

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

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

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

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 Capiiranga (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 (≤ 6.400 ; ≤ 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.

Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

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

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral humana (LVH) é uma doença grave e potencialmente fatal sem diagnóstico e tratamento precoces. No continente americano é causada pelo protozoário *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi*, cuja transmissão a hospedeiros vertebrados é feita pela espécie *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), o vetor mais definido da LVH nas Américas. A raposa (*Cerdocyon thous*) atua como reservatório do parasito na manutenção de um ciclo silvestre^{14,11}, mas o cão doméstico (*Canis familiaris*) tem importância epidemiológica na transmissão aos humanos, por ser o reservatório no ciclo doméstico do protozoário e a principal fonte de infecção ao vetor¹⁵.

A leishmaniose visceral encontra-se em expansão, com tendência à urbanização no Estado do Pará. Algumas áreas de transmissão intensa da doença compreendem municípios do oeste do Estado. Nesta região, Juruti é classificado como município de transmissão esporádica para LVH; entretanto, tem divisa, a leste, com Santarém, segunda maior cidade do Estado e área de transmissão intensa da doença. O grande potencial mineral (bauxita) de Juruti tem atraído empreendimentos que, apesar de contribuírem para o desenvolvimento econômico da região, provocam velozes transformações ambientais, com impactos na saúde pública.

As características socioeconômicas e ambientais influenciam a efetividade das estratégias operadas nos municípios brasileiros para o controle da LVH^{20,7}. Por esse motivo, a compreensão da evolução da doença no contexto de grandes transformações orientaria as ações voltadas à vigilância, prevenção e controle da leishmaniose visceral^{20,4}.

Analisaram-se, em um seguimento de 18 meses, fatores de risco para LVH (reservatório doméstico e vetor) em dois microambientes de Juruti, representados por localidades rurais sentinelas, com e sem transmissão de LVH e sob influência direta e indireta de um empreendimento mineral. Em seguida, investigou-se o perfil de cães infectados em cada localidade, com o uso de métodos de diagnóstico clínico e laboratorial (parasitológico, molecular e sorológico). O desempenho de antígenos, bruto e recombinantes, no ensaio imunoenzimático (ELISA) para o diagnóstico sorológico nessas áreas epidemiologicamente distintas, foi estabelecido. Discutiram-se ainda as implicações da eutanásia de cães nas ações de controle.

MATERIAIS E MÉTODOS

ÁREAS DE ESTUDO

A pesquisa sobre leishmaniose visceral canina (LVC) foi realizada em duas localidades sentinelas, Santa Maria e Capiranga, do Município de Juruti/Pará, distantes do centro urbano, respectivamente, 12 e 60 km (Figura 1). Na localidade rural Capiranga, situada no entorno do sítio de prospecção mineral, não há casos de LVH relatados pela comunidade residente e tampouco notificados nos últimos cinco anos investigados. Em Santa Maria, localidade periurbana e classificada como localidade de transmissão da doença, havia um caso de LV humana notificado há três anos, conforme informado pela Secretaria de Saúde do Município de Juruti.

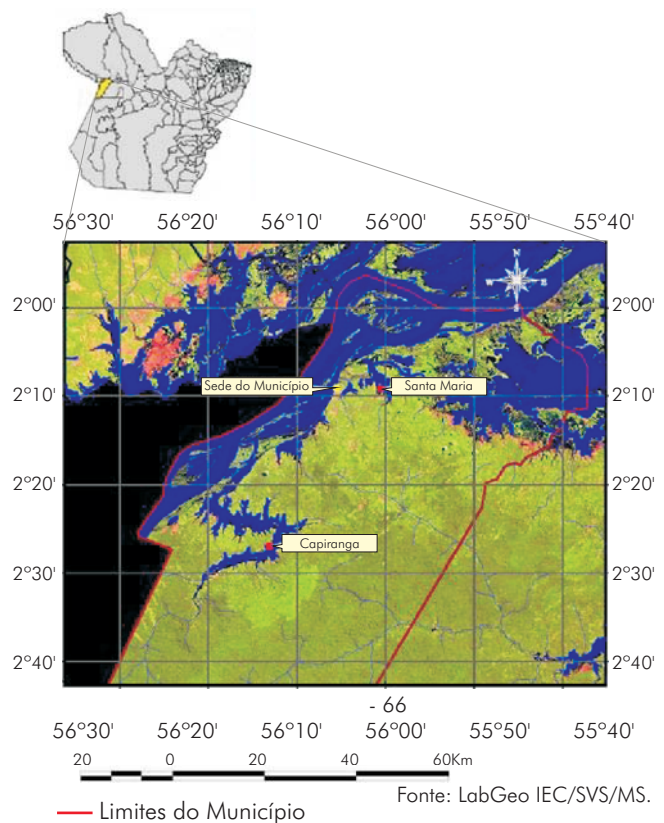


Figura 1 – Áreas de estudo no Município de Juruti, Estado do Pará. Localidades sentinelas: Santa Maria, às margens do lago Curumucuri e próxima à sede do Município cerca de 12 km e Capiranga, localizada às margens do lago Juruti Grande e distante 60 km da sede. Capiranga situa-se em posição adjacente à área de impacto da mineração de bauxita, correspondente à grande mancha clara observada ao sul do referido lago

POPULAÇÃO 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).

DESENHO DO ESTUDO E AMOSTRA

Dois grupos de amostra foram utilizados nas duas localidades. O primeiro (G1), para o seguimento da LVC por meio de inquéritos sorológicos, e o segundo (G2) para a determinação do perfil da LVC e do desempenho diagnóstico de diferentes antígenos em testes sorológicos. A amostra do G1 consistiu apenas de plasmas. Sendo assim, em um seguimento temporal de 18 meses realizaram-se quatro inquéritos sorológicos a intervalos semestrais: novembro/2006, abril/2007, outubro/2007 e abril/2008. O número de animais variou a cada inquérito, na dependência do tamanho da população canina e do encontro dos cães nos arredores das residências. Em Santa Maria, as amostras do primeiro ao quarto inquérito somaram 217 plasmas (55, 57, 47 e 58), enquanto em Capiranga totalizaram 90 (27, 10, 23 e 30). A amostra do G2 compôs-se de diferentes espécimes: plasma, leucócitos do sangue periférico (LSP) e aspirado medular/linfático de 53 cães (Santa Maria: 28 e Capiranga: 25), obtidos dois meses após a conclusão do seguimento sorológico. Nessa amostra investigou-se o perfil da LVC nas duas localidades, considerando critérios clínicos e laboratoriais para determinação de infecção e/ou doença.

COLETA DE ESPÉCIMES E EXAMES LABORATORIAIS

O total de 5 mL de sangue (para G1 ou G2) foi coletado de cada animal por punção venocefálica em tubo a vácuo contendo EDTA (Shandong, USA). O plasma foi então obtido por centrifugação à temperatura ambiente (3700g/10'/TA) e mantido a -20° C para posterior análise por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA) com uso de antígeno bruto de *Leishmania*, que consistiu em lisado de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*¹⁸. Para G2 utilizaram-se no ELISA, além do antígeno bruto de *Leishmania*, antígenos recombinantes Hsp83² e k39²³. O desempenho dos testes sorológicos para o diagnóstico da LVC com os três antígenos foi comparado nas diferentes áreas em relação ao padrão ouro estabelecido. Para este grupo (G2), também obtiveram-se LSP, que foram preservados a -20° C até o momento de uso e destinaram-se ao diagnóstico pela kDNA-PCR¹³. Amostras de linfonodo (pré-escapular e/ou poplíteo) ou medula óssea foram também obtidas dos mesmos cães, por punção aspirativa, e o material destinou-se ao preparo de esfregaços corados pelo Giemsa e examinados ao microscópio óptico (40x) para a pesquisa de amastigotas¹⁶.

EXAME CLÍNICO DOS CÃES

Os cães do G2 foram examinados quanto a seis sinais da doença: alopecia, dermatite, ulcerações cutâneas, conjuntivite, onicogribose e linfadenopatia. Cada sinal foi pontuado em uma escala semiquantitativa de 0 (ausente) a 3 (severo) e a soma revelou o total da pontuação clínica. Cães com pontuação total de 0 a 2 foram arbitrariamente classificados como assintomáticos, de 3 a 6 oligossintomáticos e de 7 a 18 polissintomáticos¹⁹.

PADRÃO OURO PARA COMPARAÇÃO DOS TESTES

Na amostra obtida após o seguimento, o exame parasitológico direto e o ELISA-lisado foram utilizados em associação para se determinar um painel de amostras padrão ouro. Estabeleceu-se um consenso entre os dois testes, no qual os plasmas positivos para pelo menos um deles, e os negativos para ambos, foram considerados os grupos padrão ouro positivo e negativo, respectivamente.

ESTATÍSTICAS

Utilizou-se o teste exato de Fisher e a análise de variância (ANOVA) para comparação entre grupos, com nível de significância igual a 5%. Como parte da análise do perfil da infecção/doença em amostra de cães de Santa Maria (28) e Capiranga (25), os resultados dos testes de ELISA com os três antígenos nessa amostra foram comparados àqueles obtidos com o padrão ouro para a determinação do desempenho do teste com cada antígeno (ELISA-lisado, ELISA-Hsp83 e ELISA-k39). Assim, utilizou-se o *screen test*, onde: a = verdadeiros positivos, b = falsos positivos, c = falsos negativos e d = verdadeiros negativos. Foram calculados a sensibilidade ($a/a+c \times 100$), especificidade ($d/b+d \times 100$) e os valores de predição positivo ($a/a+b \times 100$) e negativo ($d/c+d \times 100$), além da prevalência ($a+c/a+b+c+d$). O contrabalanço entre sensibilidade e especificidade foi expresso na curva ROC (do inglês, *receiver operator characteristic*) para definição do teste com melhor poder discriminatório em cada localidade⁸.

LEVANTAMENTOS ENTOMOLÓGICOS

Realizaram-se três levantamentos entomológicos com armadilhas luminosas CDC em períodos do verão (abril e julho/2007) e do inverno amazônicos (janeiro/2008). Cinco estações de coleta entomológica foram utilizadas por localidade e cada captura teve a duração de quatro noites (18 - 6 h x 4), perfazendo um esforço de captura igual a 144 h em cada localidade. As armadilhas luminosas (CDC) foram estabelecidas em pares dentro das casas e fora delas, às proximidades de anexos abrigando animais em um raio inferior a 20 m. A identificação dos flebotomíneos foi feita pelo método morfológico²².

RESULTADOS

Os resultados obtidos por meio da vigilância do reservatório canino (*Canis familiaris*) e do vetor flebotomíneo (*Luzomyia longipalpis*) em Santa Maria e Capiranga revelaram fatores de risco para leishmaniose visceral humana em ambas as localidades.

O seguimento de cães das populações de Santa Maria e Capiranga durante 18 meses, por meio de inquéritos sorológicos, revelou frequências de soropositividade para LVC (ELISA-Lisado) mais altas em Santa Maria do que em Capiranga, especialmente nos dois primeiros pontos de coleta (Figura 2A). Os níveis de anticorpos IgG também foram elevados para os cães de Santa Maria (≤ 6400), com nítida ascensão de sua média geométrica ao longo do tempo (320, 378, 951, 1866; $p < 0,05$). Nos animais de Capiranga detectaram-se baixos níveis de IgG (≤ 200), sem alterações significantes durante todo o seguimento (100, 159, 141, 0; $p > 0,05$), como mostra a figura 2B.

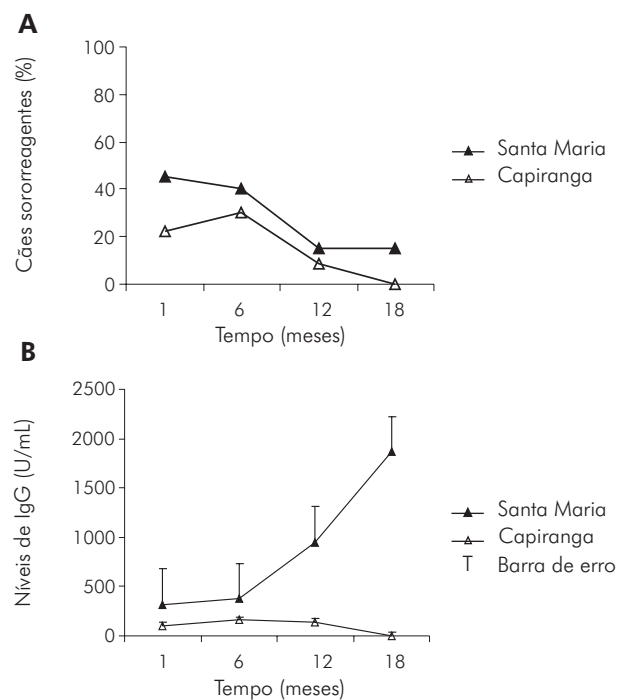


Figura 2 – Leishmaniose visceral canina no Município de Juruti, Estado do Pará, Brasil. Cães sororreagentes (A) e média geométrica dos títulos de anticorpos IgG (B) em localidades periurbana e rural, Santa Maria e Capiranga, com e sem transmissão de leishmaniose visceral humana, respectivamente. Utilizou-se o ELISA com antígeno lisado de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*

Tabela 1 – Flebotomíneos capturados em localidades distintas para a transmissão de leishmaniose visceral humana no Município de Juruti, Pará, durante o verão (abril e julho/2007) e o inverno amazônicos (janeiro/2008)

ESPÉCIES	Santa Maria*			Capiranga [†]		
	♀	♂	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. davisi</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)

Leishmaniose visceral humana/localização:

*com transmissão/periuirbana; [†]sem transmissão/rural.

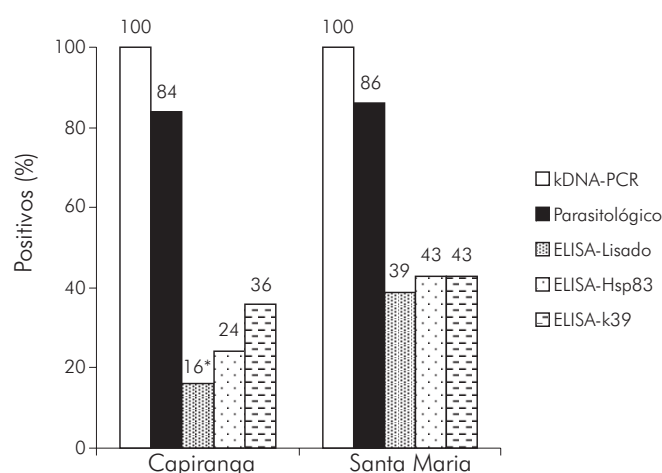
As capturas entomológicas simultâneas ao seguimento dos cães, duas no verão e uma no inverno amazônicos, revelaram a presença de flebotomíneos sinantrópicos nas duas localidades, com predominância de *Lutzomyia longipalpis* em relação a *Lutzomyia* spp. A frequência daquela espécie na amostra foi maior em Santa Maria (279/296) que em Capiranga (4/6), com densidade mais elevada no peridomicílio. No intradomicílio a espécie foi capturada em baixa frequência nas duas localidades (Santa Maria: 3/279 e Capiranga: 2/4). A tabela 1 apresenta as oito espécies identificadas e suas respectivas frequências na amostra. Nenhum espécime apresentou infecção natural por *Leishmania*.

A abordagem transversal para comparação do perfil da infecção/doença indicou semelhanças entre os cães de Santa Maria (28) e Capiranga (25). A maioria, aproximadamente 80%, tinha idade igual ou inferior a quatro anos, nas duas localidades (Tabela 2). Também não diferiu, entre as localidades, o número de animais nas diferentes categorias clínicas: assintomáticos (SM = 12 e CA = 14), oligossintomáticos (SM = 11 e CA = 9) e polissintomáticos (SM = 5 e CA = 2), sendo o percentual de assintomáticos (SM = 43% e CA = 56%) e de sintomáticos (SM = 57% e CA = 44%) semelhantes em ambas. A frequência de infecção confirmada parasitologicamente foi igualmente alta em Santa Maria (86%) e Capiranga (84%) e atingiu 100% quando usada a kDNA-PCR (Figura 3). A amplificação específica do DNA (145 pares de bases) confirmou tratar-se de infecção por *L. (L.) infantum chagasi* (Figura 4).

Tabela 2 – Idades dos cães amostrados para determinação do perfil da leishmaniose visceral canina nas localidades de Capiranga e Santa Maria, Município de Juruti, Estado do Pará, 2008

Idades*	Capiranga (rural)		Santa Maria (periuirbana)	
	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

* Idades de machos e fêmeas (não lactantes) ≥ 6 meses.

**Figura 3** – Leishmaniose visceral canina no Município de Juruti, Pará. Frequência de infecção determinada por vários métodos de diagnóstico nas localidades rural, Capiranga, e periurbana, Santa Maria, com e sem transmissão de leishmaniose visceral humana, respectivamente (*p<0,05)**Figura 4** – Produto de kDNA-PCR (RV1-RV2) revelado por eletroforese em gel de agarose (1,5%) para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina no Município de Juruti, Estado do Pará. Utilizou-se DNA extraído de leucócitos do sangue periférico (LSP) de cães residentes nas localidades Capiranga (1-14) e Santa Maria (15-25). A banda específica para o complexo *Leishmania donovani sensu lato* apresenta 145 pb, de acordo com Lachaud et al¹³. Marcador de peso molecular a 50 pb (PM); Controle positivo (CP: *Leishmania infantum chagasi*) e controles negativos (CN1: LSP de cão não infectado; CN2: água)

As diferenças entre o perfil de infecção/doença para os cães de Santa Maria e Capiranga foram apenas observadas na resposta humoral de anticorpos IgG à infecção por *Leishmania*. A frequência de cães sororreagentes diferiu nas duas áreas, na dependência do antígeno utilizado para o ELISA (Figura 3). O k39 foi mais sensível que o lisado e o Hsp83 na detecção de cães infectados assintomáticos, sendo o único a revelar semelhança entre as frequências de soropositivos assintomáticos das duas localidades, haja vista os demais se mostrarem sensíveis para cães infectados assintomáticos somente em Santa Maria (Figura 5A e 5C). Os níveis de IgG em cães, à semelhança do observado nos

inquéritos sorológicos realizados durante o seguimento, foram mais elevados em animais de Santa Maria do que naqueles de Capiranga, sobretudo quando utilizado o ELISA-lisado (Figura 5B e 5D).

A tabela 3 apresenta o desempenho dos testes de diagnóstico em relação ao padrão ouro, destacando a superior sensibilidade do exame parasitológico para detecção de infecção por *Leishmania* e as variações em prevalência determinadas pelo método de diagnóstico utilizado. Entre os testes sorológicos, o ELISA-k39 foi o que apresentou maior poder discriminatório no sorodiagnóstico da LVC em ambas as localidades (Figura 6).

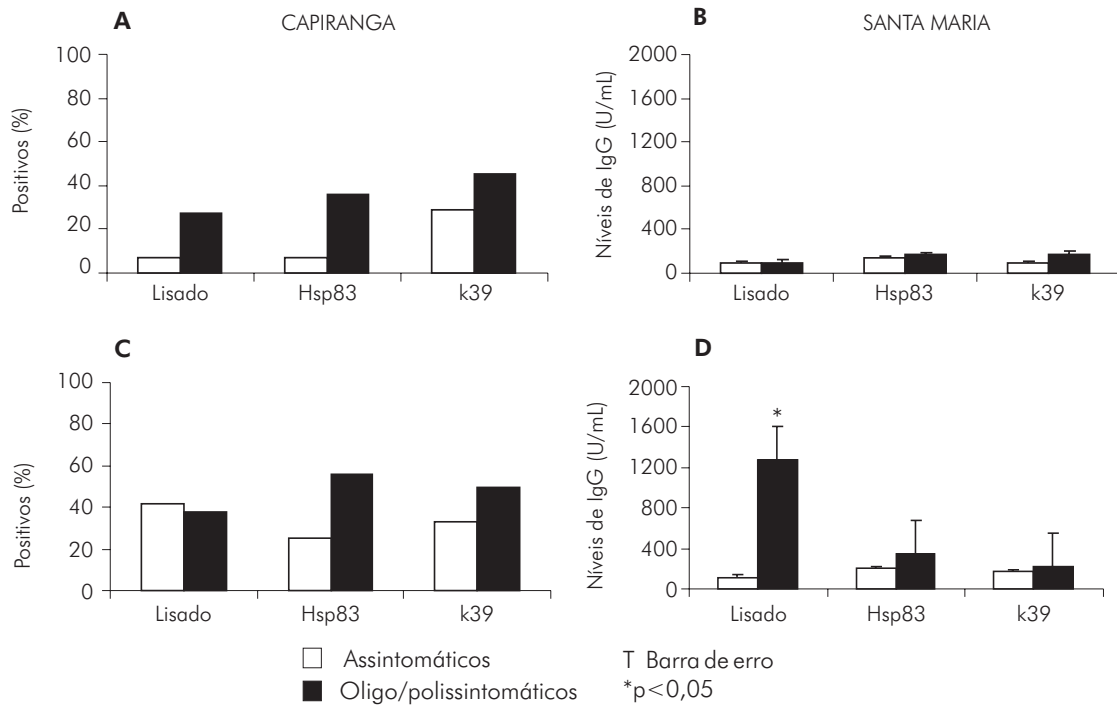


Figura 5 – Leishmaniose visceral canina no Município de Juruti, Pará. Frequência de positividade e níveis de IgG (média geométrica) para cães assintomáticos e sintomáticos nas localidades periurbana, Santa Maria, e rural, Capiranga, com e sem transmissão de leishmaniose visceral humana, respectivamente. Utilizou-se o ELISA com diferentes antígenos: lisado de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* e os recombinantes Hsp83 e k39

Tabela 3 – Leishmaniose visceral canina em localidades epidemiologicamente distintas do Município de Juruti, Estado do Pará, 2008. Desempenho do exame parasitológico e do ensaio imunoenzimático (ELISA) com diferentes antígenos em relação ao padrão ouro

Índices	ELISA						EXAME	
	Lisado (%)		Hsp83 (%)		k39 (%)		Parasitológico (%)	
	SM ¹	CA ²	SM	CA	SM	CA	SM	CA
Sensibilidade	44	18	48	27	48	41	96	95
Especificidade	100	100	100	100	100	100	100	100
VPP*	100	100	100	100	100	100	100	100
VPN [†]	18	14	19	16	19	19	75	75
Prevalência	39	16	43	24	43	36	86	84

Cães residentes nas localidades periurbana e rural, Santa Maria¹ (n = 28) e Capiranga² (n = 25), com e sem transmissão de leishmaniose visceral humana, respectivamente;

* Valor de predição positivo; [†] Valor de predição negativo.

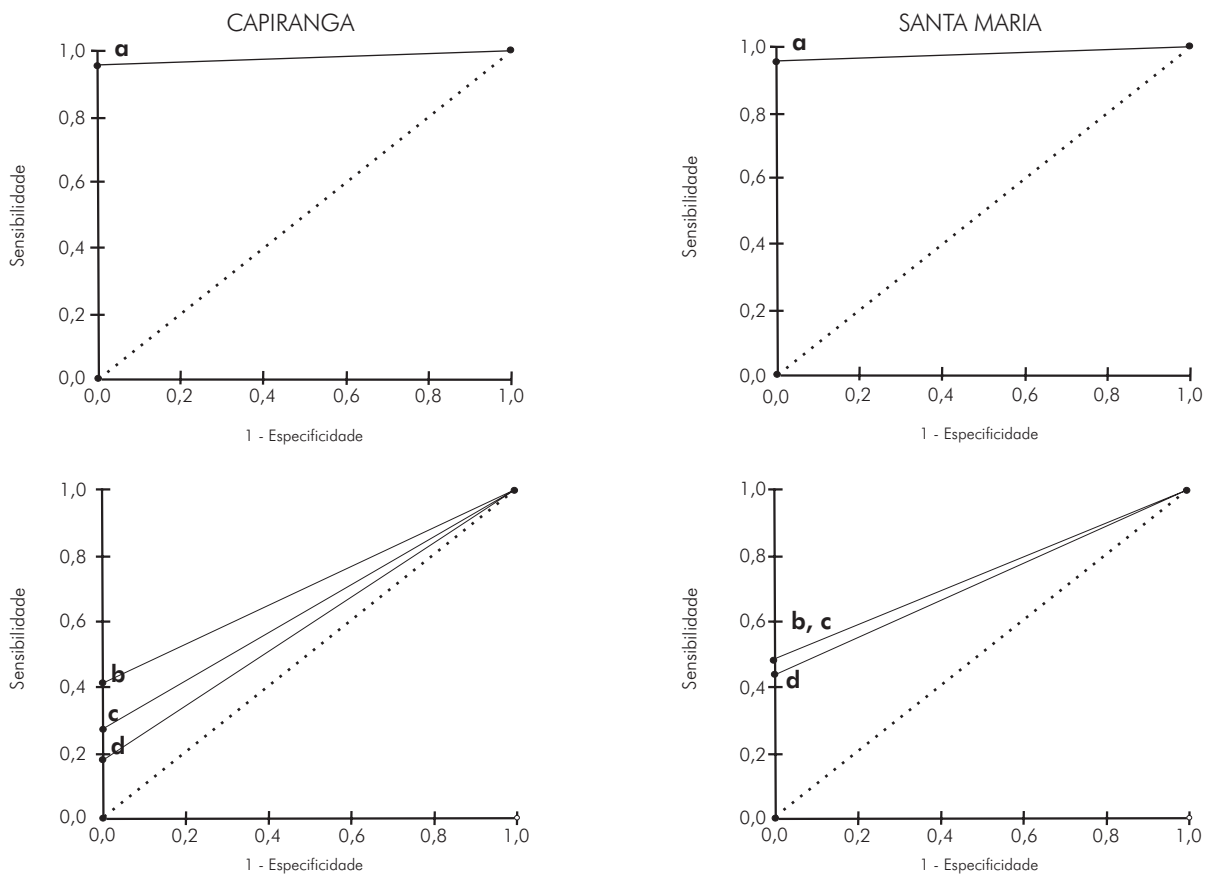


Figura 6 – Curvas ROC para testes de diagnóstico da leishmaniose visceral canina em localidades epidemiologicamente distintas do Município de Juruti, Pará. Acurácia do exame parasitológico (a) e do ensaio imunoenzimático (ELISA) com diferentes antígenos (b= k39; c= Hsp83; d= lisado de promastigotas), de acordo com pontos de corte entre infectado e normal para cães de Santa Maria (n = 28) e Capiiranga (n = 25), localidades com e sem transmissão de leishmaniose visceral humana, respectivamente. O teste com melhor poder discriminatório é o que mais se distancia da linha diagonal pontilhada no centro da área

DISCUSSÃO

O grande potencial mineral de Juruti, no oeste do Estado do Pará, tem atraído empreendimentos que, a despeito de contribuírem com o desenvolvimento econômico da região, provocam rápidas transformações ambientais capazes de influenciar a epidemiologia da leishmaniose visceral e produzir impactos na saúde pública^{20,7}. O fortalecimento das ações de vigilância, incluindo a investigação detalhada dos fatores de risco, deve propiciar o conhecimento necessário para a elaboração das estratégias de controle a serem operadas pelo Município.

Neste estudo executaram-se ações de vigilância para leishmaniose visceral (LV) ao longo de 18 meses, durante fase de prospecção da bauxita em Juruti. As ações foram centradas no reservatório canino e no vetor. Utilizaram-se espaços rurais epidemiologicamente distintos e denominados localidades sentinelas: Santa Maria, com transmissão de LVH e exposta a influências urbanas pela sua localização periférica à sede municipal, da qual dista apenas 12 km, e Capiiranga, a 60 km da área urbana, onde não há registros de LVH. Esta segunda localidade, entretanto, situa-se no entorno da mina de bauxita, onde estão em curso atividades relacionadas à extração do minério.

Inicialmente, foram investigadas as variações temporais da frequência de infecção determinada pela sorologia (ELISA) na população canina das localidades em estudo. Em seguida, buscou-se estabelecer o perfil da infecção/doença nos cães em cada localidade, a fim de obter subsídios à discussão do potencial das ações de controle, tendo como alvo o reservatório cão.

Ao determinar-se a prevalência de cães sororreagentes para leishmaniose visceral no início do seguimento, sobretudo no segundo inquérito semestral, ambas as localidades pareciam expostas ao mesmo risco (Figura 2A). Com base nesses resultados e na ocorrência de um novo caso de LVH em Santa Maria durante a pesquisa, a equipe de vigilância do Município decidiu pela eutanásia dos cães sororreagentes, o que foi parcialmente realizado apenas em Santa Maria. Os terceiro e quarto inquéritos sorológicos caninos revelaram crescentes níveis de IgG nos cães de Santa Maria, mesmo na vigência da intervenção, mas em Capiiranga, onde não houve eutanásia de cães e tampouco casos de LVH, os níveis de IgG mantiveram-se baixos ou indetectáveis durante os 18 meses de seguimento (Figura 2B).

Em áreas de transmissão intensa, os níveis de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em cães são elevados ou estão em ascensão¹⁹ e se relacionam à parasitemia^{7,21}, o que estaria

ocorrendo com os cães de Santa Maria. Os baixos níveis de IgG, por sua vez, semelhantes àqueles descritos para a população canina de Capiranga, sugerem controle da infecção canina (neste caso, Capiranga seria uma localidade silenciosa) ou são consequência de reações inespecíficas na sorologia, passíveis de ocorrer devido à alta sensibilidade do ELISA, pois os cães estão expostos a diversas outras doenças infecciosas^{9,3,10} que induzem linfócitos B à produção de IgG com eventual reação cruzada com antígenos de *L. (L.) infantum chagasi*¹.

Diferenças entre as populações caninas das duas localidades não teriam sido reveladas se considerada apenas a frequência de cães sororreagentes constatada, por exemplo, no segundo inquérito sorológico (Santa Maria: 40% e Capiranga: 30%, como mostra a figura 2A). Ações de vigilância da leishmaniose visceral focadas no reservatório canino, portanto, devem considerar a necessária temporalidade dos inquéritos sorológicos e a investigação dos níveis de IgG, especialmente quando levantamentos entomológicos não são factíveis pela carência de suporte técnico local.

Os intrigantes baixos níveis de IgG em cães de Capiranga, com ausência total de reatividade no último inquérito (Figura 2B), suscitaram uma investigação do perfil da infecção/doença canina em amostras das duas localidades, a fim de se compararem os resultados. Cães de Santa Maria e de Capiranga, com idades semelhantes (Tabela 2), revelaram-se idênticos quanto à apresentação clínica da leishmaniose visceral, considerando a intensidade de sinais e o número de animais distribuídos nas categorias assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos. A frequência de infecção confirmada parasitologicamente foi igualmente alta em Santa Maria (86%) e Capiranga (84%) e, com o uso da kDNA-PCR (Figuras 3 e 4), alcançou 100% em cães de ambas as localidades, indicando que a enzootia atinge toda a população canina nas duas áreas.

A ocorrência da LVH em uma determinada área depende, basicamente, da presença de dois fatores, o vetor infectado e o hospedeiro humano suscetível¹¹. Mesmo existindo o cão infectado (reservatório doméstico) nas duas localidades em igual proporção, a alta frequência de *Lutzomyia longipalpis* em Santa Maria, mas não em Capiranga (Tabela 1), diferenciou as duas localidades quanto ao risco de transmissão da leishmaniose visceral aos humanos. O hábito de se fazer fogueiras noturnas em Capiranga, incorporado da cultura indígena local, certamente contribui para inibir a presença de flebotômíneos no peridomicílio e a consequente transmissão de *L. (L.) infantum chagasi* aos humanos. Esta hipótese merece ser investigada com um estudo sobre conhecimentos, atitudes e práticas (CAP) dos habitantes dessas localidades em relação à leishmaniose visceral e sua prevenção.

Embora o exame parasitológico garanta a confirmação absoluta da infecção, na prática é necessário trabalhar com testes que não são altamente sensíveis e específicos. Na mesma amostra, o ELISA revelou frequência de positivos muito inferior ao real número de cães infectados, e com

variações de sensibilidade em função do antígeno utilizado (Figura 3). Embora o lisado bruto de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* tenha se apresentado mais sensível para detectar altos níveis de IgG em cães sintomáticos (Figura 5D), para animais infectados assintomáticos não teve o mesmo desempenho nas duas áreas. Os dois antígenos recombinantes (Hsp83 e k39) foram os mais sensíveis nessas circunstâncias, mas o ELISA-k39 foi o que apresentou maior poder discriminatório (Figura 6), detectando cães infectados assintomáticos tanto em Santa Maria quanto em Capiranga (Figura 5A e C).

Para este tipo de análise é desejável utilizar cães semelhantes aos que receberão aplicação de teste sorológico na prática de vigilância, bem como é importante que a escolha do teste padrão ouro, inexistente no caso da LVC, seja adequada⁸. Foi necessário, então, estabelecer um padrão ouro para efeito de cálculo dos índices de desempenho dos diferentes antígenos, que consistiu na associação dos dois exames mais tradicionais, o parasitológico e o ELISA-lisado. Este fato e, sobretudo, a inusitada natureza da amostra em CA (84% dos cães infectados), influenciaram a estimativa de especificidade e demais índices relacionados, como o valor de predição negativo, extremamente baixo em função do pequeno número de padrões negativos (Tabela 3). Esses índices precisam ainda ser investigados em cães provenientes de localidades com baixa frequência de infecção por *L. (L.) infantum chagasi*, pois apesar de o ELISA ser o método de escolha para pesquisas epidemiológicas¹¹, é importante considerar variações de performance associadas à carga de doença (ou intensidade de transmissão) em determinada localidade. A sensibilidade e especificidade do ELISA são também significativamente reduzidas no período latente da infecção canina⁷. Sendo assim, sob diferentes condições (ou em populações caninas distintas), sua sensibilidade poderia se apresentar ainda mais baixa do que a descrita neste estudo.

A inexistência de registros oficiais nos últimos cinco anos, ou de relatos dos moradores, da ocorrência de LVH em Capiranga (onde não se realizou a eutanásia de cães), associada aos fatores de risco descritos nesse estudo, confirma a necessidade da vigilância da LV dirigida às demais localidades no entorno da mina de bauxita e fundamentada nas características epidemiológicas locais, para o alcance da efetividade.

Em Capiranga, a vigilância entomológica é preferencial à eutanásia de cães, pois, nas condições ali existentes, o potencial destes de infectar flebotomos, com subsequente transmissão aos humanos, é limitado. Os achados em Santa Maria, contudo, indicam iminente risco de urbanização da LV e medidas rigorosas devem ser operadas de imediato para evitar sua expansão, incluindo ações de educação ambiental, monitoramento de vetores vislumbrando o controle químico, eutanásia de cães polissintomáticos e a busca de novos focos nas redondezas, em localidades rurais e urbanas.

Algumas ações que podem ser desenvolvidas para o controle químico da população de vetores são a borrifação de residências com inseticidas e o uso de

coleiras para cães ou de mosquiteiros para humanos, ambos impregnados com deltametrina⁵. Recentemente, em um estudo inédito na América Latina, demonstrou-se que o banho de cães com esse piretróide tem efeito residual (eficácia entomológica) de 5,2 meses, semelhante ao observado com o uso das coleiras, com a vantagem do baixo custo (US\$0.06-0.10) em comparação a estas (US\$10-15)⁶.

A despeito das intervenções possíveis, já disponíveis ou em experimentação, qualquer ação de controle químico do vetor depende de estudos entomológicos prévios¹⁶ que os municípios amazônicos comumente não conseguem executar. Em contrapartida, o controle efetivo da LV por meio da eliminação de cães exige que uma grande proporção de cães infectados, e infectantes ao vetor, seja removida da localidade⁷, o que geralmente não é factível, sobretudo quando toda a população canina se encontra infectada, como demonstrado neste estudo.

A melhor maneira de controlar a LVC, e conseqüentemente, prevenir a doença humana, seria uma vacina efetiva para cães, o que ainda não está disponível. As pesquisas associadas ao tema indicam promissores compostos candidatos¹⁷, e os avanços na compreensão dos mecanismos pelos quais parasitos do gênero *Leishmania* infectam e se evadem da resposta imune de hospedeiros mamíferos estão abrindo frentes de pesquisa em busca de novas vacinas contra a doença¹².

Na indisponibilidade de uma vacina para cães, ainda que o método de diagnóstico ideal para a detecção de infecção canina seja encontrado, ele não será efetivo sem a solução dos problemas locais enfrentados pela maioria dos municípios amazônicos, como as deficiências em gestão, a escassez de recursos humanos e financeiros e os

frequentes conflitos entre autoridades sanitárias e a população local, relacionados à prática da eutanásia de cães nos moldes atuais.

Os resultados deste estudo revelam a ocorrência e a extensão da enzootia de LVC em Capiiranga e, conseqüentemente, a possibilidade de emergência da LVH não apenas nesta localidade, mas também em outras silenciosas (similares a Capiiranga) e expostas ao impacto direto de grandes transformações ambientais relacionadas às atividades minerárias. Demonstrou-se ainda o risco da expansão do número de casos de LVH em áreas de transmissão expostas a crescentes influências urbanas (Santa Maria e similares). Os resultados orientam ações de vigilância, prevenção e controle da LVH em Juruti, nas localidades rurais, no entorno da mina e naquelas periurbanas.

AGRADECIMENTOS

Às comunidades Santa Maria e Capiiranga, pela sempre calorosa recepção e adesão à pesquisa. A dra. Ana Márcia Souza da Cunha Oliveira e demais profissionais da Secretaria Municipal de Saúde de Juruti, pelo apoio e participação. Às equipes técnicas do Instituto Evandro Chagas, sobretudo aquelas dos Laboratórios de Imunologia e Epidemiologia (Seção de Parasitologia) e de Geoprocessamento. Às técnicas Rosângela Barros e Rita Félix, aos estudantes Eduardo Mota e Luís Dickson e ao dr. Nelson Veiga, pelo inestimável apoio técnico. A dra. Nazaré Souza, da Universidade Federal Rural da Amazônia. À mineradora Alcoa Alumínio S/A, à Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (DECIT/SCTIE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.



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 (Capiiranga-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 ($\leq 6,400$; ≤ 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.

Vigilância de la leishmaniasis visceral en localidades epidemiológicamente diferentes en Juruti, municipio minero del Estado de Pará (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 (Capiranga-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 (≤ 6.400 ; ≤ 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 serologica fue ELISA-k39.

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



REFERÊNCIAS

- 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 difilarirose 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 CMF, 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.
- 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.
- 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 Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*, 54, Florida: Associated Publishers; 1994. 881p.
- 23 Zijlstra EE, Daifalla NS, Kager PA, Khalil EAG, El-Hassan AM, Reed SG, et al. rk39 enzyme-linked Immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998 Sep;5(5):717-20.

Recebido em / Received / Recibido en: 31/7/2009
 Aceito em / Accepted / Aceito en: 21/9/2009