

ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO PROSPECTIVO DA LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA CANINA NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU, SP

Selene Daniela Babboni¹
Nicoly Pereira¹
Carlos Roberto Padovani²
José Carlos de Figueiredo Pantoja¹
Cassiano Victoria¹
Jéssica C. Melice Gouveia¹
Sandra Regina Nicoletti D'Auria³
Maria Cecilia Gibrail de Oliveira Camargo³
Jose Rafael Modolo⁴

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) é uma enfermidade de caráter zoonótico, exposta a cerca de 200 milhões de pessoas entre cinco continentes do mundo e apresenta grande impacto na saúde pública, devido à alta letalidade em humanos. No Brasil, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é o principal reservatório para LVA, sendo este animal a principal fonte de infecção para o homem. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar de forma pareada no intervalo de um ano, a situação soro-epidemiológica prospectiva da LVA da população canina da área urbana de 100km² do município de Botucatu, SP, que é classificado epidemiologicamente como silencioso não receptivo e vulnerável. Para o presente estudo, foram utilizados 360 cães, selecionados aleatoriamente com representatividade da área urbana, os quais tiveram amostras de sangue colhidas no primeiro momento na 41^a campanha de vacinação anual contra Raiva. Para a determinação do tamanho amostral foi utilizado o nível de 95% de confiança juntamente a um erro de estimação da ordem de 10%, associados à participação casual do animal. Após o período de um ano, foram realizadas as repetições das colheitas de sangue nos mesmos cães nos respectivos domicílios. O método sorológico de diagnóstico utilizado, em ambos os momentos, foi a reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Os resultados sorológicos nos cães revelaram-se não reagentes. Desta forma, considerando que o presente estudo encontrou apenas resultados sorológicos pareados não reagentes na identificação da LVA canina no Município e que o tamanho amostrado foi significativo para as condições da pesquisa, pode-se afirmar que a população canina da área urbana estudada encontrava-se, na ocasião, sem indicativos da ocorrência da enfermidade.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral americana, situação epidemiológica, teste pareado, cães, Botucatu.

PROSPECTIVE SEROEPIDEMIOLOGICAL STUDY OF AMERICAN VISCERAL LEISHMANIASIS CANINE IN BOTUCATU, SP

ABSTRACT

The American Visceral Leishmaniasis (AVL) is a zoonotic disease, exposed to about 200 million people across five continents of the world and has a great impact on public health, due to high mortality in humans. In Brazil, the domestic dog (*Canis familiaris*) is the main

¹ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública FMVZ/UNESP/Botucatu.

² Professor do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

³ Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores, Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura do município de São Paulo, SP, Brasil.

⁴ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública FMVZ/UNESP/Botucatu. Contato principal para correspondência.

reservoir for AVL, and this animal is the main source of infection for man. This research aimed to evaluate in the paired form within one year, the situation seroepidemiological prospective AVL in dog population of the urban area of 100km² of Botucatu, SP, which is classified as epidemiologically silent, unreceptive and vulnerable. To the present study, we used 360 dogs randomly selected that were representative of the urban area, which had blood samples taken for the first time at the 41st annual vaccination campaign against rabies. To determine the sample size it was used at the 95% confidence, coupled to an estimation error of about 10%, associated to the casual participation of the animal. After one year, repetitions of blood samples were made on the same dogs, in their homes. The serological diagnostic method used, both times, was the indirect immunofluorescence assay (IFA). The serological results in dogs proved nonreactive. Thus, considering that this study found only paired serological results were also negative in the identification of canine LVA in the city and that the size sampled was significant for the conditions of the research, it can be said that the dog population of the urban area studied was - at the time, without any indication of the occurrence of the disease.

Keywords: American Visceral Leishmaniasis, epidemiological situation, paired test, dogs, Botucatu.

ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO PROSPECTIVO DE LEISHMANIASIS VISCERAL AMERICANA CANINA EN BOTUCATU, SP

RESUMEN

La leishmaniasis visceral Americana (LVA) es una enfermedad zoonótica, expuesta a unas 200 millones de personas en los cinco continentes del mundo y tiene un gran impacto en la salud pública, debido a la alta mortalidad en seres humanos. En Brasil, el perro doméstico (*Canis familiaris*) es el principal reservorio de la LVA, y este animal es la principal fuente de infección para el hombre. Este estudio tuvo como objetivo evaluar utilizando muestras sucesivas del mismo animal, en el intervalo de un año, la situación seroepidemiológica prospectiva de la LVA en la población canina de la zona urbana de 100km² de Botucatu, SP, que es clasificado epidemiológicamente silencioso, no receptivo y vulnerable. Para el presente estudio, se utilizaron 360 perros seleccionados al azar representativos de la zona urbana, que tuvieron muestras de sangre colectadas por primera vez en la 41^a campaña de vacunación anual contra la Rabia. Para determinar el tamaño de la muestra se utilizó el nivel de confianza del 95% acoplado a un error de estimación de alrededor de 10%, asociado a la participación ocasional del animal. Después de un año, se realizaron repeticiones de colecta de muestras de sangre en los mismos perros en sus domicilios. El método de diagnóstico serológico utilizado, en ambas ocasiones, fue la prueba de reacción de inmunofluorescencia indirecta (RIFI). Los resultados serológicos en perros se demostraron no reactivos. De esta manera, se considera que el presente estudio encontró solamente resultados serológicos pareados no reactivos en la identificación de LVA canina en Botucatu y que el tamaño de muestra fue significativo para las condiciones del estudio, se puede afirmar que la población canina del área urbana estudiada se encuentra, en ocasión, sin indicativos de ocurrencia de la enfermedad.

Palabras clave: Leishmaniasis visceral americana, situación epidemiológica, pruebas sucesivas perros, Botucatu.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) é uma enfermidade de caráter zoonótico, exposta a cerca de 200 milhões de pessoas entre os cinco continentes do mundo e é endêmica em 70 países. Estima-se que, anualmente, 500 mil novos casos são diagnosticados no mundo (1-3).

Na América Latina, já foi descrita em 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil (1,2). A doença apresenta aspectos climáticos e sociais diferenciados no Brasil, com destaque para a ampla distribuição geográfica, que envolve as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (1). Somente no ano de 2010, houve o registro de 3526 casos humanos (4), com incidência de 1,8 (5), e letalidade de 6,2 em cada 100 mil habitantes (6).

No estado de São Paulo, desde o primeiro registro da ocorrência da LVA em 1998, até novembro de 2011, estima-se a ocorrência da transmissão em 100 municípios, com o registro de 1875 casos humanos autóctones confirmados. Dentre eles, 159 evoluíram ao óbito (7).

Segundo a Secretaria Municipal de Saúde em 2012 foram notificados no Brasil 3036 casos de LV em humanos sendo 216 óbitos, com maior incidência na região Nordeste com 1309 casos. No ano de 2013 foram notificados 3253 casos com 231 óbitos, tendo a região Nordeste 1745 casos. No estado de São Paulo foram notificados no ano de 2012, 194 casos com 12 óbitos, no ano de 2013 notificaram-se 160 casos no estado com 13 óbitos, do total de casos do ano de 2013, 26 ocorreram na região de Bauru/SP, área endêmica para a enfermidade, localizada a 95km do município de Botucatu (8).

A investigação da ocorrência de uma doença em uma população tem por objetivo determinar medidas estratégicas básicas para a prevenção e o controle de doenças e auxiliar na identificação da situação epidemiológica local em qualquer momento (9,10). Para a LVA canina, no entanto, é de extrema importância manter medidas de vigilância epidemiológica (7). Estas têm por objetivo determinar medidas estratégicas básicas para a prevenção e o controle de doenças e auxiliar na redução de mortalidade, letalidade em humanos e na identificação da situação epidemiológica local em qualquer momento dado (9,10).

As estratégias do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral Americana (PCLVA) do Estado estão centradas na vigilância epidemiológica como um pilar para as medidas de profilaxia e controle da transmissão, tendo por objetivo a redução de mortalidade e letalidade em humanos (11).

A vigilância epidemiológica é um conjunto de procedimentos, de natureza sistemática e permanente, por meio do qual tomamos conhecimento dos eventos relacionados com a presença de doenças e respectivos meios de combate, em uma determinada área geográfica. Fica evidente que esse recurso diagnóstico tem como propósito básico a obtenção contínua de conhecimentos a cerca dos competentes envolvidos com a ocorrência de doenças, visando a oferecer elementos de apoio aos programas de prevenção, tanto em nível de controle como a de erradicação dessas (12). A vigilância epidemiológica, por sua vez, quando realizada em amostras de soro pareadas do mesmo animal melhora o nível de sensibilidade, aumentando, com isso, a probabilidade de detecção do agente infeccioso. Pode-se assegurar com alta probabilidade de segurança que os animais testados estejam, provavelmente, livres da condição que foi investigada (9).

Conforme o BEPA (7), até o presente momento, o município de Botucatu, SP, localizado no interior do estado de São Paulo, é classificado segundo o PCLVA como silencioso não receptivo e vulnerável, ou seja, não possui confirmação de casos autóctones humanos e caninos nem a presença conhecida do vetor, mas tem proximidade com cidades endêmicas.

Considerando essa condição de vulnerabilidade do município de Botucatu à LVA canina, objetivou-se avaliar, no presente estudo, a situação epidemiológica desta enfermidade

em amostras de soros pareadas de cães, no intervalo de 12 meses, representativos da área urbana de 100km² do Município.

MATERIAL E MÉTODOS

As colheitas das amostras caninas foram realizadas na 41^a campanha de vacinação anual contra a Raiva de cães, realizada em 2009, compreendendo os 100 km² de área urbana de Botucatu. Na ocasião foram vacinados 23755 cães (13). Destes, 360 cães foram aleatoriamente selecionados para o plano amostral, independentemente de raça, idade ou sexo. Esse tamanho amostral representou-se nas cinco regiões setoriais da área urbana do Município, conforme levantamento sobre o histórico dos dez últimos anos de campanha de vacinação, visando procurar uma melhor acurácia para a representatividade do universo. Dentre os 72 postos de vacinação distribuídos pela área urbana, foram escolhidos 13 postos localizados nos bairros: Jd. Continental, Jd. Monte Mor, COHAB II, Jd. Peabiru, Jd. Brasil, Vila São Luiz, CECAP, Jd. Nossa Senhora da Penha, Parque 24 de Maio, COHAB I, Parque Marajoara, Rubião Júnior e Vila Real.

Após o consentimento livre e esclarecido assinado pelo dono do cão, foi preenchido um protocolo de identificação do animal, sendo tirada uma foto para posterior anexação no seu protocolo. Cumpridos esses procedimentos, as 360 amostras sanguíneas caninas foram colhidas por venopunção da veia cefálica, safena ou jugular e acondicionadas em tubos de ensaio estéreis sem anticoagulante. As amostras foram transportadas ao laboratório para centrifugação e obtenção do soro sanguíneo. Os soros foram alíquotados em microtubos e mantidos a -20°C até o momento da realização do teste sorológico.

Para obtenção da segunda amostra de sangue dos mesmos cães, foram realizadas visitas domiciliares, um ano após, e os cães comparados com as fotos do protocolo de identificação.

Os testes diagnósticos sorológicos da LVA canina utilizados foram os recomendados pelo PCLVA (11) e pelos Órgãos de Saúde Pública, sendo o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) como método de triagem e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) como teste confirmatório. No presente estudo a teste diagnóstico utilizado foi a RIFI para todas as amostras. Na técnica padrão RIFI, as amostras consideradas reagentes são as que apresentam títulos iguais ou superiores a 40 (2,3,11,14).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo realizado, não foram encontrados cães reagentes no teste RIFI para LVA canina em ambas as amostras caninas. O antígeno utilizado para o teste diagnóstico foi *Leishmania chagasi*, que apresenta sensibilidade aproximada de 98,3% e especificidade aproximada de 94,1% (15). Considerando os elevados valores de sensibilidade e especificidade pode-se assegurar baixo risco de interpretações errôneas e oferecer maior confiança para os testes empregados (15).

São poucas as pesquisas que abordam a análise sorológica pareada de cães utilizando o teste RIFI como uma forma de vigilância epidemiológica para LVA canina em áreas consideradas não endêmicas. No entanto, alguns estudos de vigilância epidemiológica da enfermidade pela técnica RIFI se reportam a áreas endêmicas, como, por exemplo, Barboza et al. (16) que investigaram a incidência da enfermidade em um grupo de 147 cães de 20 áreas localizadas nos municípios de Lauro Freitas e Camaçari, Bahia. Esses cães foram acompanhados durante o período de nove a 18 meses e foram observadas soroconversões em 27 cães (18,4%). Assim como Alves (17), utilizando o mesmo teste de diagnóstico, realizou a primeira colheita de sangue em 80 cães de Teresina, Piauí, encontrando 40 animais não reagentes. Os cães sorologicamente negativos foram acompanhados ao longo de um ano e

houve soroconversões em 25 cães (62,5%) deles. Na segunda colheita, 15 cães (60%) tornaram-se sorologicamente positivos no período de três meses, na terceira cinco (20%) positivaram em seis meses e na quarta, outros cinco animais (20%) positivaram no intervalo de nove meses.

No Município objeto deste estudo, até então, não havia sido realizado pesquisa sorológica pareada como forma de identificar a LVA canina. No entanto, há trabalhos como o de Brant et al. (18) que identificaram que 10% (67/660) dos cães residentes no Município eram provenientes de municípios limítrofes a Botucatu e considerados endêmicos para LVA canina. Carvalho (19), analisando 676 amostras sanguíneas caninas do mesmo Município, obteve apenas uma amostra sorologicamente reagente na RIFI pra LVA canina.

Luciano et al. (20) analisaram, pelo teste RIFI, 150 amostras de cães provenientes de Botucatu e encontraram 136 (90,6%) cães não reagentes para *Leishmania spp* e *Trypanosoma cruzi*; cinco (3,3%) para *T. cruzi*; cinco (3,4%) para *Leishmania spp.* e *T. cruzi* e quatro cães (2,7%) reagentes somente para *Leishmania spp.*, demonstrando ser, provavelmente, um título de infecção para leishmaniose sem a ocorrência da reatividade cruzada. No entanto, Victória et al. (21), não encontraram, em suas pesquisas, o vetor *Lutzomyia longipalpis*, no Município. O que sugere, provavelmente, que os animais reagentes para *Leishmania spp* poderiam proceder de regiões endêmicas.

A interpretação de um teste sorológico de diagnóstico depende das condições epidemiológicas em que ele é realizado. Assim, mesmo encontrando resultados sorológicos pareados negativos na identificação da LVA canina em cães representativos da área urbana do Município e levando em consideração as condições de risco e vulnerabilidade à enfermidade, não se pode prescindir da necessidade da realização de frequentes vigilâncias epidemiológicas ativa e passiva no Município.

CONCLUSÃO

Os resultados sorológicos nos cães revelaram-se não reagentes. Desta forma, considerando que o presente estudo encontrou apenas resultados sorológicos pareados não reagentes na identificação da LVA canina no Município e que o tamanho amostrado foi significativo para as condições da pesquisa, pode-se afirmar que a população canina da área urbana estudada encontrava-se, na ocasião, sem indicativos da ocorrência da enfermidade.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. p.9-29.
2. World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. WHO technical report series. Geneva: World Health Organization; 2010.
3. Michalick MSM, Ribeiro RR. Leishmaniose visceral americana. In: Neves DP, Linardi PM, Vitor RWA, Melo AL. Parasitologia humana. 12a ed. São Paulo: Atheneu; 2012. p.69-88.
4. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Casos confirmados de leishmaniose visceral, Brasil, grandes regiões e unidades federadas: 2010. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

5. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Letalidade de leishmaniose visceral, Brasil, grandes regiões e unidades federadas: 2010. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.
6. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Taxa de incidência da leishmaniose visceral, Brasil, grandes regiões e unidades federadas: 2010. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.
7. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, atualizado em novembro de 2011. Bol Epidemiol Paul. 2011;8:32-6.
8. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Casos confirmados de leishmaniose visceral, Brasil, grandes regiões e unidades federadas: 2014. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.
9. Thrusfield M. Veterinary epidemiology. 3rd ed. Oxford, UK: Blackwell Science; 2007. p.22-33, 323-30.
10. Organização Pan Americana da Saúde. Módulo de Princípios de Epidemiologia para o Controle de Enfermidades. Brasília: Organização Pan Americana da Saúde, Ministério da Saúde; 2010. p.8-24.
11. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Superintendência de Controle de Endemias. Manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral americana do Estado de São Paulo. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde; 2006. p.11-5.
12. Côrtes JA. Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais. São Paulo: Varela; 1993.
13. Secretaria Municipal de Saúde (Botucatu). Relatório da campanha antirrábica de 2009. Botucatu: Secretaria Municipal de Saúde; 2009. p.1-9.
14. Ministério da Saúde. Esclarecimentos sobre diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde - Nota técnica n.48. Brasília; 2011.
15. Laurenti MD. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. Bol Epidemiol Paul. 2009;6:1-8.
16. Barboza DCPM, Gomes Neto CMB, Leal DC, Bittencourt DVV, Carneiro AJB, Souza BMPS, et al. Estudo de coorte em áreas de risco para leishmaniose visceral canina, em municípios da região metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. Rev Bras Saude Prod Anim. 2006;7:152-63.
17. Alves GBB. Soro-conversão e avaliação das alterações renais em cães recém-infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* [dissertação]. Teresina: Universidade Federal do Piauí; 2011.
18. Brant JL, Costa VM, Padovani CR, Langoni H, Modolo JR. Origem da população canina de Botucatu/SP como parâmetro de risco de introdução da leishmaniose visceral. Comunicação Curta. Vet Zootec. 2010;17:348-53.

19. Carvalho JLB. Leishmaniose visceral canina: busca ativa de casos e estudo sobre o conhecimento da doença em proprietários de cães na área urbana de Botucatu [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2007.
20. Luciano RM, Lucheis SB, Trocarelli MZ, Luciano DM, Langoni H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2009;46:181-7.
21. Victória C, Modolo JR, Souza LC, Oliveira AG. Pesquisa e identificação de flebotomíneos (díptera psychodidae) na zona urbana e periurbana do município de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil: resultados parciais. In: I Simposio Iberoamericano de Zoonoses Emergentes e Reemergentes; 2011; Punta Del Este. Punta Del Este: Sociedad de Medicina Veterinaria Del Uruguay; 2011.

Recebido em: 11/12/2013

Aceito em: 17/04/2015