



Leishmaniose visceral canina em Itapecerica da Serra, região metropolitana de São Paulo, SP, Brasil: nova classificação epidemiológica

Camila de Abreu Aires Ribeiro Costa¹, Ryan Emiliano da Silva², Isabella Pereira Pesenato², Giovanna Stefani Nosberto Castelli¹, Fernanda Ap. Nieri-Bastos³, Arlei Marcili^{1,2*}.

¹Programa de Medicina e Bem-estar Animal e Saúde Única, Universidade Santo Amaro, São Paulo, SP, Brasil.

²Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, SP, Brasil.

³Faculdade Anclivepa, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO

OBJETIVO

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. A leishmaniose visceral é uma doença severa com ampla distribuição geográfica, com uma incidência de dois milhões de casos por ano e 350 milhões de pessoas em áreas de risco, sendo causada pela espécie *Leishmania infantum*, que possui nos canídeos domésticos o grupo mais importante de reservatórios envolvidos na manutenção da infecção. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de parasitas do gênero *Leishmania* spp. no município de Itapecerica da Serra, Cotia e Juquitiba, municípios da região metropolitana de São Paulo, Brasil.

MÉTODOS

Foi realizado o diagnóstico molecular, sorológico e parasitológico (isolamento) em 153 amostras de cães oriundos de abrigos.

RESULTADOS

O diagnóstico sorológico apresentou 9,8% (15/153) de positividade para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* e o diagnóstico molecular específico para *Leishmania infantum* apresentou 5,2% (8/153) de positividade. O exame parasitológico, nos animais previamente positivos nas metodologias utilizadas no presente estudo, foi realizado através da punção por agulha fina de linfonodo poplíteo e apenas um animal foi positivo do município de Itapecerica da Serra.

CONCLUSÕES

Os testes moleculares específicos para *Leishmania infantum* corroboraram a presença e circulação do agente nos municípios que integram a região metropolitana de São Paulo. Adicionalmente, desperta a particular atenção para uma nova classificação epidemiológica do município de Itapecerica de Serra, contribuindo com a atualização nas medidas de vigilância epidemiológica da doença no município.

DESCRITORES

Catepsina, Flebotomíneos, Epidemiologia, Doenças negligenciadas, *Canis familiaris*, *Leishmania infantum*.

Corresponding author:

Arlei Marcili.
Universidade de Santo Amaro (UNISA). Rua
Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340 - Jardim das
Imbuías, São Paulo - SP, 04829-300
Tel: +55-11-99891
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

As Leishmanioses são um grupo de doenças zoonóticas que estão amplamente distribuídas, são caracterizadas por uma progressão insidiosa e crônica, causadas por diferentes espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*¹. A doença pode ser classicamente subdividida em formas tegumentares e viscerais, sendo esta última responsável por condições clínicas mais graves. No continente americano, a leishmaniose visceral está etiológicamente ligada à espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*^{2,3}.

O mecanismo de transmissão da doença envolve vetores insetos pertencentes ao grupo taxonômico dos flebotomíneos, cujas fêmeas inoculam o protozoário num possível hospedeiro quando se alimentam do seu sangue^{4,5}. Os cães são epidemiologicamente considerados os principais reservatórios de *L. infantum*, participando no ciclo da doença e sendo o principal elo na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral. Esta descoberta baseia-se na prevalência da doença na população canina e que os casos humanos são normalmente precedidos por casos caninos. Os cães tendem a ter um maior número de parasitas, levando a uma maior possibilidade de infectar o inseto vetor, que está muito próximo dos nichos ecológicos ocupados pelas populações humanas^{6,7}. A condição epidemiológica torna-se mais grave, uma vez que tanto os cães sintomáticos como os oligossintomáticos (e assintomáticos) são igualmente importantes fontes de infecção para os vetores competentes⁸.

Apesar da grande importância desta doença, ainda é difícil a padronização de metodologias para o diagnóstico correto com elevados valores preditivos. As metodologias de diagnóstico direto estabelecidas, que são geralmente consideradas como o padrão-ouro, são invasivas, laboriosas, e têm baixos valores de sensibilidade⁹. Os testes sorológicos também apresentam uma série de limitações técnicas, tais como baixos valores de especificidade devido à reatividade cruzada com outros Tripanosomatídeos, baixos níveis de concordância entre diferentes testes sorológicos, e nenhum consenso sobre a natureza e utilização de produtos antigênicos^{10,11}. Assim, a utilização de metodologias de diagnóstico molecular que satisfazem positivamente as rigorosas fases de validação e demonstração eficazes torna-se interessante e plausível, de modo a aumentar a precisão das rotinas de diagnóstico clínico e dos inquéritos epidemiológicos³.

A leishmaniose visceral tem se expandindo rapidamente no estado de São Paulo, Brasil, o que merece atenção especial. Esta expansão espaço-temporal tem levado a um aumento do número de cidades afetadas em casos e mortes. Esta situação é particularmente alarmante à medida que esta tendência se dirige para a região metropolitana de São Paulo, que tem uma das maiores densidades populacionais do país, proporcionando assim um elevado número de hospedeiros susceptíveis¹². Assim, uma melhor compreensão deste fenômeno nas cidades afetadas, a identificação dos determinantes e fatores predisponentes pode contribuir para a implementação de ações eficazes de vigilância e controle, impedindo assim que a leishmaniose visceral se propague a novos territórios endêmicos ou, pelo menos, que o seu progresso seja dificultado.

Considerando este cenário, o objetivo do presente estudo foi realizar a detecção sorológica, molecular e parasitológica de *Leishmania infantum* em cães oriundos dos municípios de Itapequerica da Serra, Cotia, e Juquitiba, na região metropolitana de São Paulo, SP, Brasil.

MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade de Santo Amaro (Protocolo nº 05/2019). A população da amostra incluía cães do mesmo abrigo com unidades em

Cotia, Itapequerica da Serra, e Juquitiba, localizada na região metropolitana sudoeste que faz fronteira com a cidade de São Paulo, SP, Brasil.

Foram coletadas amostras de sangue das veias jugular, radial e cefálica dos cães, o volume total foi fracionado, armazenados e congelados em microtubos com etanol absoluto (1:1) e em tubos com fatores de coagulação para a posterior coleta de soro.

As frações de soro obtidas foram utilizadas em ensaios imunocromatográficos para detectar anticorpos anti-*Leishmania infantum*. Foi utilizado o kit de diagnóstico rápido DPP® (Biomanguinhos/Fiocruz), com substratos antigênicos correspondentes às proteínas K9/K26/K39.

Foram utilizadas amostras de sangue conservadas em etanol absoluto para extração de DNA utilizando o PureLink Genomic DNA Mini Kit comercial (Invitrogen®). Os ácidos nucleicos extraídos foram quantificados utilizando a espectrofotometria miniaturizada para verificar a eficiência da extração. As amostras extraídas foram utilizadas para o diagnóstico molecular de *L. infantum* utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) com base no marcador específico tipo L da Catepsina³, que foi verificado por meio de eletroforese (1,5% gel de agarose) e subsequente visualização utilizando transiluminador ultravioleta.

Os cães que apresentaram resultados positivos em testes sorológicos e/ou moleculares foram submetidos à aspiração dos gânglios linfáticos poplíteos e, quando possível, a uma nova coleta de sangue periférico. Para o diagnóstico parasitológico, as amostras foram inoculadas em tubos de cultura com um meio bifásico constituído por meio à base de ágar sangue (BAB) como fase sólida e meio de infusão hepática triptose (LIT) como fase líquida e mantido durante 28 °C e inspecionado a partir de 4 dias por um período de 10 dias.

RESULTADOS

Foi avaliado um total de 153 cães: 42 de Cotia, 30 de Itapequerica da Serra, e 81 de Juquitiba. Destes, 9,8% (15/153) foram positivos para anticorpos anti-*Leishmania infantum* usando o método imunocromatográfico e 5,2% (8/153) foram positivos no diagnóstico molecular usando o marcador tipo L da Catepsina (Tabela 1).

Foram efetuados testes parasitológicos nos cães que deram positivo nos testes sorológicos e/ou moleculares. No entanto, não foi possível realizar o teste parasitológico em todos os cães porque os tutores do abrigo e/ou novos donos recusaram-se a submeter os seus cães ao teste. Apenas dois cães de Itapequerica da Serra e um de Cotia foram submetidos à aspiração de linfonodos poplíteos de agulha fina, e apenas um cão de Itapequerica da Serra deu positivo no teste parasitológico.

Tabela 1. Frequência de cães positivos dos testes sorológicos e moleculares a *Leishmania spp* em municípios da região metropolitana de São Paulo, SP, Brasil

Município	Indivíduo amostrados	Amostras positivas	
		DPP	CatLeish_PCR
Cotia	42	4/42 (9,52%)	1/42 (2,38%)
Itapequerica da Serra	30	4/30 (13,33%)	7/30 (23,33%)
Juquitiba	81	7/81 (8,64%)	0/81 (0%)
Total	153	15/153 (9,8%)	8/153 (5,22%)

DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral tem sido um problema de saúde pública no Brasil desde 1934, quando foi noticiado o primeiro caso de leishmaniose visceral humana no país. No final do século XX, as formas de leishmaniose, que pareciam estar controladas, reapareceram em áreas rurais e urbanas, apareceram em áreas consideradas livres desta doença endêmica devido a alterações ambientais, migração humana, crescimento urbano caótico, e outros fatores socioeconômicos em grandes áreas

do território brasileiro¹³.

O Brasil é um dos países com maior incidência de leishmaniose visceral no mundo, e as autoridades brasileiras reconhecem-no como um dos mais desafiadores problemas de saúde pública¹⁴. No entanto, a leishmaniose permanece como uma doença tropical negligenciada e a segunda principal causa de morte de uma doença parasitária em nível mundial¹⁵.

Apesar da grande importância desta doença, ainda há dificuldade de padronização de testes diagnósticos altamente preditivos^{3,16}, o que explica a falta de concordância entre os resultados dos testes de diagnóstico que corroboram aos dados descritos na literatura, pois os testes de diagnósticos disponíveis têm uma série de limitações técnicas, incluindo baixos valores de especificidade, devido a reações cruzadas com outros agentes etiológicos^{17,18,19}.

Além disso, os resultados dos testes sorológicos imunocromatográficos dependem da fase de infecção em cães assintomáticos, com aumento da sensibilidade na presença de sintomas clínicos^{17,18}.

A resposta imunitária humoral em cães infectados com *Leishmania infantum* envolve quase sempre múltiplos antígenos que são reconhecidos de formas diferentes em indivíduos distintos e em várias fases da doença no mesmo hospedeiro. Esta descoberta sugere que, sempre que possível, é preferível utilizar testes paralelos ou múltiplos de antígenos para identificar as infecções nos animais. Além disso, alguns estudos mostram que estes métodos têm uma especificidade superior a outros testes sorológicos (ELISA) incluídos os protocolos oficiais para o diagnóstico confirmatório da leishmaniose visceral canina no Brasil^{19,20}.

Os municípios incluídos neste estudo estavam próximos uns dos outros, facilitando a circulação dos cães para a cidade de São Paulo. A intensa movimentação dos cães é corroborada pela história dos animais positivos obtidos no presente estudo. Apenas um cão teve resultados positivos em todos os testes. Apresentou sintomas clínicos e está em tratamento há três anos com um protocolo de medicamentos estabelecido para cães no Brasil. Este cão veio da cidade de Vargem Grande e foi adotado; vive em Itapeverica da Serra e é constantemente transportado para o município de Ibiúna. Outro cão positivo no teste de diagnóstico molecular veio de Itapeverica da Serra e viveu no município de Cotia. O terceiro cão positivo no teste molecular foi resgatado em São Paulo, no bairro de Grajaú, foi acolhido na cidade de Cotia e adotado por uma família de São Paulo. Os outros cães com resultados positivos no teste molecular nasceram e têm vivido em Itapeverica da Serra.

A instalação de abrigos segue a orientação do Decreto Estadual 40400/95, que restringe os estabelecimentos a manter animais dentro do perímetro urbano, visando reduzir o odor, o ruído e a proliferação de roedores e artrópodes nocivos. Estas medidas favorecem a instalação/manutenção de canis e abrigos comerciais nas zonas periféricas de São Paulo ou em outros municípios da região metropolitana, que têm uma grande cobertura florestal remanescente e, conseqüentemente, oferecem maiores possibilidades de contato com os insetos vetores da doença em relação as zonas metropolitanas.

Itapeverica da Serra tem sido considerado um município silencioso, não receptivo e vulnerável; não têm sido confirmado casos autóctones da doença em humanos e caninos, bem como da presença do vetor. Portanto, este é o primeiro estudo a demonstrar a presença de *Leishmania infantum* em cães neste município, reforçando a necessidade de levantamentos mais abrangentes na região, envolvendo tanto reservatórios de vertebrados como os insetos vetores.

O presente estudo em conjunto com outros estudos, demonstra que a presença deste parasito na região metropolitana de São Paulo tem grande significado porque essa região é considerada a quarta maior região do mundo em densidade populacional, o que levou à elevada concentração de animais de

estimação^{20,21}. Portanto, é essencial planejar e implementar políticas públicas de vigilância epidemiológica que ofereçam alternativas razoáveis e viáveis para prevenir a expansão geográfica da doença, o que diminuiria a incidência e prevalência da leishmaniose visceral.

CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que *Leishmania infantum* foi diagnosticada em cães oriundos de Cotia, Juquitiba e Itapeverica da Serra por meio de diagnósticos sorológicos e em Cotia e Itapeverica da Serra por testes moleculares. Este é o primeiro estudo a demonstrar a presença de *Leishmania infantum* em Itapeverica da Serra.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) processo número 302145/2018-4 e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), código financiamento 001.

REFERÊNCIAS

1. Akhoundi M, Downing T, Votypka J, Kuhls K, Lukes J, Cannet A, et al. *Leishmania infections: molecular targets and diagnosis*. Mol Aspects Med 2017 Oct; 57:1-19. doi: 10.1016/j.mam.2016.11.012
2. Marcili A, Sperança MA, da Costa AP, Madeira MF, Soares HS, Sanches COCC, et al. Relações filogenéticas de espécies de *Leishmania* com base no código de barras de tripanossomatídeos (SSU rDNA) e genes gGAPDH: Revisão taxonômica de *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* na América do Sul. Infect Genet Evol 2014 July;25;44-51. doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.001
3. Silva RE, Sampaio BM, Tonhosolo R, da 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 Oct;19(1);1-9. doi: 10.1186/s12879-019-4463-8
4. Foratini OP, Rabello EX, Pattoli DGB. Sobre o encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) no Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saude Publica 1970 Jun;4(1);1. doi: 10.1590/S0034-89101970000100014.
5. Galvis-ovallos F, Silva MD, Bispo GBS, Oliveira AG, Gonçalves Neto JR, Malafronte RS et al. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of Sao Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. Parasite 2017;24(2);1-10. doi: 10.1051/parasite/2017002
6. Rossi CN, Tomokane TY, Batista LFS, Marcondes M, Larsson CE, Laurenti MD. *In situ* Cutaneous cellular immune response in dogs naturally affected by visceral leishmaniasis. Ver Inst Med trop S Paulo 2016;58(48);1-8. doi.org/10.1590/S1678-9946201658048
7. Araujo AC, Costa AP, Silva IWG, Matos NNVG, Dantas ACS, Ferreira F, et al. Epidemiological aspects and risk factors for infection by *Leishmania infantum chagasi* in dogs from municipality of Petrolina, Northeastern Brazil. Vet Parasitol Reg Stud Rep 2016 Jun;3-4;41-48. doi: 10.1016/j.vprsr.2016.07.001
8. Moshfe A, Mohebbi M, Edrissian G, Zarei Z, Akhoundi B, Kazemi B, Jamshidi S, et al. Canine visceral leishmaniasis: asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. Acta Trop 2009 Nov;112(2);101-105. doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.004
9. Laurenti MD. Correlação entre o diagnóstico parasitológico

- co e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. BEPA, Bol. epidemiol. paul. (Online) [periódico na Internet]. 2009 Jul [citado 2021 Mar 29];6(67):13-23. Disponível em: http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-42722009000700002&lng=pt
10. Zanette MF, Lima VMF, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RFC, et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. Ver Soc Bras Med Trop 2014 Jan-Feb;47(1);105-107. doi.org/10.1590/0037-8682-1723-2013
 11. Hirschmann LC, Brod CS, Simon CF, Recuero ALC. Leishmaniose Visceral Canina: comparação de métodos sorológicos em cães de área indene do Rio Grande do Sul Brasil. Rev patol trop 2015;44(1);33-44. doi:10.5216/rpt.v44i1.34799
 12. Cardim MFM, Guirado MM, Dibo MR, Neto FC. Visceral leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil: Spatial and space-time analysis. Ver Saude Publica 2016; 16;1-11. doi: 10.1590/s1518-8787.2016050005965
 13. Benchimol JL, Gualandi FC, Barreto DCS, Pinheiro LA. Leishmanioses: sua configuração histórica no Brasil com ênfase na doença visceral nos anos 1930 a 1960. Bol Mus Para Emilio Goeldi Cien Hum 2019 Nov;14(2);611-626. doi.org/10.1590/1981.81222019000200017
 14. Gomez SA, Picado A. Systemic insecticides used in dogs: potential candidates for phlebotomine vector control? Trop Med Int Health 2017 Jun;22(6);755-764. doi: 10.1111/tmi.12870.
 15. WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Leishmaniasis [accessed: apr 08,2020]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
 16. Faria AR, Andrade HM. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. Rev Pan-Amaz Saude [Internet]2012 Jun; [citado 2020 Nov 5];3(2):47-57. doi: 10.5123/s2176-62232012000200007.
 17. Grimaldi JR G, Teva A, Ferreira AL, Santos CB, Pinto IS, Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 2012 Jan;106(1);54-59. doi: 10.1016/j.trstmh.2011.10.001.
 18. Laurenti MD, de Santana Leandro MV Jr, Tomokane TY, De Lucca HR, Aschar M, Souza CS, et al. Comparative evaluation of the DPP(®) CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. Vet Parasitol. 2014 Oct;205(3-4):444-50. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.09.002
 19. Teixeira AIP, Romero GAS. Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A challenge for current and future tests. Mem Inst Oswaldo Cruz 2019;114(1);1-9. doi: 10.1590/0074-02760180452
 20. Marcili A, da Silva RE, Costa VP, Nieri-Bastos FA, Azevedo RCF, Filho JM, et al. Canine Visceral Leishmaniasis in São Paulo, Brazil, the Most Populous City of South America: Isolation, Molecular Diagnosis, and Phylogenetic Inferences. Vector-borne and Zoonotic Diseases, 2020; Volume 20, Number 10. <https://doi.org/10.1089/vbz.2020.2638>
 21. Silva RE, Costa AP, Tonhosolo R, Molla LM, Filho JM, Marcili A, et al. Detection of *Leishmania infantum* in dogs (*Canis familiaris*) from São Paulo municipality, Brazil. Brazilian Journal of Global Health. 2020; 1(1), 61-63.