

## LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA SOROLÓGICA UTILIZADA EM INQUÉRITOS EPIDEMIOLÓGICOS

Carlos A. da Costa, Odair Genaro, Marta de Lana, Paulo A. Magalhães, Magno Dias, Marilene S. M. Michalick, Maria N. Melo, Roberto T. da Costa, Neuza M. Magalhães-Rocha e Wilson Mayrink

*Foi realizado um estudo comparativo da reação de imunofluorescência indireta em eluatos de sangue de cães infectados experimentalmente com diferentes tripanosomatídeos. Utilizaram-se como antígeno promastigotas de L. mexicana, L. braziliensis e L. chagasi. Os resultados mostraram que a sensibilidade do método foi de 87,5% para o diagnóstico do calazar canino, independentemente do antígeno empregado; e que ocorre reação cruzada com Leishmaniose tegumentar em 75% dos casos e com doença de Chagas em 83,3%. Levantamento epidemiológico em área de leishmaniose confirma que a reação de imunofluorescência em eluatos de sangue canino fornece reações cruzadas em cães infectados com Leishmania braziliensis e L. chagasi. Não se verificou reação cruzada pela RFC. Sugere-se a utilização da reação de imunofluorescência nas campanhas de saúde pública, mas é de se chamar a atenção para o fato de que as taxas de positividade não devem ser utilizadas como indicadores da prevalência do calazar canino.*

Palavras-chaves: *Leishmania chagasi*. Calazar canino. Imunofluorescência.

A partir dos trabalhos de Chagas<sup>5</sup>, Deane e Deane<sup>9</sup> e Alencar<sup>1</sup>, demonstrando a importância do cão na transmissão da leishmaniose visceral no Brasil, vários pesquisadores dedicaram-se ao estudo sorológico de cães infectados, visando obter métodos de diagnóstico que facilitassem a realização de inquéritos epidemiológicos, assim como melhor conhecimento da distribuição geográfica da leishmaniose visceral do nosso País.

Desses trabalhos, destacam-se aqueles que procuraram padronizar a técnica de fixação do complemento no diagnóstico do calazar canino<sup>2 11</sup>. Com o surgimento do antígeno alcoólico<sup>7</sup> e a demonstração da possibilidade de aplicação da reação de fixação do complemento em eluatos de sangue colhidos em papel de filtro<sup>12</sup>, esta técnica tornou-se largamente difun-

dida e passou a ser usada pelo Ministério da Saúde para levantamentos epidemiológicos do calazar, no Brasil. Tal prática foi adotada até recentemente, quando a SUCAM (Superintendência de Campanhas MS), substituiu a reação de fixação do complemento pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Embora tal substituição tenha sido justificada pelas facilidades técnicas proporcionadas pela reação de imunofluorescência, pareceu-nos que uma avaliação da RIFI em eluatos de sangue de cães parasitados por outros tripanosomatídeos seria de fundamental importância para melhor compreensão do valor deste método nos levantamentos epidemiológicos do calazar. Nossa preocupação deve-se ao fato de que, no Brasil, o cão é encontrado parasitado tanto pela *Leishmania chagasi*, quanto pela *L. braziliensis* e pelo *Trypanosoma cruzi*, sendo comum o encontro de áreas de superposição das leishmanioses tegumentar e visceral, bem como da doença de Chagas<sup>13</sup>.

Em 1985, um levantamento soro-epidemiológico, utilizando a RIFI em eluatos de sangue de cães provenientes de áreas de leishmaniose visceral e tegumentar do Rio de Janeiro, revelou positividade para as duas doenças, mesmo sendo empregado somente *L. braziliensis* como antígeno<sup>8</sup>. Resultado semelhante foi observado em São Paulo<sup>10</sup>.

Por outro lado, em estudos preliminares, tivemos oportunidade de observar que elevados títulos de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* são detectados no soro de cães portadores de doença de Chagas expe-

Departamentos de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia e de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Departamentos de Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas e de Análises Clínicas da Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG.

Ministério da Saúde/SUCAM.

Trabalho financiado pela FAPEMIG.

Endereço para correspondência: Dr. Carlos A. da Costa, Departamento de Parasitologia/ICB/UFGM, Caixa Postal 2486, 31270 Belo Horizonte, MG.

Recebido para publicação em 04/06/90.

rimental, quando se utiliza a RIFI com antígeno de promastigotas de *Leishmania*.

As razões expostas levaram-nos a realizar um estudo do comportamento da reação de imunofluorescência indireta em eluatos de sangue de cães experimentalmente infectados com *Leishmania chagasi*, *L. braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*, utilizando como antígeno promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*. Numa segunda etapa, realizamos um levantamento epidemiológico para leishmaniose canina na localidade de São José do Batatal, Município de Caratinga-MG, utilizando comparativamente a reação de fixação do complemento e a reação de imunofluorescência.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cães experimentalmente infectados

Foram utilizados 66 cães procedentes dos biotérios do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e da Universidade Federal de Ouro Preto. Destes, 24 foram inoculados com  $1 \times 10^5$  promastigotas da cepa MCAN/BR/73/BH348 de *L. (V.) braziliensis*, 24 infectados com  $1 \times 10^6$  promastigotas da cepa MHOM/BR/70/BH46 de *L. (L.) chagasi* e 18 infectados com  $2 \times 10^3$  tripomastigotas metacíclicos da cepa Berenice de *Trypanosoma cruzi* por quilograma de peso, via conjuntival.

As amostras de sangue para testes sorológicos (reação de imunofluorescência e reação de fixação do complemento) foram colhidas 5 meses após a infecção nos cães inoculados com *L. (V.) braziliensis* e que apresentavam lesão ativa no local do inóculo; e entre 4 a 24 meses nos cães inoculados com *L. (L.) chagasi*, quando já se havia comprovado a infecção através de mielograma. Nos cães experimentalmente infectados com *T. cruzi*, o sangue foi colhido durante a fase crônica da doença, entre 3 a 21 meses após inóculo infectante.

### Controles

Como controles sem infecção, foram utilizados 30 cães com idade variando de 3 a 12 meses, nascidos e criados nos biotérios do ICB/UFMG e UFOP.

### Levantamento epidemiológico de Leishmaniose canina

Foram examinados 697 cães da localidade de São José do Batatal, Município de Caratinga-MG. Trata-se de região onde a leishmaniose tegumentar humana ocorre, mas onde não havia sido registrado nenhum caso de calazar humano ou canino. Foram coletadas amostras de sangue de papel de filtro para reação de fixação do complemento e imunofluores-

cência. Naqueles cães com sorologia positiva foram realizados exames clínicos e laboratoriais, inclusive biópsias de material de pele e vísceras para confecção de esfregaços por aposição, cultura em meio de NNN e inoculação em hamsters.

### Obtenção dos eluatos de sangue

Foi utilizada metodologia descrita por Coutinho<sup>8</sup>. Após incisão na orelha do cão, gotas de sangue eram embebidas em papel de filtro (Klabin 125) que era identificado, secado ao ar e conservado a 4°C até o momento do uso. Para eluição, confetes de 6mm de diâmetro da área embebida eram picotados e eluídos em PBS para reação de imunofluorescência (2 confetes em 0,28 ml de PBS correspondendo à diluição de 1/40 do soro) e em solução fisiológica para reação de fixação do complemento (8 confetes em 0,28 ml de salina, correspondendo à diluição de 1/10 do soro). A eluição era realizada por 16 horas a 4°C.

### Sorologia

A reação de fixação do complemento foi realizada como descrita por Pellegrino e Brener<sup>12</sup> utilizando antígeno alcoólico<sup>7</sup>.

Para a reação de imunofluorescência indireta foram empregados antígenos constituídos de promastigotas de *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* cultivados em meio de LIT<sup>3</sup>, em fase exponencial de crescimento. A reação foi realizada quantitativamente partindo-se da diluição inicial de 1/40 do eluato. Como conjugado foi empregado anti IgG de cão marcado com fluoresceína obtido do laboratório CAPPEL.

## RESULTADOS

Os eluatos de sangue de cães-controles, submetidos à reação de imunofluorescência indireta, forneceram resultados negativos na diluição de 1/40 com os diferentes antígenos empregados.

Os resultados dos testes realizados com o material de cães experimentalmente infectados estão sumarizados nas Tabelas 1 e 2. Na Tabela 1 são apresentados os resultados da reação de imunofluorescência indireta realizada com três diferentes antígenos em material proveniente de cães infectados com *Leishmania (L.) chagasi*. Constata-se que promastigotas de *L. chagasi*, *L. mexicana* e *L. braziliensis* apresentaram a mesma eficiência em diagnosticar os casos de calazar canino, ou seja, foram positivos em 21 dos 24 casos. (87,5%).

Tabela 1 – Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em eluatos de sangue de cães experimentalmente infectados com *Leishmania chagasi*, empregando-se como antígeno promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*.

Título final da RIFI	Antígenos		
	<i>L. chagasi</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. braziliensis</i>
N*	3	3	3
40	5	6	4
80	4	3	4
≥160	12	12	13
Total	24	24	24

N\* = negativo na diluição de 1/40.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da RIFI realizada com promastigotas de *L. chagasi* em eluatos de sangue de cães infectados experimentalmente com *L. (L.) chagasi*, *L. (V.) braziliensis* e com *Trypanosoma cruzi*. Observa-se que na diluição de 1/40 o teste foi positivo em 87,5% dos casos de calazar, 75% de leishmaniose tegumentar e 83,3% dos casos de doença de Chagas, e que não há diferenças estatisticamente significativas entre os três antígenos empregados.

Tabela 2 – Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em eluatos de sangue de cães experimentalmente infectados com *Leishmania chagasi*, *L. braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*, empregando-se como antígeno promastigotas de *L. chagasi*.

Doença	RIFI na diluição de 1:40					
	positivos		negativos		total	
	N	%	N	%	N	%
Leishmaniose visceral	21	87,5	3	12,5	24	100
Leishmaniose tegumentar	18	75,0	6	25,0	24	100
Doença de Chagas	15	83,3	3	16,7	18	100

Com relação ao levantamento epidemiológico, dos 697 cães cujos eluatos de sangue foram submetidos à reação de fixação do complemento, apenas um apresentou reação positiva à diluição de 1/10. Procedida à captura deste cão, foi constatado quadro clínico clássico de calazar. A pesquisa de parasitos foi positiva na cultura e nos animais inoculados com material de pele e vísceras. Análise isoenzimática deste parasito mostrou tratar-se de *L. (L.) chagasi*.

Os resultados da RIFI para estes mesmos animais, empregando como antígeno promastigotas de

*L. chagasi*, revelaram 11 cães positivos à diluição de 1/40. Um dos cães era o mesmo que havia sido positivo na RFC, e no qual já havia sido confirmada a leishmaniose visceral. O exame clínico dos 10 cães restantes revelou aspecto normal em 3 e, nos outros sete, pequenas lesões tegumentares. Biópsia da pele desses animais foram inoculadas em hamster, ocorrendo desenvolvimento de lesão tegumentar em 4 casos. Os parasitos foram isolados e caracterizados isoenzimaticamente como *L. (V.) braziliensis*.

## DISCUSSÃO

É inquestionável a contribuição dada por metodologias sorológicas nos levantamentos epidemiológicos de doenças endêmicas, notadamente na leishmaniose visceral. Contudo, quando os resultados da sorologia são utilizados como medidores da prevalência da doença, é preciso ter-se um bom estudo da sensibilidade e, principalmente, da especificidade do método empregado. Caso contrário, pode-se estar manipulando taxas de positividade equivocadas o que leva a falso conhecimento da gravidade da endemia na região.

Isso posto, este trabalho foi desenvolvido face a preocupação com o fato de a SUCAM<sup>14</sup> estar utilizando os índices de positividade observados em inquéritos sorológicos caninos, através da reação de imunofluorescência indireta, como indicadores das taxas de calazar canino no País. A preocupação justifica-se pelo conhecimento da existência de vários estudos demonstrando dificuldades na identificação específica dos anticorpos contra tripanosomatídeos através da RIFI, em soros humanos<sup>2 6 8 10</sup>. Procurou-se por isso mesmo verificar se este fato ocorria também com material proveniente de cães. Para tanto, iniciou-se por testar eluatos de sangue de cães experimentalmente infectados, utilizando cães criados em biotério, para evitar o risco de infectar cães aparentemente sadios, mas que poderiam estar com infecção inaparente, o que falsearia os resultados. Uma segunda preocupação foi a de avaliar sorologicamente os animais somente quando já houvessem decorrido pelo menos 3 meses do inóculo infectante, quando já havia sido demonstrado o parasitismo por *Leishmania* ou *Trypanosoma*, e decorrido tempo suficiente para a formação de possíveis imunoglobulinas G específicas.

Quando se estabelecia o protocolo para realizar as reações sorológicas surgiu a questão de qual seria a espécie de *Leishmania*, dentre as que ocorrem no Brasil, mais adequada para ser usada como antígeno na RIFI. Para responder a esta pergunta, realizaram-se os testes comparando promastigotas de *L. chagasi*, *L. mexicana* e *L. braziliensis*, espécies comumente

encontradas no nosso meio, e que representam os três complexos encontrados na América.

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que a sensibilidade da reação, independentemente da *Leishmania* utilizada como antígeno na detecção de casos de calazar canino, é elevada (87,5%), não havendo diferença significativa entre as três espécies empregadas. Sob o ponto de vista técnico a constatação é interessante, pois facilita a execução da técnica, mesmo em laboratórios que não contam com facilidades para cultivar diferentes espécies de *Leishmania*. (Neste caso, sugerimos que seja utilizada *L. mexicana*, pela facilidade do seu cultivo *in vitro*).

Feita esta abordagem inicial, partiu-se para avaliação da reação em aluatos de sangue de cães infectados com diferentes tripanosomatídeos. A análise da Tabela 2 revela que a reação fornece resultado cruzado, em altas taxas, com leishmaniose tegumentar (75%) e doença de Chagas (83,3%), de modo semelhante ao observado com infecções humanas<sup>4 8</sup>. Confirma-se, pois, nossa preocupação inicial.

Uma vez concluído o estudo com cães experimentalmente infectados, foi realizado um levantamento epidemiológico da leishmaniose canina, ocasião em que se procurou comparar a sorologia realizada pela reação de fixação do complemento com a imunofluorescência indireta.

O número de testes positivos foi significativamente maior com a RIFI (11) que com a RFC (01). Contudo, quando foram procedidos exames complementares verificou-se que apenas um caso realmente era de calazar, e que este havia sido detectado por ambos os processos. Dos demais casos detectados pela RIFI, em 4 constatou-se tratar de leishmaniose tegumentar causada pela *L. (V.) braziliensis*. Isso confirma os dados obtidos com material de infecção experimental e reforça a tese de que a RIFI, em eluatos de sangue canino, promove diagnóstico de tripanosomatídeos, não devendo seus resultados serem utilizados como indicadores de infecção leishmaniótica específica.

Entendemos que os resultados aqui apresentados permitem concluir que os índices atribuídos à infecção canina pela *L. chagasi*, medidos pela sorologia com a reação de imunofluorescência indireta, não correspondem à realidade, haja vista que são comuns as áreas de superposição de calazar com leishmaniose tegumentar e doença de Chagas em nosso País<sup>13</sup> e que, como mencionamos, o cão é encontrado parasitado pelos diferentes tripanosomatídeos. Por outro lado, achamos que a utilização da RIFI em levantamentos epidemiológicos de infecção canina torna-se justificável a partir do momento em que ela for usada com objetivo de detectar cão parasitado e sua conseqüente eliminação, contri-

buindo assim para a diminuição das fontes de infecção de três importantes endemias do nosso meio. Contudo, ressaltamos que estes dados não devem ser usados como indicadores da prevalência do calazar canino, mas sim da taxa de infecção por tripanosomatídeos.

## SUMMARY

*A comparative study was made of eluates of the blood of dogs experimentally infected with different trypanosomatids. Using antigens prepared from promastigotes of Leishmania mexicana, L. braziliensis and L. chagasi, assessments were made by the indirect immunofluorescence test. The results showed a sensitivity of 87,5% in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis, independent of antigen used. Cross-reactions occurred in 75% of cases of cutaneous leishmaniasis and 83,3% of dogs with chagas' disease. An epidemiological survey in an area of leishmaniasis confirmed that immunofluorescence tests on eluates of dogs' blood give cross-reactions between L. braziliensis and L. chagasi. The results suggest that such testing could be useful in public health campaigns but attention is drawn to the fact that the level of positive reactions cannot be used as an indicator of the prevalence of canine kala-azar.*

Key-words: *Leishmania chagasi. Canine kala-azar. Immunofluorescence.*

## AGRADECIMENTOS

Somos gratos ao Dr. Sebastião Gonçalves de Lima, Diretor regional da SUCAM em Minas Gerais, pela facilidade proporcionada ao inquérito epidemiológico, e aos Srs. Jair Cecílio de Paula, Raimundo Luiz Pinto e Floriano de Souza Oliveira, pelo apoio técnico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alencar JE. Leishmaniose visceral no Novo Mundo. Publicações Médicas, Rio de Janeiro 196: 71-87, 1956.
2. Brener Z. Calazar canino em Minas Gerais. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1957.
3. Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origen of metacyclic Trypanosomes in liquid media. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 6: 43-100, 1964.
4. Camargo ME, Rebonato C. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 18: 500-505, 1969.
5. Chagas E, Cunha AM, Ferreira LC, Deane L, Deane G, Guimaraes FN, Von Paumgarten MJ, Sá B. Leishmaniose visceral Americana (Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 33: 89-229, 1938.

6. Chiari CA, Magalhães PA, Mayrink W. Pesquisa de anticorpos, por imunofluorescência, em soros de pacientes com leishmaniose tegumentar americana apresentando lesões cutâneas recentes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 15: 304-309, 1973.
7. Cisalpino EO, Mayrink W, Batista SM. Antígeno metílico em calazar. *O Hospital* 61: 156-60, 1962.
8. Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MCA, Tramontano N. A survey for american cutaneous and visceral leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 80: 17-22, 1985.
9. Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar, no Ceará. *O Hospital* 48: 61-76, 1955.
10. Iversson LB, Camargo ME, Villanova A, Reichmann MLAB, Andrade EA, Tolezano JE. Inquérito sorológico para pesquisa de Leishmaniose visceral em população canina urbana no município de São Paulo-Brasil (1979-1982). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 25: 310-17, 1983.
11. Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Alencar JE. Leishmaniose visceral canina nos arredores de Fortaleza, Estado do Ceará: inquérito sorológico utilizando a reação de fixação do complemento com antígeno extraído de bacilo da tuberculose. Observações sobre o diagnóstico e epidemiologia da doença. *O Hospital* 52: 107-129, 1957.
12. Pellegrino J, Brener Z. Reação de Fixação do Complemento com sangue dessecado no diagnóstico do calazar canino. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* X: 39-44, 1958.
13. Pessoa SB, Martins AV. *Parasitologia Médica*, 11ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1982.
14. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM). *Controle das Endemias em 1983*, 1ª edição SUCAM, Brasília 174 p, 1983.