y niveles de IgG (promedio geométrico) para perros asintomáticos y sintomáticos en las localidades periurbana, Santa Maria, y rural, Capiiranga, con y sin transmisión de leishmaniasis visceral humana, respectivamente. Fue utilizado el ELISA con diferentes antígenos: lisis de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* y los recombinantes Hsp83 y k39

**Tabela 3** – Leishmaniasis visceral canina en localidades epidemiológicamente distintas del Municipio de Juruti, Estado do Pará, 2008. Desempeño del examen parasitológico y del ensayo inmunoenzimático (ELISA) con diferentes antígenos en relación al patrón oro

Índices	Lisis (%)		ELISA				Examen Parasitológico (%)	
			Hsp83 (%)		k39 (%)			
	SM <sup>1</sup>	CA <sup>2</sup>	SM	CA	SM	CA	SM	CA
Sensibilidad	44	18	48	27	48	41	96	95
Especificidad	100	100	100	100	100	100	100	100
VPP*	100	100	100	100	100	100	100	100
VPN <sup>†</sup>	18	14	19	16	19	19	75	75
Prevalencia	39	16	43	24	43	36	86	84

Perros residentes en las localidades periurbana y rural, Santa Maria<sup>1</sup> (n = 28) y Capiiranga<sup>2</sup> (n = 25), con y sin transmisión leishmaniasis visceral humana, respectivamente;

\* Valor de predicción positivo; <sup>†</sup> Valor de predicción negativo.



**Figura 6** – Curvas ROC para pruebas de diagnóstico de leishmaniasis visceral canina en localidades epidemiológicamente distintas del Municipio de Juruti, Pará. Exactitud del examen parasitológico (a) y del ensayo inmunoenzimático (ELISA) con diferentes antígenos (b= k39; c= Hsp83; d= lisis de promastigotas), de acuerdo con puntos de corte entre infectado y normal para perros de Santa María (n = 28) y Capiiranga (n = 25), localidades con y sin transmisión de leishmaniasis visceral humana respectivamente. El test con mejor poder discriminador es el que más se distancia de la línea diagonal punteada en el centro del área

superior sensibilidad del examen parasitológico para detección de infección por *Leishmania* y las variaciones en prevalencia determinadas por el método de diagnóstico utilizado. Entre los test serológicos, el ELISA-k39 fue el que presentó más poder discriminador en el serodiagnóstico de la LVC en ambas localidades (Figura 6).

## DISCUSIÓN

El gran potencial mineral de Juruti, al oeste del Estado de Pará, ha atraído emprendimientos que, a despecho de contribuir con el desarrollo económico de la región, provocan rápidas transformaciones ambientales capaces de influir en la epidemiología de la leishmaniasis visceral y producir impactos en la salud pública<sup>20,7</sup>. El fortalecimiento de las acciones de vigilancia, incluyendo la investigación detallada de los factores de riesgo, debe propiciar el conocimiento necesario para la elaboración de las estrategias de control a ser operadas por el Municipio.

En este estudio, se ejecutaron acciones de vigilancia para leishmaniasis visceral (LV) a lo largo de 18 meses, durante la fase de prospección de bauxita en Juruti. Las acciones fueron centradas en el reservorio canino y en el vector. Se utilizaron espacios rurales epidemiológicamente distintos y denominados localidades centinelas: Santa María, con transmisión de LVH y expuesta a influencias urbanas por su localización periférica a la sede municipal,

de la cual queda a apenas 12 Km, y Capiiranga, a 60 Km. del área urbana, donde no hay registros de LVH. Esta segunda localidad, sin embargo, se sitúa en el entorno de la mina de bauxita, donde están en curso actividades relacionadas a la extracción del mineral

Inicialmente, fueron investigadas las variaciones temporales de la frecuencia de infección determinada por la serología (ELISA) en la población canina de las localidades en estudio. En seguida, se buscó establecer el perfil de la infección/enfermedad en los perros de cada localidad, con el fin de obtener subsidios para la discusión del potencial de las acciones de control, teniendo como blanco el reservorio perro

Al determinar la prevalencia de perros serorreactivos para leishmaniasis visceral al inicio del acompañamiento, sobre todo en la segunda averiguación semestral, ambas localidades parecían expuestas al mismo riesgo (Figura 2A). Con base en esos resultados y la ocurrencia de un nuevo caso de LVH en Santa María durante la investigación, el equipo de vigilancia del Municipio decidió por la eutanasia de los perros serorreactivos, lo que fue parcialmente realizado solamente en Santa María. Las terceras y cuartas averiguaciones serológicas caninas revelaron crecientes niveles de IgG en los perros de Santa María, aún en vigencia de la intervención, pero en Capiiranga, donde no hubo eutanasia de perros ni

tampoco casos de LVH, los niveles de IgG se mantuvieron bajos o indetectables durante los 18 meses de acompañamiento (Figura 2B).

En áreas de transmisión intensa, los niveles de anticuerpos IgG antileishmania en perros son elevados o están en ascenso<sup>19</sup> y se relacionan a la parasitemia<sup>7,21</sup>, lo que estaría ocurriendo con los perros de Santa Maria. Los bajos niveles de IgG, por su lado, semejantes a los descritos para la población canina de Capiranga, sugieren el control de la infección canina (en este caso, Capiranga sería una localidad silenciosa) o son consecuencia de reacciones inespecíficas en la serología, pasibles de ocurrir debido a la alta sensibilidad del ELISA, pues los perros están expuestos a diversas otras enfermedades infecciosas<sup>9,3,10</sup> que inducen los linfocitos B a la producción de IgG con eventual reacción cruzada con antígenos de *L. (L.) infantum chagasi*<sup>1</sup>.

No habrían sido reveladas diferencias entre las poblaciones caninas de las dos localidades, si considerada apenas la frecuencia de perros serorreactivos constatada, por ejemplo, en la segunda averiguación serológica (Santa Maria: 40% y Capiranga: 30%, como muestra la figura 2A). Acciones de vigilancia de la leishmaniasis visceral con foco en el reservorio canino, por lo tanto, deben considerar la necesaria temporalidad de las averiguaciones serológicas y la investigación de los niveles de IgG, especialmente cuando levantamientos entomológicos no son factibles por la carencia de soporte técnico local.

Los intrigantes bajos niveles de IgG en perros de Capiranga, con ausencia total de reactividad en la última averiguación (Figura 2B), suscitaban una investigación del perfil de la infección/enfermedad canina en muestras de las dos localidades, a fin de comparar los resultados. Perros de Santa Maria y de Capiranga, con edades semejantes (Tabla 2), se revelaron idénticos con relación a la presentación clínica de la leishmaniasis visceral, considerando la intensidad de señales y el número de animales distribuidos en las categorías asintomáticos, oligosintomáticos y polisintomáticos. La frecuencia de infección confirmada parasitológicamente fue igualmente alta en Santa Maria (86%) y Capiranga (84%) y, con el uso de kDNA-PCR (Figura 4), alcanzó un 100% en perros de ambas localidades, indicando que la enzootia abarca a toda la población canina en las dos áreas.

La ocurrencia de la LV humana en una determinada área depende, básicamente, de la presencia de dos factores, el vector infectado y el hospedero humano susceptible<sup>11</sup>. Aunque existan perros infectados (reservorio doméstico) en las dos localidades en igual proporción, la frecuencia alta de *Lutzomyia longipalpis* en Santa Maria, pero no en Capiranga (Tabla 1), diferenció las dos localidades con relación al riesgo de transmisión de la leishmaniasis visceral a los humanos. El hábito de hacer hogueras nocturnas en Capiranga, incorporado de la cultura indígena local, ciertamente contribuye a inhibir la presencia de flebotómicos en el peridomicilio y la consecuente transmisión de *L. (L.) infantum chagasi* a los humanos. Esta hipótesis merece ser investigada con un estudio sobre conocimientos, actitudes y prácticas (CAP) de los habitantes de esas localidades en relación a la leishmaniasis visceral y su prevención.

Aunque el examen parasitológico garantice la confirmación absoluta de la infección, en la práctica es necesario trabajar con pruebas que no son altamente sensibles y específicos. En la misma muestra, el ELISA reveló frecuencia de positivos muy inferior al real número de perros infectados, y con variaciones de sensibilidad en función del antígeno utilizado (Figura 3). Aunque la lisis bruta de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* se haya presentado más sensible para detectar altos niveles de IgG en perros sintomáticos (Figura 5D), para animales infectados asintomáticos no tuvo el mismo desempeño en las dos áreas. Los dos antígenos recombinantes (Hsp83 y k39) fueron los más sensibles en esas circunstancias, pero el ELISA-k39 fue el que presentó mayor poder discriminatorio (Figura 6), detectando perros infectados asintomáticos tanto en Santa Maria como en Capiranga (Figura 5A y C).

Para este tipo de análisis es deseable utilizar perros semejantes a los que recibirán aplicación de test serológico en la práctica de vigilancia, bien como es importante que la elección de la prueba patrón oro, inexistente en el caso de la LVC, sea adecuada<sup>8</sup>. Fue necesario, entonces establecer un patrón oro para efecto de cálculo de los índices de desempeño de los diferentes antígenos, que consistió en la asociación de dos exámenes más tradicionales, el parasitológico y el ELISA-lisis. Este hecho y, sobre todo, la inusitada naturaleza de la muestra en CA (84% de los perros infectados), influyeron en la estimativa de especificidad y demás índices relacionados, como el valor de predicción negativo, extremadamente bajo en función del pequeño número de patrones negativos (Tabla 3). Esos índices precisan todavía ser investigados en perros provenientes de localidades con baja frecuencia de infección por *L. (L.) infantum chagasi*, pues a pesar del ELISA ser el método de elección para investigación epidemiológicas<sup>11</sup>, es importante considerar variaciones de desempeño asociados a la carga de enfermedad (o intensidad de transmisión) en determinada localidad. La sensibilidad y especificidad del ELISA se reducen también significativamente en el período latente de la infección canina<sup>7</sup>. Siendo así, bajo diferentes condiciones (o en poblaciones caninas distintas), su sensibilidad podría presentar aún más baja que la descrita en este estudio.

La inexistencia de registros oficiales en los últimos cinco años, o de relatos de los moradores, de la ocurrencia de LV humana en Capiranga (donde no se realizó la eutanasia de perros), asociada a los factores de riesgo descritos en ese estudio, confirma la necesidad de la vigilancia de la LV dirigida a las demás localidades en el entorno de la mina de bauxita y fundamentada en las características epidemiológicas locales, para el alcance de la efectividad.

En Capiranga, la vigilancia entomológica tiene preferencia delante de la eutanasia de perros, pues, en las condiciones existentes, el potencial de infectar a flebotomos, con la subsiguiente transmisión a los humanos, es limitado. Los hallazgos en Santa Maria, con todo, indican inminente riesgo de urbanización de la LV y medidas rigurosas deben ser tomadas de inmediato para evitar la expansión, incluyendo acciones de educación ambiental, monitoreo de vectores vislumbrando el control

químico, eutanasia de perros polisintomáticos y la búsqueda de nuevos focos en los alrededores, en localidades rurales y urbanas

Algunas acciones que se pueden desarrollar para el control químico de la población de vectores, son la aspersión con insecticidas y el uso de collares para perros o de mosquiteros para humanos, ambos impregnados con deltametrina<sup>5</sup>. Recientemente, en un estudio inédito en América Latina, se demostró que el baño de perros con este piretroide tiene efecto residual (eficacia entomológica) de 5,2 meses, semejante al observado con el uso de collares, con la ventaja del bajo costo (US\$0.06-0.10) en comparación con éstos (US\$10-15)<sup>6</sup>.

A despecho de las intervenciones posibles, ya disponibles o en experimentación, cualquier acción de control químico del vector depende de estudios entomológicos previos<sup>16</sup> que los municipios amazónicos corrientemente no consiguen ejecutar. En contrapartida, el control efectivo de la LV por medio de la eliminación de perros exige que una gran proporción de perros infectados, e infectantes al vector, sea removida de la localidad<sup>7</sup>, lo que generalmente no es factible, sobre todo cuando toda la población canina se encuentra infectada, como demostrado en este estudio.

La mejor manera de controlar la LVC y, consecuentemente, prevenir la enfermedad humana, sería una vacuna efectiva para perros, lo que todavía no está disponible. Las investigaciones asociadas al tema indican prometedores compuestos candidatos<sup>17</sup>, y los avances en la comprensión de los mecanismos por los cuales parásitos del género *Leishmania* infectan y se evaden de la respuesta inmune de hospederos mamíferos están abriendo frentes de investigación en busca de nuevas vacunas contra la

enfermedad<sup>12</sup>.

En la indisponibilidad de una vacuna para perros, aunque el método de diagnóstico ideal para la detección de infección canina sea encontrado, no será efectivo sin la solución de los problemas locales enfrentados por la mayoría de los municipios amazónicos, como las deficiencias en gestión, la escasez de recursos humanos y financieros y los frecuentes conflictos entre autoridades sanitarias y la población local, relacionados a la práctica de la eutanasia de perros en los moldes actuales.

Los resultados de este estudio revelan la ocurrencia y la extensión de la enzootia de LVC en Capianga y, consecuentemente, la posibilidad de emergencia de la LVH no apenas en esta localidad, sino también en otras silenciosas (similares a Capianga) y expuestas al impacto directo de grandes transformaciones ambientales relacionadas a las actividades mineras. Se demostró además el riesgo de expansión del número de casos de LVH en áreas de transmisión expuestas a crecientes influencias urbanas (Santa Maria y similares). Los resultados orientan acciones de vigilancia, prevención y control de la LVH en Juruti, en las localidades rurales, en el entorno de la mina y en las áreas periurbanas.

## AGRADECIMIENTOS

A las comunidades Santa Maria y Capianga, por la siempre cálida recepción y adhesión a la investigación. A la dra. Ana Márcia Souza da Cunha Oliveira y demás profesionales de la Secretaría Municipal de Salud de Juruti, por el apoyo y la participación. A los equipos técnicos del Instituto Evandro Chagas, sobre todo a los de los Laboratorios de Inmunología y Epidemiología (Sección de



## Vigilância da leishmaniose visceral em localidades epidemiologicamente distintas em Juruti, um município minerário do Estado do Pará, Brasil

### RESUMO

Realizaram-se ações de vigilância para leishmaniose visceral humana (LVH) em Juruti, município minerário do Estado do Pará. Foram selecionadas as localidades de Santa Maria (SM), periurbana, e Capianga (CA), rural, com e sem LVH, respectivamente, para quatro inquéritos sorológicos semestrais (ELISA-Lisado) nas populações caninas (SM = 94; CA = 45) e três levantamentos entomológicos (armadilhas luminosas CDC, 18-6hx4). Posteriormente, investigaram-se status clínico e infecção por *Leishmania* em 53 cães (SM = 28; CA = 25) com diagnóstico parasitológico (medula/linfa, Giemsa), molecular (leucócitos do sangue periférico, kDNA-PCR) e sorológico (ELISA), avaliando-se diferentes antígenos (Lisado, k39, Hsp83 - *screen test*, curva ROC). Soroprevalências variaram em SM (45; 40; 15; 15%) e CA (22; 30; 8,5; 0%), com médias crescentes de IgG em SM (320; 378; 951; 1866;  $p < 0,05$ ), apesar da eutanásia de cães após segundo inquérito, e estáveis em CA (100; 159, 141; 0), onde não houve eutanásia. A frequência de *Lutzomyia longipalpis/Lutzomyia* spp diferiu em SM (279/296) e CA (4/6). Os resultados clínicos e laboratoriais assemelharam-se para cães de SM e CA, respectivamente, quanto à infecção (parasitológico: 86 e 84%; kDNA-PCR: 100%), status clínico (assintomáticos: 43 e 56%; sintomáticos: 57 e 44%) e especificidade no ELISA (100%), mas variaram sensibilidades (Lisado: 44 e 18%; Hsp83: 48 e 27%; k39: 48 e 41%) e níveis de IgG ( $\leq 6,400$ ;  $\leq 200$ ). O perfil da infecção canina nas localidades com e sem transmissão de LVH diferiu apenas em níveis/evolução de IgG, o que torna necessária a temporalidade dos inquéritos, sobretudo em áreas silenciosas, isoladas com baixa densidade do vetor, onde seria dispensável a eutanásia de cães. O melhor teste sorológico foi ELISA-k39.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Visceral; Cães; ELISA; Reação em Cadeia da Polimerase; Insetos Vetores; Vigilância Epidemiológica.



## Surveillance of visceral leishmaniasis in epidemiologically distinct locations in Juruti, a mining municipality in Pará State, Brazil

### ABSTRACT

Surveillance actions for human visceral leishmaniasis (HVL) were carried out in Juruti, a mining municipality in Pará State. A peri-urban (Santa Maria-SM) and a rural (Capiranga-CA) location were selected with or without HVL, respectively, for the execution of four biannual serologic inquiries (lysate ELISA) in canine populations (SM = 94, CA = 45) and three entomological surveys (CDC light traps, 18-6 h x4). Subsequently, the clinical status, as well as the infection by *Leishmania*, was investigated in 53 dogs (SM = 28; CA = 25) with parasitological (bone marrow/lymph, Giemsa), molecular (peripheral blood leukocytes, kDNA-PCR) and serological (ELISA) diagnoses assessing different antigens (lysate, k39, Hsp83 - screen test, ROC curve). Seroprevalence varied in SM (45; 40; 15; 15%) and in CA (22; 30; 8.5; 0%), presenting increasing average IgG rates in SM (320; 378; 951; 1866;  $p < 0.05$ ) despite the euthanasia of dogs after the second survey, and stable average IgG rates in CA (100; 159; 141; 0), where euthanasia was not conducted. The frequency rates of *Lutzomyia longipalpis/Lutzomyia* spp. differed in SM (279/296) and CA (4/6). Clinical and laboratory results were similar for dogs from SM and CA, respectively: infection (parasitological examination: 86 and 84%; kDNA-PCR: 100%), clinical status (asymptomatic: 43 and 56%; symptomatic: 57 and 44%), and specificity by ELISA (100%). On the other hand, sensitivity (lysate: 44 and 18%; Hsp83: 48 and 27%; k39: 48 and 41%) and IgG levels ( $\leq 6,400$ ;  $\leq 200$ ) varied, respectively. The profile of canine infection in localities with or without HVL transmission differed only in terms of the level/evolution of IgG, which makes the temporality of investigations necessary, especially in quiet and isolated areas that present a low vector density and where the euthanasia of dogs would become unnecessary. The best serological test was ELISA-k39.

**Keywords:** Leishmaniasis, Visceral; Dogs; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Polymerase Chain Reaction; Insect Vectors; Epidemiologic Surveillance.



Parasitología) y de Geoprocesamiento. A las técnicas Rosângela Barros y Rita Félix, a los estudiantes Eduardo Mota y Luís Dickson y al dr. Nelson Veiga, por el inestimable apoyo técnico. A la dra. Nazaré Souza, de la Universidad Federal Rural de la Amazonía. A la minera Alcoa Alumínio S/A, a la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Insumos Estratégicos - DECIT/SCTIE y al Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico - CNPq por el soporte financiero.

### REFERENCIAS

- Alves WA, Bevilacqua PD. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cad Saude Publica*. 2004 Jan-Feb;20(1):259-65.
- Celeste BJ, Angel SO, Castro LG, Gidlund M, Goto H. *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Nov;37(11):1591-3.
- Colpo CB, Monteiro SG, Stainki DR, Colpo ETB, Henriques GB. Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Cienc Rural*. 2005 May-Jun;35(3):717-19.
- Costa CHN, Vieira JBF. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001 mar-abr;34(2):223-228.
- Courtenay O, Gillingwater K, Gomes PAF, Garcez LM, Davies CR. Deltamethrin-impregnated bednets reduce human landing rates of sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* in Amazon households. *Med Vet Entomol*. 2007 Jun;21(2):168-76.
- Courtenay O, Kovacic V, Gomes PA, Garcez LM, Quinnell RJ. A long-lasting topical deltamethrin treatment to protect dogs against visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol*. 2009 Sep;23(3):245-56.
- Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis*. 2002;186(9):1314-20.
- Fletcher RH, Fletcher SW. *Epidemiologia clínica: elementos essenciais*. Porto Alegre: Artmed; 2006. 288 p.
- Garcez LM, Souza NF, Mota EF, Dickson LAJ, Abreu WU, Cavalcanti VF, et al. Focus de difilariose canina na Ilha do Marajó: um fator de risco para a saúde humana. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006 jul-ago;39(4):333-6.
- Glaser B, Gothe R. Imported arthropod-borne parasites and parasitic arthropods in dogs. Species spectrum and epidemiologic analysis of the cases diagnosed in 1995/96. *Tierarztl Prax Ausg K Klientiere Heimtiere*. 1998 Feb;26(1):40-6.
- Gontijo CME, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol*. 2004 set;7(3):338-49.
- Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F. Leishmaniasis vaccine candidates for

- development: a global overview. *Indian J Med Res.* 2006 Mar;123(3):423-38.
- 13 Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien PJ. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2002 Jan; 40(1):210-5.
  - 14 Lainson R, Shaw JJ, Lins ZC. Leishmaniasis in Brazil. IV. The fox *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Pará state. Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1969;63(6):741-5.
  - 15 Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters WE, Killick-Kendrick R, editors. *The leishmaniasis in biology and medicine.* London: Academic Press; 1987. p. 2-118.
  - 16 Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília; 2006. 120 p.
  - 17 Nogueira FS, Moreira MAB, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Menz I, Parra LE, et al. Leishmune® vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine.* 2005 Sep;23(40):4805-10.
  - 18 Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, et al. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology.* 2001 Mar;122(Pt 3):253-61.
  - 19 Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, et al. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003 Feb;91(3-4):161-8.
  - 20 Werneck GL, Pereira TJCF, Farias GC, Silva FO, Chaves FC, Gouvêa MV, et al. Avaliação da efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral na cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil: resultados do inquérito inicial 2004. *Epidemiol Serv Saúde.* 2008 abr-jun;17(2):87-96.
  - 21 Xiong G, Jin C, Cheng X, Su Z. Deltamethrin bath of domestic dog in the prevention of sandfly bite. *End Dis Bull.* 1994;9:32-34.
  - 22 Yong DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in