

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PELO MÉTODO DE
IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI) PARA DETECÇÃO DE
ANTICORPOS ANTI-*Leishmania sp.*, EM CÃES ERRANTES DO MUNICÍPIO
DE CAMPOS DOS GOYTACAZES, ESTADO DO RIO DE JANEIRO, NO
PERÍODO DE 2000 A 2001, APÓS SURGIMENTO DE
CASO HUMANO AUTÓCTONE**

SEROLOGICAL DIAGNOSE BY INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE (IFI) METHOD FOR
ANTI-*Leishmania sp.* ANTIBODY DETECTION ON DOGS IN MONGREL CAMPOS DOS
GOYTACAZES COUNTY, RIO DE JANEIRO STATE, BRAZIL, FROM 2000 TO 2001, AFTER
AUTOCHTHONOUS HUMAN BEING REPORTING

M. A. V. C. PEREIRA¹, M. P. F. TÁVORA², G. F. VITA³, V. L. SILVA⁴

RESUMO

Realizou-se estudo soroepidemiológico sobre Leishmaniose, zoonose de grande importância, envolvendo população canina de rua, pertencente ao município de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro, Brasil, considerando a ocorrência de um caso humano autóctone de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no ano de 2000. Esta pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de observar a eficiência da Imunofluorescência Indireta (IFI), padrão em humanos, na detecção de anticorpos contra *Leishmania sp.* em cães. Inicialmente coletou-se 5 ml de sangue da veia ulnar, para obtenção do soro, de 370 cães errantes, no período de 2000 a 2001, capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses e Vigilância Ambiental (CCZ) do município de Campos dos Goytacazes. Dos cães pesquisados 8 (2,16%) amostras foram positivas e 362 (97,84%) foram negativas. A IFI para Leishmaniose Canina, além de ter comprovada eficiência na detecção de anticorpos anti-*Leishmania sp.*, apresenta um maior grau de especificidade, comparado a outros testes até então utilizados. O município de Campos dos Goytacazes, devido à ocorrência de um caso humano, passa então a ser considerado área endêmica para Leishmaniose.

PALAVRAS-CHAVE: Leishmaniose Tegumentar Americana. Cão. Zoonose.

ABSTRACT

It was carried out an seroepidemiological study about Leishmaniosis, a great important zoonosis, involving street canine population from Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil, considering the occurrence of American Tegumentar Leishmaniosis (ATL) autochthonous human case in 2000. This research was developed with the objective of observing the efficiency of the Indirect Immunofluorescence (IFI), pattern in humans, for detection of antibodies against *Leishmania sp.* in dogs. Firsty, collection 5 ml of blood of ulnar vein to obtain of serum, of 370 errant dogs, in a period from 2000 to 2001, captured by Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), in Campos dos Goytacazes. Of the researched dogs 8 (2.16%) samples were positive and 362 (97.84%) they were negative. The IFI for Canine Leishmaniosis, besides having proven efficiency in the detection of antibodies anti-*Leishmania sp.*, it presents a larger specificity degree, compared the others tests until then used. Campos dos Goytacazes country because of the occurrence of a human being report, it supposes to be and endemic area for Leishmaniosis.

KEY-WORDS: American Tegumentar Leishmaniosis. Dog. Zoonosis.

¹ Médico Veterinário, Professor Associado III, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

² Médica Veterinária, Diretora de Projetos da FENORTE/TECNORTE

³ Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Castelo Branco, Bolsista FENORTE/TECNORTE

⁴ Biólogo, Fundação Instituto Oswaldo Cruz

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma doença causada por um protozoário que se inclui na ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* Ross, 1903 (REY, 1991).

As primeiras observações e a primeira descrição do protozoário foi realizada por Borovsky, em 1898, na Rússia, em um paciente com a forma cutânea da doença. Leishman & Donovan (1903), reconheceram o parasito nos casos de Leishmaniose Visceral (Calazar indiano). Segundo Rey (1991), foi Ross (1903) que em seus estudos denominou o parasito de *Leishmania donovani*.

No Brasil, no início da década de 80 foram registrados casos da doença em 19 unidades federadas, além de novos casos autóctones nos últimos anos. Em 1994 houve registro de casos autóctones em 1861 municípios, o que representa 36,9% dos municípios do país; em 2001 houve uma expansão da doença para 2268 municípios (40,8%). A região Nordeste contribuiu com o maior percentual (cerca de 38,8% do total de casos registrados no período), e a região Norte com os coeficientes mais elevados (93,84/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (42,70/100.000 habitantes) e Sudeste (26,50/100.000 habitantes) (FUNASA, 2002).

Trata-se de uma zoonose urbana e periurbana, dividida em quatro grupos: 1) Leishmaniose cutânea - produz exclusivamente lesões cutâneas, ulcerosas ou não, porém limitadas; 2) Leishmaniose cutânea mucosa ou mucocutânea - produz lesões cutâneas destrutivas nas mucosas do nariz, boca e faringe; 3) Leishmaniose visceral ou Calazar - os parasitos apresentam tropismo acentuado pelo Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) do baço, do fígado, da medula óssea e dos tecidos linfóides; e, 4) Leishmaniose cutânea difusa - lesões cutâneas disseminadas que ocorre em indivíduos anérgicos ou, tardiamente, em pacientes mal curados da Leishmaniose Visceral.

A resposta imunológica é mais celular do que humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). O papel desempenhado pela imunidade humoral não é ainda bem conhecido, sendo baixos os níveis de anticorpos no soro. A imunidade celular manifesta-se mais tardiamente e é fundamental para o processo de cura, pois coincide com os primeiros sinais de regressão das lesões e com a queda da parasitemia.

Segundo Valim (1993), os padrões de transmissão para a Leishmaniose Tegumentar no Brasil, compreendem silvestre, localizado na Amazônia e no centro-oeste brasileiro, onde a transmissão ocorre em focos naturais nos ecossistemas florestais; um segundo, também em focos naturais, com ciclo silvestre, mantido em áreas florestais preservadas, próximas às áreas de produção agrícola tradicional, como ocorre no nordeste (Ceará e Bahia) e sudeste (Minas Gerais e Rio de Janeiro). E, um terceiro padrão de transmissão, cuja ocorrência tem sido observada nas periferias de áreas urbanas. No ciclo urbano a transmissão da endemia pode ocorrer devido à expansão da cidade nos limites das florestas, como foi observado em Manaus (ANDRADE, 1998). Já na cidade do Rio de Janeiro, o

processo de urbanização criou condições favoráveis à produção de focos da endemia, assegurando a persistência e reprodução ampliada da doença (KAWA, 1998).

Fatores sócio-econômicos que conduziram expressivo contingente das populações humanas a migrarem de áreas rurais para os centros urbanos, contribuíram sobremaneira para as alterações epidemiológicas nas Leishmanioses, com a ocorrência de ciclos nitidamente urbanos, nos quais o cão se destaca como um dos elementos na cadeia de transmissão (ANDRADE, 1998).

O teste sorológico padrão para detecção de anticorpos anti-*Leishmania sp.* no homem é a Imunofluorescência Indireta (IFI), não havendo ainda um teste sorológico padrão para a detecção no cão. É sabido que a IFI apresenta maior grau de especificidade do que outros testes até então utilizados (TÁVORA, 2004, 2007).

No estado do Rio de Janeiro são reconhecidas áreas endêmicas para Leishmaniose Humana e Canina, localizadas na zona oeste da cidade e no litoral sul do estado, particularmente na cidade de Paraty (AGUIAR *et al.*, 1993).

O objetivo deste trabalho foi detectar anticorpos contra *Leishmania sp.* em cães errantes do município de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro, utilizando-se o método padrão IFI aplicado no diagnóstico sorológico no homem, após a confirmação de um caso de Leishmaniose humana (LTA) autóctone no ano de 2000.

MATERIAL E MÉTODOS

Campos dos Goytacazes é um município situado no norte-noroeste do estado do Rio de Janeiro, ocupando uma área de planície de 4.027 km², localizado a 21°45'23" de latitude Sul e 41°19'40" de longitude Oeste (Greenwich), fazendo divisa com 10 municípios. O clima varia de tropical a semi-árido, durante as estações do ano, com temperatura oscilando entre 22 a 27°C. Possui uma população estimada em 406.511 habitantes, 14 distritos e 195 localidades (IBGE, 2000).

A pesquisa foi desenvolvida pelo Centro de Controle de Zoonoses e Vigilância Ambiental (CCZ) do município, no período de dezembro de 2000 a dezembro de 2001.

Foram selecionados 370 cães errantes, adultos, mestiços, apresentando estado nutricional variável, provenientes das regiões urbana, periurbana e rural do referido município. Procedeu-se a coleta de 5 ml de sangue da veia ulnar, seguindo os métodos clássicos de assepsia. As amostras sanguíneas foram obtidas sem anti-coagulante e centrifugadas, separando-se o soro, que foi armazenado sob congelamento (-20°C) em duas cotas, em frascos estéreis.

O exame sorológico utilizando-se a técnica de IFI foi executado pelo Laboratório de Imunodiagnóstico, do Departamento de Ciências Biológicas, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ.

Após a detecção do caso humano de LTA em área rural do município de Campos dos Goytacazes, foi

elaborado um questionário, visando o esclarecimento da origem da enfermidade, segundo o protocolo da Funasa (2000), modificado e adaptado ao estudo.

A IFI para Leishmaniose Humana (complexo *Leishmania major* "like"), é o teste de referência para diagnóstico humano e também muito utilizado em Medicina Veterinária para diagnóstico da Leishmaniose Canina, segundo Coons et al. (1941) in Laurentino-Silva (1999). A titulação estabelecida como padrão para o diagnóstico foi de 1:40 a 1:80.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizou-se levantamento soropidemiológico de Leishmaniose, importante zoonose no estado do Rio de Janeiro, envolvendo pesquisa sorológica da população canina de rua do município de Campos dos Goytacazes, no período de dezembro de 2000 a dezembro de 2001, após a ocorrência de um caso humano, em um jovem de 23 anos, residente em Poço Gordo, região periurbana do município em questão. Das 370 amostras de soros caninos, 8 (2,16%) foram positivas e 362 (97,84%) negativas. Os percentuais de soropositividade e soronegatividade do teste sorológico IFI estão representados na Figura 1.

A IFI é diagnóstico padrão para Leishmaniose Tegumentar Americana em humanos e foi também utilizada como técnica de diagnóstico sorológico em cães de áreas endêmicas do Rio de Janeiro, segundo Marzochi & Barbosa-Santos (1988).

O teste intradérmico canino vem caindo em desuso, principalmente porque em casos de Leishmaniose Visceral, a resposta da hipersensibilidade retardada a antígenos de *Leishmania sp.* é quase sempre negativa, concordando com os achados de Ferreira & Ávila (2001), em casos de suspeita em humanos.

A partir do final da década de 80 e início dos anos 90, é que se começaram as primeiras pesquisas com testes sorológicos já utilizados no diagnóstico de Leishmaniose Humana (IFI e ELISA), e no diagnóstico da Leishmaniose Canina ainda não foi padronizado nenhum teste sorológico. As pesquisas avançam para que um teste sorológico ideal seja ao mesmo tempo: prático e de fácil execução, se possível a campo, de baixo custo e que reúna especificidade e sensibilidade.

A IFI é um bom teste confirmatório, podendo ser utilizado como contra-prova de outros testes. Nos casos de sorologia positiva, é indicado pelo MINISTÉRIO DA SAÚDE (1994) o sacrifício do animal. Recomenda-se a associação de dois testes de diagnóstico sorológico em casos positivos.

Barbosa-Santos et al. (1998), através de inquérito epidemiológico em 270 cães, encontrou uma prevalência da Leishmaniose Tegumentar Americana, avaliada pelo teste cutâneo e pela IFI, respectivamente, de 40,5% e 25,5%, sugerindo que esses testes são úteis como instrumento de diagnóstico epidemiológico em áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar Americana.

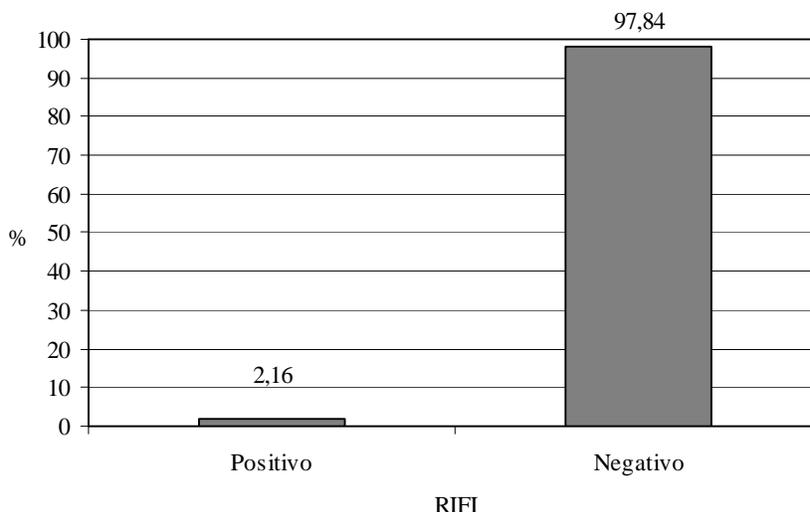


Figura 1- Percentual de soropositivos e soronegativos à IFI, de 370 cães errantes, capturados no município de Campos dos Goytacazes, RJ, no período de dezembro de 2000 a dezembro de 2001.

CONCLUSÃO

A análise dos resultados possibilitou-nos reconhecer que o teste sorológico IFI, padrão para humanos, demonstrou eficiência comprovada para a detecção de anticorpos no diagnóstico da Leishmaniose Canina, sendo apropriado para confirmação sorológica,

em casos de dúvida, ou como contraprova de casos positivos, em que segundo o Ministério da Saúde, é necessário o sacrifício do animal, e concluir que o município de Campos dos Goytacazes, passa a ser considerado área endêmica para Leishmanioses, após a ocorrência do caso humano em 2000, segundo a Funasa (2002).

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G. M., MEDEIROS, W. M., SANTOS, T. G., KLEIN, A. F. L., FERREIRA, V. Ecology of sandflies in recent focus of cutaneous Leishmaniasis in Paraty, litoral of Rio de Janeiro State (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.88, p.339-40, 1993.
- ANDRADE, L. S. **Leishmaniose Tegumentar Americana em área de ocupação recente na periferia da cidade de Manaus, estado do Amazonas, Brasil**. Rio de Janeiro, RJ. 1998. 125p. Tese (Mestrado) - Fundação Instituto Oswaldo Cruz.
- BARBOSA-SANTOS, E. G., MARZOCHI, M. C., CONCEIÇÃO, N. F., BRITO, C. M., BARROSO, J. A., PACHECO, R. S. N-methylglucamine antimoniate (SbV+): intralesional canine tegumentary leishmaniasis therapy. **Parasite**, v.5, p.175-80, 1998.
- COONS, A. H., CREECH, H. J., JONES, R. N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Proceedings Society for Experimental Biology Medical**, v.47, p.200-02, 1941.
- FERREIRA, A. W., ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes**. São Paulo: Editora Guanabara Koogan, 2001. 262p.
- FUNASA. **Boletim Epidemiológico**. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br>>. Acesso em: 8 set. 2000.
- FUNASA. **Manual de Leishmaniose: doenças parasitárias**. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br>>. Acesso em: 11 dez. 2002.
- IBGE. **Censo Agropecuário em Microrregiões**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 19 set. 2000.
- KAWA, H. **Organização do espaço e produção da Leishmaniose Tegumentar no município do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, RJ. 1998. 148p. Tese (Mestrado), Universidade Estadual do Rio de Janeiro.
- LAURENTINO-SILVA, V. **Imunologia aviária e aplicação da imunoglobulina Y (IgY) na soropidemiologia das leishmanioses caninas**. Seropédica, RJ. 1999. 130p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- MARZOCHI, M. C. A., BARBOSA-SANTOS, E. G. O. Evaluation of a skin test on the diagnosis of canine cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.83, p.391-92, 1988.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Controle, diagnóstico e tratamento da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1994. 25p.
- REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1991. 731p.
- TÁVORA, M. P. F. **Inquérito sorológico para *Leishmania sp.* em cães de rua apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro**. Campos dos Goytacazes, RJ. 2004. 64p. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- TÁVORA, M. P. F., DA COSTA PEREIRA, M. A. V., LAURENTINO SILVA, V., VITA, G. F. Estudo de validação comparativo entre as técnicas ELISA e RIFI para diagnosticar *Leishmania sp.* em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.4, p.482-83, 2007.
- VALIM, C. **Transmissão da *Leishmania (Viannia) braziliensis* no Ceará**. Rio de Janeiro, RJ. 1993. 120p. Tese (Mestrado), Fundação Instituto Oswaldo Cruz.