



Detecção de *Leishmania infantum* em cães (*Canis familiaris*) do município de São Paulo, Brasil

Ryan E. Silva¹, Andréa P. Costa², Renata Tonhosolo³, Letícia M. Molla⁴, Rafael G. Agopian⁴, Jonas Moraes-Filho⁴, Arlei Marcili^{1,4,*}

¹Departamento de Medicina Veterinária e Saúde Animal. Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil. ²Departamento de Patologia, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil. ³Faculdade de Medicina. Universidade de Santo Amaro (UNISA), São Paulo, SP, Brasil. ⁴Programa de Medicina e Bem-Estar Animal e Saúde Única. Universidade de Santo Amaro (UNISA), São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO

OBJETIVO

A leishmaniose visceral é causada por *Leishmania infantum*. No estado de São Paulo, essa zoonose está se expandindo para áreas urbanas e a incidência de doenças humanas está relacionada à infecção canina. Neste trabalho, foi realizado o diagnóstico sorológico e molecular em 152 cães (*Canis familiaris*) dos bairros Grajaú e Ilha do Bororé, extremo sul do município de São Paulo, Brasil.

MÉTODOS

Observamos a prevalência de *L. infantum* nesses animais que são identificados como os principais reservatórios do agente etiológico da leishmaniose visceral.

RESULTADOS

Os testes sorológicos mostraram um baixo índice de positividade, enquanto os testes moleculares mostraram animais positivos em 3,94% e 0,65% para a cathepsina L-like de *Leishmania infantum* e ITS do gene ribossomal, respectivamente.

CONCLUSIONS

Diagnóstico molecular de 3,94% de positividade sugerindo a introdução de *L. infantum* nesta localidade de São Paulo, que ainda preserva 80% da Mata Atlântica. Nossos dados apontam para a necessidade de controle efetivo de cães infectados para prevenir a disseminação da leishmaniose visceral em humanos.

DESCRIPTORS

Leishmania infantum. Cães. Sorologia. Diagnóstico molecular. São Paulo. Brasil.

Corresponding author:

Arlei Marcili. Universidade de Santo Amaro (UNISA). Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340 - Jardim das Imbuías, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: amarcili@prof.unisa.br /ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0478-6771>

Copyright: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons

Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original author and source are credited.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é causada pelo protozoário *Leishmania infantum*¹, e é uma parasitose zoonótica classificada pela Organização Mundial da Saúde como uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas. A doença afeta cerca de 80 países da Ásia, África e América Latina². Do total de registros, 90% estão concentrados em Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão do Sul e Brasil. O Brasil contribui com 90% dos casos documentados no continente americano³.

No intervalo de 2013 a 2015, a transmissão da leishmaniose visceral foi notificada em 1339 municípios de 21 dos 27 estados brasileiros; em 2015, o coeficiente de incidência atingiu a média anual de 1,6 casos/100.000 habitantes. No estado de São Paulo, dados de séries epidemiológicas e de modelos de projeção estatística mostram que a doença está em clara dispersão, com rota de difusão em direção à região metropolitana, com o maior contingente demográfico do país⁴. O município de São Paulo é classificado como silenciador não receptivo vulnerável, sendo considerados com transmissão canina apenas os municípios de Cotia e Embu, que pertencem à região metropolitana de São Paulo.

Na epidemiologia da doença, os cães são considerados os principais reservatórios do patógeno, de modo que as principais implicações clínicas adquiridas em função da infecção são: alterações bioquímicas na urina, onicogribose, adelgaçamento progressivo, formação de áreas de alopecia seguida de descamação, presença de lesões pustulares, distúrbios esfoliativos ou ulcerativos, adenite, envolvimento do baço e do fígado, leucocitose e neutrofilia, linfopenia e trombocitopenia⁵.

Estudar o comportamento da leishmaniose em cães pode ajudar na compreensão da doença como um todo e de como ela se integra à saúde humana. No entanto, apesar do impacto clínico e epidemiológico da doença, os dados dos inquéritos de leishmaniose em populações caninas no município de São Paulo são escassos e insipientes.

Neste trabalho, investigamos a ocorrência de *Leishmania infantum*, por diagnóstico sorológico e molecular, em cães dos bairros Grajaú e Ilha do Bororé localizados no extremo sul do município de São Paulo, Brasil. Nossos dados apontam para a necessidade de medidas de controle eficazes para cães infectados para prevenir a transmissão da leishmaniose visceral na população humana.

MÉTODOS

Área de estudo e coleta de amostra

Este estudo foi realizado no Grajaú e na Ilha do Bororé, bairros localizados no extremo sul do município de São Paulo. Particularmente a Ilha do Bororé é cercada pela Represa Billings, o bairro tem cerca de 80% de sua área útil coberta pela vegetação da Mata Atlântica, preservada em terrenos e propriedades particulares. Alguns pontos de ocupação irregular são notados no bairro de São Paulo, e há grande quantidade de cães nas residências e/ou abandonados nas ruas.

A amostragem incluiu cães de ambos os sexos, com mais de três meses e de raças mistas. No momento da coleta os animais foram submetidos a uma avaliação física que incluiu observação da mucosa oral, pesquisa de lesões dermatológicas, atribuição de escore corporal e palpação de linfonodos pré-escapulares e poplíteos. Um total de 152 animais foram contidos para exame físico e coleta de material biológico. Foram coletadas duas alíquotas de sangue, da veia cefálica ou, caso não fosse possível, da veia jugular de cada animal, uma foi acondicionada em tubos estéreis e a seguir centrifugada para separação física do plasma e hemácias e uma segunda alíquota de o sangue foi transferido para tubos estéreis contendo etanol

para análise de PCR. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais (05/2016).

Análise sorológica

Os soros desses animais foram utilizados para a realização de diferentes técnicas sorológicas: a) Teste rápido da leishmaniose canina DPP® (Biomanguinhos/FIOCRUZ); b) Teste imunoenzimático ELISA (Kit Canine Visceral Canine Leishmaniose, Biomanguinhos/FIOCRUZ) e c) Reação de imunofluorescência indireta (IFAT) com antígeno da forma promastigota de *Leishmania infantum* obtido de um cão do Estado do Maranhão-Brasil e depositado na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos do Departamento de Veterinária Preventiva e Zootecnia da FMVZ-USP. O ponto de corte para determinação do resultado do reagente foi a diluição 1:80. Para todos os testes, as instruções do fabricante foram seguidas e amostras de animais sabidamente infectados e não infectados foram usadas como controle.

Extração e amplificação de DNA de sangue de cães

Amostras de sangue armazenadas em etanol absoluto tiveram seu DNA extraído com o kit Purelink Genomic DNA (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro e utilizado nas reações de PCR convencionais utilizando como marcadores os genes de um espaçador ribossomal interno transcrito (ITS SSUrDNA)⁶ e catepsina L-like⁷. Como controle positivo da reação, foi utilizado DNA de culturas de *L. infantum*.

RESULTADOS

Foram coletadas 152 amostras de cães nos bairros do Grajaú e Ilha de Bororé. Destes, treze animais apresentavam alguma lesão dermatológica, seis apresentavam mucosas hiperemadas, dois apresentavam caquexia e nenhum animal apresentava linfonodomegalia alterada.

O teste imunocromatográfico revelou apenas um animal positivo (0,65%), enquanto o ensaio imunoenzimático ELISA não mostrou positividade para nenhum dos cães testados. O teste baseado na técnica RIFI demonstrou positividade para o mesmo animal que também foi positivo no teste imunocromatográfico (Tabela 1).

O ensaio molecular revelou seis animais positivos para o gene catepsina L (3,94%) e um animal positivo para o gene ITS (0,65%), sendo este animal positivo no gene ITS igualmente positivo para o gene catepsina L-like. O animal positivo sorologicamente por ELISA e método imunocromatográfico foi positivo para o teste molecular baseado no gene catepsina L-like (Tabela 1).

Tabela 1 - Porcentagem de positividade das amostras de cães testadas pelos métodos diagnósticos de leishmaniose visceral.

Cães testados	Metodologia de Diagnóstico				
	Teste Sorológico			Ensaio Molecular	
	DPP®	ELISA	RIFI	Catepsina	ITS
Animais Reagentes (%)	01 (0,65%)	00 (0%)	01 (0,65%)	06 (3,94%)	01 (0,65%)
Animais não reativos (%)	151 (99,35%)	152 (100%)	151 (99,35%)	146 (96,06%)	151 (99,35%)

DISCUSSÃO

No estado de São Paulo, a primeira identificação da presença de vetores da leishmaniose visceral ocorreu na cidade de Salto de Pirapora, este achado epidemiológico foi o primeiro a chamar a atenção para uma eventual possibilidade de trans-

missão da doença no estado⁸. No entanto, a doença adquiriu intenso *status* de transmissão apenas na década de 1990, com o surgimento na região noroeste do estado. Esses achados concentraram-se inicialmente no município de Araçatuba onde o vetor foi encontrado em 1997, e apenas dois anos depois foram registrados os primeiros casos autóctones em humanos⁹.

Durante a década seguinte, a propagação da doença foi acentuada; em 2011, a doença já acumulava notificações em 73 municípios da região oeste de São Paulo¹⁰.

Os principais fatores que explicam essa ampla dispersão são o aumento das densidades dos artrópodes vetores e a migração de hospedeiros suscetíveis e infectados, ambos causados por intervenções antrópicas no espaço natural, entre elas a expansão da monocultura da cana-de-açúcar, a interconexão com o Mato Grosso do Sul via rodovia Marechal Rondon, rodovia Noroeste e obras do gasoduto Brasil-Bolívia¹⁰⁻¹².

Os dados retrospectivos da série epidemiológica e a análise dos fatores de risco permitiram inferir modelos preditivos que indicam uma rota de dispersão da doença que parte desta região do noroeste paulista em direção à região leste do Estado⁴, passando a representar uma ameaça para a região metropolitana e conseqüentemente para a cidade de São Paulo que possui uma população elevada.

Os resultados deste trabalho corroboram a hipótese de dispersão da doença ao mostrar que existem cães infectados por *L. infantum* no município de São Paulo, contribuindo para o aumento de dados referentes a esta importante zoonose em saúde pública na maior cidade da América Latina e corrobora os dados de presença parasitológica de *L. infantum* na região metropolitana de São Paulo¹³.

Considerando o protocolo diagnóstico recomendado pela vigilância sanitária brasileira, nenhum animal do estudo pode ser classificado sorologicamente como positivo para leishmaniose visceral canina, uma vez que apenas o teste (ELISA) imunocromatográfico de triagem foram positivos.

A incidência de reservatórios infectados somada à presença de vetores potenciais para o protozoário na região metropolitana indica um alto risco de aumento da prevalência de leishmaniose visceral nesses ciclos urbanos¹⁴. Portanto, esse contexto de expansão da doença indica que as medidas amplamente utilizadas desde a segunda metade do século 20 e baseadas puramente na aplicação de inseticidas e eutanásia de cães soropositivos são insuficientes, sendo necessária a adoção de estratégias integradas de prevenção e controle que funcionem em todos os pontos da dinâmica ambiental de transmissão.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERÊNCIAS

- Honigberg BM. A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. In: Ludvik J, Lom J, Vavra J, editors. Progress in Protozoology. 1st ed. New York: Academic Press; 1963. p. 68.
- Ashford RW, Desjeux P, Deraadt P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. Parasitol Today. 1992;8(3):104-5.
- Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. Clin Dermatol. 1996;14(5):417-23.
- Sevá AP, Mao L, Galvis-Ovallos F, Lima JMT, Valle D. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(2).
- Figueiredo FB, Filho CJLB, Schubach EYP, Pereira SA, Nascimento LD, Madeira MF. Relato de caso autóctone de leishmaniose visceral canina na zona sul do município do Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(1):98-9.
- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003;47(1):349-58.
- Silva RE, Sampaio BM, Tonhosolo R, Costa AP, Costa LES, Nieri-Bastos FA, et al. Exploring *Leishmania infantum* cathepsin as a new molecular marker for phylogenetic relationships and visceral leishmaniasis diagnosis. BMC Infect Dis. 2019(895).
- Forattini OW, Rabello EX, Pattoli DGB. Sobre o encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) no Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saude Publica. 1970;4(1):99-100.
- Camargo-Neves VLF, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spínola RMF, et al. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana - Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. Cad Saude Publica. 2001;17(5):1263-7.
- Cardim MFM, Rodas LAC, Dibo MR, Guiraldo MM, Oliveira AM, Chiaravalloti-Neto F. Introdução e expansão da Leishmaniose visceral americana em humanos no estado de São Paulo, 1999-2011. Rev Saúde Pública. 2013;47(4):691-700.
- Barata RB. Cem anos de endemias e epidemias. Cien Saude Colet. 2000;5(2):333-45.
- Antoniali SAC, Torres TG, Filho ACP, Tolezano JE. Spatial analysis of American Visceral Leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, Central Brazil. J Infect. 2007;54(5):509-14.
- Marcili A, Silva RE, Costa VP, Nieri-Bastos FA, Azevedo RCF, Moraes Filho J, et al. Canine Visceral Leishmaniasis in São Paulo, Brazil the most populous city of South America: isolation, molecular diagnosis and phylogenetic inferences. Vector Borne Zoonotic Dis. 2020 (Article in Press).
- Galvis-Ovallos F, Silva MD, Bispo GB, Oliveira AG, Neto JR, Malafronte RD, et al. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. Parasite. 2017;24(2).