

DETECÇÃO MOLECULAR DE *Leishmania* spp. EM MATERIAL DE HEMOCULTURA, E DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA LEISHMANIOSE EM CÃES PROCEDENTES DO BAIRRO DA CONQUISTA, SÃO MANUEL-SP, BRASIL

Helio Langoni¹
Virgina Bodelão Richini-Pereira²
Carlos Scremin³
Marcella Zampoli Troncarelli¹
Janaína Biotto Camargo¹
Juliana Giantomassi Machado¹
Leila Sabrina Ulmann¹
Felipe de Freitas Guimarães¹
Daniela Barbosa da Silva¹
Gabriela Pacheco Sánchez¹
Simone Baldini Lucheis⁴

RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos para os hospedeiros mamíferos por flebotomíneos infectados. Esta zoonose inclui um amplo espectro de manifestações clínicas, desde lesões cutâneas no local da picada dos flebotomíneos até a leishmaniose visceral sistêmica, podendo se apresentar como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral (LV). Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção da LV, pois assume grande importância na transmissão da doença, provavelmente devido ao seu maior parasitismo cutâneo e por apresentar-se infectado em quase todos os focos brasileiros de calazar humano. Foram analisadas 197 amostras de sangue de cães procedentes do bairro da Conquista, no município de São Manuel-SP. Exames sorológicos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ELISA foram realizados, sendo todos os animais não reagentes, bem como negativos ao exame parasitológico de punção de linfonodos. À hemocultura, 48/197 (24,3%) amostras apresentaram crescimento de tripanossomatídeos, sendo que, destas, três amostras (1,5%) foram positivas à técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp. Apenas um animal (0,5%) com sintomatologia compatível foi positivo à PCR para *Leishmania* spp. O estudo ressalta a importância de esforços contínuos e permanentes na vigilância epidemiológica contra esta zoonose, visando o diagnóstico precoce de casos autóctones, para prevenção na disseminação do agente para o homem, animais e flebotomíneos. É imprescindível que as autoridades de Saúde Pública avaliem casos autóctones de leishmanioses.

Palavras-chave: Leishmaniose, hemocultura, cães, vigilância epidemiológica.

¹ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – FMVZ-UNESP-Botucatu.

² Pesquisadora Científica, Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais Bauru II.

³ Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura Municipal de São Manuel-SP.

⁴ Pesquisadora Científica Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA Centro-Oeste – Bauru-SP.

MOLECULAR DETECTION OF *Leishmania* spp. IN BLOOD CULTURE MATERIAL, AND LEISHMANIASIS SEROLOGICAL DIAGNOSIS IN DOGS FROM BAIRRO DA CONQUISTA, SAO MANUEL, BRAZIL

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by *Leishmania* genus protozoa, and transmitted to mammals by infected phlebotomines. This zoonosis determines a high spectrum of clinical manifestations, like skin lesions at the local of phlebotomine's bite, or more severe signs in case of visceral systemic leishmaniasis. According to the *Leishmania*'s specie infection, the disease can be clinically presented as American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) or Visceral Leishmaniasis (VL). Dog (*Canis familiaris*) is the main VL infection source in the urban area, and has high importance in the disease transmission, probably due to its high cutaneous parasitism, and also because dogs are frequently diagnosed infected in all Brazilian regions where human visceral leishmaniasis cases are related. 197 blood samples were collected from dogs in Bairro da Conquista, in São Manuel-SP Brazil. Serum samples were evaluated by Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT) and ELISA for *Leishmania* spp. diagnosis, and all resulted negative. The cytology of dogs' lymph nodes was also negative for *Leishmania* spp. 48/197 (24.3%) blood samples were positive to culture, with tripanosomatides visualization. Three of these positive samples (1.5%) were also positive by PCR for *Leishmania* spp. One blood sample collected from a VL symptomatic dog (0.5%) that was positive to culture was also positive by PCR. The present study reinforces the importance of continuous engagement on the epidemiological vigilance of this zoonosis, viewing the early diagnosis of autochthon cases for the prevention of disease transmission for human, animals and phlebotomines. It is essential that public health authorities be in constant alert for autochthon leishmaniasis cases searching.

Keywords: Leishmaniasis, blood culture, dogs, epidemiological vigilance.

DETECCIÓN MOLECULAR DE *Leishmania* spp. EN MATERIAL DE HEMOCULTIVO, Y DIAGNOSTICO SOROLOGICO PARA LEISHMANIASIS EN PERROS DEL BARRIO DE LA CONQUISTA, SÃO MANUEL-SP, BRASIL

RESUMEN

Leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida causada por protozoos del género *Leishmania*, y transmitida a hospederos mamíferos por flebótomos infectados. Esta zoonosis incluye un amplio espectro de manifestaciones como lesiones cutáneas en el sitio de la picadura de los flebótomos hasta la leishmaniasis visceral sistémica, y pueden presentarse como leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) y leishmaniasis visceral (LV). En las zonas urbanas, los perros (*Canis familiaris*) son la principal fuente de infección de LV, además son de gran importancia en la transmisión de la enfermedad, probablemente debido al mayor parasitismo cutáneo y por estar infectados en casi todos los sitios brasileños de leishmaniasis visceral humana. Fueron evaluadas 197 muestras de sangre de perros del barrio de la Conquista, en el municipio de São Manuel-SP, Brasil. Las pruebas serológicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA fueron realizadas, y todos los animales fueron no reactivos, así como en los exámenes parasitológicos de punción de nódulos linfáticos. En el hemocultivo, 48/197 (24,3%) de las muestras presentaron crecimiento de tripanosomas, incluso tres muestras fueron positivas en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *Leishmania* spp. Solamente un animal (0,5%) con sintomatología compatible se

mostró positivo en la PCR de *Leishmania* spp. El estudio enfatiza la importancia de los esfuerzos continuos y permanentes para la vigilancia epidemiológica contra esta zoonosis, con objetivo de la detección temprana de los casos autóctonos, para evitar la propagación del agente a los humanos, animales y flebotomos. Es imprescindible que las autoridades sanitarias evalúen los casos autóctonos de leishmaniasis.

Palabras clave: Leishmaniasis, Hemocultivo, perros, vigilancia epidemiológica.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos para os hospedeiros mamíferos por flebotomíneos infectados. Este protozoário tem um ciclo de vida dimórfico, cujos parasitas residem como promastigotas extracelulares no vetor e como amastigotas intracelulares em macrófagos no hospedeiro mamífero (1). As leishmanioses incluem um amplo espectro de manifestações clínicas, desde lesões cutâneas no local da picada dos flebotomíneos até a leishmaniose visceral sistêmica (2).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a leishmaniose como sendo a segunda protozoose mais importante da atualidade, ficando atrás apenas da malária, estando ainda entre as seis mais relevantes enfermidades infecto-parasitárias do mundo (3).

As lesões cutâneas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* no Novo Mundo são denominadas de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). São de grande importância como problema de saúde pública no Brasil, tanto pela ampla distribuição geográfica do parasita como pelo grau de destruição tecidual observada nas lesões cutâneas e mucocutâneas no homem (4), além do envolvimento psicológico do doente, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria das vezes, pode ser considerada uma doença ocupacional (3,5).

Na Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) os cães e os equídeos parecem desempenhar algum papel na manutenção do ciclo de vida do parasita, atuando como reservatórios e amplificadores da epizootia em surtos envolvendo o ser humano (6,7).

Já a Leishmaniose Visceral (LV), dada à sua incidência e alta letalidade, principalmente em crianças desnutridas, é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade. Na América Latina, a LV já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste. A doença tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão no país, inicialmente predominando pelas características de ambientes rurais e periurbanos e, mais recentemente em centros urbanos (8).

Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção da LV, pois assume grande importância na transmissão da doença, provavelmente devido ao seu maior parasitismo cutâneo e por apresentar-se infectado em quase todos os focos brasileiros de calazar humano (9). A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente que no homem. O cão é muito importante na epidemiologia da LV, por se tratar do principal reservatório do agente no âmbito doméstico, pelo fato de viver em contato estreito com humanos e atrair a presença do vetor.

Exames parasitológicos baseados na demonstração das formas amastigotas do parasito por microscopia, tanto dentro dos macrófagos como na forma livre, permitindo o diagnóstico definitivo da infecção, podem ser facilmente realizados, sendo os procedimentos corados por Giemsa, Panótico ou Leishman (10, 11, 12). O isolamento das formas promastigotas de

Leishmania spp. por meios de cultura a partir de diversos tecidos, bem como a partir do sangue no caso das hemoculturas, apesar de trabalhoso, também é uma técnica possível (13).

Dentre os métodos moleculares, a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) tem sido utilizada como ferramenta em pesquisas epidemiológicas, bem como para identificação de espécies de *Leishmania* spp., por amplificação seletiva de sequências de DNA do parasito. A detecção de DNA é possível em uma variedade de tecidos, incluindo medula óssea, biópsias cutâneas, aspirados de linfonodos, sangue, cortes histológicos de tecidos parafinados, e também no vetor (14, 12, 15).

Para uma melhor acuidade diagnóstica da LV faz-se necessário o uso de uma combinação de técnicas, uma vez que não está disponível um método que isoladamente reúna todas as características consideráveis desejáveis para o diagnóstico, tais como: fácil execução, custo acessível, rapidez e especialmente sensibilidade e especificidade altas. Recomenda-se que o diagnóstico desta doença seja realizado baseando-se na sintomatologia clínica, nas características epidemiológicas da região e nos exames laboratoriais, desta forma contribuindo para o destino correto dos animais verdadeiramente positivos. Isto é importante tanto para os aspectos de saúde pública quanto aos de ética, pois contribuirá para diminuição da eutanásia desnecessária de cães erroneamente considerados infectados.

A hemocultura representa um teste parasitológico cuja positividade demonstra a presença do parasita na corrente sanguínea, o qual é visualizado ao microscópio óptico. Esta é uma diferença importante em relação à técnica de PCR, a qual tem capacidade de detectar DNA do parasita, que não necessita estar presente inteiro na circulação (16).

Quando se identifica hemocultura positiva, é desejável obter lâmina corada, o que se torna difícil, devido à necessidade da presença de parasitas em quantidade suficiente para sua visualização. Estudos confirmam que a hemocultura é sensível para o diagnóstico da doença de Chagas, sendo que pode haver resultados persistentemente negativos, mesmo que a sorologia convencional mostre sempre resultado positivo (13). Sua sensibilidade aumenta quando o volume e o número de amostras é maior, o tempo entre a coleta e o processamento é menor e quando se utiliza o meio LIT (Liver Infusion Tryptose) para cultivo (17).

Os métodos diagnósticos sorológicos da LVC antes recomendados pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) eram o ELISA como método de triagem e a RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) como confirmatório (18). Apesar das conhecidas vantagens apresentadas por esta técnica, como facilidade na execução, rapidez na emissão de resultados e baixo custo (19,20), este teste apresenta algumas desvantagens, pois poderia identificar grande número de animais falso-positivos e, sendo assim, não seria o mais específico para o diagnóstico da LV, tendo em vista a possibilidade de apresentar reação cruzada com outras enfermidades, como a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), com a doença de Chagas, ou ainda, com outros agentes infecciosos, tais como *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Babesia canis* e *Dirofilaria immitis* (21,22,23,24). Porém, atualmente, com o intuito de aperfeiçoar a técnica de diagnóstico da LVC, o Ministério da Saúde estabeleceu a substituição do protocolo de triagem com ELISA e confirmação com RIFI, com a implantação do teste rápido imunocromatográfico com antígenos recombinantes (k26 e k39) como triagem e o ELISA como confirmatório, considerando vantagens e facilidades no teste rápido imunocromatográfico e ao fornecimento de resultados semi-automatizados sem subjetividade no ELISA (25).

Tendo em vista as dificuldades de controle da doença, a metodologia proposta para a vigilância e adoção de medidas baseia-se em uma melhor definição das áreas de transmissão ou de risco. O novo enfoque é o de incorporar os estados e municípios silenciosos, ou seja, sem ocorrência de casos humanos ou caninos da doença, nas ações de vigilância da mesma, visando assim evitar ou minimizar os problemas referentes a este agravo em áreas sem transmissão.

O município de São Manuel (SP), de acordo com a Secretaria de Estado de Saúde e Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), foi classificado como silencioso não receptivo e vulnerável, ou seja, não apresenta confirmação de casos autóctones humanos ou caninos e não há presença conhecida do vetor (26,27). Está localizado próximo a Botucatu-SP, onde a cidade também é considerada silenciosa a respeito da leishmaniose, pois ainda não se encontrou o vetor flebotomíneo no local. Por este motivo, a detecção precoce de casos caninos por meio de exames sorológicos e a possível identificação da espécie dos parasitas obtidos de aspirados de linfonodos e/ou medula óssea dos animais procedentes do Bairro da Conquista poderão auxiliar na adoção de condutas estratégicas rápidas visando à prevenção e controle das leishmanioses pelos órgãos de saúde, especialmente em se tratando de LV, na tentativa de bloquear a expansão da doença e a ocorrência de casos humanos e caninos.

Desta forma, o objetivo do trabalho foi detectar mediante exames laboratoriais os cães positivos para *Leishmania* spp., procedentes do Bairro da Conquista, em São Manuel-SP, tendo em vista que os mesmos apresentavam sintomas sugestivos para leishmaniose (emaciação, alopecia, pêlos quebradiços e opacos, úlceras de pele, etc).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram analisados 197 soros de cães sintomáticos e assintomáticos do bairro da Conquista, no município de São Manuel-SP, dos quais 64 (32,5%) eram provenientes de cães machos e 133 (67,5%) de fêmeas, sendo que 22/197 (11,1%) dos animais que apresentavam sinais clínicos sugestivos de leishmaniose eram machos, e 21/197 (10,6%) fêmeas (Tabela 1).

Tabela 1. Dados dos cães procedentes do Bairro da Conquista em São Manuel-SP, quanto as variáveis sexo e presença ou ausência de sinais clínicos.

Variável	Total (n) – (%)	Sinais clínicos*	
		*Sintomáticos - (%)	Assintomáticos-(%)
Sexo			
Machos	104 – 52,8	22 – 11,1	82 – 41,6
Fêmeas	93 – 47,2	21 – 10,6	72 – 36,6
Total	197 – 100,0	43 – 21,8	154 – 78,2

*Foram considerados como sinais clínicos: onicogribose, emagrecimento progressivo, úlceras ou lesões na pele, pneumonia, linfadenomegalia, alopecia, esplenomegalia, hepatomegalia, lesões oculares e outros.

O exame clínico atentou para a condição corporal, coloração das mucosas, presença de lesões de pele (especialmente úlceras, feridas, lesões cicatrizadas com alopecia) e quaisquer outras alterações. Foi realizada palpação de cadeia linfática para constatação de infartamento de linfonodos, bem como palpação de fígado e baço para identificação de hepato e esplenomegalia.

As amostras de sangue foram coletadas para as provas sorológicas e hemocultura e para os cães sintomáticos, animais com linfonodos infartados ou amostras positivas nas provas anteriores, foi realizada a punção aspirativa de linfonodos e/ou punção de medula óssea para esfregaço em lâmina de vidro para identificação por exame parasitológico e PCR.

A pesquisa foi realizada com o consentimento e com a parceria da Prefeitura Municipal de São Manuel-SP.

Hemocultura

Na hemocultura, foram separados três tubos, contendo, em cada um, 5mL de meio LIT (Liver Infusion Tryptose) estéril. Com uma seringa estéril de 1mL, retirou-se a porção

Langoni H, Richini-Pereira VB, Scremin C, Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Ulmann LS. et al. Detecção molecular de *Leishmania* spp. em material de hemocultura, e diagnóstico sorológico para leishmaniose em cães procedentes do bairro da Conquista, São Manuel-São Paulo, Brasil. Vet. e Zootec. 2015 dez.; 22(4): 580-590.

plasmática e transferiu-se lentamente para o primeiro tubo. Este procedimento foi repetido para a porção leucocitária, a qual foi transferida para o segundo tubo e, igualmente para o sedimento de hemácias, o qual foi transferido para o terceiro tubo. As culturas foram mantidas em estufa a 28 a 30°C e analisadas quinzenalmente até quatro meses após a inoculação segundo Luz et al. (13), quando então as culturas positivas foram submetidas ao preparo para a extração do DNA de *Leishmania* spp. (28).

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania* spp.

A técnica de RIFI foi realizada de acordo com Camargo et al. (29) Após a leitura dos controles, foi procedido o exame das amostras em teste, considerando-se como título final a maior diluição do soro em que ainda ocorresse fluorescência completa na borda de pelo menos 50% das promastigotas.

Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA das amostras de linfonodo dos animais foi realizada empregando-se o Kit Illustra Tissue & Cells genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare). A quantificação foi avaliada em espectrofotômetro (NanoVue-GE Healthcare).

Amplificação do DNA

A amplificação do DNA foi realizada utilizando os conjuntos de *primers* LIN R4 e LIN 19 segundo Ikonopoulou et al. (30) e perfil de ciclagem conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1: Iniciadores utilizados nas reações de Reação em Cadeia da Polimerase para *Leishmania* spp., indicando o tamanho do amplicon, a sequência e o perfil de ciclagem.

Agente	Amplicon	Iniciadores	Sequência	Perfil de ciclagem
<i>Leishmania</i> spp	720pb	LINR4	5'-GGGGTTGGTGTAAAATAGGG-3'	3min { 95°C- 32X { 95°C-30s 58°C-30s 72°C- 1min 72°C- 7min
		LIN19	5'-CAGAACGCCCTACCCG-3'	

As reações de PCR foram realizadas em microtubo de 0,5mL com volumes totais de 25 µL contendo tampão de reação 10mM Tris HCl pH 8.0, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP, 20pM de cada *primer*, 0,2 unidades de *Taq platinum* polymerase (Invitrogen) e 10ng de DNA genômico. A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf).

A corrida eletroforética foi realizada utilizando gel de agarose a 1,5% adicionado de 0,5µg/mL de brometo de etídio em cuba horizontal contendo TBE 1X (89 nM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico e 20 mM EDTA) e a voltagem empregada foi 65V. Após o término da corrida o gel foi visualizado em transluminador de luz UV e a imagem foi capturada pelo sistema GelDoc-It® Imaging System.

Foi utilizado 4 µL de marcador de 100pb (Invitrogen) e 8 µL da amostra. Em cada amostra avaliada, bem como para o marcador molecular, foi adicionado 2 µL do tampão de amostra (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol, 30% glicerol, 70% água Milli-Q).

RESULTADOS

Observaram-se formas flagelares em 48/197 (24,3%) hemoculturas, enquanto que em 149/197 (75,7%) não houve crescimento (Tabela 2).

Tabela 2. Exames de hemocultura em meio *LIT/NNN a partir de amostras de sangue de 197 cães procedentes do bairro da Conquista, São Manuel – SP.

Número de amostras	Hemoculturas		
	Negativos	Positivos	
197	149	48	
Total (%)	75,7	24,3	100,0

*LIT= meio Liver Infusion Tryptose + meio NNN (Mc Neal, Novy & Nicolle) para cultivo de *Leishmania*

Os demais resultados das avaliações sorológicas (ELISA e RIFI), parasitológico direto e molecular de aspirado de linfonodo foram negativos para 100% das amostras. De todas as hemoculturas positivas, 3/48 (6,25%) foram positivas à prova de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp., sendo que destes, apenas um cão (0,5%) apresentava sintomatologia característica de leishmaniose, porém não apresentou sorologia positiva.

Das 48 (24,3%) amostras positivas na hemocultura, 28/197 (14,2%) eram de animais machos e 20/197 (10,1%) eram fêmeas, no entanto nos resultados de PCR, apenas 3 amostras (1,5%) foram positivas para *Leishmania* spp. e as 3 amostras se tratavam de animais fêmeas, onde apenas 1 animal (0,5%) apresentava sintomatologia sugestiva da doença (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. PCR para *Leishmania* spp. a partir das amostras de 48 hemoculturas positivas de cães procedentes do Bairro da Conquista, São Manuel –SP.

Número de Amostras	* PCR hemoculturas positivas		
	Negativos	Positivos	
48	45	3	
Total (%)	93,75	6,25	100,0

*Apenas foram realizados PCR das amostras que se mostraram positivas à hemocultura.

Tabela 4. Associação da variável sexo com a sintomatologia, hemocultura e PCR para *Leishmania* spp.

Variável	Animais – (%)	Sintomatologia clínica	Hemoculturas Positivas	*PCR Positivos
Sexo		*Sintomáticos		
Machos	104 – 52,8%	22 – 11,1%	28 – 14,2%	0 – 0,0%
Fêmeas	93 – 47,2%	21 – 10,6%	20 – 10,1%	3 – 1,5%
Total	197 – 100,0%	43 – 21,8%	48 – 24,3%	3 – 1,5%

*PCR – apenas foi realizado PCR de amostras com hemoculturas positivas.

DISCUSSÃO

Langoni et al. (31), em pesquisa de vigilância epidemiológica no município de Botucatu-SP, avaliaram 781 amostras de soro canino durante campanha de vacinação anti-rábica, para pesquisa de anticorpos da classe IgG anti *Leishmania* spp. pela técnica de RIFI. Todos os soros testados foram negativos, o que indica que a cidade, naquele momento, não apresentava risco potencial para ocorrência de surto epidêmico de leishmaniose.

O exame sorológico pelas técnicas de RIFI e ELISA já é consolidado em inquéritos caninos para a detecção da leishmaniose visceral, apresentando altas taxas de sensibilidade e

especificidade (32; 33). Entretanto, os resultados dessas metodologias relacionados à forma cutânea da doença são discordantes. Pode ser ressaltada a importância de uma terceira técnica, a hemocultura. Dado que no estudo os animais positivos à hemocultura foram negativos à PCR para *Leishmania* spp., o valor desta técnica seria avaliar a positividade a tripanossomatídeos em geral, sendo necessário outras provas moleculares para confirmação diagnóstica.

Em infecções humanas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* é descrito que a resposta imune é predominantemente celular, determinando assim fraca resposta humoral e baixa quantidade de anticorpos séricos detectáveis pelos métodos tradicionais (34).

Tomaz-Soccol et al. (35), em estudo realizado no Estado do Paraná, avaliaram casos autóctones de leishmaniose visceral em 24 cães que apresentavam perfil clínico compatível com leishmaniose. Para tanto, foram realizadas hemoculturas e culturas de punção de medula óssea e linfonodos em meio NNN, tendo-se culturas positivas em 19 das 24 culturas realizadas. Quatorze isolados foram identificados pela técnica de RAPD-PCR como *L. (Leishmania) infantum* e cinco como *L. (Viannia) braziliensis*, concluindo-se que todos os cães com *L. (L.) infantum* tratavam-se de casos alóctones.

Tendo em vista que o município de São Manuel localiza-se a cerca de 23 Km de Botucatu, bem como próximo a Lençóis Paulista –SP (aproximadamente 30 Km) justifica-se a necessidade da vigilância epidemiológica para esta zoonose, já que, conforme o Programa Estadual de Controle da Leishmaniose Visceral Americana (LVA), o município de Botucatu está classificado como “silencioso, não receptivo e vulnerável”, com ausência de casos autóctones humanos e caninos, sem confirmação comprovada do vetor, porém próximo e com fluxo frequente de animais e pessoas para municípios com epidemias recentes, como Bauru, Agudos e Lençóis Paulista, que apresentam transmissão humana e canina confirmada e são municípios, assim como Botucatu, localizados às margens da Rodovia Marechal Rondon, uma das vias mais movimentadas do interior paulista e possível rota de disseminação da infecção pelo Estado (36).

No período entre 1999 e 2013, o município de Botucatu registrou 16 casos de LTA e nenhum caso de LVA, e Lençóis Paulista registrou 5 casos de LTA e 3 casos de LVA, sendo um caso no ano de 2007 outro no ano de 2010 e o terceiro caso em 2013 (37,38).

Portanto, o estudo ressalta a importância de esforços contínuos e permanentes na vigilância epidemiológica contra esta doença, visando o diagnóstico precoce de casos autóctones, para prevenção posterior na disseminação do agente para o homem, animais e flebotomíneos. É imprescindível que as autoridades de Saúde Pública avaliem casos autóctones de leishmanioses, para que sejam implementadas as medidas de vigilância e controle destas zoonoses, bem como o apoio de médicos veterinários das clínicas da região e campanhas de conscientização da população a respeito da enfermidade.

AGRADECIMENTOS

À Prefeitura Municipal de São Manuel pelo suporte financeiro e aos médicos veterinários André A. Cutolo, Audrey Rennó Campos Braga, Luciano José Eloy, Priscila Barbante e Patrícia Yoshida Faccioli Martins, pela ajuda na colheita das amostras e registro dos dados.

REFERÊNCIAS

1. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saraiva NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005; 366:1561-1577.

2. Call MC, Zang WW, Matlashewski G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. PLOS Pathogens. 2003; 9.
3. Brasil. Guia de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde. Fundação Nacional De Saúde, Centro Nacional De Epidemiologia, Coordenação Nacional De Dermatologia Sanitária. Brasília. 1994; 44p.
4. Tolezano JE. Ecoepidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1994; 89:427-434.
5. Dourado MIC, Noronha CV, Alcantara N, Ichihara MYT, Loureiro S. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana e suas relações com a lavoura e o garimpo, em localidade do Estado da Bahia (Brasil). Rev. Saude Pub. 1989; 23:2-8.
6. Yoshida ELA, Correa FMA, Marques SA, Stolf HO, Dillon NL, Momen H, Grimaldi Júnior G. Human, canine and equine (*Equus caballus*) leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* (= *L. braziliensis braziliensis*) in the south-west Region of São Paulo State, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1990; 85:133-134.
7. Lonardon MVC, Teodoro U, Arraes SMAA, Silveira TGV, Bertolini DA, Ishikawa EAY, Shaw JJ. Nota sobre leishmaniose canina no noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil. Rev. Saude Pub. 1993; 27:378-379.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília. 2006.
9. Machado JG. Comparação do diagnóstico sorológico da Leishmaniose visceral Canina entre laboratórios de Belo Horizonte, 2003-2004. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2004; 48p.
10. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2002; 9:951-958.
11. Simões-Mattos L, Mattos MRF, Teixeira MJ, Oliveira-Lima JW, Bevilaqua CML, Prata-Júnior RC, Holanda CM, Rondon FCM, Bastos KMS, Coêlho ZCB, Coêlho ICB, Barral A, Pompeu MML. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. Veterinary Parasitology. 2005; 127:199-208.
12. Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. 3 ed. Canadá: Saunders/Elsevier. 2006; 1387p.
13. Luz ZMP, Coutinho MG, Caçado JR, Krettli AU. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da Doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 1994; 27: 146-148.
14. Muller N, Zimmermann V, Forster U, Bienz M, Gottstein B, Welle M. PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. Vet Parasitol. 2003; 114(3):223-229.
15. Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília: Ministério da Saúde. 2011.

16. Lucheis SB, Da Silva AV, Araújo Jr. JP, Langoni H, Meira DA, Marcondes-Machado J. et al. Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas' disease living in Botucatu town and surrounding region. São Paulo State, Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2005; 11(4): 492-509.
17. Portela-Lindoso AAB & Shikanay-Yasuda MA. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Rev Saúde Pública*. 2003; 37(1): 107-115.
18. São Paulo. Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) e Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. São Paulo. 2006.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília. 2003; 9-18.
20. Mohammed AR, Wrigth EP, Abdel Rahman AM, Kolk A, Laarman JJ, Pondman KW. Serodiagnosis Sudanese visceral an mucosal leishmaniasis: comparasion of Elisa-immunoflorescence and indirect haemagglutination. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1985; 80:271-274.
21. Brasil. Ministério Da Saúde. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar). 2 ed. Brasília: Fundação Nacional da Saúde. 1996.
22. Mancianti F, Pedonese F, Poli A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluoresce assay. *Vet. parasitol*. 1996; 65(1):1-9.
23. Alvar J, Canãvete C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. *Advances in Parasitology*. 2004; 57: 1-58.
24. Gomes APS, Cordeiro RLR. Reação cruzada no diagnóstico sorológico de leishmaniose canina. *Rev. Bras. Parasitol. Vet*. 2004; 23(1):238.
25. Luciano RM, Lucheis SB, Troncarelli MZ, Luciano DM, Langoni H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci*. 2009; 46:181-187.
26. Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília: Ministério da Saúde. 2011.
27. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília. 2003; 9-18.
28. Rangel O, Himaroto MR, Henriques LF, Taniguchi HH, Ciaravolo RMC, Tolezano JE, França ACC, Yamashiro J, Oliveira SS. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo para 2013. *BEPA*. 2013; 10(111):5-16.

29. Pinto PLS. Circulação e caracterização de *Trypanosoma cruzi* isolados de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo, Brasil. 141f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. 2000.
30. Camargo ME. Fluorescent antibody test for the sorodiagnosis of american trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1966; 8:227-234.
31. Ikonopoulou J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. Veterinary Parasitology. 2003; 113:99-103.
32. Langoni H, Modolo JR, Souza LC, Araujo WN, Shimabukuro FH, Mendonca AO, Leite BLS, Padovani CR. Epidemiological vigilance for canine leishmaniasis in the country of Botucatu, SP, Brazil. ARS Veterinária. 2001; 17:196-200.
33. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos: 1ª ed. Brasília. 2006.
34. Oliveira LS, Julião FS, Souza VMM, Freitas DS, Souza BMPS, Paule BJA, Aguiar PHP, Melo SMB, Franke CR. A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. Ciência Animal Brasileira 2005; 6:41-47.
35. Ajadary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A, Coutinho SD. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. Journal of Infectious Diseases. 1996; 173:758-761.
36. Tomaz-soccol V, Castro EA, Navarro IT, De Farias MR, Carvalho Y, Bispo S, Membrve NA, Minozzo JC, Truppel J, Bueno W, Luz E. Allochthonous cases of canine visceral leishmaniasis in Paraná, Brazil: epidemiological implication. Revista Bras. Parasitol. Vet. 2009; 18(3):46-51.
37. São Paulo. Secretaria do Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Distribuição do número de Casos autóctones e óbitos de LVA, no Estado de São Paulo, Disponível on line em http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_lpi.htm Acesso em Nov/2014.
38. São Paulo. Secretaria do Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Leishmaniose Tegumentar Americana. Distribuição do número de Casos Confirmados segundo GVE de Notificação e Ano de Diagnóstico e segundo GVE de Residência e Ano Diagnóstico. Estado de São Paulo, 2007-2013. Disponível on line em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lta_lpi.htm Acesso em Nov/ 2014.

Recebido em: 11/06/2014

Aceito em: 22/04/2015