

## ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES DE CORUMBÁ, MATO GROSSO DO SUL<sup>1</sup>

VANIA L.B. NUNES<sup>2</sup>, YOSHIMI Y. YAMAMOTO<sup>3</sup>, FREDERICO A. REGO JÚNIOR<sup>4</sup>, MARIA ELIZABETH C. DORVAL<sup>2</sup>, EUNICE A.B. GALATI<sup>5</sup>, ELISA T. OSHIRO<sup>2</sup> e MARILENE RODRIGUES<sup>2</sup>

**ABSTRACT.**- Nunes V.L.B., Yamamoto Y.Y., Rego Jr. F.A., Dorval M.E.C., Galati E.A.B., Oshiro E.T. & Rodrigues M. 1988. [Epidemiological situation of visceral Leishmaniasis in dogs in Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brazil] Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral em cães de Corumbá, Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 8(1/2):17-21. Depto Patologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cx. Postal 649, Campo Grande, MS 79100, Brazil.

Recent reports on human cases with a clinical diagnosis of visceral Leishmaniasis in Corumbá, Mato Grosso do Sul state, where the agent had never been demonstrated parasitologically, caused a more thorough investigation of the local epidemiological situation of the dog population, one of the main reservoirs of the protozoa in question. Amastigotes were observed in parasitological examinations of skin and viscera in 7 out of 30 animals with clinical symptoms of kala-azar. The isolated parasites from infected dogs were identified as *Leishmania donovani* by biochemical methods. A serological survey was also carried out on 481 dogs from the urban area, by collecting blood on filter paper for indirect immunofluorescence and passive hemagglutination tests. The serological prevalence of the infection in the dog population studied was 8.7%, of which only 19% showed clinical signs of kala-azar. The remaining 81% was suggestive of being potential carriers without, however, ruling out the possibility of cross reactions with other animal protozoa. The canine infection is disseminated in practically all of the town.

**INDEX TERMS:** Visceral Leishmaniasis, canine infection, epidemiology.

**SINOPSE.**- Recentes relatos sobre casos humanos com diagnóstico clínico de leishmaniose visceral em Corumbá, Mato Grosso do Sul, onde o agente nunca havia sido demonstrado parasitologicamente, levou a uma melhor investigação epidemiológica local sobre a situação da população canina, um dos principais reservatórios do parasita. Formas amastigotas foram observadas através de exame parasitológico da pele e de vísceras de 7 entre 30 animais com sintomas clínicos de calazar. Os parasitas isolados de cães infectados foram identificados bioquimicamente como sendo *Leishmania donovani*. Inquérito sorológico foi também realizado em 481 cães da área urbana, através das reações de imunofluorescência indireta e hemaglutinação passiva, utilizando-se sangue coletado em papel de filtro. Sorologicamente, a prevalência da infecção na população canina estudada foi de 8,7%, dos quais, apenas 19% apresentavam sinais clínicos de calazar e o restante, 81%, eram sugestivos de serem portadores em potencial, sem contudo, poder ser excluída a possibilidade de reações cruzadas com outros protozoários. A infecção canina encontra-se praticamente disseminada por toda a cidade.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Leishmaniose visceral, infecção canina, epidemiologia.

### INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral americana apresenta-se como problema de saúde pública em muitas áreas das Américas do Sul e Central. As áreas endêmicas mais extensas, situam-se em regiões semi-áridas da América Latina, sobretudo no nordeste brasileiro nos Estados do Ceará e da Bahia (Deane 1981, Silveira et al. 1982).

Apesar da suposição de que o primeiro caso humano autóctone do Continente Americano, comprovado parasitologicamente, tenha se infectado na região de Porto Esperança, município de Corumbá, Mato Grosso do Sul (Migone 1913, Deane 1956) desconhecemos estudos para a avaliação da amplitude do problema nessa região. Os dados da literatura, referem-se apenas a menções esporádicas sobre a existência da doença na zona rural de outras áreas do Estado de Mato Grosso do Sul (Oliveira 1938, Chagas & Chagas 1938, Arruda et al. 1949).

A notificação de casos humanos, com diagnóstico clínico de leishmaniose visceral, a partir de 1980, no Hospital e Centros de Saúde de Corumbá, assim como a observação de cães com aspectos sugestivos de calazar, nas ruas dessa cidade, conduziram a estudos visando esclarecer aspectos epidemiológicos da parasitose na região. Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo verificar a identificação da espécie de *Leishmania* e a sua prevalência na população canina uma vez que a infecção humana constitui reflexo da observada nos reservatórios.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 2 de julho de 1987.

<sup>2</sup> Departamento de Patologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cx. Postal 649, Campo Grande, MS 79100.

<sup>3</sup> Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Cx. Postal 30786, São Paulo, SP 01051.

<sup>4</sup> Departamento de Inspeção e Defesa Agropecuária de Mato Grosso do Sul - IAGRO, Rua Treze de Junho 1577, Corumbá, MS 79300.

<sup>5</sup> Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 751, São Paulo, SP 01255.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área estudada

A cidade de Corumbá está inserida no Pantanal Matogrossense, à margem direita do Rio Paraguai a 18° 59' 44" de latitude Sul, 57° 39' 16" de longitude Oeste e altitude de 116 m acima do nível do mar (IBGE 1983).

O clima é quente e úmido com 3 meses secos (junho a agosto). A temperatura apresenta-se com a média das mínimas de 21,5° C e média das máximas de 30,4° C. As médias anuais para umidade relativa, precipitação pluviométrica, pressão atmosférica e nebulosidade são respectivamente 76,8%, 77,8 mm, 993,8 mb e 4,3% (IDESUL 1984).

A cidade implanta-se em solo de rocha calcárea com formações de morros, sendo estes revestidos por mata caducifolia raleada (Fig. 1).

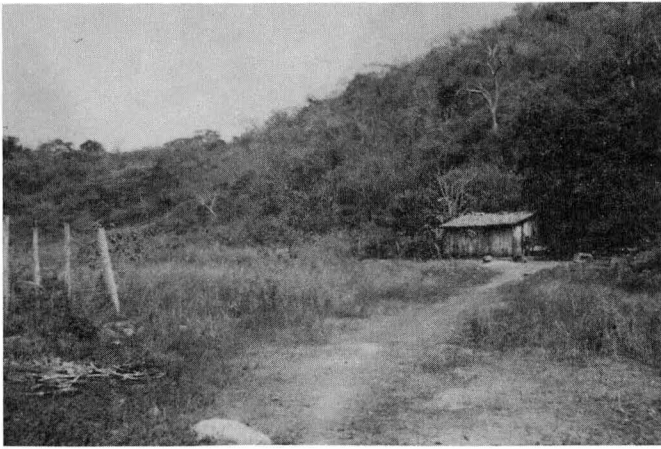


Fig. 1. Periferia de Corumbá, mostrando aspectos de topografia e vegetação.

A população humana do município para o ano de 1983 foi estimada em 81.145 habitantes, sendo 67.563 da área urbana e 13.582 da área rural (IBGE 1983).

### Inquérito parasitológico

Cães com sinais clínicos compatíveis com calazar foram capturados, no período entre 38 de abril e 20 de maio de 1983, nas ruas do centro e da periferia da cidade de Corumbá, ao todo 30. Os animais foram sedados com cloridrato de clorpromazina e sacrificados com solução de cloreto de potássio a 20% (inoculação de cerca de 5 ml, via endovenosa).

O diagnóstico parasitológico foi efetuado através de lâminas de impressão de pele, linfonodo, fígado e baço, coradas pela solução de Giemsa.

Para o isolamento do parasita foram utilizados fragmentos de pele, linfonodo, baço e fígado. O material foi lavado 5 vezes em solução salina com antibiótico (penicilina, 2.000 UI/ml, e estreptomicina, 200 mg/ml), homogeneizado e semeado em meio NNN (Neal, Novy e Nicolle) enriquecido com BHI (infusão de cérebro e coração bovino). O homogeneizado foi também inoculado em hamsters (volume de 0,5 ml de material por animal, via intraperitoneal).

Os tubos de cultura foram mantidos à temperatura de 24° C em estufa incubadora tipo BOD e examinados semanalmente para formas promastigotas.

As culturas positivas e os hamsters inoculados experimentalmente foram enviados ao Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, para a identificação de *Leishmania*, segundo metodologia empregada nesse Instituto (Lainson et al. 1981).

### Inquérito sorológico

Foram coletados, ao acaso, cerca de 800 amostras de sangue de cães, procedentes da área central e periférica da cidade de Corumbá. Contudo, problemas de ordem técnica, relacionados à coleta e armazenamento do sangue, permitiram que apenas 481 amostras fossem analisadas sorologicamente.

A distribuição das amostras, segundo os bairros é a seguinte: Centro – 130, Cidade Jardim – 63, Aeroporto – 71, Popular Velha – 71, Popular Nova e Guarany – 31, Cristo Redentor – 23, Maria Leite e Vila Mamona – 91.

O sangue coletado em papel de filtro Whatman nº 1, foi seco ao ar livre, colocado em sacos de polietileno e guardado a 20° C negativos em dessecador a vácuo. Esses papéis foram assim conservados por um período de no máximo 4 meses até a realização dos testes sorológicos. Para a reação, 2 discos de 1,4 cm de diâmetro foram eluídos em 0,4 ml de solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M pH 7,2 (SSTF) por 18 horas a 4° C, obtendo-se assim uma diluição correspondente a 1/20 do soro.

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi realizada com formas promastigotas de uma amostra de *Leishmania donovani*, isolada de uma cão em Corumbá. Assim, para a obtenção desse antígeno, baço e fígado de hamster infectado com essa amostra foram homogeneizados e semeados em meio NNN, com fase líquida constituída de infusão de cérebro e coração bovino. Após 6 dias de incubação a 28° C, as formas promastigotas foram lavadas com SSTF e tratadas com formalina a 2% em temperatura ambiente, por 18 horas. Em seguida, os parasitas foram lavados em SSTF e fixados em áreas delimitadas de lâminas de microscopia, de modo a se ter 40 a 50 formas parasitárias por campo microscópico (400x).

Para análise dos soros, foi utilizada a técnica descrita por Guimarães et al. (1974), fazendo-se diluições na razão 2 do soro a partir de 1/20 e empregando-se conjugado fluorescente anti-gamaglobulina de cão<sup>6</sup>. As leituras foram realizadas em microscópio de fluorescência, marca Nikon, sistema de epi-iluminação com lâmpada de halogênio, filtro de excitação B, filtro barreira 515W e com aumento de 400x.

Para a reação e hemaglutinação passiva (RHP) utilizou-se a amostra 49 de *Leishmania braziliensis* como antígeno. Para a preparação do reagente e a análise dos soros, seguiu-se a técnica descrita anteriormente por Yamamoto et al. (1981). As diluições do soro iniciaram-se a partir de 1/20, utilizando-se a razão 2.

## RESULTADOS

De 30 cães examinados parasitologicamente 7 foram positivos para formas amastigotas e as amostras isoladas do parasita, foram caracterizadas bioquimicamente como sendo *Leishmania donovani*.

Quadro 1. Resultados de RIFI e RHP em 481 cães de Corumbá, Mato Grosso do Sul, fevereiro a abril de 1984

Títulos de RHP	Títulos de RIFI							Sub-total
	<20	20	40	80	160	320	640	
<20	431	8	5	5	1	–	–	450
20	8	4	–	1	1	1	–	15
40	–	4	4	–	–	–	–	8
80	–	–	–	–	1	–	–	1
160	–	–	1	–	–	–	–	1
320	–	–	1	1	–	–	–	2
640	–	–	–	–	–	1	–	1
1280	–	–	1	–	–	–	2	3
Sub-total	439	16	12	7	3	2	2	481

<sup>6</sup> O conjugado foi gentilmente cedido pelo Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Quadro 2. Distribuição percentual dos títulos dos 42 cães reagentes

Título	RIFI		RHP	
	Nº	%	Nº	%
<20	0	0	19	45,2
20	16	38,1	7	16,7
40	12	28,7	8	19,1
80	7	16,7	1	2,4
160	3	7,1	1	2,4
320	2	4,7	2	4,7
640	2	4,7	1	2,4
1280	0	0	3	7,1

Quadro 3. Relação de reagentes e não reagentes sorológicos e de animais com sinais clínicos de calazar do total de 481 cães examinados

Reagentes				Não reagentes				Totais
C/sinais clínicos	%	S/sinais clínicos	%	C/sinais clínicos	%	S/sinais clínicos	%	
08	19,0	34	81,0	42(8,7%)	30	6,8	409	93,2
								439(91,3%)

Quadro 4. Prevalência da infecção por *Leishmania donovani* segundo os bairros da cidade de Corumbá, Mato Grosso do Sul

Bairro	Cães analisados Nº	Cães reagentes (RIFI $\geq$ 20 e/ou RHP $\geq$ 40)		Prevalência da infecção %
		Nº	%	
Centro e Cervejaria	130	19	14,6	
Cidade Jardim	63	2	3,2	
Aeroporto	72	5	6,9	
Popular Velha	71	7	9,8	
Popular Nova e Guarany	31	0	0	
Cristo Redentor	23	2	8,7	
Maria Leite e Vila Mamona	91	7	7,7	
Total	481	42	8,7	

Os resultados da RIFI e da RHP observados em 481 cães estão expressos no Quadro 1. Utilizando-se o limiar de reatividade de 1/20 e 1/40 respectivamente para RIFI e RHP (Yamamoto et al. 1985), observaram-se 42 casos reagentes, representando 8,7% de positividade.

A distribuição percentual dos cães conforme os títulos de anticorpos encontra-se no Quadro 2.

A relação entre cães reagentes e presença ou não de sinais clínicos de leishmaniose visceral está expressa no Quadro 3, enquanto que a distribuição dos resultados segundo os bairros investigados está apresentada no Quadro 4.

## DISCUSSÃO

Uma vez que o parasita isolado foi identificado como sendo *Leishmania donovani*, comprovou-se a ocorrência de calazar canino na área urbana de Corumbá. Deve-se assinalar que este achado constitui o primeiro relato da presença de parasitose em cães no Estado de Mato Grosso do Sul, tendo provas de certeza parasitológica e etiológica.

A avaliação do papel do cão como reservatório da leishmaniose visceral no Brasil, segundo diferentes técnicas, tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores. Alen-

car et al. (1962) divulgaram dados sobre calazar em Santarém, Pará, onde 617 cães foram analisados através de fixação de complemento (RFC) encontrando uma taxa de infecção de 3,1%. No Ceará, Estado de alta endemicidade de calazar humano e canino, detectou-se uma taxa de infecção de 3,8% num total de 139.317 cães examinados pela RFC e/ou pela pesquisa de *Leishmania* (Alencar & Cunha 1963). Sherlock & Almeida (1969) em 554 animais examinados em Jacobina, Bahia, encontraram 2,5% de cães positivos através do exame do esfregaço de pele, da RFC no sangue e da punção hepática em alguns casos. Nestes trabalhos assim como em outros (Alencar et al. 1974/75, Sherlock & Almeida 1970) verifica-se a superioridade da RFC sobre os métodos parasitológicos em relação à capacidade de detectar índices de infecção. Atualmente, com o desenvolvimento de técnicas sorológicas mais sensíveis, a RFC tem sido deixada de lado, dando preferência à reação de imunofluorescência indireta que é menos laboriosa permitindo analisar grande número de soros (Iverson et al. 1983, Lanotte et al. 1974, 1979).

No presente trabalho, o emprego de duas técnicas sorológicas, RIFI e RHP teve como expectativa aumentar a sensibilidade na detecção de casos positivos. Contudo, os resultados mostraram que a utilização apenas da RIFI teria sido suficiente, em vista da baixa sensibilidade apresentada pela RHP. Tanto na RIFI como na RHP os títulos dos soros reagentes variaram de 20 até valores altos de 640 e 1280, entretanto, os dois testes apresentaram baixa concordância de resultados, como pode ser visto no Quadro 1. Somente cerca de 40% dos casos detectados pela RIFI mostraram-se reagentes pela RHP. Isto provavelmente se deve ao fato de ter sido usado antígeno homólogo para RIFI e heterólogo para RHP. Acrescenta-se também a diferença nos anticorpos detectados por estas reações: a RIFI detecta principalmente anticorpos dirigidos para a membrana do parasita e a RHP às estruturas citoplasmáticas.

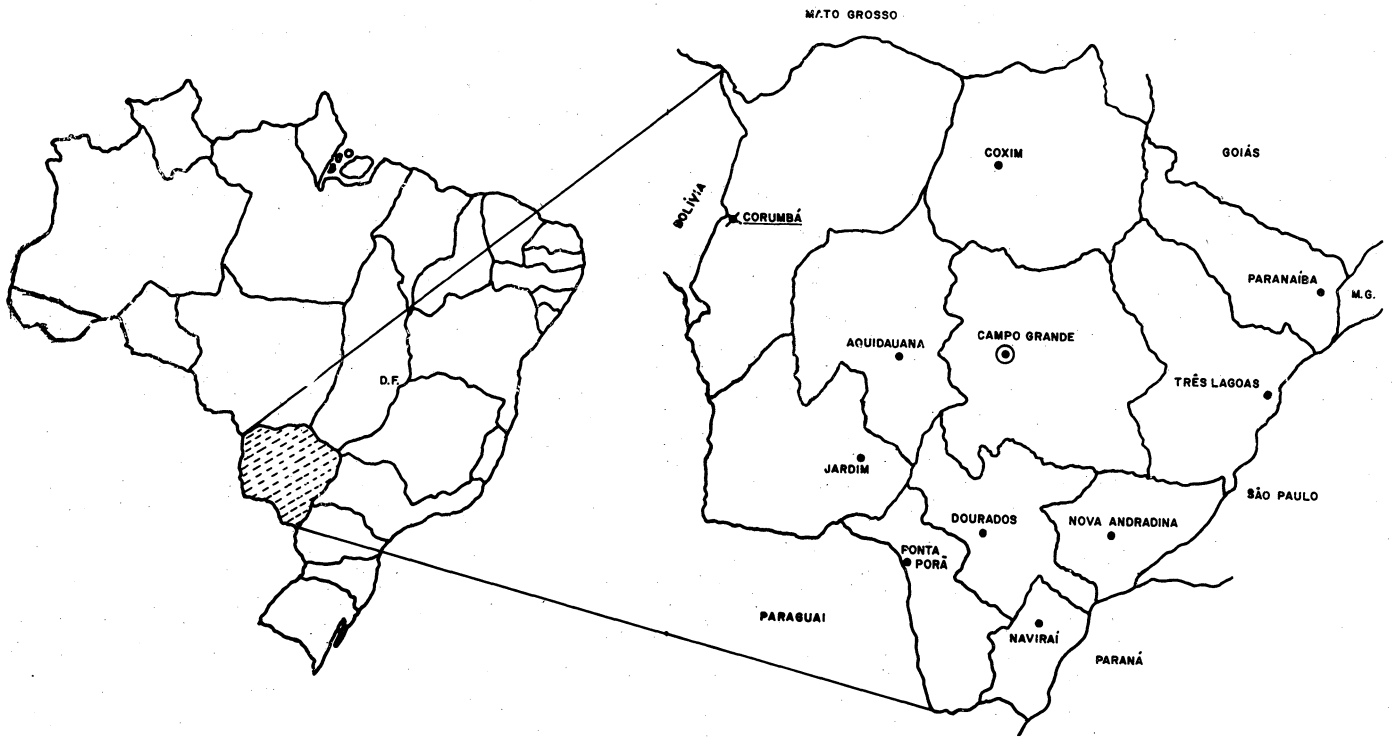
Utilizando-se o limiar de reatividade de 20 para RIFI e 40 para RHP como avaliados anteriormente (Yamamoto et al. 1985) foram encontradas 8,7% de prevalência da leishmaniose no total de 481 cães analisados. Este índice encontra-se próximo ao obtido por Magalhães et al. (1980) em inquéritos realizados em populações de cães no Estado de Minas Gerais.

Dados relevantes para o conhecimento epidemiológico da doença, encontram-se no Quadro 3; pois dentre os casos reagentes sorologicamente, 81 não apresentaram sinais clínicos de leishmaniose visceral, enquanto que apenas 6,8% dos que os apresentavam não tiveram sorologia positiva. Desta forma, o controle da doença na área, provavelmente será comprometido se a eliminação dos cães doentes basear-se apenas em critérios clínicos.

A ocorrência de reações cruzadas entre a doença de Chagas e leishmaniose visceral é conhecida de longa data (Brenner & Pellegrino 1958). Contudo, na região estudada não há relatos da ocorrência de *Trypanosoma cruzi* em cães, entretanto é conhecida a presença de *Trypanosoma evansi* nesses animais (Nunes 1986), sendo assim, impossibilita a exclusão de eventuais reações cruzadas em cães infectados por esse tripanossomo.

Através do Quadro 4 e da Figura 1, pode-se verificar

MATO GROSSO DO SUL NO BRASIL



CORUMBÁ - MS

- 1 CENTRO
- 2 CIDADE JARDIM
- 3 AEROPORTO
- 4 POP. VELHAS
- 5 POP. NOVAS
- 6 GUARANY
- 7 CRISTO
- 8 MARIA LEITE
- 9 VILA MAMONA

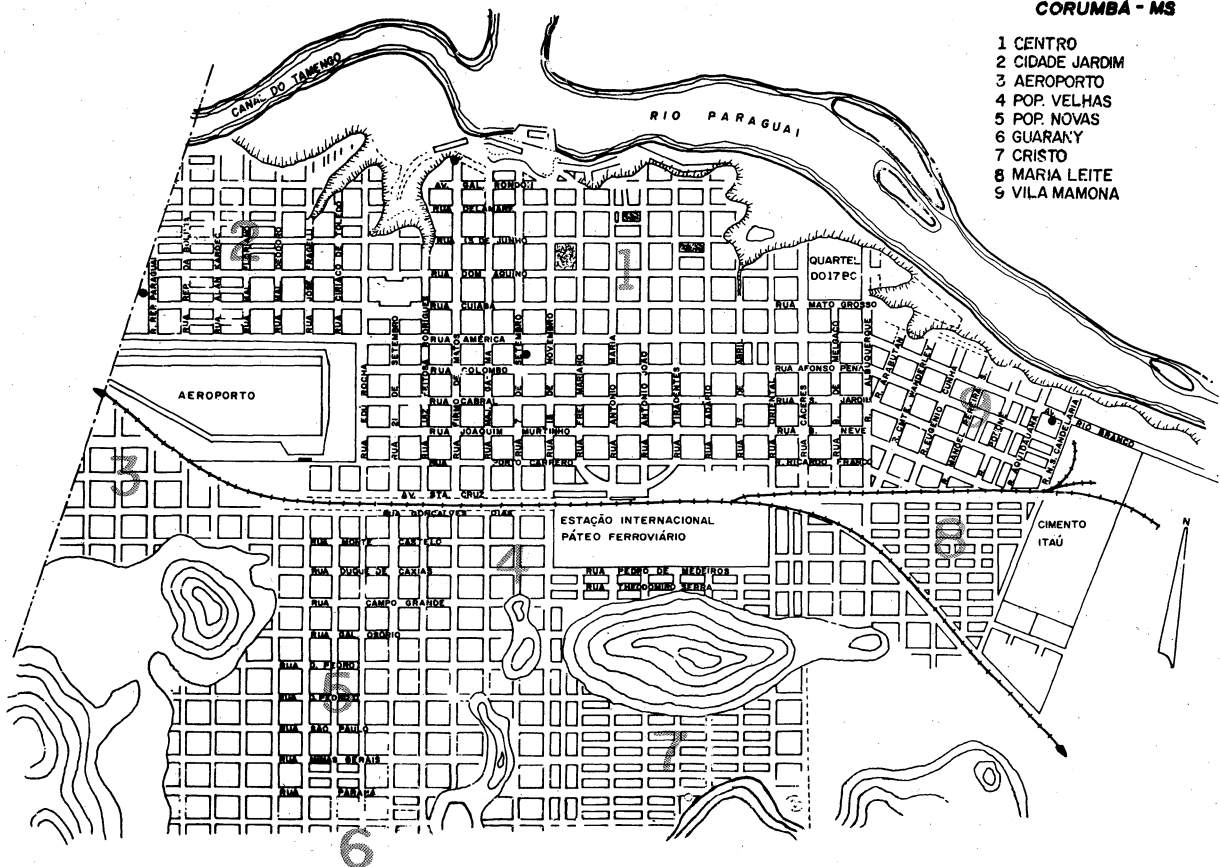


Fig. 2. Localização geográfica de Corumbá, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, foco urbano de calazar canino, atribuível a *Leishmania donovani*.

que a infecção canina encontra-se disseminada praticamente por toda a área urbana.

O resultado negativo encontrado para os bairros Guarany e Popular Nova provavelmente possa ser explicado pela pequena amostra analisada.

Estudos relativos à ação de vetores da leishmaniose visceral vem registrando a presença de *Lutzomyia cruzi*, com as mais expressivas densidades, em domicílios urbanos, quando comparadas com as das demais espécies que compõem a fauna flebotômica de Corumbá (dados não publicados).

### CONCLUSÕES

Confirma-se a ocorrência de foco urbano de calazar canino, com etiologia atribuível a *Leishmania donovani* em Corumbá, Mato Grosso do Sul.

A prevalência da infecção na população canina obtida através de inquérito sorológico foi de 8,7%.

Dos cães sorologicamente reagentes, 81% não apresentavam sinais clínicos sugestivos de calazar canino.

Dos cães não reagentes, 6,8% apresentavam sinais clínicos sugestivos de calazar canino.

A infecção encontra-se disseminada praticamente por todos os bairros da cidade.

### REFERÊNCIAS

- Alencar J.E., Pessoa E.P. & Costa O.R. 1962. Calazar em Santarém, Estado do Pará, 1961. *Revta Bras. Malariol. Doenças Trop.* 14:371-377.
- Alencar J.E. & Cunha R.V. 1963. Inquéritos sobre calazar canino no Ceará - novos resultados. *Revta Bras. Malariol. Doenças Trop.* 15(3):391-404.
- Alencar J.E., Almeida Y.M., Silva Z.F., Paiva A.S. & Fonseca M.F. 1974/75. Aspectos atuais do calazar no Ceará. *Revta Bras. Malariol. Doenças Trop.* 26/27:27-53.
- Arruda W., Costa F.C., Nahas S. & Rosenfeld G. 1949. Leishmaniose visceral americana. *Bras. Med.* 63:64-65.
- Brener Z. & Pellegrino J. 1958. Reações imunológicas cruzadas em cães com doença de Chagas e leishmaniose visceral, naturalmente infectados. *Revta Bras. Malariol. Doenças Trop.* 10:45-49.
- Chagas E. & Chagas A.W. 1938. Notas sobre epidemiologia da leishmaniose visceral americana em Mato Grosso. *Hospital, Rio de J.*, 13(3):471-480.
- Deane L.M. 1956. Leishmaniose visceral no Brasil. Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro, p. 162.
- Deane L.M. 1981. Report on the epidemiology of the leishmaniasis in Brazil. Meeting of the WHO Scientific Working Group on Leishmaniasis, Geneva.
- Guimarães M.S.C., Giovannini V.L. & Camargo M.E. 1974. Antigenic standardization for mucocutaneous leishmaniasis immunofluorescence test. *Revta Inst. Med. Trop.*, S. Paulo, 16(3):145-158.
- IBGE 1983. Geografia do Brasil: Região Centro Oeste. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, Vol. 1, no. 23.
- IDESUL 1984. Fundação Instituto de Desenvolvimento de Mato Grosso do Sul, Secretaria de Planejamento e Coordenação Geral, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.
- Iverson L.B., Camargo M.E., Villanova A., Reichmann M.L.A.B., Andrade E.A. & Tolezano I.T. 1983. Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina urbana do município de São Paulo (1979-1982). *Revta Inst. Med. Trop.*, S. Paulo, 25(6):310-317.
- Lainson R., Miles M.A. & Shaw J.J. 1981. On the identification of viscerotropic leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 75:221-223.
- Lanotte G., Rioux J.A., Croset H. & Vollhardt Y. 1974. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 7. Despitage de l'enzootie canine par les méthodes immunosérologiques. *Ann. Parasitol.*, Paris, 49(1):41-62.
- Lanotte G., Rioux J.A., Perieres J. & Vollhardt Y. 1979. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Ann. Parasitol.*, Paris, 54(3):277-295.
- Magalhães P.A., Mayrink W., Costa C.A., Melo M.N., Dias M., Batista S.M., Michalick M.S.M. & Williams P. 1980. Calazar na Zona do Rio Doce, Minas Gerais. Resultados de medidas profiláticas. *Revta Inst. Med. Trop.*, S. Paulo, 22(4):197-202.
- Migone L.E. 1913. Un caso de calazar a Assuncion (Paraguay). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 6:118-120.
- Nunes V.L.B. 1986. Comunicação pessoal (Depto Patologia, Univ. Fed. Mato Grosso do Sul, Campo Grande).
- Oliveira A.C. 1938. Um caso de leishmaniose visceral americana. *Hospital, Rio de J.*, 13(3):465-470.
- Sherlock I.A. & Almeida S.P. 1969. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. II. Leishmaniose canina. *Revta Bras. Malariol. Doenças Trop.* 21:535-239.
- Sherlock I.A. & Almeida S.P. 1970. Notas sobre leishmaniose canina no Estado da Bahia. *Revta Bras. Malariol. Doenças Trop.* 22:231-242.
- Silveira F.T., Lainson R., Shaw J.J. & Povoas M.M. 1982. Leishmaniasis in Brazil. XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* (L.) as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76(6):830-832.
- Yamamoto Y.I., Ceneviva A.C. & Moura R.A.A. 1981. Leishmaniose cutâneo-mucosa: reações de hemaglutinação passiva e de contraímuno-eletroforese com antígeno de *Leishmania brasiliensis*. *Revta Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo* 17(1):123-132.
- Yamamoto Y.I., Nunes V.L.B., Rego Jr. F.A., Oshiro E.T. & Dorval M.E.C. 1985. Estudo da eficiência das reações de imunofluorescência e de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães. XII Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambú, Minas Gerais.