

Universidade Santo Amaro

**Diagnóstico sorológico e molecular de Leishmaniose Canina e
isolamento de parasitas do gênero *Leishmania* em cães do
município de Itapecerica da Serra, Cotia e Juquitiba, São Paulo.**

Camila de Abreu Aires Ribeiro Costa

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili

São Paulo - SP

2020

Camila de Abreu Aires Ribeiro Costa

Diagnóstico sorológico e molecular de Leishmaniose Canina e isolamento de parasitas do gênero *Leishmania* em cães do município de Itapequerica da Serra, Cotia e Juquitiba, São Paulo.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina e Bem-Estar Animal.

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili

SÃO PAULO, 2020

C87 Costa, Camila de Abreu Aires Ribeiro

Diagnóstico sorológico e molecular de Leishmaniose Canina e isolamento de parasitas do gênero *Leishmania* em cães do município de Itapeverica da Serra, Cotia e São Paulo / Camila de Abreu Aires Ribeiro. – São Paulo, 2020.

67 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Medicina e Bem-Estar Animal) – Universidade Santo Amaro – 2020.

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili

1. Leishmaniose. 2. Trypanosomatídeos. 3. Leishmaniose canina. 4. *Leishmania (L.) infantum*. I. Marcili, Arlei, orient. II. Universidade Santo Amaro III. Título

Camila de Abreu Aires Ribeiro Costa

Diagnóstico sorológico e molecular de Leishmaniose Canina e isolamento de parasitas do gênero *Leishmania* em cães do município de Itapequerica da Serra, Cotia e Juquitiba, São Paulo.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina e Bem-Estar Animal.

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili.

São Paulo, 03 de dezembro de 2020

Banca Examinadora

Prof. Dr. Arlei Marcili

Prof. Dra. Fernanda Nieri Bastos

Prof. Dr. Herbert Soares

Conceito final: _____



Programa de Pós-graduação Stricto Sensu

Medicina Veterinária - Mestrado

Ata de Dissertação

Ao terceiro dia do mês de dezembro do ano de dois mil e vinte , via Webconferência, conforme Regimento Geral e Regulamento de Pós-graduação da UNISA teve início às 14h00min, o exame de Defesa de Dissertação intitulada "Diagnóstico sorológico e molecular de Leishmaniose Canina e isolamento de parasitas do gênero Leishmania em cães do município de Itapetecica da Serra, Cotia e Juquitiba, São Paulo" . Do(a) mestrando(a) Camila de Abreu Aires Ribeiro da Costa , regularmente matriculado(a) no programa de Mestrado em Medicina Veterinária. Os requisitos exigidos foram cumpridos conforme registros constantes nos arquivos da Secretaria de Pós-graduação segundo encaminhamento do Prof. Doutor Rafael Garabet Agopian, Coordenador do Programa. Os trabalhos foram instalados pelo presidente da banca examinadora e orientador Prof. Doutor Arlei Marcili, Pós-doutorado em Ciências Biológicas pelo Instituto de Ciências Biomédicas na Universidade de São Paulo, que foi constituída pelos seguintes professores: Prof. Doutor Herbert Sousa Soares, Pós-Doutorado em Medicinas Agrárias pelo Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ USP, Brasil. Profa. Doutora Fernanda Aparecida Nieri Bastos, Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada as Zoonoses pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP. A banca examinadora, tendo decidido aceitar a pesquisa, passou à arguição do(a) aluno(a). Encerrados os trabalhos, deram o parecer final conforme consta a seguir:

Prof. Doutor Arlei Marcili

Parecer: Aprovada

Assinatura:

Prof. Doutor Herbert Sousa Soares

Parecer: Aprovada

Assinatura:

Profa. Doutora Fernanda Aparecida Nieri Bastos

Parecer: Aprovada

Assinatura:

Campus Interlagos: Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340 - Jardim das Imbuías, São Paulo - SP

Campus Metrô Adolfo Pinheiro: Rua Isabel Schmidt, 349 - Santo Amaro, São Paulo - SP

Campus Metrô Marechal Deodoro: Rua Dr. Gabriel dos Santos, 30 - Santa Cecília, São Paulo - SP

PARECER N. 05/2019

Projeto de Pesquisa: "Diagnóstico sorológico e molecular de Leishmaniose Canina e isolamento de parasitas do gênero *Leishmania* em cães dos municípios de Itapeverica da Serra, Cotia e Juquitiba, São Paulo"

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Arlei Marcili

Camila de Abreu Aires Ribeiro Costa

Curso: Medicina Veterinária

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, coube a seguinte deliberação:

O Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (**CEUA-UNISA**), seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei federal nº 11.794 (Lei Arouca), as resoluções do CONCEA, que estabelecem os procedimentos para o uso científico de animais no país e a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo, deliberando pela **Pendência** do Projeto **"Diagnóstico sorológico e molecular de Leishmaniose Canina e isolamento de parasitas do gênero *Leishmania* em cães dos municípios de Itapeverica da Serra, Cotia e Juquitiba, São Paulo"**.

Pendências

- Alterar nos formulários, a data de início da vigência do projeto para após a aprovação da CEUA-UNISA.

- Incluir carta de ciência e aprovação dos responsáveis por cada um dos locais onde são mantidos os cães a serem investigados.

- As informações relacionadas ao número total de animais que serão investigados, bem como sua proveniência, não estão claras e não são as mesmas no projeto e no formulário unificado.

Uniformizar o número total de animais, caso não consiga informar com precisão, colocar o número máximo que poderá ser utilizado. No projeto fala-se em aproximadamente 200 cães, já no item 9.2 do formulário unificado a informação é de que serão utilizados 300 animais.

No projeto consta a informação de que o estudo será conduzido em um abrigo, porém cita três diferentes municípios. Não ficou claro se em cada um dos

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

municípios, um abrigo diferente será investigado. Já no formulário unificado, a informação é de que serão amostrados cães de um dos municípios e, no caso dos outros municípios, serão provenientes de abrigo.

São Paulo, 25 de março de 2019.



PROFA. DRA. VALERIA CASTILHO ONOFRIO

Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA
UNISA - Universidade Santo Amaro

**DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS
CIENTÍFICOS E DIDÁTICOS – DBCA
CONCEA**

5.2.9. Relatório de projetos ou protocolos

5.2.9.1. O responsável pelo projeto ou protocolo encaminhará a CEUA, ao final do estudo, um relatório de uso de animais. O relatório deverá conter informações básicas acerca do projeto ou protocolo baseando-se nos itens descritos no Anexo I (Formulário Unificado para Solicitação de Autorização para Uso de Animais em Ensino e/ou Pesquisa) da Resolução Normativa nº 04 do CONCEA, de 18 de abril de 2012.

VI. RESPONSABILIDADES DOS PESQUISADORES E PROFESSORES

VI.1. GERAIS

6.1.1. Pesquisadores e professores são responsáveis por todas as questões relacionadas ao bem-estar dos animais utilizados e devem agir de acordo com as exigências desta Diretriz. Essa responsabilidade se inicia quando os animais são alocados para uso em um projeto e se finaliza com término do mesmo.

6.1.2. Para garantir o bem-estar dos animais utilizados, os usuários de animais (pesquisadores, professores, alunos e técnicos) devem assegurar que a qualidade da supervisão do pessoal envolvido no cuidado e manejo dos animais usados esteja de acordo com a responsabilidade e com o nível de competência do pessoal.

6.1.3. Antes do início de qualquer atividade científica ou didática envolvendo o uso de animais, os pesquisadores e professores devem enviar uma proposta à CEUA indicando que o planejamento do projeto ou protocolo se encontra de acordo com esta Diretriz, com a Lei nº 11.794 e seus instrumentos de regulamentação.

6.1.4. Pesquisadores, professores, alunos e técnicos não podem iniciar atividade científica ou didática envolvendo o uso de animais antes de obter a aprovação por escrito da CEUA, cumprindo todas as exigências solicitadas por esta.

6.1.5. Ao solicitar a aprovação para uma proposta, usuários de animais (pesquisadores, professores, alunos, técnicos) devem informar à respectiva CEUA sobre outras Instituições científicas ou didáticas participantes do projeto ou protocolo.

6.1.6. Pesquisadores, professores, alunos e técnicos envolvidos em projetos com animais devem disponibilizar meios para que possam ser contatados em casos de emergência.

6.1.7. Os pesquisadores e professores devem garantir que a escolha da espécie animal a ser utilizada encontra-se apropriada ao fim científico ou didático. Devem ser observadas as condições de padrão genético, a ausência de patógenos específicos, a documentação de padrão sanitário, os históricos nutricionais e ambientais, e outros fatores relevantes.

6.1.8. Pesquisadores, professores, alunos e técnicos devem registrar e manter todas as informações sobre o uso e o monitoramento de animais usados para fins científicos ou didáticos. Os registros devem, sempre que possível, incluir a origem e o destino dos animais, o tempo de permanência dos animais no projeto, os procedimentos realizados, o manejo dos animais e as medidas para promoção do bem-estar animal durante seu período em experimentação.

6.1.9. A aprovação da CEUA é obrigatória quando animais são utilizados para adquirir, desenvolver ou demonstrar conhecimentos e técnicas para fins científicos ou didáticos.

6.1.10. Quando animais de produção, domésticos ou de companhia forem utilizados para fins científicos ou didáticos e seus proprietários (ou terceiros) tiverem a responsabilidade pelo tratamento e cuidados diários, a descrição dessas responsabilidades do pesquisador ou professor, assim como as do proprietário do(s) animal(is) ou terceiros devem estar claramente definidas na proposta.

6.1.11. Quando cabível deve ser anexado à proposta o Termo de Consentimento – TC, assinado pelos responsáveis.

6.1.12. Nos casos em que cadáveres ou parte deles sejam oriundos de animais utilizados em experimentos, o profissional responsável pelo protocolo original deverá obter aprovação prévia da CEUA. Nos casos em que cadáveres ou parte deles tenham outra origem, o profissional responsável deve informar a procedência deles à CEUA.

“É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo do mais importante: nada nessa vida é por acaso, absolutamente nada! Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível. A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser!” (Chico Xavier)

Ao meu filho Mateus, por tudo que significa na minha vida,
 por ser como seu nome diz “presente de Deus”, o verdadeiro
 significado da minha existência, que me faz todo dia querer ser
 alguém melhor, que eu seja sempre um exemplo para você de
 trabalho e dedicação”

A Deus , aos meus pais Luiz e Beth e ao meu marido Ricardo, todo agradecimento que existe no meu coração por sempre me apoiarem, sendo muitas vezes meus braços para eu dar conta de tudo, meus pais por serem meus exemplos de dedicação, trabalho , por fazerem tanto por nós e ao meu marido que nesta vida já segurou minha mão muitas vezes, em todos os sentidos, me dando força , amor, coragem para continuar nos momentos difíceis, cuidando de mim com tanto carinho! Não sou nada sem vocês!

Por animais, com todo meu amor, carinho e compaixão!

AGRADECIMENTOS

Um dia o mestrado era um sonho, hoje já é o término de uma realidade da qual muitas pessoas participaram desde antes dele começar.

Primeiramente a Deus, pela oportunidade da vida, a oportunidade de ser médica veterinária e exercer a profissão que tanto amo, pois nela tenho a oportunidade de conviver com os animais, do qual eu realmente amo e respeito!

Mateus, meu filho, o meu agradecimento é diário a Deus por me conceder a honra de ser mãe de um menino como você, palavras não seriam suficientes para descrever o amor que tenho dentro de mim meu menino sorridente!

A minha família, meus pais, sobrinhos queridos que muito os amo, Sophia, Pietra, Heloísa e João, meu irmão Rodrigo, minha amiga Dani, cunhadas e cunhados, sogro e sogra por todo apoio e compreensão, por todos os não que ouviram para eventos familiares pois eu tinha que estudar...

Meus pais, a base de tudo desta vida, amo vocês incondicionalmente, sempre vou cuidar de vocês! Minha mãe, minha auxiliar de cirurgia, minha melhor amiga, minha companheira de jornada com os animais!

Meu marido Ricardo, meu amor, que em 2019 mostrou todo seu amadurecimento e amor por mim, tendo enfim entendido que juntos somos mais fortes e mais felizes, para que em 2020 recomeçássemos novamente de uma nova forma, e lutando juntos, dia após dia pelos nossos sonhos junto como o nosso pequeno Mateus!

Ao meu professor e orientador Arlei Marcili por todos ensinamentos, por toda paciência, por nos mostrar que somos capazes, pelas broncas que nos fazem crescer, por segurar nas nossas mãos e seguir este projeto até o fim, mesmo com as dificuldades, sempre estava lá para me ajudar! Meu agradecimento por dividir todo o seu conhecimento comigo!

Aos amigos que fiz ao longo desta caminhada, aos meus amigos de sala, por tantas risadas nas aulas presenciais, por sempre um ajudar ao outro! E em especial as que se tornaram grandes amigas, Denise, Daniela e Milena, vocês foram primordiais para esta conquista, em meio a tantos choros e risadas por

todos os motivos nestes 2 anos, nós 4, uma sempre segurou a mão da outra e seguimos juntas! Foi muito bom Deus permitir este encontro! Obrigada meninas de coração, com vocês no mesmo barco ficou mais fácil dividir as angústias e compartilhar as alegrias!

Agradecimento especial a ONG Adote um Amicão, representada pela Jozian Quental, presidente da Ong, que abriu as portas dos abrigos para que eu pudesse coletar sangue dos animais, sempre me ajudando nas dúvidas sobre eles, permitindo que eu usasse seus queridos animais para estudo.

Ao pessoal do grupo de pesquisa Tryp/Leish Usp/Unisa. E, em especial à Roberta por toda ajuda com meu trabalho, por ter me tirado tantas dúvidas, sempre disposta a me ajudar, sendo um exemplo para mim, a Giovanna, pela paciência e ajuda nas análises laboratoriais, e ao Caio, um amigo “leishmaniótico” que fiz ao longo desta jornada que me ajudou muitas vezes e eu espero ter o ajudado também!

A UNISA e todos os professores, mestres e doutores, que nos ensinaram tanto e que cada um saiba que nos espelhamos em vocês! Meu muito obrigada por todo ensinamento compartilhado!

A equipe veterinária do plano espiritual que sempre guia meus passos e me orienta para eu tomar as decisões mais assertivas, estamos sempre juntos!

Aos que me ajudaram indiretamente mas foram primordiais, Seu Osvaldo que há tantos anos me ajuda nesta caminhada como veterinária, a Dorinha que cuida da minha casa e do meu filho para que eu consiga viver esta vida louca que vivo!

Que Deus ilumine a todos!

RESUMO

As leishmanioses são antroponoses consideradas um grande problema de saúde pública e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. Elas parasitam mamíferos e possuem ciclos de vida com alternância entre vertebrados e invertebrados. A maioria das espécies se desenvolve em artrópodes hematófagos, que podem pertencer a diversas ordens e famílias. A Leishmaniose visceral é uma importante zoonose e possui canídeos silvestres e domésticos como importantes reservatórios conhecidos e a diversidade genética de *Leishmania infantum* no Brasil ainda não é conhecida. Leishmaniose 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 de infecção. O objetivo deste projeto é avaliar a presença de parasitas do gênero *Leishmania* no município de Itapecerica da Serra, Cotia e Juquitiba através do isolamento e diagnóstico molecular. Foram amostrados 153 cães do município do abrigo da ONG Adote um Amicão de Itapecerica da Serra, Cotia e Juquitiba. O diagnóstico sorológico foi realizado dos 153 cães através do método de imunocromatográfico DPP®, destes 9,80 % (15/153) foram positivos para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* pelo método de imunocromatografia (DPP®). A positividade foi de 9,52% (4/42), 13,33% (4/30) e 8,64% (7/81) nos municípios de Cotia, Itapecerica da Serra e Juquitiba, respectivamente. Sequencialmente o diagnóstico molecular foi realizado em amostras de sangue dos mesmos cães através do gene da catepsina L-like, destes 5,33% (8/153) foram positivos para a pesquisa de *Leishmania infantum*. A positividade foi de 4,76% (2/42), 22,22 % (6/30) nos municípios de Cotia e Itapecerica da Serra, respectivamente. O exame parasitológico foi realizado através da punção por agulha fina de linfonodo poplíteo e sangue periférico total dos animais positivos no sorológico ou molecular, destes 0,66 % (1/153) foi positivo, este animal é oriundo de Itapecerica da Serra. Os testes moleculares específicos para *Leishmania infantum* demonstraram a presença do agente nos municípios de Cotia e Itapecerica da Serra. Além disso, atenta para uma nova classificação epidemiológica do município de Itapecerica de Serra e para implementação de protocolos de sanidade animal nos processos de adoção.

Palavras-chave: leishmaniose; Trypanosomatideos; leishmaniose canina; *Leishmania (l.) infantum*.

SUMMARY

Leishmaniasis are anthroponoses considered a major public health problem and represent a complex of diseases with an important clinical spectrum and epidemiological diversity. They parasitize mammals and have life cycles alternating between vertebrates and invertebrates. Most species develop in hematophagous arthropods, which can belong to different orders and families. Visceral Leishmaniasis is an important zoonosis and has wild and domestic canids as important known reservoirs and the genetic diversity of *Leishmania infantum* in Brazil is not yet known. Leishmaniasis is a severe disease with wide geographical distribution, with an incidence of two million cases per year and 350 million people in areas at risk of infection. The objective of this project is to evaluate the presence of *Leishmania* parasites in the municipality of Itapequerica da Serra, Cotia and Juquitiba through isolation and molecular diagnosis. 153 dogs were sampled from the municipality of the shelter of the NGO Adopt an Amicão from Itapequerica da Serra, Cotia and Juquitiba. The serological diagnosis was made of the 153 dogs using the DPP® immunochromatography method, of which 9.80% (15/153) were positive for the detection of anti-*Leishmania* antibodies using the immunochromatography method (DPP®). Positivity was 9.52% (4/42), 13.33% (4/30) and 8.64% (7/81) in the municipalities of Cotia, Itapequerica da Serra and Juquitiba, respectively. Sequentially, the molecular diagnosis was carried out on blood samples from the same dogs using the L-like cathepsin gene, of which 5.33% (8/153) were positive for *Leishmania infantum*. Positivity was 4.76% (2/42), 22.22% (6/30) in the municipalities of Cotia and Itapequerica da Serra, respectively. The parasitological examination was carried out by puncture with a fine needle of popliteal lymph node and total peripheral blood of the serological or molecular positive animals, of which 0.66% (1/153) was positive, this animal is from Itapequerica da Serra. The specific molecular tests for *Leishmania infantum* demonstrated the presence of the agent in the municipalities of Cotia and Itapequerica da Serra.

In addition, it is attentive to a new epidemiological classification of the municipality of Itapequerica de Serra and to the implementation of animal health protocols in the adoption processes.

Keywords: leishmaniasis; Trypanosomatides; canine leishmaniasis; Leishmania (l.) Infantum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Leishmania</i> : forma amastigota.....	21
Figura 2 - <i>Leishmania</i> : forma promastigota.....	22
Figura 3 - <i>Lutzomyia longipalpis</i>	26
Figura 4 - Status de endemidade da leishmaniose visceral em 2018.....	30
Figura 5 - Status de endemidade de leishmaniose cutânea mundial em 2018.....	31
Figura 6 - Casos de leishmaniose visceral nos países com maior número de casos, Américas, 2001-2017.....	33
Figura 7 - Casos de Leishmaniose Visceral por UF (unidade federal) de infecção.....	34
Figura 8 - Casos de Leishmaniose Visceral por município de infecção.....	34
Figura 9 - Classificação dos municípios para a vigilância e controle da leishmaniose visceral no estado de São Paulo.....	39
Figura 10 - Distribuição de municípios segundo a classificação epidemiológica para leishmaniose visceral em dezembro de 2017, Estado de São Paulo.....	41
Figura 11 - Mapa do Estado de São Paulo destacando a região metropolitana de São Paulo.....	50
Figura 12 - Mapa da região metropolitana de São Paulo mostrando a proximidade entre as cidades de Cotia, Itapeverica da Serra e Juquitiba....	51
Figura 13 - Abrigo da ONG Adote um Amicão localizado no município de Juquitiba.....	52
Figura 14 - Abrigo da ONG Adote um Amicão localizado no município de Juquitia.....	52

Figura 15 - Abrigo da ONG Adote um Amicão localizado no município de Juquitiba.....53

Figura 17 - Mapa da região metropolitana de São Paulo onde em cada cidade há uma marcação em círculo colorido de cada caso positivo naquela cidade.....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de animais positivos por cidade e representatividade naquela quantidade de cães amostrados.....	56
--	-----------

Lista de abreviaturas

BAB	Blood Agar Base
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPP	Dual Path Plataform
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (enzyme-linked immunosorbent assay)
gGAPDH	Proteína Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
gp63	Proteína de Superfície 63
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação da Cadeia de Polimerase (Polimerase Chain Reaction)
RIFI	Reação de imunofluorescência
RPMI	Meio de cultura L-Aanil-L-Glutamina
SSUrRNA	Ácido Desoxirribonucleico da Pequena Unidade Ribossomal (Small Subunit Ribossomal Ribonucleic Acid)
TAE	Tris-Acetato-EDTA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 VETORES.....	24
1.2 SITUAÇÃO MUNDIAL.....	29
1.3 SITUAÇÃO NA AMÉRICA DO SUL.....	31
1.4 SITUAÇÃO NO BRASIL.....	33
1.4.1 HISTÓRIA DA LEISHMANIOSE NO BRASIL.....	35
1.4.2 SITUAÇÃO NO ESTADO DE SÃO PAULO.....	37
1.5 EXAMES LABORATORIAIS.....	42
1.5.1 TESTES SOROLÓGICOS.....	42
1.5.2 TESTES MOLECULARES.....	44
1.5.2.1 Catepsina L-like.....	44
2. JUSTIFICATIVA.....	48
3. OBJETIVO.....	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1 Área de estudo e obtenção das amostras.....	50
4.2 Obtenção do material.....	53
4.3 Triagem sorológica.....	54
4.4 Extração do DNA.....	54
4.5 Diagnóstico molecular.....	54
4.6 Isolamento de parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	55
5. RESULTADOS.....	56
6. DISCUSSÃO.....	58
7. CONCLUSÃO.....	61
8. BIBLIOGRAFIA.....	62

1. INTRODUÇÃO

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 Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (BRASIL, 2017).

As leishmanioses são de distribuição mundial, de evolução insidiosa, de caráter crônico, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que inclui várias espécies, na qual pode ocorrer manifestações tanto viscerais como tegumentares. São, classicamente, subdivididas em duas formas, segundo o agente envolvido: a leishmaniose tegumentar, que apresenta manifestações cutâneas (localizada ou difusa), em mucosas e/ou zonas mucocutâneas, e a leishmaniose visceral, com alterações sistêmicas e/ou tegumentares (ROSSI, 2013). Há relatos de pelo menos 30 espécies diferentes de *Leishmania* distribuídas pelo Velho e Novo Mundo (LOPES et al., 2016). A doença é transmitida de cães infectados para humanos através da picada de algumas espécies de dípteros sugadores de sangue, conhecidas coloquialmente como flebotomíneos (GOMEZ & PICADO, 2017).

O agente trata-se de um protozoário pleomórfico da ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania* (SILVA, 2018). As espécies de *Leishmania* são divididas em decorrência à sua distribuição geográfica: *L. (Viannia)* é composta por espécies restritas aos neotrópicos e *L. (Leishmania)* possui espécies distribuídas no Novo e no Velho Mundo (MARCILI et al., 2014). *Leishmania sp* é um protozoário pleomórfico que completa seu ciclo de vida em dois hospedeiros distintos, sendo um vertebrado, principalmente canídeos, murídeos e humanos, nos quais o parasito apresenta-se sob a forma aflagelada, denominada amastigota (Figura 1), que se multiplica no interior das células do sistema mononuclear fagocitário por divisão binária. O outro hospedeiro é invertebrado, representado por insetos hematófagos, nos

quais as amastigotas, após serem ingeridas por ocasião do repasto sanguíneo, transformam-se, no tubo digestório, em formas flageladas, denominadas promastigotas (Figura 2), que, na sequência, após quatro dias, já podem ser transmitidas a novo hospedeiro, como formas promastigotas metacíclicas, indivisíveis e dotadas de alta mobilidade, que passam a ser a forma infectiva para os vertebrados durante o repasto sanguíneo (ROSSI, 2013). As diferenças na organização celular entre amastigota e promastigota estão centradas na posição do cinetoplasto em relação ao núcleo celular, bem como na presença ou ausência de um flagelo livre associado à membrana ondulante (SILVA, 2018). Então a forma promastigota é encontrada em vetores de artrópodes, representados por insetos do grupo flebotomíneo, enquanto as formas amastigotas são encontradas dentro de células do sistema fagocítico mononuclear de hospedeiros vertebrados, como roedores, marsupiais, morcegos, canídeos e humanos (SILVA et al., 2019).

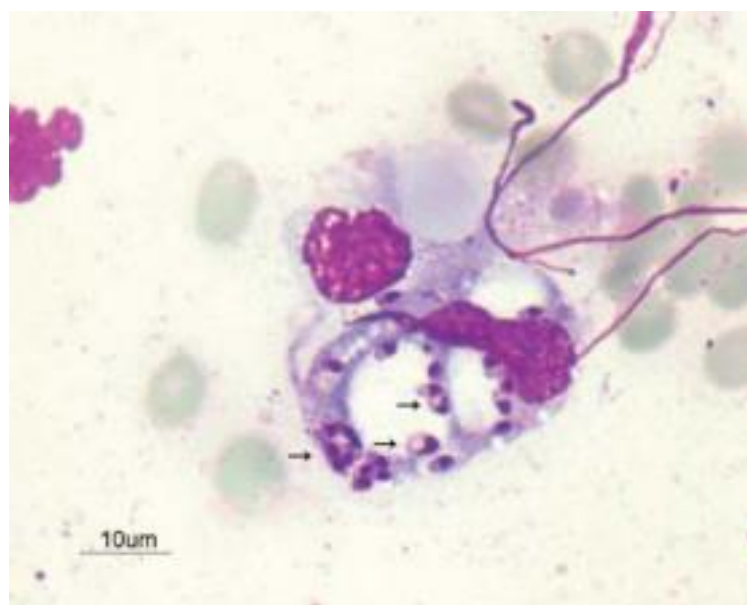


Figura 1: *Leishmania* – forma amastigota

Fonte: Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose IOC – Fiocruz , Brasil para Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas (OPAS, 2019)

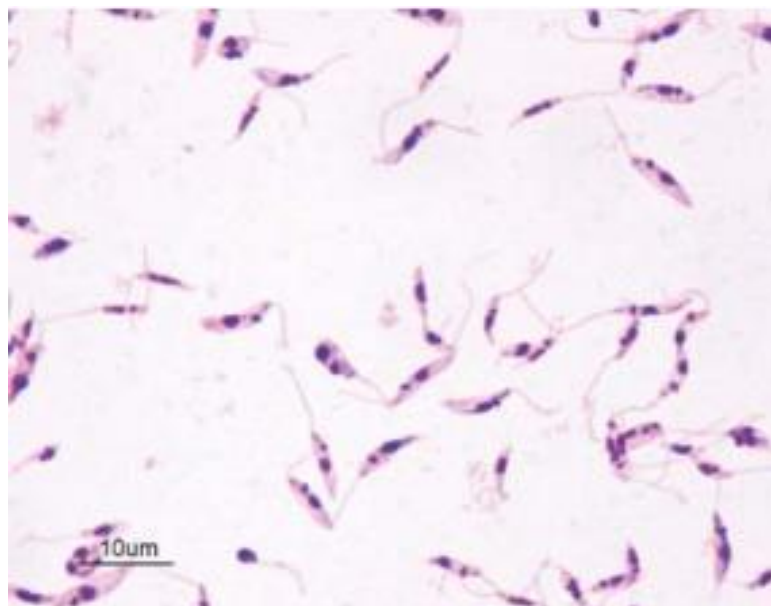


Figura 2: *Leishmania* - Forma promastigota

Fonte: CLIOC – IOC – Fiocruz, Brazil para Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas (OPAS, 2019)

Epidemiologicamente, os cães são considerados os principais reservatórios domésticos de *Leishmania* sp, sendo preponderante a sua participação para a manutenção do ciclo da doença, constituindo-se, assim, no principal elo na cadeia de transmissão da Leishmaniose Visceral (LV). Essa hipótese baseia-se nos fatos da enfermidade ser mais prevalente na população canina, relativamente à humana, e na constatação de que os casos humanos normalmente são precedidos por casos caninos, pois estes últimos apresentam uma quantidade muito maior de parasitos por área tegumentar, relativamente ao evidenciado em humanos infectados, levando a maior possibilidade de infecção do vetor pela *Leishmania infantum* e daí a transmiti-la a suscetíveis humanos (ROSSI, 2013; ARAUJO et al., 2016). Além disso, a doença é mais prevalente em caninos, por sua estreita relação com os seres humanos (DE LIMA et al., 2017).

Finalmente, destaca-se o fato de que tanto cães sintomáticos quanto assintomáticos apresentam igual importância como fonte de infecção aos flebotomíneos hematófagos, incluindo cães subcl clinicamente infectados (ROSSI, 2013; ARAUJO et al., 2016).

O complexo *Leishmania* que inclui todas as espécies capazes de causar sintomatologia visceral principalmente e tegumentar possui ampla distribuição (Velho e Novo Mundo). Assim, para o entendimento das relações destas diferentes espécies e diferentes origens geográficas foram realizados diversos estudos utilizando vários marcadores moleculares, como o espaçador interno transcrito do gene ribossômico (MAURICIO et al., 2004; KUHLS et al., 2008), gp63 (MAURICIO et al., 2001; QUISPE TINTAYA et al., 2004), mini-exon (MAURICIO et al., 2004), cisteíno proteases (QUISPE TINTAYA et al., 2004), citocromo oxidase II (IBRAHIM et al., 2001) e microsatélites (KUHLS et al., 2007; LUKES et al., 2007). Estes estudos demonstram uma clara associação das espécies do complexo *Leishmania donovani* com a origem geográfica dos isolados, mas não possibilitavam a separação de *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi*.

Estudo recente baseado em relações filogenéticas dos genes SSU rDNA e gGAPDH com diversos isolados brasileiros e europeus possibilitou a separação de *Leishmania infantum chagasi* de *Leishmania infantum* e sugere um evento recente de introdução, provavelmente no processo de colonização de *Leishmania infantum* no Novo Mundo através dos valores de divergência destas sequências e história evolutiva de seus hospedeiros vertebrados (MARCILI et al., 2014) contrastando com o cenário de introdução mais antiga com *L. chagasi* sendo uma espécie nativa das Américas (LAINSON E SHAW, 1987).

Segundo Silva et al. (2019) *Leishmania infantum* foi introduzida nas Américas durante o período de colonização. Mesmo entre biomas com climas diferentes, chuvas, cobertura vegetal e disponibilidade de hospedeiros e vetores de artrópodes, ele corrobora a teoria de que esse parasita não é autóctono para as Américas. Essa descoberta indica que o evento que levou à introdução desse parasita no Novo Mundo foi recente. Portanto, provavelmente pode ser datado do processo de colonização ibero-americana iniciado no século XV, causado pela chegada de cães e roedores infectados. Focando apenas alguns genes específicos, podemos especular que esse curto intervalo de tempo evolutivo seria insuficiente para o aparecimento e fixação de possíveis mutações na população. Segundo o se estudo refuta-se a hipótese de um cenário em qual o parasita responsável pelos casos de leishmaniose visceral é nativo das

Américas. Assim, o argumento de que o parasita é autóctono, por ser adaptado ao parasitismo em outros reservatórios da fauna silvestre, atribuindo a isso a adaptação aos hábitos alimentares ecléticos dos insetos vetores.

A Leishmaniose pode ser classificada em cutânea, mucocutânea e visceral. Grande parte da etiologia da leishmaniose mucocutânea foi atribuída a *Leishmania braziliensis* e *Leishmania panamensis*, da leishmaniose em mucosa foram atribuídas a *Leishmania guyanensis*, e da leishmaniose cutânea a *L. amazonensis* e *Leishmania mexicana* (SILVA et al., 2019).

Apesar da alta importância desta doença, há alguma dificuldade em padronizar metodologias de diagnóstico com altos valores preditivos. Fazer um diagnóstico direto é invasivo e trabalhoso, e apenas baixos níveis de sensibilidade são atingidos. Os testes sorológicos também apresentam uma série de limitações técnicas, como baixos valores de especificidade resultantes de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, baixos índices de concordância entre os diferentes testes sorológicos e falta de consenso quanto à natureza e ao uso do produto antigênico a ser empregado (SILVA et al., 2019). A determinação da sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico para Leishmaniose Visceral Canina (LVC) tem sido um ponto discutível devido à dificuldade em estabelecer um padrão-ouro. O exame parasitológico permanece o padrão-ouro para o diagnóstico de LVC, e um resultado positivo em qualquer um dos outros testes de diagnóstico pode ser mal interpretado como falso positivo, devido à baixa sensibilidade do exame parasitológico. Assim, como é importante melhorar as estratégias para o diagnóstico de LVC, as amostras devem ser cuidadosamente selecionadas para evitar interpretações inadequadas dos resultados (LOPES et al., 2016).

1.1. VETORES

Nas Américas, apesar das 521 espécies de flebotomíneos reconhecidas, 60 foram implicadas como vetores de *Leishmanias* e apenas algumas são consideradas efetivamente vetores dos parasitas em questão.(GALVIS-OVALLOS et al., 2017).

No Brasil, a transmissão da leishmaniose visceral é realizada pela picada de fêmeas de insetos hematófagos pertencentes à ordem Díptera, da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gênero *Lutzomyia*, sendo a *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie envolvida (Figura 10). É ela conhecida popularmente como: cangalha, cangalhinha, orelha-de-veado, mosquito palha, birigui, tatuquira, tatuíra, bererê, catuqui, murutinga, escangalhado, asa branca, asa dura ou asa reta. Afora ela, a *Lutzomyia cruzi* parece também participar como vetor no estado do Mato Grosso do Sul, a *Lutzomyia intermedia*, no litoral do Município do Rio de Janeiro, a *Lutzomyia neivai* (*Nissomyia neivai*) e a *Lutzomyia sallesi* (*Evandromyia sallesi*) nas Minas Gerais. Alguns autores associam o período de maior transmissibilidade àquelas das estações chuvosas, quando os insetos invadem o domicílio picando o homem e outros animais domésticos. Existem outras formas de transmissão da LV, porém, até o momento, a presença do inseto vetor hematófago é considerado elemento essencial na cadeia de transmissão da doença (ROSSI, 2013).

No entanto, modos de transmissão alternativos estão sendo investigados e a transmissão de *Leishmania spp.* através de mordidas ou através da ingestão de pulgas e carrapatos infectados pode ser epidemiologicamente relevante em cães domésticos. Algumas evidências sugerem a possibilidade de que o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) poderia atuar como um vetor biológico ou mecânico de *L. infantum*. Além disso, estudos moleculares indicam a possibilidade de transmissão transovariana de *L. infantum* em *R. sanguineus*. Esses resultados destacam o potencial de *R. sanguineus* como vetor de *L. infantum*. No entanto, um problema que permanece por resolver é o motivo pelo qual o DNA de *L. infantum* está presente em carrapatos que se alimentam de animais infectados quando, até o momento, não foi possível isolar parasitas viáveis de *R. sanguineus* que se alimentavam de cães naturalmente infectados. Os espécimes de *R. sanguineus* que se alimentam de cães naturalmente infectados por *L. infantum* contêm DNA do parasita em seus intestinos e glândulas salivares. Além disso, é possível isolar *L. infantum* viável desse ectoparasita. No entanto, não se pode ainda confirmar ou presumir que os carrapatos são vetores potenciais de *L. infantum*. Mais estudos devem ser realizados para melhor entender a relevância desses achados para a potencial

competência de *R. sanguineus* na manutenção da transmissão da leishmaniose visceral (MEDEIROS-SILVA et al., 2015).

A incriminação de espécies como vetores envolve a análise de parâmetros de capacidade vetorial, como densidade vetorial, antropofilia, distribuição geográfica coincidente com a do patógeno, sobrevivência e competência vetorial, e provar que a espécie é essencial para a manutenção da transmissão na natureza e que a redução em sua taxa de picada também reduz a incidência da doença. Nas Américas, *L. longipalpis* é considerado o principal vetor de *L. infantum*. No entanto, a ocorrência de infecção por *L. infantum* em populações caninas e/ou humanas na ausência desta espécie de flebotomíneo, bem como a descoberta de outros flebotomíneos naturalmente infectados com esse agente sugeriram que há outros vetores, como ocorreu com o *Migonemyia migonei* no estado de Pernambuco (Brasil) e norte da Argentina (GALVIS-OVALLOS et al., 2017).



Figura 3: *Lutzomyia longipalpis*

Fonte: CDC/ James Gathany

Em Cotia e Embu das Artes, municípios da região metropolitana de São Paulo, casos de LVC são relatados desde 2003, mas *L. longipalpis* não foi encontrado nas pesquisas entomológicas realizadas nesses focos. Por outro lado, *Pintomyia fischeri* foi a espécie mais frequente (95%) coletada em estudos anteriores na Grande São Paulo, como *Migonemyia migonei*, *Psychodopygus*

lloydi e *Evandromyia edwardsi* também estão sendo relatados (GALVIS-OVALLOS et al., 2017).

Desde o primeiro relatório em áreas urbanas do estado de São Paulo o vetor principal de *L. infantum* foi *L. longipalpis*, tanto para o primeiro caso canino como para o primeiro caso humano. A área afetada pela Leishmania Visceral no noroeste do estado de São Paulo expandiu-se, em associação com a dispersão de *L. longipalpis*. No entanto, nos municípios de Carapicuíba, Cotia e Embu das Artes, na região da Grande São Paulo, existem outros padrões de transmissão associados a outros flebotomíneos que podem estar atuando em *L. infantum*, como também observado em outros focos de LV no Brasil. No foco da LVC na região da Grande São Paulo, as espécies suspeitas de flebotomíneos foram *P. fischeri* e *M. migonei*, em vista de sua dominância, mas não há evidências de sua capacidade vetorial com avaliação de critérios ecológicos das relações vetor-parasita e vetor-hospedeiro (GALVIS-OVALLOS et al., 2017).

Em um estudo de 2005 foi relatado que após investigações entomológicas implementadas nos municípios de Cotia e Embu das Artes detectaram a presença de *Lutzomyia fischeri*, *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia edwardsi*. Nesta última espécie, foram identificadas formas flageladas de *Leishmania* em cinco exemplares coletados de Cotia, posteriormente identificados, por PCR, como *Leishmania (V.) braziliensis*. Até então, *Lutzomyia edwardsi* havia sido registrada em poucas ocasiões, quando realizadas investigações entomológicas em decorrência de notificação de casos autóctones de leishmaniose tegumentar. Essa espécie de flebotomíneo já havia sido documentada, além da Região Metropolitana de São Paulo, em dois municípios situados no Litoral Norte, não sendo considerada espécie de importância epidemiológica mas faz-se necessária a continuação das investigações entomológicas para definir o papel dessa espécie nos ciclos de transmissão (CONTROLE & SUCEN, 2005).

Segundo um estudo de Moschin et al., (2013) na Serra da Cantareira, também região da Grande São Paulo houve altas frequências do *P. fischeri* e *M. migonei* podendo inferir que essas duas espécies possam estar transmitindo o agente do Leishmaniose nesta área. *P. fischeri* é a espécie mais abundante nesta região, com maior frequência na primavera e atividade durante a noite,

principalmente ao amanhecer, sendo os períodos de maior risco de transmissão por *Leishmania sp.* na área.

P. fischeri também predominou nos estudos pioneiros realizados no final da década de 1930 e início da década de 1940 na cidade de São Paulo (MOSCHIN et al., 2013).

P. fischeri, embora amplamente dispersa em todo o estado de São Paulo é escasso ou ausente na parte nordeste do estado, significativamente mais quente que outras áreas e com inverno seco. Porém, é nas florestas da Grande São Paulo que esta espécie tem as maiores frequências. Esse fato pode estar relacionado à altitude da região da Grande São Paulo (≈ 800 m) e sua cobertura vegetal, oferecendo condições especiais necessárias para o desenvolvimento de seus estágios imaturos, com temperatura e umidade de cerca de 20°C e 70-80%, respectivamente (MOSCHIN et al., 2013).

Observou-se que a atratividade de cães para *P. fischeri* foi maior que o de *M. migonei*, no entanto, parece que esse comportamento pode estar relacionado às frequências das espécies de vetores na área (GALVIS-OVALLOS et al., 2017).

É claro que *P. fischeri* tem uma eficiência mais baixa na transmissão de *L. infantum* que *L. longipalpis*, mas na ausência desta espécie, *P. fischeri* constitui um vetor potencial do agente da LVC na Grande São Paulo. No entanto, sua competência vetorial precisa ser mais investigada (GALVIS-OVALLOS et al., 2017).

O controle vetorial é provavelmente a maneira mais eficaz de prevenir a infecção por *Leishmania*. Por exemplo, um estudo realizado no Brasil mostrou que coleiras impregnadas de deltametrina têm potentes efeitos anti-alimentação e inseticidas no *L. longipalpis* e *L. migonei* e podem reduzir o risco de infecção em cães. O impacto dessa estratégia em uma comunidade depende da cobertura da coleira (ou seja, número de cães que usam a coleira em uma comunidade) e da taxa de perda. Na realidade, o uso de coleiras impregnadas de deltametrina não é muito popular entre os donos de cães que vivem em áreas rurais e suburbanas, provavelmente por causa de seus custos. Geralmente, as más

condições sociais e econômicas de muitos donos de cães que vivem em áreas rurais e suburbanas da América do Sul não lhes permitem suprir nem as necessidades básicas da vida. Talvez um controle sistemático de flebotomíneos nessas áreas usando coleiras impregnados com deltametrina deva ser substituído por outras estratégias (por exemplo, combinação local de permetrina e imidaclopride) poderiam ser possíveis, se apoiadas pelas autoridades locais de saúde pública (DANTAS-TORRES, 2009; GOMEZ & PICADO, 2017).

O uso de inseticidas sistêmicos em cães pode superar algumas das limitações impostas pelos métodos atuais de controle de vetores e podem ser uma alternativa ou complemento às dos países endêmicos. Devido à sua distribuição pelo corpo, os inseticidas sistêmicos devem matar os flebotomíneos que se alimentam do sangue dos cães, interrompendo a transmissão da Leishmaniose Visceral em áreas endêmicas. Semelhante ao sucesso da aplicação de coleiras, a cobertura de inseticidas sistêmicos precisa ser alta (por exemplo, 80%). Para obter cobertura adequada e garantir a máxima aderência ao tratamento, os inseticidas sistêmicos devem ser fáceis de aplicar e ter um efeito duradouro, idealmente de 3 a 6 meses (GOMEZ & PICADO, 2017).

1.2. SITUAÇÃO MUNDIAL

Classificadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como doenças tropicais negligenciadas, as leishmanioses são as únicas ainda em crescimento, e o Brasil é o país com maior número de casos das três formas de leishmaniose no continente americano: a cutânea, a mucocutânea e a visceral (WHO, 2020).

A Leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é fatal se deixada sem tratamento em mais de 95% dos casos. A maioria dos casos ocorre no Brasil, na África Oriental e na Índia. Estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorram em todo o mundo anualmente, com apenas 25 a 45% relatados à OMS. Continua sendo uma das principais doenças parasitárias com surto e potencial de mortalidade. Em 2018, mais de 95% dos novos casos relatados à OMS ocorreram em 10 países: Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (Figura 3). (WHO, 2020).

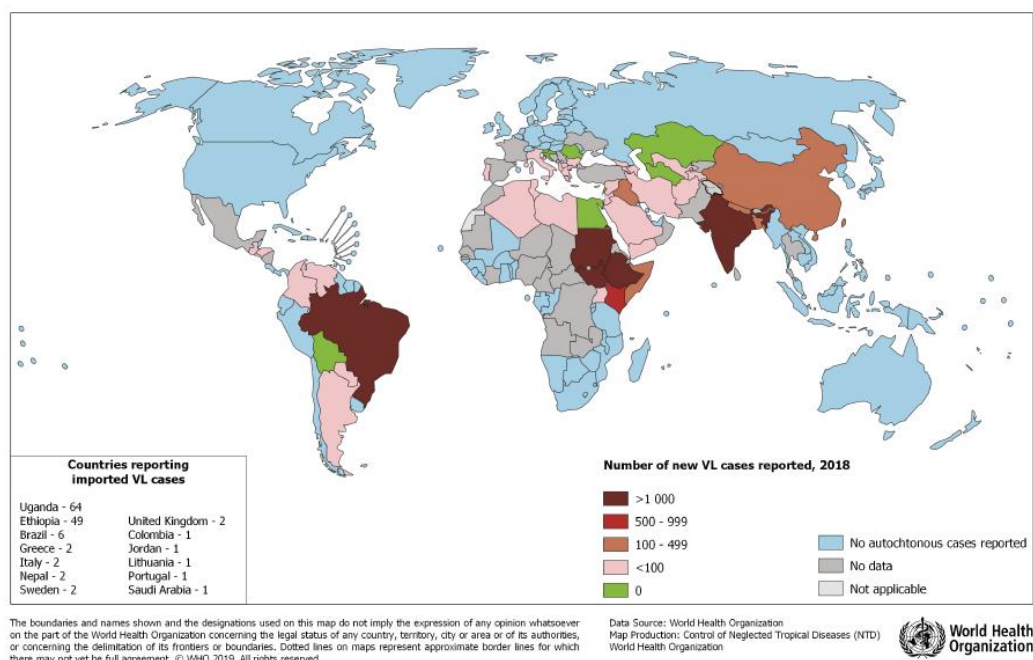


Figura 4: *Status de endemicidade da leishmaniose visceral em 2018*

Fonte: WHO, 2020

No velho mundo, as principais áreas endêmicas estão na região do Mediterrâneo, onde a Leishmaniose Visceral é principalmente um problema veterinário e os casos humanos ocorrem esporadicamente. Já no novo mundo, a Leishmaniose Visceral é considerada um problema de saúde humana (GOMEZ & PICADO, 2017).

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum de leishmaniose e causa lesões de peles. Cerca de 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Em 2018, mais de 85% dos novos casos de LC ocorreram em 10 países: Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Paquistão, República Árabe da Síria e Tunísia (Figura 4). Estima-se que entre 600.000 a 1 milhão de novos casos ocorram no mundo anualmente. (WHO, 2020).

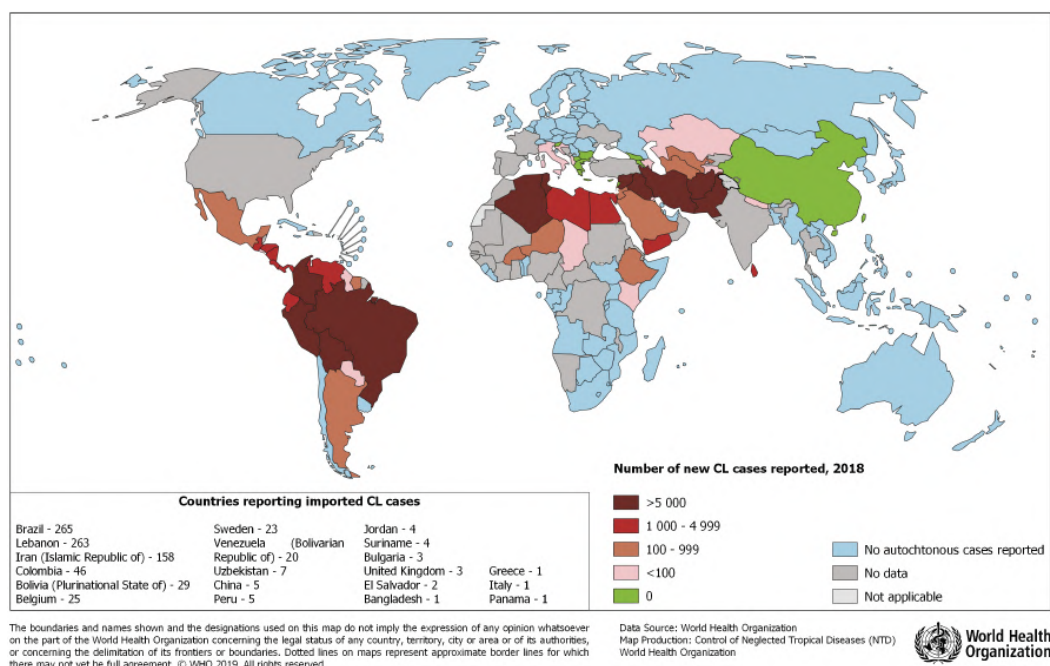


Figura 5: Status de endemidade de leishmaniose cutânea mundial em 2018

Fonte: WHO, 2020.

A leishmaniose mucocutânea leva à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta. Mais de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru. (WHO, 2020).

1.3. SITUAÇÃO NA AMÉRICA DO SUL

A América do Sul é um grande continente localizado no hemisfério ocidental. A maior parte de sua massa terrestre está situada na zona tropical (que se estende do equador até os paralelos norte e sul de 23 ° 30 '), proporcionando um ambiente muito adequado para muitos tipos de artrópodes (por exemplo, carrapatos, mosquitos e flebotomíneos) que podem atuar como vetores de vários patógenos. As pessoas que vivem na América do Sul estão expostas a várias doenças transmitidas por artrópodes, incluindo malária, leishmaniose e dengue. Da mesma forma, os cães também são afetado por muitas doenças transmitidas por artrópodes, incluindo erliquiose, babesiose, dirofilariose e leishmaniose (DANTAS-TORRES, 2009).

As espécies que causam leishmaniose na América Latina são divididas em dois grupos taxonômicos. Um grupo é o subgênero *Viannia*, que compreende as espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* e são responsáveis por infecções cutâneas ou mucocutâneas. O outro grupo é o subgênero *Leishmania*, que inclui as espécies *Leishmania (Leishmania) mexicana* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, responsável por lesões cutâneas localizadas ou difusas, e *Leishmania (Leishmania) infantum*, que causa leishmaniose visceral. Nas Américas, onze espécies dermatrópicas de *Leishmania* causam doenças em seres humanos e oito espécies descritas apenas em animais são atualmente reconhecidas (LOPES et al., 2016).

L. infantum é o agente causador mais importante da leishmaniose visceral canina na América do Sul. *Leishmania braziliensis* é o principal agente causador da leishmaniose cutânea em cães da América do Sul. A maioria dos cães infectados por *L. braziliensis* vive em áreas rurais e pode apresentar lesões cutâneas ou mucosas únicas. Suspeita-se que os cães desempenhem um papel no ciclo de transmissão doméstica de *L. braziliensis* e *L. peruviana* em algumas áreas da América do Sul, mas há apenas evidências circunstanciais que apóiam essa hipótese (DANTAS-TORRES, 2009).

A maioria das informações sobre a prevalência de infecção entre cães provém de pesquisas sorológicas realizadas no Brasil, e em menor grau, em outros países como Argentina, Colômbia e Venezuela. A infecção em cães na América do Sul pode variar amplamente de região para região e, de acordo com o método de diagnóstico usado, geralmente é superior a 25% e pode chegar a 75% em focos altamente endêmicos. No entanto, é difícil estimar a prevalência geral de infecção por *Leishmania* em cães na América do Sul devido à quantidade limitada de dados publicados de alguns países (por exemplo, Paraguai), à existência de diferenças metodológicas entre os estudos (por exemplo, tamanho da amostra e critérios de positividade) e as limitações inerentes à sorologia (por exemplo, possibilidade de reações cruzadas) (DANTAS-TORRES, 2009). Mas estima-se que a maioria dos casos ocorra no Brasil, com 4200 a 6300 casos por ano, seguidos pelo Paraguai (100 a 200 casos

novos por ano), Colômbia (70 a 110 casos novos por ano) e Venezuela. (50–70 novos casos por ano) (Figura 5) (ALVAR et al., 2012).

Uma importante característica epidemiológica observada na América do Sul (e também na bacia mediterrânea) é que a maioria dos cães infectados por *L. infantum* é aparentemente saudável, não exibindo sinais clínicos visíveis de leishmaniose visceral. Em alguns focos no Brasil, mais de 80% dos cães soropositivos podem ser clinicamente saudáveis. Esta informação pode ser relevante porque cães soropositivos, mas aparentemente saudáveis, também podem servir como fonte de infecção para flebotomíneos (DANTAS-TORRES, 2009).

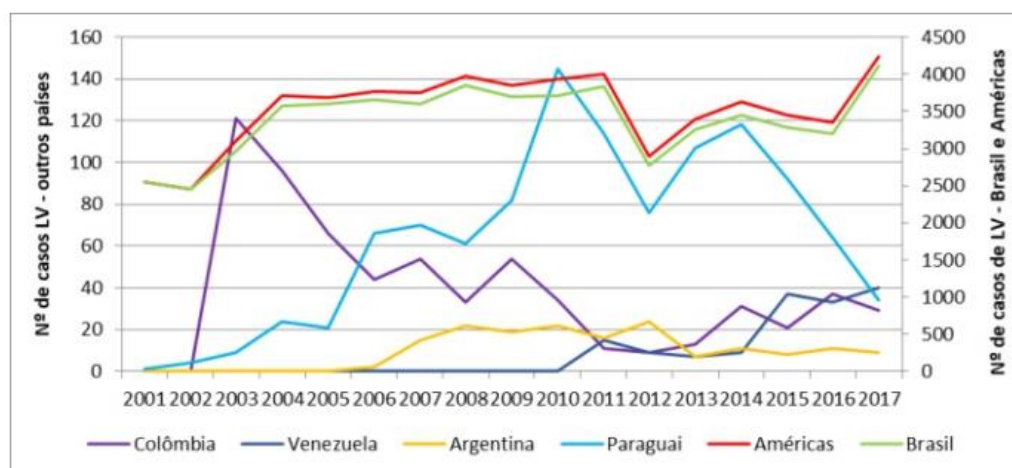


Figura 6: Casos de leishmaniose visceral nos países com maior número de casos, Américas, 2001-2017.

Fonte: SisLeish – OPAS/OMS: Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses/ Serviços de vigilância. Acesso em: abril, 2020

1.4. SITUAÇÃO NO BRASIL

No Brasil, casos humanos foram descritos nas cinco regiões do país (PEIXOTO et al., 2015) (Figuras 6 e 7), com mais de 3000 casos humanos por ano, é o país com a maior incidência de Leishmaniose Visceral no mundo. As autoridades brasileiras reconheceram a LV como um problema de saúde pública e adotaram uma série de medidas de controle desde 1980 (GOMEZ & PICADO, 2017). O coeficiente de incidência no Brasil é de 1,98 casos/ 100.000 habitantes

(BRASIL, 2017), sendo a espécie mais frequentemente encontrada é *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (LOPES et al., 2016).

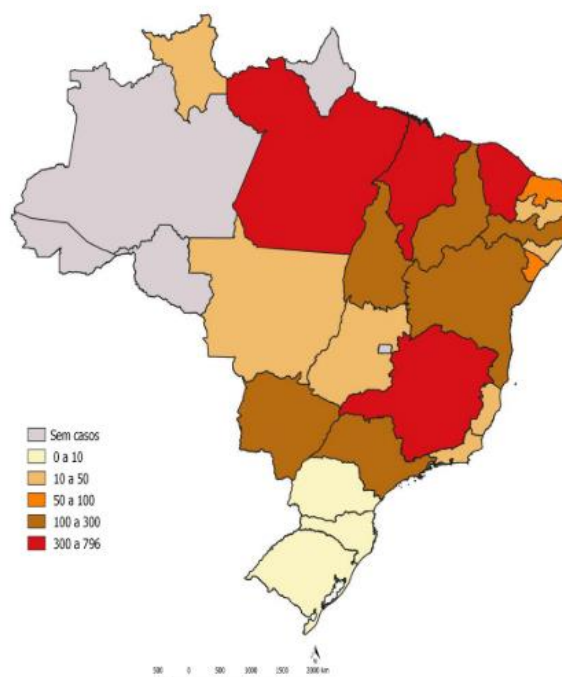


Figura 7: Casos de Leishmaniose Visceral por UF (unidade federal) de infecção

Fonte: (Brasil, 2017)

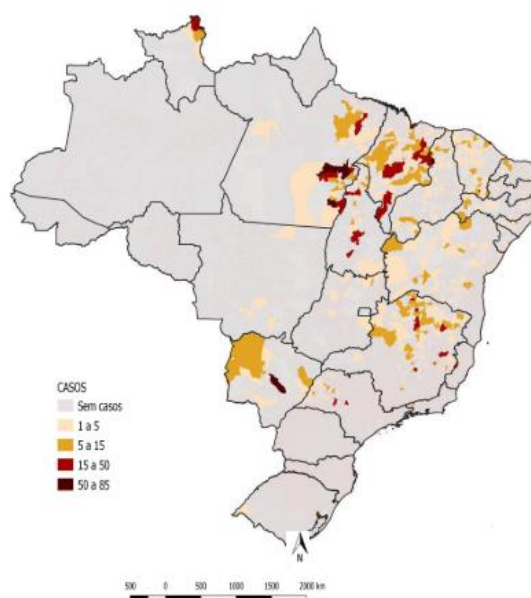


Figura 8: Casos de Leishmaniose Visceral por município de infecção

Fonte: (Brasil, 2017)

As intervenções dirigidas a cães no Brasil têm sido controversas. Cães infectados por *L. infantum* no Brasil que não puderam ser tratados foram eutanasiados por mais de 20 anos. Essa estratégia, com o objetivo de reduzir o reservatório de *L. infantum*, não resultou em uma diminuição significativa da incidência em casos humanos. Várias razões podem explicar essa falha, incluindo a baixa sensibilidade dos testes de rastreamento utilizados, a falta de conformidade e a substituição por cães suscetíveis. A aplicação de coleiras impregnadas de inseticida foi sugerido como uma alternativa econômica ao abate de cães para controle da Leishmaniose Visceral no Brasil (GOMEZ & PICADO, 2017).

No Brasil, existem aproximadamente 20 a 30 milhões de cães. Nas regiões endêmicas para LVC, a soroprevalência varia na população em geral, incluindo cães sintomáticos e assintomáticos, entre 3,4% e 40%, revelando o potencial de fiscalização da infecção canina como um marcador da transmissão e dos desafios emergentes (PEIXOTO et al., 2015).

Em relação a Leishmaniose tegumentar o Brasil registrou um aumento acentuado nos casos nas últimas décadas. Ao mesmo tempo, a ocorrência de diferentes padrões epidemiológicos dessa doença endêmica em diferentes regiões geográficas também foi observada. No Sudeste, com colonização antiga e presença de florestas residuais, a transmissão ocorre principalmente em habitats domiciliares ou peridomésticos (SOARES et al., 2017).

1.4.1. HISTÓRIA DA LEISHMANIOSE NO BRASIL

Houve um diagnóstico, em 1912, feito pelo médico paraguaio Migone Mieres (1913) em um morador de Mato Grosso, um italiano que havia trabalhado na construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil. Essa mesma ferrovia, quatro anos antes, fora palco de um surto de 'úlceras de Bauru', então reconhecida – pela primeira vez nas Américas – como leishmaniose tegumentar. E, em 1926, dois outros casos de leishmaniose visceral foram identificados na Argentina. Esses diagnósticos, todavia, ficaram como eventos isolados, em gritante contraste com centenas de casos de leishmaniose cutânea e mucocutânea descritos pelos médicos latino-americanos. A leishmaniose visceral irrompeu como problema de saúde pública em 1934, em meio a pesquisas de

rotina relacionadas a outra doença. O Serviço Cooperativo de Febre Amarela criara na Bahia, um laboratório para analisar fragmentos de fígado que centenas de postos de viscerotomia espalhados pelo país retiravam de pessoas falecidas de febres suspeitas. Em lâminas feitas com material colhido no Norte e no Nordeste do Brasil, negativas para febre amarela, o patologista Henrique Penna identificou protozoários do gênero *Leishmania*. Neste mesmo ano Evandro Serafim Lobo Chagaso identificou o primeiro paciente brasileiro diagnosticado com Leishmaniose visceral em vida, um adolescente de 16 anos que vivia em Aracaju, Sergipe (BENCHIMOL et al., 2019).

Em 1953, entretanto, irrompeu uma epidemia no norte do Ceará, a primeira documentada nas Américas, que alterou drasticamente as representações da leishmaniose visceral. Em apenas cinco anos (1953 a 1957), o total de casos in vivo no Brasil saltou de 34 para 1.832, 81,38% dos quais no Ceará. No continente americano, o total de casos subiu para 2.179 (1.840 em vida e 339 post-mortem), porém mais de 98% desse total (2.145 casos) pertenciam ao Nordeste do Brasil (BENCHIMOL et al., 2019).

No final do século XX (a partir dos anos 80), no Brasil e em outros países, todas as formas de leishmaniose que pareciam sob controle reemergiram em zonas rurais e urbanas e irromperam em áreas consideradas livres desse complexo de doenças endemoepidêmicas devido a mudanças ambientais, migrações humanas, crescimento urbano caótico e outros processos socioeconômicos incidentes sobre largas porções dos territórios desses países (BENCHIMOL et al., 2019). A migração, em geral desencadeada por questões socioeconômicas, tem sido apontada como um dos fatores responsáveis pelo processo de disseminação do vetor e da expansão da leishmaniose visceral no País (CARDIM et al., 2016).

As alterações ambientais, causadas pelo intenso processo migratório de um grande contingente populacional do campo para as cidades estimulado por questões econômicas e/ou sociais, aliado às secas periódicas, promoveram o chamado “esvaziamento rural” e levaram a um processo de urbanização crescente. Tais mudanças acarretaram a expansão das áreas endêmicas, forçaram a adaptação do vetor ao ambiente urbano e contribuíram para o

aparecimento de novos focos. Por falta de condições sócio-econômicas, essas populações passaram a habitar verdadeiros bolsões de pobreza do meio urbano, mas não perderam o vínculo com sua cultura rural e continuam mantendo não só seus cães, como também pequenos animais de produção. Esse fato é importante não só pela falta de condições higiênico-sanitárias, que propiciam a reprodução do vetor, mas, além disso, por permitir a introdução do agente etiológico em área indene (ROSSI, 2013; ARAUJO et al., 2016).

A prevalência de infecção canina é maior nas áreas rurais do que nas áreas urbanas (ARAUJO et al., 2016). Descobriram que a variação na soroprevalência entre essas duas áreas está intrinsecamente ligada a condições ambientais peridomésticas / domésticas para o desenvolvimento de infecção. Essas condições podem incluir o vetor, população canina, alterações causadas pela antropização, acúmulo de matéria orgânica, más condições de saneamento e coleta precária de lixo. Nessas áreas, os cães têm mais acesso a espaços e ruas abertos e podem se mover além de suas casas. Devido a essa mobilidade, eles podem estar mais expostos a fatores que aumentam a probabilidade de infecção por *Leishmania spp.* Além disso, as áreas rurais apresentam maior diversidade de animais do que as áreas urbanas, domésticas ou selvagens, e a presença de matas ciliares ou fragmentos florestais são fatores predisponentes para a presença de mosquitos (OLIVEIRA et al., 2010).

Observa-se notável incremento na cooperação internacional no tocante às leishmanioses. No Brasil, a progressiva urbanização das leishmanioses nas últimas décadas colocou em questão as estratégias adotadas para seu controle. Elas são classificadas como doenças tropicais negligenciadas, as únicas ainda em crescimento; e, embora esse complexo de doenças seja de fato negligenciado pelas políticas públicas e afete populações também negligenciadas, mobiliza uma das mais pujantes comunidades de pesquisa no Brasil. Novos paradigmas, especialmente a biologia molecular, mudaram a maneira de ver as leishmanioses (BENCHIMOL et al., 2019).

1.4.2. SITUAÇÃO NO ESTADO DE SÃO PAULO

A leishmaniose visceral vem apresentando importante expansão territorial e processo de urbanização no Brasil. No estado de São Paulo, a série histórica

de casos de LV inicia-se em 1999, tendo como porta de entrada a região oeste, tendo a cidade de Araçatuba com o primeiro caso canino de Leishmaniose Visceral em 1998 e em seguida, em 1999 tendo os primeiros casos autóctones humanos, e a partir daí a LV expande-se para outras regiões, processo ainda em curso (CARDIM et al., 2016; SAVANI et al., 2013).

No período entre 2003 e 2007, a doença seguiu seu curso de expansão para o sudeste. Esses processos migratórios que para São Paulo são especialmente provenientes de Minas Gerais e estão relacionados à substituição da criação de gado pelo cultivo da cana-de-açúcar, geram novas alterações antrópicas, as quais têm criado condições propícias para a evolução da leishmaniose visceral. Condições precárias de saneamento e moradia; deslocamento de cães infectados; processos adaptativos do vetor; obras de construção civil e o grande fluxo de pessoas, produtos e serviços por rodovias e ferrovias também têm sido relacionados à expansão e urbanização da leishmaniose visceral (CARDIM et al., 2016).

A construção da etapa paulista do gasoduto Bolívia-Brasil e a reativação da ferrovia Novoeste em São Paulo trouxeram muitos trabalhadores de outros estados e países para a região, os quais viviam em constante movimentação decorrente de mudanças dos canteiros de obras, juntamente com máquinas e equipamentos. Esta migração de pessoas possivelmente também desencadeou a migração de cães infectados pela *Leishmania*. No Mato Grosso do Sul, a construção do gasoduto foi apontada como um dos responsáveis pela disseminação do vetor e da Leishmaniose Visceral (CARDIM et al., 2016).

O fluxo de pessoas, mercadorias e serviços por ferrovias e, especialmente, por rodovias, parece ter um papel de destaque na expansão da leishmaniose visceral em São Paulo. Araçatuba e Birigui, localizados na região de saúde de Araçatuba e os primeiros a notificar casos de Leishmaniose Visceral, são cortados pela rodovia Marechal Rondon, principal eixo de ligação entre as regiões de Araçatuba e de Bauru e entre elas e a capital do estado. Conforme observado por Cardim et al (2016), o curso de dispersão e expansão da Leishmaniose Visceral, a partir da região de Araçatuba, seguiu a rota da rodovia Marechal Rondon no sentido oeste para leste e, a partir dessa rodovia,

seguir o curso da malha de rodovias transversais e de outras rodovias radiais. Reforçando a influência das malhas rodoviárias e ferroviárias no processo de expansão da Leishmaniose Visceral em São Paulo, está o fato de que a ferrovia Novoeste e a rodovia Marechal Rondon se ligam ao Mato Grosso do Sul, pelo município de Castilho no estado de São Paulo e Três Lagoas em Mato Grosso do Sul. Neste ponto, a Marechal Rondon se une a BR-262, seguindo o curso até Corumbá (Mato Grosso do Sul), município endêmico para Leishmaniose Visceral desde 1982. Corumbá se situa na divisa entre Brasil e Bolívia e essa facilidade de ligação entre os dois estados e o país estrangeiro já foi abordada como um dos fatores responsáveis pela expansão da Leishmaniose Visceral no Mato Grosso Sul, por favorecer, entre outros aspectos, o processo migratório (CARDIM et al., 2016).

Conforme é preconizado pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, os municípios com transmissão de Leishmaniose Visceral em São Paulo são classificados epidemiologicamente em dois grandes grupos: silenciosos, ou seja, sem confirmação de casos humanos e/ou caninos e, com transmissão, isto é, com confirmação de casos humanos e/ou caninos autóctones (Figura 8) (SÃO PAULO, 2006).



Figura 9: Classificação dos municípios para a vigilância e controle da leishmaniose visceral no estado de São Paulo

Fonte: SÃO PAULO, 2006.

Dessa forma, segundo São Paulo (2006) os municípios silenciosos são agrupados, preenchendo os seguintes critérios como se segue:

- municípios silenciosos não receptivos: sem confirmação de casos autóctones humanos e caninos; sem presença conhecida do vetor; não selecionado pelos valores de distância estimados para caracterizar a vulnerabilidade;

- municípios silenciosos não receptivos vulneráveis: sem confirmação de casos autóctones humanos e caninos; sem presença conhecida do vetor; selecionado pelos valores de distância estimados para caracterizar a sua vulnerabilidade;

- municípios silenciosos receptivos não vulneráveis: sem confirmação de casos autóctones humanos e caninos; com presença conhecida do vetor; não selecionado pelos valores de distância estimados para caracterizar a sua vulnerabilidade;

- municípios silenciosos receptivos vulneráveis: sem confirmação de casos autóctones humanos e caninos; com presença conhecida do vetor; selecionado pelos valores de distância estimados para caracterizar a sua vulnerabilidade;

Os municípios em “investigação” são agrupados também dentre os municípios silenciosos, porém independente da sua receptividade ou vulnerabilidade e com as seguintes notificações: caso humano ou canino clinicamente suspeito, aguardando conclusão de outros itens da investigação epidemiológica ou cão positivo para *Leishmania sp* no exame parasitológico direto ou reagente na sorologia para anticorpos anti-Leishmania e aguardando conclusão de outros itens da investigação epidemiológica (SONODA, 2007)

Ainda, os municípios que são considerados “com transmissão” de Leishmaniose Visceral são aqueles que englobam os seguintes critérios: caso canino autóctone confirmado por meio de identificação de *L. infantum* e/ou confirmação de pelo menos 2 ou 3 casos caninos autóctones positivos para *Leishmania sp* na área em investigação e detecção do vetor (SONODA, 2007).

A partir da confirmação de transmissão, os municípios são classificados em: municípios somente com transmissão canina e municípios com transmissão humana (SONODA, 2007).

Na região metropolitana da Grande São Paulo, casos de Leishmaniose foram registrados em áreas fragmentárias da Mata Atlântica, sugerindo que a *Leishmania* pode permanecer em pequenos ecossistemas florestais e os seres humanos que habitam as áreas adjacentes podem ser afetados radicalmente (MOSCHIN et al., 2013).

Até o final de 2017, foram 156 municípios do estado de São Paulo onde a presença do reservatório canino infectado foi detectada e, destes, 145 municípios onde o vetor foi localizado. Os municípios de Embu das Artes e Cotia, classificados anteriormente, são caracterizados como de transmissão canina. Então totalizando neste período 145 municípios com Transmissão Canina no estado de São Paulo (Figura 9). No ano de 2017, os destaques foram a expansão da transmissão canina em municípios da Grande São Paulo, como Barueri, Jandira, Itapevi e Mogi das Cruzes, com outros municípios apresentando casos suspeitos e ainda em investigação (HIRAMOTO et al, 2017). Segundo o BEPA (Boletim Epidemiológico Paulista, 2007) o município de Juquitiba é considerado um município silencioso receptivo vulnerável, ou seja, ele conta com a presença do vetor mas sem notificação de casos humanos e/ou caninos autóctones.

A cidade de Embu das Artes, município vizinho de Itapeverica da Serra e Cotia, foi a primeira cidade tão perto da capital São Paulo a ter casos caninos diagnosticados em 2002 (SAVANI et al., 2004).

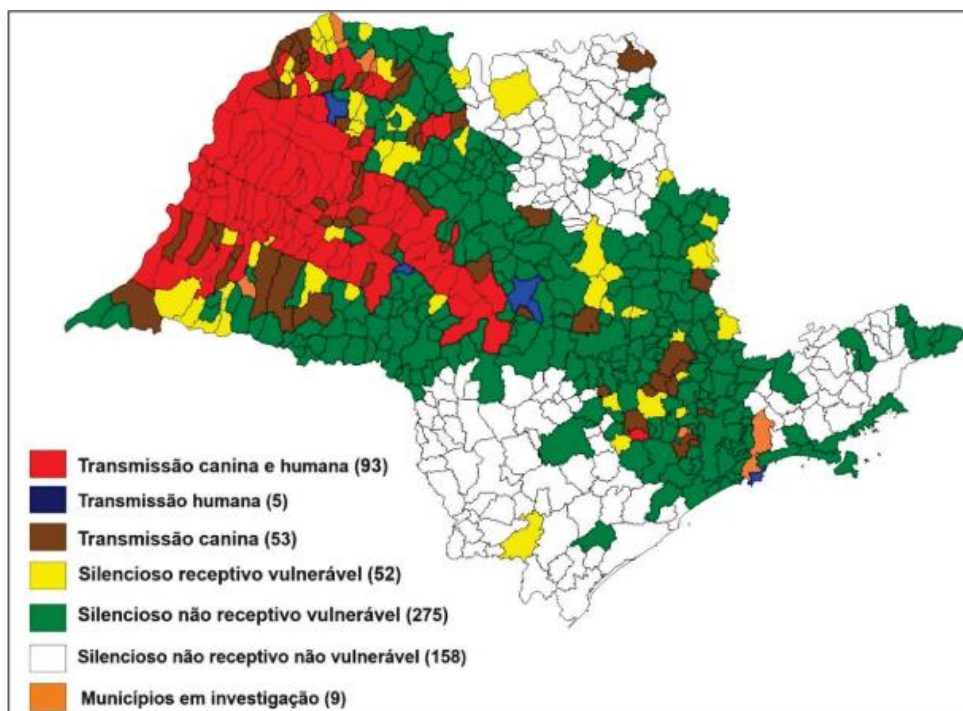


Figura 10: Distribuição de municípios segundo a classificação epidemiológica para leishmaniose visceral em dezembro de 2017, Estado de São Paulo

Fonte: Hiramoto et al, 2017.

A leishmaniose em gatos domésticos (*Felis catus*) foi relatada esporadicamente em várias partes do mundo. Essas observações sugerem que o gato é um hospedeiro acidental, mas seu verdadeiro papel como reservatório da doença é ainda totalmente desconhecido. No ano de 2004 foi relatado o primeiro caso positivo de *L. infantum* em um gato do município de Cotia diagnosticado em 2000, até então nunca havia sido relatado em gatos latino-americanos e, portanto, este caso representou o primeiro relato de um gato doméstico naturalmente infectado por *L. infantum*. no Brasil e nas Américas. O diagnóstico deste gato foi feito a partir da visualização de abundantes formas amastigotas intra e extracelulares em esfregaços de um nódulo cutâneo que este gato apresentava, após isso foi realizado de teste sorológico de fluorescência indireta (RIFI) com título 1:80 e além disso foi obtido DNA a partir de uma amostra do baço que produziu o fragmento esperado em um ensaio de PCR baseado em rDNA específico para *Leishmania*. O produto de PCR, um fragmento de 520 pb, foi sequenciado e a sequência nucleotídica era idêntica à de *L. infantum* (SAVANI et al., 2004).

1.5. EXAMES LABORATORIAIS

1.5.1. TESTES SOROLÓGICOS

A princípio, no Brasil, os testes sorológicos como o imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) eram recomendados pelo Ministério da Saúde em inquérito epidemiológico canino (BRASIL, 2006), porém, apresentam reação cruzada com *Trypanossoma cruzi* e outras espécies de *Leishmania* (VEXENAT et al., 1996).

Atualmente o Ministério da Saúde recomenda para triagem o uso do DPP (“Dual Path Platform”). O DPP® é um imunoensaio cromatográfico para testes de diagnóstico rápido, que foi desenvolvido pela empresa norte americana Chembio® e a empresa nacional Bio-Manguinhos®. É um teste qualitativo para detecção de anticorpos anti- *Leishmania* que utiliza a proteína recombinante K28, fragmentos K 26, K 39 e K9, como antígeno. Esta proteína é o produto de um gene clonado a partir de *Leishmania infantum*; e que contém uma repetição de 39 aminoácidos conservados entre as espécies viscerotrópicas de leishmania. Em testes experimentais, este teste apresentou alta sensibilidade para cães com sinais clínicos e alta especificidade para cães sem expressão clínica para Leishmaniose Visceral. A presença de anticorpos 6 anti-rK39 é indicativo de infecção, e ainda não foi relatado reação cruzada com outros tripanossomatídeos. Com esses resultados, ficou estabelecido um novo protocolo de diagnóstico, onde o DPP® passou a ser utilizado como método de triagem pelas equipes de campo. Somente nos cães reagentes no DPP® é coletado soro para a realização do ELISA, dentro dos laboratórios de apoio, confirmando o diagnóstico do cão soro reagente (Grimaldi et al., 2012). Estes exames deverão ser realizados nos laboratórios estaduais (LACENs) ou nos Centros de Controle de Zoonoses (CCZs) municipais (BRASIL, 2006).

Segundo Peixoto et al. (2015) foi apurado em sua revisão sistemática sobre o assunto, as médias de sensibilidade e especificidade do teste DPP® são de 0,835% e 0,729% respectivamente, com um IC de 95%. E ainda segundo Peixoto et al. (2015) demonstrou-se que os testes hoje preconizados pelo Ministério da Saúde do Brasil, o ELISA (teste imunoenzimático com antígenos

brutos) e o DPP® Biomanguinhos/Fiocruz (teste imunocromatográfico de via dupla) têm precisão moderada para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral canina.

O Programa Brasileiro de Controle da Leishmaniose utiliza sequencialmente estes dois testes sorológicos, que apresentam menor acurácia diagnóstica em cães assintomáticos ou nos estágios iniciais da infecção. Embora alguns trabalhos determinam que testes sorológicos podem ser utilizados com eficácia no diagnóstico de animais assintomáticos, o desempenho dos testes sorológicos pode ser até 20% inferior ao desempenho dos testes moleculares. O protocolo de diagnóstico usando DPP ® como teste confirmatório para Leishmaniose Visceral Canina foi implementado no Brasil desde 2012 (TEIXEIRA et al., 2019).

1.5.2. TESTES MOLECULARES

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é amplamente utilizada para a detecção e identificação de patógenos e é uma ferramenta valiosa para estudos moleculares e epidemiológicos. Na leishmaniose, como em muitas outras infecções sistêmicas, a detecção do agente é de suma importância para a confirmação da infecção em animais soropositivos e em estudos realizados com vetores e animais de vida livre para identificar reservatórios de infecção. Além disso, a PCR permite a identificação molecular do agente quando marcadores filogeneticamente informativos são amplificados e sequenciados, como código de barras de DNA nos genomas mitocondrial e nuclear (LOPES et al., 2016).

Para encontrarmos o DNA do agente patológico no hospedeiro, pela PCR, devemos utilizar primers específicos, que serão responsáveis pela multiplicação da sequência de DNA correta, determinando assim a infecção do organismo pelo agente patológico ao qual estamos procurando. Por isso, selecionar corretamente o primer utilizado na PCR é de fundamental importância para o

sucesso no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (GABRIEL, 2013). Não há consenso entre os autores, particularmente no Brasil, sobre quais primers devem ser utilizados para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina, pois existem inúmeras seqüências de oligonucleotídeos disponíveis para o diagnóstico molecular desta doença. Os procedimentos para extração de ácidos nucléicos têm desempenhos diferentes, bem como métodos para o manuseio de amostras utilizadas no diagnóstico molecular. Diferentes desempenhos de técnicas moleculares em vários laboratórios dificultam a comparação de resultados (LOPES et al., 2016).

1.5.2.1. Catepsina L-Like

A gravidade da doença é explicada pela alta virulência de seus agentes etiológicos, que resulta da ação de um conjunto de moléculas funcionais com intensa atividade biológica em seus hospedeiros. O papel dos inibidores de protease no desenvolvimento de mecanismos patogênicos foi investigado. Essas enzimas podem ser divididas em endopeptidases e exopeptidases, dependendo do local da hidrólise. Se o resíduo presente no local catalítico for levado em consideração, eles serão divididos em metaloproteases, serina proteases, proteases aspárticas e proteases de cisteína. No gênero *Leishmania*, as cisteína proteases são a classe mais abundante de enzimas e concentram-se no interior dos megassomas, onde atuam na regulação das rotas metabólicas, diferenciação celular em vertebrados e vetores, invasão e transposição celular de barreiras teciduais, degradação da hemoglobina e outras proteínas hematopoiéticas, evasão da resposta imune, ativação de respostas inflamatórias e morte celular programada (SILVA et al., 2019).

As cisteínas proteases tipo catepsina L na *Leishmania* têm três isoformas, denominadas cisteína protease A (CPA), cisteína protease B (CPB) e cisteína protease C (CPC). No caso específico de *L. infantum*, duas isoformas são expressas, a isoforma da CPB expressa nas formas promastigotas encontradas nos insetos (vetores) e a isoforma da CPA, na qual os estudos transcriptômicos revelaram um perfil de expressão único das formas amastigotas. Eles são, portanto, usados para construir informações filogenéticas (SILVA et al., 2019).

O gene CPA do tipo catepsina L é um bom marcador para o posicionamento filogenético de espécies do gênero *Leishmania*, o que sugere que esse gene pode ser um bom alvo para o diagnóstico molecular da leishmaniose. Isso permite uma diferenciação satisfatória entre as formas clínicas da doença, inclusive entre as variantes das formas tegumentares, que podem auxiliar na prescrição da terapia, estabelecendo o prognóstico médico da doença e atenuando os problemas recorrentes do diagnóstico específico (SILVA et al., 2019).

Segundo Silva et al. (2019) o CatLeish-PCR não faz amplificação cruzada com nenhuma das espécies epidemiologicamente associadas ao complexo de leishmaniose cutânea ou tegumentar no Brasil, e nem contra hemoparasitas pertencentes aos gêneros *Babesia*, *Ehrlichia* e *Trypanosoma*.

Apesar da alta importância desta doença, há alguma dificuldade em padronizar metodologias de diagnóstico com altos valores preditivos. Fazer um diagnóstico direto é invasivo e trabalhoso, e apenas baixos níveis de sensibilidade são atingidos. Os testes sorológicos também apresentam uma série de limitações técnicas, como baixos valores de especificidade resultantes de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, baixos índices de concordância entre os diferentes testes sorológicos e falta de consenso quanto à natureza e ao uso do produto antigênico a ser empregado (SILVA et al., 2019).

Há grandes preocupações com o uso de testes sorológicos para identificar cães assintomáticos, considerando que o diagnóstico sorológico é a principal ferramenta de levantamento para o controle da Leishmaniose Visceral Canina. Assim, é possível que os cães que foram rastreados e considerados soronegativos pelos protocolos sorológicos possam ter sido infectados e possam ter permanecido como reservatório por mais tempo, sem qualquer intervenção (TEIXEIRA et al., 2019; SILVA et al., 2014). Segundo estudos, um em cada cinco cães soronegativos podem ter sido infectados, destacando a preocupação manifestada por vários autores quanto à real capacidade de detecção dos testes atualmente em uso pelos programas de controle. A necessidade de novos métodos de diagnóstico para pesquisas em populações de cães que conseguem discernir animais assintomáticos e sintomáticos de maneira precisa persiste,

porque esse é um elemento-chave para definir o sucesso ou falha do controle de Leishmaniose Visceral Canina (LOPES et al., 2017).

Segundo Silva et al. (2014) os resultados de uma avaliação comparativa entre vários métodos de diagnóstico reforçam que apenas um teste não identifica adequadamente os cães com Leishmaniose Visceral Canina e, por esse motivo, é necessária uma combinação de métodos diferentes.

O CatLeish-PCR é uma ferramenta que pode ser usada para diagnosticar leishmaniose visceral. Ele supera os problemas recorrentes de baixa sensibilidade que as metodologias de visualização direta apresentam e os de baixa especificidade e concordância entre os métodos sorológicos que são preferencialmente bem recomendados para o diagnóstico dessa doença. Os ensaios de diagnóstico molecular utilizados e descritos na literatura têm baixa sensibilidade e especificidade. Marcadores baseados no gene do citocromo b não são específicos. Marcadores baseados em genes presentes no cinetoplasto têm alta sensibilidade, mas sua especificidade é baixa. Marcadores baseados em genes ribossômicos são específicos, mas não muito sensíveis. Outros ensaios, como o polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (PCR-RFLP), foram padronizados, mas aumentam o custo de se fazer o diagnóstico ou ainda requerem o seqüenciamento do produto (SILVA et al., 2019).

A revolução molecular também afetou os paradigmas para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral Humana. Com protocolos mais sensíveis, é possível diagnosticar pacientes em diferentes estágios de infecção e em diferentes tipos de amostras clínicas, incluindo pacientes imunossuprimidos que não apresentam níveis detectáveis de anticorpos em testes sorológicos tradicionais (TEIXEIRA et al., 2019).

2. JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Visceral está em ampla expansão no estado de São Paulo. Essa expansão vem ocorrendo no espaço e no tempo, com aumento do número de municípios afetados e do número de casos e óbitos. A melhor compreensão desse processo, dos municípios acometidos e a identificação de fatores determinantes podem facilitar a adoção de ações de vigilância e controle efetivas, evitando que a leishmaniose visceral se espalhe por todo o território paulista ou, ao menos, diminuindo sua velocidade de expansão. Lembrando que a doença nos cães precede 2 anos a doenças nos seres humanos, sendo então importante uma investigação epidemiológica antes da ocorrência de casos humanos, visando evitar que a região se torne endêmica assim como ocorreu na região oeste paulista.

Considerando que a maioria dos cães infectados permanece assintomático por longos períodos, é importante que os animais infectados sejam detectados com precisão, independentemente da medida de controle a ser aplicada a essa população canina. A chave para o sucesso potencial do controle da Leishmaniose Visceral Canina pode ser a identificação de cães assintomáticos.

3. OBJETIVO

Detecção de anticorpos, molecular e parasitológica de *Leishmania infantum* em cães do município de Itapequerica da Serra, Cotia e Juquitiba, municípios considerados fazendo parte da região metropolitana de São Paulo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Área de estudo e obtenção das amostras

O estudo foi conduzido em três cidades da região metropolitana do estado de São Paulo (figura 11), sendo elas Cotia, Itapequerica da Serra e Juquitiba (figura 12).

O município de Itapequerica da Serra compreende uma área de 151,458 km² localizado na região metropolitana de São Paulo. Itapequerica da Serra faz parte da zona fisiográfica da serra de Paranapiacaba, seus limites são Embu das Artes a norte, a capital a leste, Embu-Guaçu e São Lourenço da Serra a sul e Cotia a oeste. Possui áreas desmatadas para fins residenciais e comerciais e áreas remanescentes de Mata Atlântica.

O município de Cotia compreende uma área de 323,890 km² localizada na zona sudoeste da região metropolitana de São Paulo. Localiza-se as margens do Rio Cotia. Possui também áreas desmatadas para fins residenciais e comerciais e áreas remanescentes de Mata Atlântica.

O município de Juquitiba compreende uma área de 521,598 km² localizado na região metropolitana de São Paulo. Seus limites são Ibiúna a norte e a oeste, São Lourenço da Serra e Embu-Guaçu a nordeste, São Paulo a leste, Itanhaém a sudeste, Pedro de Toledo e Miracatu a sul. A vegetação da região é típica Mata Atlântica. Juquitiba integra uma região rica em nascentes e cursos d'água que cortam o município.



Figura 11: Mapa do Estado de São Paulo destacando a região metropolitana de São Paulo

Fonte: São Paulo MesoMicroMunicip.svg



Figura 12: Mapa da região metropolitana de São Paulo mostrando a proximidade entre as cidades de Cotia, Itapeverica da Serra e Juquitiba

Fonte: <http://aquietrabalho.com/apos-pressao-de-prefeitos-doria-anuncia-subdivisao-de-saude-na-grande-sp/> - acesso em 10 de outubro, 2020

O estudo foi conduzido em abrigo localizado na cidade de Juquitiba (Figuras 13, 14 e 15), Cotia e Itapeverica da Serra, SP, Brasil, onde se encontram atualmente cerca de 200 animais, mas com população flutuante devido as adoções realizadas. Os canis são rústicos, feitos de madeira, cercados e cimentados, e toda a área destinada aos animais é cercada por mata nativa da região. Outros animais, além de cães também se encontram presentes no abrigo, como gatos. Estes abrigos são denominados de lares temporários para o processo de tratamento, castração e recuperação para a reinserção ou adoção deste animal.



Figura 13: Abrigo da ONG Adote um Amicão localizado no município de Juquitiba

Fonte: Arquivo pessoal, 2020

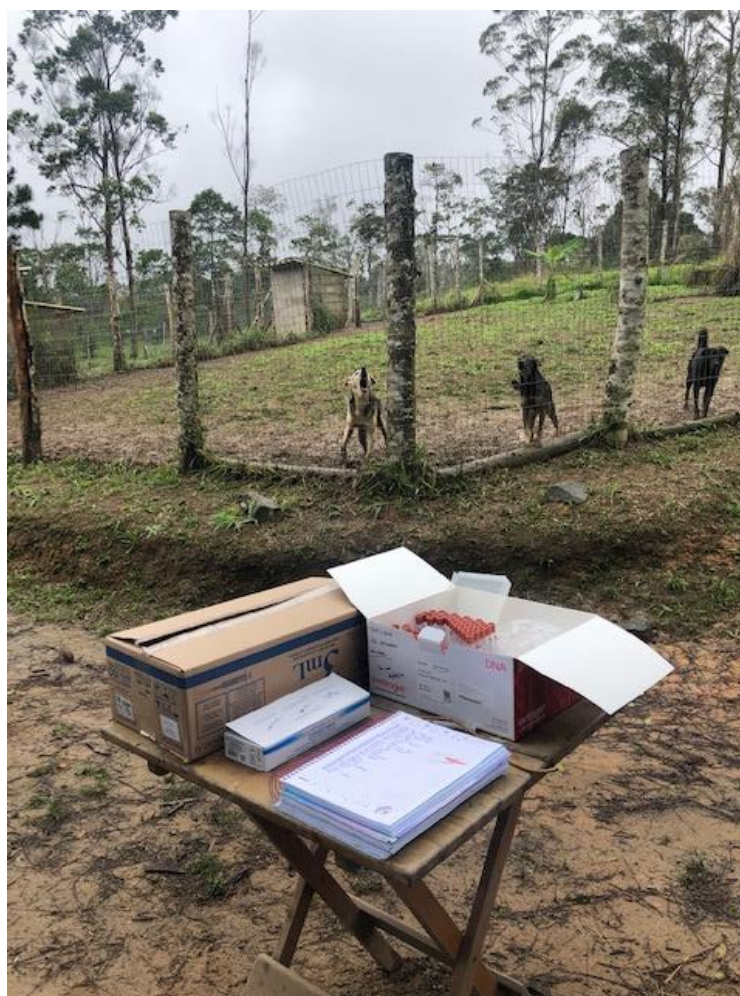


Figura 14: Abrigo da ONG Adote um Amicão localizado no município de Juquitiba

Fonte: Arquivo pessoal, 2020



Figura 15: Abrigo da ONG Adote um Amicão localizado no município de Juquitiba

Fonte: Arquivo pessoal, 2020

Inicialmente foi coletado sangue total periférico e, após triagem, dos positivos foi coletado novamente o sangue total e também foi realizada punção aspirativa por agulha fina de linfonodo poplíteo dos cães.

4.2. Obtenção do Material

Foram coletados pelo menos 3 mililitros de sangue total periférico da veia cefálica, jugular ou radial de 153 cães, a escolha de qual veia seria coletada dependia do estado geral, temperamento e tamanho corpóreo do cão. Do material obtido, metade foi acondicionado em tubos tipo Eppendorf® contendo álcool 100% e a outra metade em tubo seco com ativador de coágulo.

O sangue coletado no Eppendorf® com álcool permaneceu em temperatura ambiente e o sangue colocado no tubo seco foi submetido a centrifugação, o soro resultado desta centrifugação foi congelado, ambos permaneceram assim até a realização dos exames.

Foi realizada uma ficha de cada animal com o nome e cada um deles representava um número de 1 a 153. Eles foram cadastrados nos tubos

Eppendorf® e seco cada qual com seu respectivo número para melhor identificação.

4.3. Triagem sorológica

O exame sorológico para triagem dos pacientes foi realizado com sangue total periférico pelo método de imunocromatografia, utilizando o Kit de diagnóstico rápido DPP® para Leishmaniose canina, Biomanguinhos/Fiocruz para detecção de anticorpos anti-amastigotas K9/K26/K39, Os testes foram executados de acordo com as recomendações do fabricante e com os parâmetros estabelecidos pelo Ministério da Saúde.

4.4. Extração do DNA

Para a extração do DNA, foi utilizado o kit comercial “PureLink Genomic DNA Mini Kit” (ThermoFisher), de acordo com as instruções do fabricante.

4.5. Diagnóstico molecular

Para as reações de PCR foi utilizada a seguinte mistura de reação: 100 ng de DNA genômico, 100 ng de cada "primer" e 20 µL de solução mix GreenTaq (Sinapse)

Os ciclos de amplificação e as temperaturas de anelamento foram definidos de acordo com os "primers" empregados: CatLeishF (5' GACAACGGCACCGTCGGCGCCAAAATAAAAG 3') e CatLeishR (5' CAGTACGGCGGTTTCGCTTGTCTGTTGAAGC 3') com etapas de desnaturação a 94°C por 01 minuto, de anelamento a 64°C por 01 minuto e de extensão da fita a 72°C por 45 segundos repetidos por 34 ciclos, conforme descrito por Silva et al., (2019). O tamanho do produto de amplificação é de 223pb.

Os produtos amplificados por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1.5%) em tampão TAE a 50V/100 mA. Após a eletroforese os

gêis foram corados com Syber Safe (Termofisher) e fotografados em transluminador de luz U.V

4.6. Isolamento de parasitas do gênero *Leishmania*

Dos cães positivos no exame sorológico ou molecular foi realizado o isolamento através da punção de linfonodo poplíteo de cães e sangue total periférico (Marcili et al., 2014). As amostras coletadas através de punção por agulha fina e sangue total periférico foram inoculadas em tubos com meio bifásico constituído por fase sólida BAB (blood agar base) com 15% sangue de coelho) e fase líquida de meio LIT ou RPMI (contendo soro fetal bovino e antibióticos). Lâminas de vidro com esfregaços de sangue para estudos morfológicos e ainda amostras de sangue em etanol foram preparados para estudos moleculares quando o isolamento não foi possível.

5. RESULTADOS

Foram amostrados 153 cães, sendo 42 animais do município de Cotia, 30 de Itapequerica da Serra e 81 de Juquitiba. Dos cães amostrados, 9,8% (15/153) foram positivos para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* pelo método de imunocromatografia (DPP®), 5,2% (8/153) no diagnóstico molecular e 0,66% (1/153) no exame parasitológico (Tabela 1). O município com a maior positividade em ambos os testes foi Itapequerica da Serra e Juquitiba apresentou a menor positividade (Tabela 1; Figura 17).

Os exames parasitológicos foram realizados nos animais positivos no teste sorológico ou molecular. Entretanto, não foi possível realizarmos o exame parasitológico em todos os animais, por recusa dos mantenedores dos abrigos e ou dos novos tutores quando o animal já havia sido adotado. Somente de 2 animais do município de Itapequerica da Serra e 1 do município de Cotia foi possível a coleta da punção de linfonodo poplíteo por agulha fina. Destes 3 animais, 1 animal de Itapequerica da Serra foi positivo no exame parasitológico.

Tabela 1: Quantidade de animais positivos por cidade e representatividade naquela quantidade de cães amostrados

Município	Positividade sorológica (DPP®)	Positividade no teste molecular (CatLeish PCR)	Positividade Parasitológico
Cotia	4/42 (9,52%)	1/42 (2,38%)	0/1 ^a
Itapequerica de Serra	4/30 (13,33%)	7/30 (3,33%)	1/2 ^a
Juquitiba	7/81 (8,64%)	0/81 (0%)	0/0
	15/153 (9,8%)	8/153 (5,22%)	1/153 (0,66%)

^a Responsável ou tutor não autorizou a coleta do exame parasitológico.

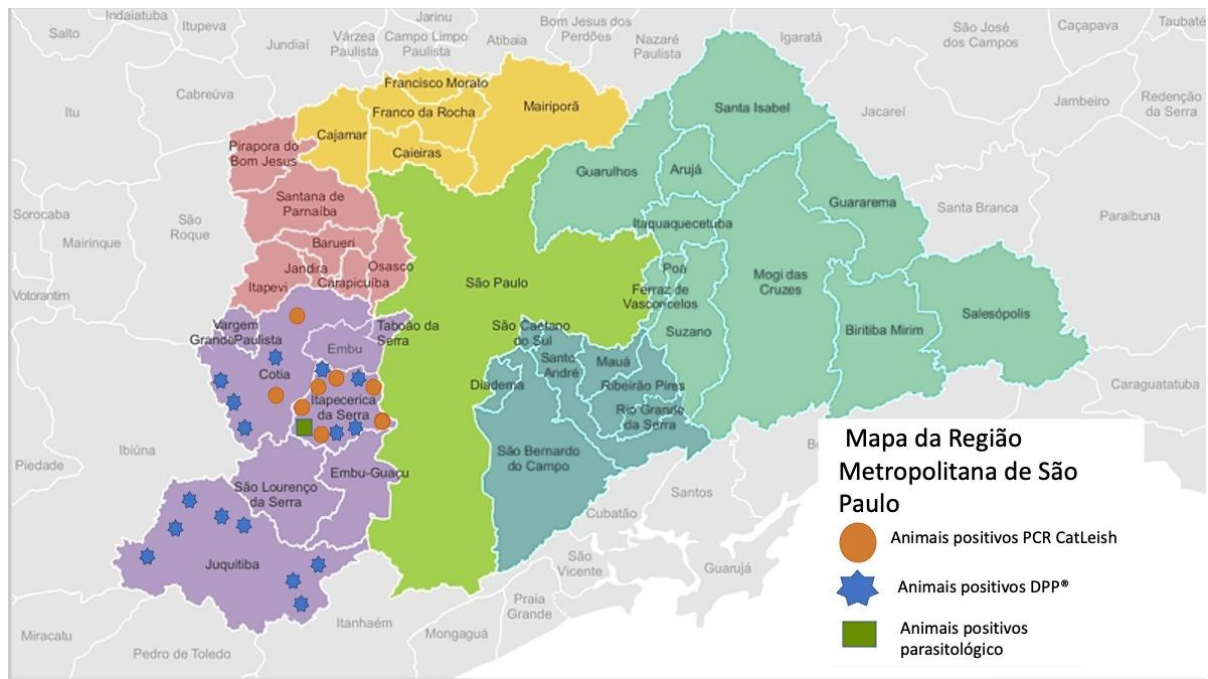


Figura 16: Mapa da região metropolitana de São Paulo onde em cada cidade há uma marcação em círculo colorido de cada caso positivo naquela cidade

FONTE: Andre Cury Moura , site www.emplasa.sp.gov.br (adaptado)

6. DISCUSSÃO

A Leishmaniose visceral irrompeu como um problema de saúde pública no Brasil desde 1934 quando ocorreu o primeiro relato de leishmaniose visceral humana no Brasil. No final do século XX (a partir dos anos 80), no Brasil e em outros países, todas as formas de leishmaniose que pareciam sob controle reemergiram em zonas rurais e urbanas e irromperam em áreas consideradas livres desse complexo de doenças endemoepidêmicas devido a mudanças ambientais, migrações humanas, crescimento urbano caótico e outros processos socioeconômicos incidentes sobre largas porções do território brasileiro (BENCHIMOL et al., 2019).

O Brasil é o país com a maior incidência de Leishmaniose Visceral no mundo e as autoridades brasileiras reconhecem a Leishmaniose Visceral como um problema de saúde pública (Gomez & Picado, 2017). Esse fato corrobora a classificação da leishmaniose como doença tropical negligenciada e segunda maior causa de óbitos por doenças parasitárias em todo o mundo (WHO, 2020).

Apesar da alta importância desta doença, há alguma dificuldade em padronizar metodologias de diagnóstico com altos valores preditivos (SILVA et al., 2019; (Faria & Andrade, 2012). Sabe-se que um teste de triagem é selecionado devido à sua alta sensibilidade para detectar doenças potenciais, e um teste diagnóstico confirmatório é selecionado por sua alta especificidade, dando mais peso à precisão do ensaio. Além disso, o teste de triagem é geralmente mais barato do que o ensaio confirmatório (LAURENTI et al., 2014)

Neste estudo foram testados 153 animais, dos quais 15 foram reagentes ao DPP®, 8 foram positivos ao PCR (CatLeish®PCR) específico para *Leishmania infantum* e um animal positivo ao parasitológico direto.

Neste estudo não houve concordância nos testes diagnósticos realizados para a maioria dos animais testados, sendo que 86% (13/15) dos animais reagentes ao DPP® foram negativos no diagnóstico molecular. Isso corrobora dados da literatura que demonstram que os testes sorológicos apresentam uma série de limitações técnicas, como baixos valores de especificidade resultantes de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos (Laurento et al., 2014; Silava et al., 2019; Grimaldi et al., 2012; Barros et al., 2012)

Além disso, o desempenho do DPP® também depende do estágio de infecção dos cães assintomáticos (Laurenti et al., 2014), sendo vista uma maior sensibilidade quando os cães apresentam sintomas clínicos (Grimaldi et al., 2012). A resposta imune humoral que se desenvolve em cães infectados por *Leishmania infantum* quase sempre envolve múltiplos antígenos que são reconhecidos de maneiras diferentes em indivíduos distintos e em vários estágios da doença no mesmo hospedeiro. Essa constatação revela claramente que, sempre que possível, é preferível realizar testes em paralelo ou testes com múltiplos antígenos para identificar um maior número de animais infectados (Falqueto et al., 2019).

No entanto, é válido destacar que alguns pesquisadores recomendam o DPP®, por sua maior especificidade quando comparado a outros testes sorológicos, como teste confirmatório no protocolo de diagnóstico de LVC no Brasil (Teixeira et al., 2019).

As cidades contempladas neste estudo são próximas facilitando o trânsito de animais entre estes municípios, bem como a cidade de São Paulo (Figura 17). Tal fato é reforçado pela história dos animais positivos. O cão positivo em todas as metodologias utilizadas apresenta sintomas clínicos e está em tratamento há 3 anos com protocolo medicamentoso estabelecido para cães. Este animal é proveniente da cidade de Vargem Grande, foi adotado e mora em Itapequerica da Serra, mas desloca-se constantemente para o município de Ibiúna.

Outro animal positivo no diagnóstico molecular é residente atualmente da cidade de Cotia, mas é proveniente do município de Itapequerica da Serra. Já, outro cão também positivo no diagnóstico molecular foi resgatado na cidade de São Paulo, no bairro do Grajaú, depois mantido no abrigo no município de Cotia e foi doado por uma família da cidade de São Paulo. Os demais animais positivos no diagnóstico molecular são oriundos e residentes de Itapequerica da Serra.

A legislação estadual (Decreto 40400/95) restringe estabelecimentos com manutenção de animais dentro do perímetro urbano, visando a diminuir exalação de odores, propagação de ruídos incômodos, proliferação de roedores e artrópodes nocivos. Tais medidas favorecem a instalação e manutenção dos canis comerciais e abrigos em áreas periféricas no município de São Paulo ou em outros municípios da região metropolitana que conseqüentemente possuem maior cobertura florestal remanescente.

Os animais deste estudo são oriundos em sua grande maioria de maus-tratos ou abandono, além de uma prática cruel, abandonar ou mal tratar um animal é crime, conforme a Lei Federal nº 9.605/98 e Lei Federal nº 14.064/2020 respectivamente. A responsabilidade pela vida do animal é sempre do tutor, em casos extremos em que não há condições de ficar com o pet, o proprietário tem o dever de viabilizar que o animal seja doado para um novo lar, mas geralmente ainda não é isso que ocorre, em sua maioria os animais acabam sendo abandonados, podendo causar acidentes quando estes o são abandonados em rodovias. Outro agravante é o risco de saúde coletiva, uma vez que muitas doenças são zoonoses, como é o caso da raiva e da leishmaniose. Isso significa que o abandono também configura um problema de saúde pública. Quando esta, como outras ONGs resgatam este animal doente, mesmo assintomático, este cão será transportado para vários locais, cidades até ter uma nova adoção definitiva, sendo uma fonte de infecção por onde passar. Tais ações antrópicas não intencionais podem favorecer a dispersão do parasita.

O processo de adoção é algo que deve ser cada vez incentivado para minimizar o número de animais errantes. Tal processo, exige do adotante condições financeiras para manutenção do animal, além de tempo e carinho. Mas, torna-se clara a necessidade de implementação de novos protocolos para sanidade animal, principalmente para doenças zoonóticas como a Leishmaniose Visceral, como mais um fator para a prática da chamada guarda-responsável.

O município de Itapequerica da Serra é considerado um município silencioso não receptivo vulnerável, ou seja, sem confirmação de casos autóctones humanos e caninos e, também, sem a presença conhecida do vetor. Este é o primeiro a estudo a comprovar a presença de *Leishmania infantum* no município e demonstra a necessidade de estudos mais abrangentes na região tanto com os reservatórios vertebrados (cães) como com os vetores.

A região metropolitana de São Paulo é considerada a quarta maior do mundo em número de habitantes e conseqüentemente, com alta concentração de animais de estimação. Estudo anterior demonstrou a presença do agente na região metropolita de São Paulo (Marcili et al., 2020), mas o presente estudo agrega o município de Itapequerica da Serra a lista de cidades com a presença comprovada de *Leishmania infantum*.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo foram obtidos resultados sorologicamente positivos nas três cidades Cotia, Itapequerica da Serra e Juquitiba. Os testes moleculares específicos para *Leishmania infantum* demonstraram a presença do agente nos municípios de Cotia e Itapequerica da Serra.

Além disso, atenta para uma nova classificação epidemiológica do município de Itapequerica de Serra e para implementação de protocolos de sanidade animal nos processos de adoção.

BIBLIOGRAFIA

- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., & de Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Araujo, A. C., Costa, A. P., Silva, I. W. G., Matos, N. N. V. G., Dantas, A. C. S., Ferreira, F., Marcili, A., & Horta, M. C. (2016). Epidemiological aspects and risk factors for infection by *Leishmania infantum chagasi* in dogs from municipality of Petrolina, Northeastern Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 3–4, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.07.001>
- Barros, J. H. S., Almeida, A. B. P. F., Figueiredo, F. B., Sousa, V. R. F., Fagundes, A., Pinto, A. G. S., Baptista, C., & Madeira, M. F. (2012). Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: What is the real impact of canine leishmaniasis control? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(7), 419–423. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.03.014>
- Benchimol, J. L., Gualandi, F. da C., Barreto, D. C. dos S., & Pinheiro, L. de A. (2019). Leishmanioses: sua configuração histórica no Brasil com ênfase na doença visceral nos anos 1930 a 1960. *Boletim Do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas*, 14(2), 611–626. <https://doi.org/10.1590/1981.81222019000200017>
- Brasil, M. da S. (2017). Leishmaniose visceral Situação Epidemiológica da. 10/2017, 25. <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/leishvisceral-l-17-novo-layout.pdf%0Afile:///D:/IC/Pibic/leishvisceral-17-novo-layout.pdf>
- Cardim, M. F. M., Guirado, M. M., Dibo, M. R., & Chiaravalloti Neto, F. (2016). Visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil: Spatial and space-time analysis. *Revista de Saude Publica*, 50, 1–11. <https://doi.org/10.1590/s1518-8787.2016050005965>

- Controle, S. De, & Sucen, D. E. (2005). Encontro de *Lutzomyia edwardsi* infectada na região da Grande de São Paulo. *Revista de Saude Publica*, 39(1), 137–138. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102005000100018>
- Da Silva, R. E., Sampaio, B. M., Tonhosolo, R., Da Costa, A. P., Da Silva Costa, L. E., Nieri-Bastos, F. A., Sperança, M. A., & Marcili, A. (2019). Exploring *Leishmania infantum* cathepsin as a new molecular marker for phylogenetic relationships and visceral leishmaniasis diagnosis. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4463-8>
- Dantas-Torres, F. (2009). Canine leishmaniosis in South America. *Parasites and Vectors*, 2(SUPPL.1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S1>
- de Lima, J. T. R., Gennari, S. M., Soares, H. S., Minervino, A. H. H., Malheiros, A. F., Marques, F. S., Laurenti, M. D., Machado, R. Z., Marcili, A., Labruna, M. B., & Soares, R. M. (2017). Serodiagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis in human and canine populations living in indigenous reserves in the Brazilian Amazon Region. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(1), 61–66. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0377-2016>
- Faria, A. R., & Andrade, H. M. de. (2012). Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 3(2), 47–57. <https://doi.org/10.5123/s2176-62232012000200007>
- Gabriel, J. E. (2013). Evaluating the specificity of primers employed for PCR-based diagnostics of Leishmaniasis using multiple alignment analysis. *Estudos de Biologia*, 35(85), 107–112. <https://doi.org/10.7213/estud.biol.35.085.ao01>
- Galvis-Ovallos, F., Da Silva, M. D., Bispo, G. B. D. S., De Oliveira, A. G., Neto, J. R. G., Malafronte, R. D. S., & Galati, E. A. B. (2017). Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. *Parasite*, 24. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017002>

- Gomez, S. A., & Picado, A. (2017). Systemic insecticides used in dogs: potential candidates for phlebotomine vector control? *Tropical Medicine and International Health*, 22(6), 755–764. <https://doi.org/10.1111/tmi.12870>
- Grimaldi, G., Teva, A., Ferreira, A. L., dos Santos, C. B., Pinto, I. de S., de Azevedo, C. T., & Falqueto, A. (2012). Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(1), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.10.001>
- Laurenti, M. D., de Santana Leandro, M. V., Tomokane, T. Y., De Lucca, H. R. L., Aschar, M., Souza, C. S. F., Silva, R. M., Marcondes, M., & da Matta, V. L. R. (2014). Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 205(3–4), 444–450. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.09.002>
- Lopes, E. G., Sevá, A. P., Ferreira, F., Nunes, C. M., Keid, L. B., Hiramoto, R. M., Ferreira, H. L., Oliveira, T. M. F. S., Bigotto, M. F. D., Galvis-Ovallos, F., Galati, E. A. B., & Soares, R. M. (2017). Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: One out of five seronegative dogs are infected. *Epidemiology and Infection*, 145(12), 2436–2444. <https://doi.org/10.1017/S0950268817001443>
- Lopes, Estela Gallucci, Geraldo Junior, C. A., Marcili, A., Silva, R. D., Keid, L. B., Oliveira, T. M. F. da S., & Soares, R. M. (2016). Performance of conventional pcrs based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of leishmania spp. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 58(1). <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658041>
- Marcili, A., Sperança, M. A., da Costa, A. P., Madeira, M. de F., Soares, H. S., Sanches, C. de O. C. C., Acosta, I. da C. L., Giroto, A., Minervino, A. H. H., Horta, M. C., Shaw, J. J., & Gennari, S. M. (2014). Phylogenetic relationships of Leishmania species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of Leishmania (L.) infantum chagasi in

- South America. *Infection, Genetics and Evolution*, 25, 44–51.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.001>
- Medeiros-Silva, V., Gurgel-Gonçalves, R., Nitz, N., D'Anduraim Morales, L. E., Cruz, L. M., Sobral, I. G., Boité, M. C., Ferreira, G. E. M., Cupolillo, E., & Romero, G. A. S. (2015). Successful isolation of *Leishmania infantum* from *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) collected from naturally infected dogs. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1186/s12917-015-0576-5>
- Moschin, J. C., Ovallos, F. G., Sei, I. A., & Galati, E. A. B. (2013). Ecological aspects of phlebotomine fauna (Diptera, Psychodidae) of Serra da Cantareira, Greater São Paulo Metropolitan region, state of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 16(1), 190–201.
<https://doi.org/10.1590/s1415-790x2013000100018>
- Oliveira, L. C. P. de, Araújo, R. R. de, Alves, C. R., Mouta-Confort, E., López, J. A., & Mendonça-Lima, F. W. de. (2010). Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Ávila, State of Bahia, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(4), 400–404. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822010000400013>
- OPAS, O. P. de la S. (2019). *Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas*. www.paho.org
- Paulo, S. (2018). RYAN EMILIANO DA SILVA Genes de Cisteíno proteases (*Catepsina L- like*) de *Leishmania infantum chagasi*: Caracterização , Relações Filogenéticas e Diagnóstico Molecular . RYAN EMILIANO DA SILVA Genes de Cisteíno proteases (*Catepsina L- like*) de *Leishma*.
- Peixoto, H. M., de Oliveira, M. R. F., & Romero, G. A. S. (2015). Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Systematic review and meta-analysis. *Tropical Medicine and International Health*, 20(3), 334–352.
<https://doi.org/10.1111/tmi.12429>
- Rossi, C. N. (2013). *Avaliação da imunidade celular na pele de cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) infantum chagasi e*

sua correlação com transmissibilidade ao vetor. 89.

- Savani, E. S. M. M., De Oliveira Camargo, M. C. G., De Carvalho, M. R., Zampieri, R. A., Dos Santos, M. G., D'Áuria, S. R. N., Shaw, J. J., & Floeter-Winter, L. M. (2004). The first record in the Americas of an autochthonous case of Leishmania (Leishmania) infantum chagasi in a domestic cat (Felix catus) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 120(3), 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.01.008>
- Silva, D. T. da, Starke-Buzetti, W. A., Alves-Martin, M. F., Paixão, M. dos S., Tenório, M. da S., & Lopes, M. L. M. (2014). Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(2), 179–186. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612014033>
- Soares, V. B., Almeida, A. S. de, Sabroza, P. C., & Vargas, W. P. (2017). Epidemiological surveillance of tegumentary leishmaniasis: local territorial analysis. *Revista de Saude Publica*, 51, 51. <https://doi.org/10.1590/S1518-8787.2017051006614>
- Sonoda, M. (2007). Leishmaniose visceral canina: aspectos clínico-epidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 a 2007, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina. *Teses.Usp.Br*, 115. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10136/tde-12122007-171752/en.php>
- Teixeira, A. I. P., Silva, D. M., Vital, T., Nitz, N., De Carvalho, B. C., Hecht, M., Oliveira, D., Oliveira, E., Rabello, A., & Romero, G. A. S. (2019). Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A challenge for current and future tests. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 114(1), 1–9. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180452>
- Vexenat, A. D. C., Santana, J. M., & Teixeira, A. R. L. (1996). Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa Trypanosoma cruzi, Leishmania chagasi and Leishmania (Viannia) braziliensis. In *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* (Vol. 38, Issue 3, pp. 177–185). <https://doi.org/10.1590/s0036-46651996000300003>

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Leishmaniasis. Genebra, 2020.

Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 8 de abril, 2020.