

Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro

Canine kala-azar control: aftermath comparison of a fast deletion program of serum-reactive dogs by immuno-enzymatic essay with another of late deletion program of serum-reactive dogs by indirect immunofluorescence of filter paper eluate

Marcus Davis Machado Braga, Ivo Castelo Branco Coêlho, Margarida Maria Lima Pompeu, Thomas G. Evans, Isabel Tavares MacAullife, Maria Jania Teixeira e José Wellington de Oliveira Lima

Resumo O programa de controle do calazar, adotado pela Fundação Nacional de Saúde (FNS), não tem conseguido reduzir a níveis aceitáveis a incidência de calazar humano. Utiliza como método diagnóstico a imunofluorescência de eluato de sangue e sacrifica os cães infectados com uma média de 80 dias após a coleta. A longa permanência do cão infectado na área e a baixa sensibilidade do teste utilizado podem ser importantes para esta falha. Neste trabalho, compara-se o programa de rotina da FNS, com outra estratégia baseada na identificação de cães infectados pelo enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) e eliminação dos cães infectados dentro de um prazo máximo de 7 dias. A prevalência do calazar canino foi medida nas duas áreas, antes e 10 meses após a medição inicial. Na área submetida ao controle de rotina da FNS observou-se um decréscimo de 9% na prevalência, enquanto na submetida ao método proposto a redução observada foi de 27%, sendo esta diferença sinificativamente maior ($p = 0,0015$).

Palavras-chaves: Leishmaniose visceral. Calazar. Controle epidemiológico. Reservatório.

Abstract The kala-azar control program, adopted by the Fundação Nacional de Saúde- FNS (National Health Foundation) has not been able to reduce to an acceptable level the incidence of human cases. The diagnostic method utilized is a blood eluate immunofluorescence. A dogs diagnosed as infected is eliminated a mean of eighty days after the blood collection. The low sensitivity of the test used and the continuing residence of the infected dog in the region due to the elimination delay may be critical in the lack of success of this program. In this study, the FNS standard canine control method is compared to a strategy based on ELISA identification of infected dog and elimination within 7 days. In both study areas the canine seroprevalence was noted ten months before and ten months after the intervention. In the routine FNS area a 9% decrease in seroprevalence was noted, compared to statistically significant greater 27%, reduction ($p = 0.0015$) in the ELISA intervention area.

Key-words: Visceral leishmaniasis. Kala-azar. Epidemiologic control. Reservoir.

Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

Suporte financeiro: Fundação Nacional de Saúde (PCDEN) - Ministério da Saúde; NIH, Grant U01 AI16305-16

Endereço para correspondência: Dr. Marcus Davis Machado Braga, Rua Alexandre Baraúna, 949, Rodolfo Teófilo, 60430-160 Fortaleza, CE.

Recebido para publicação em 11/07/97.

No Brasil a leishmaniose visceral é causada pela *Leishmania chagasi*^{6 22}, e transmitida ao homem através da picada de um psicodídeo, a *Lutzomyia longipalpis*^{6 9 13 14}. Duas espécies de mamíferos já foram incriminadas como reservatório deste parasita, uma silvestre, a raposa¹², e outra doméstica, o cão^{1 2 3 10 11}. A leishmaniose visceral humana e canina são endêmicas no Brasil, principalmente no Nordeste^{6 18}. Nesta região, e mais especificamente, no Estado do Ceará, em humanos a doença apresenta uma prevalência de 10,08/100.000 habitantes¹⁷.

O Ministério da Saúde do Brasil, desde o início da década de 60, através da então Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM), e mais recentemente, da Fundação Nacional de Saúde (FNS), vem desenvolvendo atividades de controle da infecção canina, em vários estados da Federação, incluindo o Ceará^{2 20}. Este controle inclui medidas para diminuir a densidade populacional do vetor, e a identificação e eliminação de cães infectados^{6 20 22}. Ao longo destes anos, em função da necessidade de se utilizar técnicas cada vez mais sensíveis, diferentes métodos de identificação de cães infectados têm sido propostos. Inicialmente, foi utilizado o exame parasitológico da pele e/ou vísceras³, outra técnica utilizada foi a detecção de anticorpos antileishmania, por reação de fixação do complemento⁸. A partir de 1982, vêm-se usando a técnica de imunofluorescência realizada em eluato de sangue colhido em papel filtro^{6 22}. Embora a introdução da imunofluorescência ainda represente um grande avanço, esta técnica, quando realizada em eluato de papel filtro, apresenta uma sensibilidade muito baixa, quando comparada com ELISA realizada no soro^{4 15}.

Após 5 anos de atividades de controle do reservatório canino, utilizando a imunofluorescência no eluato para detectar cães infectados, observou-se que é possível reduzir a prevalência da infecção no cão até certo limite, em torno de 0,5 a 1%. Esta redução, no entanto, não se acompanha necessariamente de uma interrupção da transmissão ao homem²¹. Acreditamos que, entre outros fatores, a baixa sensibilidade do teste de IFI no eluato, e o tempo decorrido entre a coleta de sangue e a eliminação do cão infectado, sejam responsáveis pela permanência de cães infectados e pela manutenção da transmissão da infecção.

Neste trabalho, avalia-se o impacto que a eliminação precoce de cães infectados, detectados

por uma técnica de diagnóstico mais sensível, possa ter na prevalência da infecção do cão pela *L. chagasi*, comparando esta estratégia com aquela adotada pelo programa de controle da leishmaniose visceral, na qual cães infectados são detectados pela IFI no eluato e eliminados, em média, 80 dias depois.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo. A área de estudo foi uma região do vale do rio Curú, o município de São Luiz do Curú, próximo ao litoral, de clima quente e úmido, durante os seis primeiros meses do ano e seco nos demais, sujeita a ciclos periódicos, aproximadamente quinzenais, de prolongada estiagem. São Luiz do Curú tem uma população de 10.600 habitantes e economia baseada na produção agrícola. Este município apresentou, nos dois anos anteriores à sua seleção para a pesquisa, uma prevalência de calazar canino de 2%¹⁷.

Foram selecionadas 28 localidades onde residia pelo menos um cão com exame sorológico positivo, num inquérito de rotina que a FNS havia realizado no ano anterior¹⁷, sendo relacionadas por ordem decrescente de população canina e distribuídas alternadamente entre os dois grupos, com a primeira localidade determinada por sorteio, ficando, assim, cada grupo constituído por 14 localidades.

Determinação da prevalência. A prevalência da infecção canina de ambas áreas de estudo foi determinada através do teste de ELISA, no início do estudo e 10 meses após.

Estratégias de controle. Um grupo de cães foi submetido ao tratamento proposto, ou seja diagnóstico pela técnica de ELISA no soro, e a eliminação do animal infectado no máximo em 7 dias, a partir da coleta do sangue. Chamamos este grupo *ELISA com eliminação precoce*. O outro grupo serviu de controle e recebeu o tratamento rotineiro adotado pela FNS no programa de controle do calazar, com diagnóstico pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI), e eliminação dos cães positivos realizada 80 dias após a coleta do sangue, intitulado *IFI com eliminação tardia*. Este foi o tempo médio decorrido entre o exame e a eliminação do cão, num grupo de municípios da região administrativa da FNS, incluindo a área de estudo, que havia sido trabalhado de janeiro até o início deste estudo (JW Oliveira-Lima: comunicação pessoal, 1995).

Todos os animais foram examinados, com exceção dos menores de três meses de idade,

que foram excluídos por poderem apresentar exame positivo pela presença de anticorpos maternos. Outra exceção foram os animais ausentes, embora todos os seus domicílios tenham sido revisitados.

Imunofluorescência indireta (IFI). Para o teste de IFI foi colhida uma amostra de sangue em papel filtro tipo marca Klabin® (Indústria de Papel Klabin, São Paulo), de onde se preparava o eluato, a partir de um círculo de 1cm de diâmetro do papel impregnado de sangue, ressuspenso em 0,2ml de salina tamponada com fosfato (STF). A reação foi realizada de acordo com Mendonça et al¹⁹ e Badaró et al⁵. Sumariamente, as lâminas foram preparadas com 10µl de suspensão de promastigotas de *L. chagasi*, fixadas no ar e incubadas com o eluato diluído 1:40. Anticorpos ligados eram detectados com anti-IgG de cão conjugada a FITC (FIOCRUZ, Rio), diluído em STF com 0,02% de Azul de Evans.

ELISA. Foram colhidos 5ml de sangue endovenoso da pata anterior de cada animal, e separado o soro por centrifugação, para uso no teste de ELISA, seguindo a técnica de Evans et al¹⁵. As placas foram sensibilizadas com promastigotas intactas de *L. chagasi*, 10⁶/poço, diluídas em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6 por um período a 4°C. Lavadas com STF Tween 0,05% e incubadas com os soros diluídos

a 1:400 em STF.BSA 1,5%. Os anticorpos específicos foram detectados através de anti-IgG de cão conjugada à peroxidase (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA). A reação do substrato 2,2-azino-di-3-etil sulfonato de bentiazoline (ABTS) foi medida a 405nm em leitor automático de ELISA. Foram considerados positivos os resultados superiores a 3 desvios padrões acima da média dos controles negativos.

Análise estatística. Os decréscimos de prevalência da duas áreas foram comparados através de um teste de diferença de proporções¹⁶.

RESULTADOS

Inicialmente, obtivemos informação sobre algumas variáveis básicas para saber se os dois grupos de estudo tinham composição semelhante (Tabela 1). As 14 localidades do grupo *ELISA com eliminação precoce* compunham-se, por ocasião do levantamento inicial, de 402 domicílios e uma população canina de 276 animais que foram examinados, além de 23 menores de três meses e 11 cães não localizados, que não foram encontrados mesmo após várias visitas. Por outro lado, as 14 localidades do grupo *IFI com eliminação tardia* incluíam 468 domicílios, 254 cães examinados e 21 cães menores de três meses. Então, as áreas estudadas tinham aproximadamente o mesmo número de domicílios e de cães.

Tabela 1 - Informações básicas sobre os dois grupos trabalhados, um com ELISA e eliminação precoce e outro com IFI e eliminação tardia, colhidas durante o inquérito sorológico pré-tratamento, no município de São Luiz do Curú, Ceará.

	ELISA c/ eliminação precoce	IFI c/ eliminação tardia
Localidades	14	14
Domicílios	402	468
Cães com < de 3 meses	23	21
Cães ausentes	11	0
Cães examinados	276	254

Em seguida, medimos o impacto na prevalência de cães soropositivos nos dois grupos de estudo, pela técnica de ELISA (Tabela 2). A prevalência pré-tratamento do grupo *ELISA com eliminação precoce*, foi de 46%, caindo para 19%, no inquérito pós-tratamento, significando uma redução em torno de 27%. Esta redução foi expressivamente superior ($p = 0,0015$) àquela alcançada no grupo *IFI com eliminação tardia*, onde no pré-

tratamento a prevalência foi 37% e no pós-tratamento 28%, representando uma redução de apenas 9%.

Também avaliamos pela técnica de IFI, o impacto na prevalência de cães soropositivos nos dois grupos de estudo (Tabela 3). A prevalência do grupo *ELISA com eliminação precoce* foi de 25% no pré-tratamento e 4% no pós-tratamento, o que significou uma redução de 21% na prevalência de cães soropositivos.

Tabela 2 - Resultado do inquérito sorológico por ELISA, para diagnóstico da infecção do cão pela *Leishmania chagasi*, pré e pós-tratamento, nas duas áreas, ELISA com eliminação precoce e IFI com eliminação tardia, no município de São Luiz do Curú, Ceará.

Grupo	Cães examinados por ELISA						decréscimo da prevalência (%)
	pré-tratamento			pós-tratamento			
	total	positivos	(%)	total	positivos	(%)	
IFI c/ eliminação tardia	254	93	37*	239	66	28**	9
ELISA c/ eliminação precoce	276	126	46*	197	38	19**	27

* Comparação das proporções pré-tratamento: $z = 2,19$ $p = 0,014$

** Comparação das proporções pós-tratamento: $z = 1,92$ $p = 0,027$

Comparação dos decréscimos: $z = 2,96$ $p = 0,0015$

Tabela 3 - Resultado do inquérito sorológico por IFI, para diagnóstico da infecção do cão pela *Leishmania chagasi*, pré e pós-tratamento, nas duas áreas, ELISA com eliminação precoce e IFI com eliminação tardia, no município de São Luiz do Curú, Ceará.

Grupo	Cães examinados por IFI						decréscimo da prevalência (%)
	pré-tratamento			pós-tratamento			
	total	positivos	(%)	total	positivos	(%)	
IFI c/ eliminação tardia	254	33	13*	239	21	9**	4
ELISA c/ eliminação precoce	276	68	25*	197	7	4**	21

* Comparação das proporções pré-tratamento: $z = 3,52$ $p = 0,0002$

** Comparação das proporções pós-tratamento: $z = 2,02$ $p = 0,022$

Comparação dos decréscimos: $z = 4,18$ $p < 0,0001$

No grupo *IFI com eliminação tardia*, no pré-tratamento, observou-se uma prevalência de 13% que diminuiu para 9% no pós-tratamento, ocorrendo então uma redução de 4%. A redução da prevalência de cães soropositivos por IFI foi significativamente maior no grupo *ELISA com eliminação precoce* ($p < 0,0001$). Medida pela IFI ou pelo ELISA, a estratégia de controle utilizando ELISA com eliminação imediata obteve melhores resultados do que a estratégia utilizada na rotina do programa de controle do calazar da FNS.

Finalmente, estimamos o número de cães

infectados que possivelmente não foram eliminados, quando usamos o teste de IFI no eluato, em vez de usar ELISA no soro (Tabela 4). No grupo *IFI com eliminação tardia*, foram detectados 93 cães infectados por ELISA e 33 por IFI. Enquanto isto, no grupo *ELISA com eliminação precoce*, 126 foram positivos ao ELISA e 68 na IFI. No total, provavelmente ficaram sem ser eliminados 118 cães positivos, ou seja, 54% dos cães infectados. Podemos inferir que, com a atual estratégia de identificação de cães infectados, o programa de controle do calazar da FNS está eliminando apenas cerca de 46% dos

Tabela 4 - Comparação do número de cães infectados que seriam eliminados pelo resultado do exame sorológico por ELISA ou IFI

Grupos	Cães infectados presentes no pré-tratamento			Cães que deixariam de ser eliminados,	
	que seriam examinados se examinados por			se examinados por	
	nº	ELISA*	IFI*	nº	(%)
IFI c/ eliminação tardia	254	93	33	60	65
ELISAc/ eliminação precoce	276	126	68	58	46
Total	530	219	101	118	54

* Número de cães soropositivos

DISCUSSÃO

infectados.

Para um programa de controle baseado no esvaziamento do reservatório, a sensibilidade da técnica do exame utilizado para identificar fontes de infecção é um ponto crítico. Os dados

sobre sensibilidade do teste de IFI no eluato de sangue de cães para diagnóstico da infecção por leishmania são contraditórios. Coutinho et al⁷ reportaram que a sensibilidade desta técnica no eluato é de 95%. Por sua vez, embora Evans et al¹⁵ não tenham calculado a sensibilidade do

teste de IFI no eluato, podemos inferir que a mesma é necessariamente inferior a sensibilidade obtida por Coutinho et al⁵, Evans et al¹⁵, detectaram 4,6 vezes mais cães infectados, utilizando ELISA no soro, do que com IFI no eluato de papel filtro, o que implica que, nas mãos de Evans et al¹⁵, a sensibilidade da técnica de IFI no eluato foi inferior a 95%, o valor estimado por Coutinho et al⁷. Nós obtivemos resultados semelhantes àqueles de Evans et al¹⁵, haja vista que, no inquérito inicial, detectamos de 1,84 a 2,85 vezes mais cães soropositivos com ELISA no soro do que com IFI no eluato.

No grupo *ELISA com eliminação precoce*, quando avaliado pela IFI, a prevalência foi de 25% (Tabela 3) e de 46% pelo ELISA. (Tabela 2). No grupo *IFI com eliminação tardia*, a prevalência foi de 13% pela IFI (Tabela 3) e de 37% pela ELISA (Tabela 2). A diferença entre os dois testes representa a maior sensibilidade do ELISA, permitindo, portanto, a detecção de um maior número de cães infectados.

Como a seleção das localidades foi aleatória não se pode garantir uma prevalência inicial igual para os dois grupos. Após a intervenção, houve uma queda da prevalência do calazar canino nos dois grupos de localidades avaliadas. A comparação exclusivamente através do teste ELISA, mostrou uma consistente redução no grupo *ELISA com eliminação precoce*, que foi de 27%, enquanto no grupo *IFI com eliminação tardia* houve uma redução de 9%, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0015$, Tabela 2). Esta redução da prevalência no grupo *ELISA com eliminação precoce*, onde os cães foram eliminados dentro de 7 dias após a coleta da amostra de sangue, sugere que a redução do tempo que um animal permanece infectante numa comunidade e a detecção através de uma técnica mais sensível são importantes fatores no controle do calazar.

A agilidade do sistema de saúde em fazer o resultado dos testes regressar ao campo rapidamente e a implementação de um método diagnóstico mais sensível são, portanto, pontos importantes a serem revisados no atual modelo desenvolvido pela FNS.

Observa-se ainda que a medição da prevalência final no grupo *ELISA com eliminação precoce* foi feita após ter decorrido um prazo maior do que no grupo de localidades com *IFI com eliminação tardia*, onde a eliminação dos cães ocorreu 80 dias após o exame. Mais especificamente, no grupo *ELISA com eliminação*

precoce, a prevalência final foi medida 39 semanas após a eliminação dos cães infectados, enquanto que no grupo *IFI com eliminação tardia*, foi medida com 28 semanas após a eliminação dos animais. Portanto, nas localidades do grupo com eliminação precoce decorreu um maior intervalo de tempo entre as duas medidas, aumentando o risco de ocorrer novas infecções nos cães não eliminados, sendo de se esperar, por conta disto, uma prevalência maior do que a observada no grupo *IFI com eliminação tardia* que teve um menor intervalo entre as duas medidas. Esta observação depõe a favor da superioridade da estratégia usada no grupo *ELISA com eliminação precoce*, para a redução da prevalência do calazar canino.

Em áreas onde o controle da infecção do cão vem sendo realizado através de ciclos anuais de eliminação de cães, identificados por IFI do eluato, a prevalência da infecção no cão tem se estabilizado em torno de 0,5 a 1%²¹, e nestas condições, casos humanos de leishmaniose visceral continuam a ocorrer, embora com menor frequência do que quando a prevalência no cão era mais alta. Uma possível explicação para este fato seria que a prevalência observada não reflita a realidade, isto é, dos cães infectados detectados por ELISA somente 35,4% deles estariam sendo detectados pela IFI (Tabela 4) e eliminados, indicando que possivelmente 64,5% dos cães infectados, estariam permanecendo na área, propagando a infecção.

Este estudo mostrou que houve diferença significativa entre as duas estratégias de controle avaliadas. No entanto, pelo desenho metodológico utilizado, não se pode definir, qual dos dois fatores, se a maior sensibilidade do teste ou se a eliminação imediata do cão, tenha causado um maior impacto na redução da prevalência do calazar canino.

Para que se possa tornar viável um programa de controle que reúna estas duas condições é necessário que se disponha de um teste que possa ser exequível nas condições de campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alencar JE. Calazar canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. Tese de Livre Docência. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 1959.
2. Alencar JE. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 3:175-180, 1961.

3. Alencar JE, Cunha RV. Inquéritos sobre calazar canino no Ceará. Novos resultados. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais 15:391-403, 1963.
4. Ashford DA, Badaró R, Eulálio C, Freire M, Miranda C, Zalis MG, David JR. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon Assay Screening Test-Enzyme-Linked immunosorbent assay. (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 48:1-8, 1993.
5. Badaró R, Reed SG, Carvalho EM. Immunofluorescent antibody test in american visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two leishmania species. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 32:480-484, 1983.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (Calazar): Normas técnicas. Brasília, 1996.
7. Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MCA, Tramontano N. A survey for american and visceral leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brasil) where human disease occur. Memórias Instituto Oswaldo Cruz 80:17-22, 1985.
8. Cunha RV, Alencar JE, Andrade FB. Uso da reação de fixação de complemento para diagnóstico do calazar canino em inquérito de massa. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais 15:405-410, 1963.
9. Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Serviço Nacional de Educação Sanitária. Rio de Janeiro, 1956
10. Deane LM, Deane MP. Encontro de cães naturalmente infectados por *Leishmania donovani* no Ceará. O Hospital 45:703-707, 1954.
11. Deane LM, Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. O Hospital 47:75-87, 1955.
12. Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica do calazar, no Ceará. O Hospital 48:61-76, 1955.
13. Deane LM, Deane MP, Alencar JE. Observações sobre o combate ao *Phlebotomus longipalpis* pela dedetização domiciliária, em área endêmica de calazar, no Ceará. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais 7:131-141, 1955.
14. Deane MP, Deane LM. Infecção natural de *Phlebotomus longipalpis* por leptomonas, provavelmente de *Leishmania donovani*, em um foco de calazar no Ceará. O Hospital 45:697-701, 1954.
15. Evans TG, Vasconcelos IAB, Lima JW, Teixeira JM, McAulliffe IT, Lopes UG, Pearson RD, Vasconcelos AW. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Assessment of serodiagnosis methods. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 42:118-123, 1990.
16. Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions. John Willey & Sons. New York, p. 117-118, 1981
17. Fundação Nacional de Saúde. Coordenadoria Regional no Ceará. Relatório Anual (1980 a 1995) do Programa de Controle da Leishmaniose. Informal. Fortaleza, 1995.
18. Fundação Nacional de Saúde. Leishmaniose. Informe epidemiológico do Sistema Único de Saúde n.i, p.30-33, 1992
19. Mendonça SCF, Souza WJS, Nunes MP, Marzochi MCA, Coutinho SG. Indirect immunofluorescence test in new World leishmaniasis: serological and clinical relationship. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 89:347-355, 1988.
20. Monteiro PS, Laserda MM, Arias JR. Controle da leishmaniose no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 27:67-72, 1994.
21. Oliveira-Lima JW, Fiuza IR, Dias-Branco FJ. Correlação entre prevalência do calazar no cão e incidência no homem, em áreas endêmicas do Estado do Ceará. In: Resumos do XXXII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Goiânia, p.146, 1996.
22. Organización Mundial de la Salud (OMS). Lucha contra las leishmaniasis. Informe de un comité de expertos de la OMS. Serie de informes técnicos 793. Ginebra, 1990.