UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

Livia Carla Ramos Augusto

Estudo de *Leishmania* spp. em amostras provenientes de cães e humanos e suas implicações em saúde pública na região de Bauru, São Paulo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira

Botucatu
2018

Livia Carla Ramos Augusto

Estudo de *Leishmania* spp. em amostras provenientes de cães e humanos e suas implicações em saúde pública na região de Bauru, São Paulo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Augusto, Livia Carla Ramos.
Estudo de *Leishmania* spp. em amostras provenientes de cães e humanos e suas implicações em saúde pública na região de Bauru, São Paulo. / Livia Carla Ramos Augusto. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Virgínia Bodelão Richini Pereira
Capes: 21300003

1. Leishmaniose visceral. Análise espacial (Estatistica). Doenças - Diagnóstico.

Palavras-chave: Análise Espacial; Diagnóstico; Leishmaniose.

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, Jurandi e Rita de Cássia. Obrigada por todo apoio, paciência, amor, compreensão e incentivo em todos os momentos da minha vida. Sem vocês, eu nada seria.

Agradecimentos

À Deus e aos meus santos protetores, Nossa Senhora de Fátima, Santo Antônio e São Benedito, por me proporcionar tantas alegrias, conquistas e saúde. Agradeço diariamente.

À minha preciosa família, Jurandi, Rita de Cássia, Wesley, Luciana, Anna Júlia, Lucas, Larissa, Zezinho, Benjamin e Ângelo, por sempre estarem ao meu lado. Vocês são meu porto seguro, minha base e meus amores.

Ao meu eterno amor, João Gabriel, pelo apoio incondicional, incentivo nos momentos difíceis com muito carinho e compreensão. Obrigada por sempre estar ao meu lado. Amo você!

À minha orientadora, Virgínia, pela grande oportunidade, confiança, ajuda, ensinamentos e por acreditar no meu potencial. Apesar das minhas dificuldades em conciliar trabalho e estudo, você me incentivou e me fez acreditar que era possível. Obrigada por ser minha orientadora e amiga.

Ao financeiro da LC Plásticos, em especial minha prima Aline, que me ajudou a concluir as disciplinas e a conciliar o estudo com o trabalho.

As meninas da sorologia do IAL, Zezé, Milena, Bel e Adriana, pelo grande apoio, amizade e parceria no trabalho diário e nas pesquisas.

Aos meus colegas de trabalho do IAL, Luciana, Adriana Pensuti, Laís, Maricene, Lúcia, Lucas, Jean, Val, Mariana, Kelly, Cris, Cláudia, que de alguma maneira auxiliaram para a realização desse trabalho.

À Simone Tateishi, pelo auxílio na tradução do artigo. Muito obrigada.

À Kethlyn, uma pessoa amiga e dedicada. Muito obrigada por colaborar tanto com o trabalho.

À Aghata, parceira e amiga de um coração enorme. Obrigada por me incentivar, ajudar e sempre me ouvir nos momentos mais difíceis.

À Barbara, pela paciência em me ensinar as técnicas de biologia molecular e por contribuir imensamente para conclusão desse trabalho.

Agradeço a todos orientados e co-orientados da Prof. Virgínia, Débora, Thiago, Natássia, Livia, Wesley, por toda paciência com minhas dúvidas e angústias durante as análises e pelo grande apoio.

Ao Prof. Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza, Dra. Laís M. Paiz e ao Prof. Dr. Rodrigo Costa da Silva, pelas correções e sugestões no trabalho. Obrigada por todo tempo dispensado em me ajudar.

À Prof. Dra. Simone Lucheis, por toda disponibilidade em colaborar com todas as pesquisas no IAL.

Ao Dr. José Eduardo Tolezano, pelo auxílio e orientações nas pesquisas realizadas no IAL.

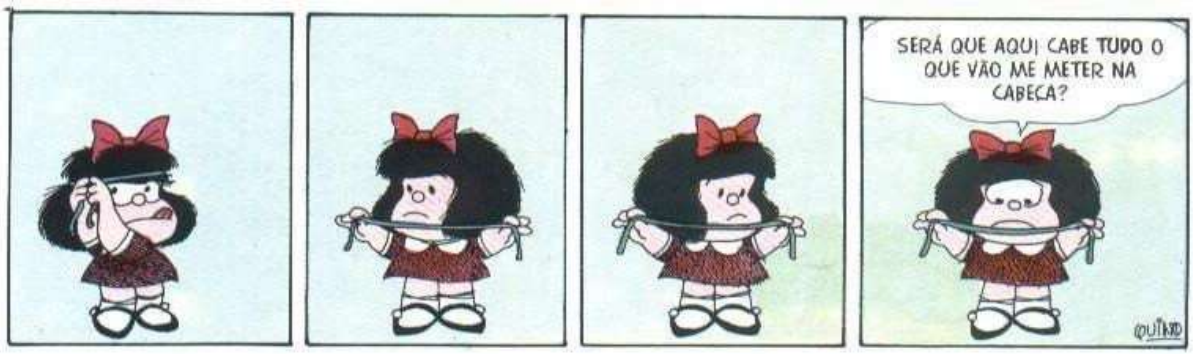
Ao Prof. Dr. Cassiano Victória, que me recebeu com todo apoio e paciência para realização de todas as análises espaciais e ao Dr. Diego Borin Nóbrega por realizar as análises estatísticas.

À todos funcionários do Centro de Controle de Zoonose de Bauru, por todas as coletas e colaboração para realização desse trabalho.

Ao serviço de biblioteca da Universidade Estadual Paulista - UNESP – Botucatu, pela correção das referências bibliográficas e pela elaboração da ficha catalográfica.

Agradeço imensamente aos funcionários, docentes e alunos do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e do programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu. Sou imensamente grata.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio à pesquisa nº 2012/21145-4 e 2015/17519-4.


SERÁ QUE AQUI CABE TUDO O QUE VÃO ME METER NA CABEÇA?
QUINO

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes".

(Marthin Luther King)

Resumo

Ramos-Augusto, L.C. **Estudo de *Leishmania* spp. em amostras provenientes de cães e humanos e suas implicações em saúde pública na região de Bauru, São Paulo.** 2018. 118p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

As leishmanioses são doenças zoonóticas de importância em saúde pública. Os objetivos do trabalho foram comparar as técnicas laboratoriais convencionas utilizadas para o diagnóstico de infecção por *Leishmania* spp. em amostras de sangue humano e canino com técnicas moleculares e realizar a quantificação da carga parasitária. Além disso, realizar a análise espacial dos casos de leishmaniose visceral humana (LV) e canina (LVC), confirmados laboratorialmente e notificados, baseando-se na incidência da enfermidade, entre 2014 a 2016, no município de Bauru (SP), com intuito de identificar as áreas prioritárias para implementação de medidas de vigilância e de controle. Foram avaliadas amostras de 26 pacientes com suspeita clínica de LV por meio do exame parasitológico direto em aspirado de medula óssea, teste imunocromatográfico rápido (TR), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR). Além disso, foram avaliadas amostras de 22 pacientes humanos com suspeita clínica de leishmaniose tegumentar (LT) para realização da RIFI, PCR e qPCR. As amostras caninas foram obtidas por meio dos inquéritos sorológicos realizados em 4725 cães, pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru, e, mediante a positividade no TR (TR-DPP®) foi realizado o teste imunoenzimático (ELISA), PCR e qPCR. A análise espacial foi realizada em 39 casos humanos de LV, com diagnóstico obtido a partir do critério clínico-laboratorial, e nos 4725 cães pertencentes aos inquéritos sorológicos realizados entre 2014 a 2016, destacando os casos de LVC. Nas 26 amostras humanas analisadas para LV, a positividade obtida no parasitológico, TR, RIFI, PCR e qPCR foram: 80,8%, 80,8%, 73,1%, 84,6% e 84,6%. A RIFI foi a metodologia que obteve menor positividade e concordância com as demais metodologias e a carga parasitária se concentrou entre 100 e 1.000 parasitas/mL (68,2%). Nas 22 amostras humanas analisadas para LT, a positividade obtida na RIFI, PCR e qPCR foram: 9,1%, 18,2 e 18,2%. A RIFI obteve menor positividade e concordância insignificante com as técnicas moleculares e a carga parasitária das amostras se concentraram entre 100 e 1.000 parasitas/mL (100%). Nas amostras caninas, a positividade de 11,5% (543/4725) foi obtida em ambas as técnicas (TR-DPP® e ELISA). Nos cães TR-DPP® positivos, a positividade no ELISA, PCR e qPCR foram: 64,9%, 63,9% e 65%. A concordância foi excelente entre o ELISA e as técnicas moleculares. A carga parasitária se concentrou entre 1.000 e 10.000 parasitas/mL (73,9%). Foram identificadas cinco áreas com densidade alta de LV, localizadas nas regiões norte e oeste do município. Foram identificadas duas áreas com densidade alta de LVC, ambas localizadas na região norte. Em duas localidades, na região norte, houve sobreposição, compreendendo 68% dos casos de LVC notificados nos inquéritos sorológicos e 38,5% casos de LV humano. As técnicas moleculares em amostras de sangue constituem uma alternativa menos invasiva de diagnóstico tanto para LV quanto para LT em humanos, devido a alta positividade entre as amostras analisadas e/ou excelente concordância com as técnicas convencionais e, em cães, podem ser utilizadas tanto para o diagnóstico quanto para complementar os resultados sorológicos. As análises espaciais são capazes de gerar informações úteis que auxiliam em um melhor planejamento de ações de vigilância e no controle da doença, além da otimização do uso de recursos públicos para a execução dessas ações.

Palavras-chave: leishmanioses, diagnóstico, análise espacial.

Abstract

Ramos-Augusto, L.C. **Study of *Leishmania* spp. in samples from dogs and humans and their implications for public health in the region of Bauru, São Paulo.** 2018. 118p. Thesis (Master) – Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

Leishmaniasis is a zoonotic disease of public health significance. The aims of the present study were to compare the conventional laboratory techniques used for the diagnosis of *Leishmania* spp. in human and canine blood samples with the molecular techniques and carry out the quantification of the parasite load. In addition, to perform a spatial analysis of visceral leishmaniasis in humans (VL) and dogs (CVL), laboratory confirmed and notified, based on the incidence of the disease in Bauru city (SP), during 2014 to 2016, with the objective of identify priority areas for surveillance and control of VL. Twenty-six samples with clinical suspicion of VL were evaluated through direct parasitological in bone marrow aspirate, rapid immunochromatographic test (RT), indirect immunofluorescent antibody test (IFAT), polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR (qPCR). In addition, twenty-two human cases with clinical suspicion of TL were selected for the accomplishment of IFAT, PCR and qPCR. The canine samples were obtained through serological investigations carried out in 4,725 dogs by the Center for Zoonoses Control (CCZ) in Bauru, and by means of the positivity in RT (RT-DPP®) was realized the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), PCR and qPCR. The spatial analysis was performed in thirty-nine human cases of VL, with a diagnosis obtained from clinical laboratory, and in 4,725 dogs belonging to the serological investigations conducted during 2014 to 2016, highlighting CVL cases. In the twenty-six human samples analyzed for VL, the positivity obtained in parasitological, RT, IFAT, PCR and qPCR were: 80.8%, 80.8%, 73.1%, 84.6% and 84.6%. IFAT was the methodology that obtained less positivity and agreement with other methodologies. The parasite load was concentrated between 100 and 1,000 parasites/mL (68.2%). In the twenty-two human samples analyzed for tegumentary leishmaniasis (TL), the positivity obtained in the IFAT, PCR and qPCR were: 9.1%, 18.2 and 18.2%. The IFAT obtained lower positivity and negligible agreement with the molecular techniques and the parasite load of the samples were concentrated between 100 and 1,000 parasites/mL (100%). In the canine samples, 11.5% (543/4,725) of positivity were obtained for both techniques (RT-DPP® and ELISA). In RT-DPP® positive dogs, positivity in ELISA, PCR and qPCR were: 64.9%, 63.9% and 65%. The agreement was excellent between ELISA and molecular techniques. The parasite load was concentrated between 1,000 and 10,000 parasites/ml (73.9%). Five areas with high VL density were identified, located in the north and west regions of the city. Two areas with high CVL density were identified, both located in the north region. In two locations in the north region was overlap, comprising 68% of cases of CVL notified in serological investigations and 38.5% cases of human VL. Molecular techniques in blood samples consist in a less invasive diagnostic alternative for both VL and TL in humans, due to the higher positivity between the samples analyzed and/or the excellent agreement with the conventional techniques and, in dogs, can be used both for diagnosis and to complement the serological results. Spatial analysis provides useful information and can assist in the better surveillance planning actions and control of the disease, besides optimizing the use of resources for the execution of these actions.

Key words: leishmaniasis, diagnosis, spatial analysis.

SUMÁRIO

Capítulo I 8
Revisão da Literatura 9
Objetivos 26
Referências 28
Capítulo II 43
Artigo Científico 1 44
Artigo Científico 2 74
Conclusão 93
Apêndices 95
Anexos 100

Capítulo I

Revisão da Literatura

As leishmanioses são zoonoses de grande importância à saúde pública. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), zoonoses são doenças ou infecções causadas por diversos tipos de agentes (bactérias, parasitas, vírus ou agentes não convencionais), transmitidos naturalmente de animais vertebrados para humanos. Além de serem um problema de saúde pública, muitas zoonoses causam impactos importantes na economia global (1).

As zoonoses foram reconhecidas há vários séculos e mais de 200 já foram descritas. De acordo com Jones et al. (2), ao analisarem 335 eventos de doenças infecciosas emergentes (DIE), entre 1940 e 2004, observaram que 60,3% destes eram zoonoses e 71,8% eram originárias de espécies de animais silvestres. Atualmente, 75% de todas as doenças novas, emergentes e re-emergentes, que afetam os seres humanos, são de origem zoonótica (3).

O termo zoonose emergente foi definido como um patógeno recém-descoberto, que sofreu evolução recente ou que já tenha sido descrito anteriormente, mas que demonstra um aumento na sua incidência ou expansão geográfica quanto ao número de hospedeiros e/ou vetores (4). Vale ressaltar que, somente no último século, 14 doenças parasitárias ou infecciosas emergiram ou re-emergiram, destacando-se: ebola, dengue, chikungunya, zika e febre amarela (5).

A expansão populacional e urbanização são fatores importantes responsáveis pelo surgimento dessas doenças. Estima-se que a população mundial alcançará 10 bilhões em 2050 e 60% será urbana em 2030, significando um aumento da densidade demográfica em grandes centros urbanos (5). Além disso, para suportar a demanda nutricional, é necessária uma maior produção de alimentos e, consequentemente, um aumento da prática da agricultura e pecuária, muitas vezes envolvendo a criação de diversas espécies de animais na mesma região, colaborando com a transposição da barreira de infecção inter-espécies (4).

Outros fatores que influenciam no aumento da ocorrência de zoonoses são: mudanças climáticas que facilitam a expansão de vetores, íntimo contato

com animais de estimação, turismo, globalização, domesticação e interação com animais silvestres, adaptação de patógenos a novas espécies hospedeiras e/ou aquisição de novos fatores de virulência, industrialização, transporte de pessoas e animais infectados, imunossupressão pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e transplantes, desenvolvimento de resistência à fármacos, fatores sociais e culturais como diferentes tipos de alimentação e religião (4,6).

As leishmanioses são classificadas como doenças tropicais negligenciadas, assim como, dengue, raiva, hanseníase, doença de Chagas, tracoma, entre outras (7, 8). As doenças negligenciadas são causadas por agentes infecciosos ou parasitários, endêmicas principalmente em população de baixa renda e apresentam investimentos reduzidos em pesquisas, produção de medicamentos e controle (9). Essas doenças não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para manutenção de desigualdades (10). De acordo com a OMS, mais de 1 bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, representando 1/6 da população mundial (10, 11).

As leishmanioses são doenças transmitidas por vetores e, atualmente, endêmica em 98 países (11). Aproximadamente, 12 milhões de pessoas estão infectadas no mundo e 350 milhões de pessoas possuem o risco de contrair a doença (11,12). Anualmente, estima-se 700 mil a 1 milhão de novos casos e 20 mil a 30 mil óbitos (13).

Estudos recentes apontam que as leishmanioses produzem uma carga de enfermidades em 2,35 milhões de anos potenciais de vida perdidos e/ou ajustados por incapacitados (DALY - *disability adjusted life years*), sendo 2,3% somente nas Américas. DALY é um indicador, no qual, mede-se, simultaneamente, o efeito da mortalidade e dos problemas de saúde que afetam a qualidade de vida dos indivíduos (11,14).

São doenças infecto-parasitárias importantes, causadas por protozoários intracelulares obrigatórios, posicionados taxonomicamente da seguinte forma: Domínio Eukarya; Ordem Kinetoplastida; Família Trypanosomatidae; Gênero *Leishmania* (15). Subdivididos em dois principais subgêneros*: Leishmania*, no qual o desenvolvimento do parasita ocorre na porção média e anterior do

intestino do vetor denominado região suprapilária, e *Viannia*, no qual o desenvolvimento ocorre uma parte na porção posterior do intestino do vetor denominado região peripilária (16).

Tendo em vista que se obteve um maior conhecimento sobre o parasita e com o advento de novas tecnologias, recentemente foi proposto uma nova classificação em duas principais linhagens: *Euleishmania*, composto pelos subgêneros *Leishmania* (*L.*)*, Viannia* (*V.*)*, Sauroleishmania* (*S.*) e complexo *L. enriettii,* e a *Paraleishmania*, composto por *L. hertigi, L. deanei, L. herreri, L. equatorensis*, *L. colombiensis* e o gênero *Endotrypanum* (17). Até o momento, foram descritas 53 espécies de *Leishmania*, sendo 31 capazes de infectar mamíferos e 20 espécies são patogênicas ao homem (18).

Como outros tripanossomatídeos, a *Leishmania* possui uma mitocôndria única ramificada denominada cinetoplasto, no qual, o seu material genético (kDNA) consiste em uma rede composta por milhares de círculos (maxicírculos, com poucas dezenas de cópias e minicírculos, com milhares de cópias) concatenados entre si, constituindo-se um dos maiores complexos estruturais mitocondriais na natureza (19). Os maxicírculos, assim como o DNA mitocondrial em outros eucariotos, codificam RNA ribossomal e proteínas da cadeia respiratória, enquanto que, os minicírculos são responsáveis por codificar os RNAs guias (*guide RNAs*), nos quais atuam na edição específica dos transcritos dos maxicírculos (20).

As leishmanioses são tradicionalmente separadas em dois grupos: Velho Mundo ("*Old World*") e Novo Mundo ("*New World*"). Essa divisão existe para se referir a região geográfica onde a infecção foi adquirida. Leishmanioses do Velho Mundo referem-se as espécies encontradas na Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e África, enquanto que, as do Novo Mundo são as espécies encontradas no México, América Central e América do Sul (21). Uma diferença no genoma também foi descrita, onde as espécies pertencentes ao Velho mundo [*Leishmania* (*L.*) *infantum*, *Leishmania* (*L.*) *donovani*, *Leishmania* (*L.*) *major*, *Leishmania* (*S.*) *tarentolae*] compreendem 36 cromossomos, enquanto, que espécies do Novo Mundo [*Leishmania* (*V.*) *braziliensis* e *Leishmania* (*L.*) *mexicana*] possuem 35 e 34 cromossomos, respectivamente, devido a eventos

de fusão de dois a quatro cromossomos (22). Peacock et al. (23) analisaram o genoma das espécies *L.* (*L.*) *infantum* e *L.* (*V.*) *braziliensis* e compararam com a sequência do genoma de *L. major.* Identificaram 200 genes com uma distribuição diferente entre as espécies estudadas e mostraram que a formação de pseudogenes e a perda dos genes são os principais motivos que moldam os diferentes genomas.

A transmissão de *Leishmania* ocorre por meio da picada de fêmeas hematófagas, pertencentes aos gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (18). Ao realizar o repasto sanguíneo em mamíferos infectados, ingerem também os macrófagos parasitados pelas formas amastigotas. Em seguida, dentro do trato digestório anterior do vetor, os macrófagos se rompem liberando o parasita, ocorrendo uma intensa reprodução por divisão binária e uma diferenciação para as formas flageladas promastigotas, denominado metaciclogênese (24). Dentro do vetor, ocorre a diferenciação do parasita em cinco formas principais: promastigotas procíclicas, nectomonadas, leptomonodas, haptomonadas e promastigotas metacíclicas (forma infectante) (24, 25).

Após esse período, quando as fêmeas realizam um novo repasto sanguíneo, há liberação do parasita na forma promastigota metacíclica, flagelada, juntamente com sua saliva. Na derme do hospedeiro, o parasita intracelular obrigatório, é fagocitado por células do sistema mononuclear fagocitário. Dentro dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, os parasitas se diferenciam para sua forma amastigota e se multiplicam intensamente. Posteriormente, há o rompimento das células e a liberação de novos parasitas capazes de infectar outras células e tecidos como os linfonodos, medula óssea e baço, inibindo cada vez mais a resposta imunológica do hospedeiro (26).

Atualmente, são reconhecidas 521 espécies de flebotomíneos nas Américas, porém somente 60 foram implicados como vetores de *Leishmania.* A incriminação de espécies como vetores envolve uma análise detalhada como a densidade vetorial, antropofilia, distribuição geográfica coincidente com a presença do patógeno, sobrevivência e competência vetorial (27).

As leishmanioses são caracterizadas pelo amplo espectro de manifestações clínicas, variando, principalmente, de acordo com a espécie do parasita, da relação do parasita com hospedeiro e da resposta imunológica do indivíduo (15,28). Classicamente, as enfermidades são divididas em dois grandes grupos: leishmaniose visceral (LV) ou calazar, forma mais severa e fatal, caso não seja tratada; e a leishmaniose tegumentar (LT).

A LT pode ser subdivida em: cutânea (LC), forma mais comum com acometimento primário da pele e incapacitante quando a lesões são múltiplas; muco-cutânea (LMC), quando há o aparecimento de lesões tanto pele quanto na mucosa, sendo considerada uma doença mutiladora; cutânea difusa, severa, devido à deficiência da resposta imune celular; e cutânea disseminada, caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares com acometimento de vários segmentos corporais (12, 28,29).

A LC é a forma clínica mais prevalente, sendo que 90% dos casos se concentram em sete países: Afeganistão, Argélia, Irã, Peru, Arábia Saudita, Síria e Brasil (30). De acordo com a OMS, em 2018, estima-se 0,6 a 1 milhão de novos casos no mundo, anualmente (13). No Brasil, entre 2000 e 2016, verificou-se uma média de 23.417 casos registrados anualmente, com um coeficiente de detecção de 12,6/100 mil habitantes (31, 32).

No Brasil, foram identificadas sete espécies envolvidas nos casos de LC, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As principais espécies são: *L.* (*V.*) *braziliensis, L.* (*V.*) *guyanensis* e *L.* (*L.*) *amazonensis.* A primeira espécie de *Leishmania* descrita foi *L.* (*V.*) *braziliensis,* considerada a mais importante no Brasil e na América Latina, pois possui uma ampla distribuição desde a América Central até o norte da Argentina. *L.*(*V.*) *guyanensis* ocorre, mais especificamente, na região norte do Brasil (Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará. *L.*(*L.*) *amazonensis* é prevalente no Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão e se estende para outros estados. Recentemente, as espécies *L.* (*V.*) *lainsoni*, *L.* (*V.*) *naiffi, L.* (*V.*) *lindenberg* e *L.* (*V.*) *shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (33).

O primeiro vetor envolvido na transmissão de LC na região Neotropical foi *Lutzomyia intermedia.* Com o desmatamento, algumas espécies silvestres

desapareceram e/ou diminuíram e outras, como *Lu. intermedia,* se adaptaram em ambientes modificados pelo o homem, causando grande impacto na saúde pública. No Brasil, outras espécies também estão envolvidas, como a *Lu. flaviscutellata, Lu. whitmani, Lu. umbratilis, Lu. wellcomei, Lu. migonei*. Há estudos envolvendo a *Lu. neivai* e *Lu. fischeri* (34).

Atualmente, a dinâmica de transmissão da LT podem assumir três padrões epidemiológicos: silvestre, onde a transmissão ocorre em área de vegetação primária, caracterizada como uma zoonose de animais silvestres e, com a entrada do homem, pode ocorrer a enzootia; ocupacional ou lazer, associada estritamente ao desmatamento desordenado de florestas para construção de usinas, hidrelétricas, atividades agropecuárias, entre outros; rural e periurbano, relacionada ao processo migratório, à ocupação de encostas, e aos aglomerados em centros urbanos, com a participação de animais domésticos como reservatórios da infecção (24).

O primeiro caso de LC foi descrito por Lewis e Cunningham (1876), no Velho Mundo, causado por *L. tropica* (35). No Brasil, em 1885, Alexandre Cerqueira foi o primeiro a identificar a doença na Bahia e Gaspar Vianna (1911) foi o responsável por nomear a espécie mais prevalente no Brasil, *L. braziliensis* (15). Em 1907, houve uma epidemia devido à construção da estrada de ferro noroeste, disseminando a doença no país, acompanhando a entrada do homem e a derrubada de matas, conhecida popularmente como "úlcera de Bauru" (36).

De acordo com a Secretaria Estadual de Saúde do Estado de São Paulo (SES-SP), entre 2007 e 2017, foram confirmados 3.738 casos de LT, predominantemente no sexo masculino (67%), faixa etária entre 35 a 64 anos (50,36%), forma clínica cutânea (77,92%) e casos autóctones (65,44%). Nos 38 municípios[1] que compõem o Grupo de Vigilância Epidemiológica de Bauru (GVE-Bauru) foram confirmados 41 casos, enquanto que, no município de São Paulo o GVE registrou 490 casos (37,38).

[1] Agudos, Arealva, Avaí, Balbinos, Bariri, Barra Bonita, Bauru, Bocaina, Boracéia, Borebi, Brotas, Cabrália Paulista, Cafelândia, Dois Córregos, Duartina, Getulina, Guaiçara, Iacanga, Igaraçu do Tietê, Itaju, Itapuí, Jaú, Lençóis Paulista, Lins, Lucianópolis, Macatuba, Mineiros do Tietê, Paulistânia, Pederneiras, Pirajuí, Piratininga, Pongaí, Presidente Alves, Promissão, Reginópolis, Sabino, Torrinha e Uru.

As lesões tegumentares se iniciam, mais frequentemente, em áreas do corpo mais expostas ao inseto como orelhas, nariz, lábios, bochechas, pernas, mãos, antebraços e tornozelos (35). O período de incubação varia entre uma a quatro semanas, até anos. No ponto de inoculação do parasita, há aumento de temperatura e inchaço, formando um pequeno eritema, evoluindo posteriormente para pápula e nódulo, que ulceriza em um período de duas semanas a seis meses (39). A forma disseminada da doença é uma manifestação clínica rara, responsável por 2% dos casos reportados de LC no Brasil, o qual, se caracteriza pela presença de múltiplas lesões papulares acneiformes (40).

Ao contrário da LC, a LMC ou “espúndia” é caracterizado imunologicamente pelo exagero das respostas celulares antileishmania e escassez de parasitos e o agente etiológico principal é L. (*V*) *braziliensis* (33). A progressão para mucosa ocorre em 1% a 10% dos pacientes, pois, depende de alguns fatores como a virulência do parasita, imunidade celular do indivíduo, gênero, idade, estado nutricional, entre outras características (21,41). Cerca de 90% das pessoas com LMC possuem uma cicatriz de um primeiro episódio de LC. Alguns sinais importantes são eritema e ulceração nas narinas, com ou sem perfuração, ulceração no palato, edema gengival, entre outros (21).

LV é a forma mais severa da doença, sendo fatal, se não tratada. No Leste da África e Subcontinente Indiano a espécie envolvida é *L. (L.) donovani* e na Europa, norte da África e na América Latina é *L. (L.) infantum* (42). Estima-se 200 mil a 400 mil novos casos no mundo, anualmente. Atualmente, 90% dos casos registrados estão concentrados em cinco países: Brasil, Bangladesh, Índia, Sudão e Etiópia (43, 44). Cerca de 96% dos casos registrados nas Américas estão concentrados no Brasil, no entanto, observa-se uma expansão para Argentina, Colômbia, Paraguai e Venezuela (45).

No Brasil, o primeiro registro de LV foi em 1913 em uma necropsia realizada em um indivíduo oriundo do estado do Mato Grosso, posteriormente, identificou-se outros casos nas regiões Norte e Nordeste (24). Descrita inicialmente como uma endemia rural, a doença passou por um processo de urbanização e expansão territorial, a partir de 1980 (46). Hoje, presente nas cinco regiões do país, acometendo 23 das 27 Unidades da Federação (UF), incluindo

recentemente o estado de Santa Catarina, que identificou casos humanos autóctones (47,48).

De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), foram confirmados 58.300 casos de LV, entre 2000 e 2016, com média anual de 3.479 casos confirmados e com coeficiente de incidência de 1,83/100 mil habitantes (48,49).

No estado de São Paulo, os casos autóctones de LV iniciaram-se no ano de 1999 em Araçatuba, região noroeste do estado, disseminando a doença no sentido sudoeste, em direção à região de Bauru. Fatores importantes para a expansão da ocorrência da LV no estado foram: elevada temperatura anual, presença de vetores, construção do gasoduto Brasil-Bolívia, entre 1997 e 1999 e a rodovia Marechal Rondon (50, 51).

De acordo com a SES-SP, entre 2014 e 2017, foram confirmados 525 casos humanos de LV e 44 óbitos e, somente, no GVE-Bauru, foram confirmados 120 casos humanos e cinco óbitos (52). Entre 2011 e 2014, o GVE-Bauru abrangeu 24,5% de casos no estado, seguido pelo GVE-Araçatuba (23,8%) e o GVE-Presidente Prudente (19,5%) (53).

O principal vetor responsável pela transmissão da LV é *Lutzomyia longipalpis*, popularmente conhecido como mosquito-palha, asa-dura, birigui e cangalhinha, dependendo da região geográfica. São insetos (mosquitos) pequenos, coloração amarelada, voos saltitantes, hábitos crepusculares, e, quando em repouso, suas asas ficam semi-abertas e eretas. Adaptados a ambientes ricos em matéria orgânica, úmidos e com baixa luminosidade, podem ser encontrados no intra e peridomicílio e em abrigos de animais domésticos (24).

Recentemente, *Lutzomyia cruzi (Lu. cruzi)* foi reconhecido como vetor nos estados: Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (54,55). Carvalho et al. (56) apontam *Migonemyia migonei* (*Mi. migonei*) como suposto vetor no estado de Pernambuco e Guimarães et al. (57) publicaram que *Lutzomyia migonei* é outro vetor suscetível ao desenvolvimento da *L. (L.) infantum.*

Outras formas de transmissão relatadas, menos frequentes, como a transfusional, vertical, por acidente de laboratório com objetos contaminados e compartilhamento de seringas entre usuários de drogas. Atualmente, tem-se observado um aumento no número de casos de leishmanioses em indivíduos infectados com HIV (35,58). No Brasil, a incidência de coinfecção aumentou de 0,7% (2001) para 8,5% (2012). Até o momento, foram reportados 35 países com casos autóctones de coinfecção (59).

A maioria dos quadros clínicos de LV são oligossintomáticos, manifestando-se linfoadenopatia, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, febre, anorexia, suores noturnos, perda de peso, pigmentação cutânea, entre outros. Caso a doença progrida, pode haver falha multissistêmica, hemorragia, caquexia e infecções secundárias, provocando a morte do indivíduo (35).

A leishmaniose visceral canina (LVC) também é um importante problema de saúde pública. Os cães domésticos (*Canis familiares*) são considerados os principais reservatórios urbanos da LV, devido a sua grande susceptibilidade à infecção pelo parasita, alta parasitemia na pele, estreita relação com os seres humanos, tanto em áreas rurais quanto urbanas (60).

Os cães são considerados alvo importante para epidemiologia e para os programas de controle da LV, pois a enzootia canina normalmente tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção canina tem sido mais prevalente (61). Estima-se que, pelo menos 2,5 milhões de cães estão infectados na Europa. Na América do Sul, os casos também são quantificados em milhões, sendo as maiores taxas encontradas na Venezuela e Brasil, onde a alta prevalência de infecção canina está associada ao alto risco para população humana (62, 63).

Vale ressaltar que, outras espécies agem como reservatórios de *Leishmania* spp. como os carnívoros (*Cerdocyon thous* e *Speothos venaticus)*, marsupiais (*Didelphis marsupialis* e *D. albiventris*), roedores (*Rattus rattus e Thrichomys laurentius),* primatas (*Cebus apela* e *Chiropotes satanas)*, entre outros (24,60,64,65,66).

A LVC é uma doença sistêmica, grave, de evolução lenta, que afeta tanto as vísceras quanto a pele do animal. O período de incubação é variável, mas em

média dura de três a sete meses. O quadro clínico pode ser classificado em: assintomáticos, ausência de sinais clínicos; oligossintomáticos, presença de adenopatia linfóide, pequena perda de peso e pelo opaco; e sintomáticos, além dos sinais anteriores, podendo haver alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose), onicogrifose, emagrecimento acentuado, ceratoconjuntivite, paresia de membros posteriores (24).

Autores apontam que a porcentagem de cães assintomáticos, que vivem em áreas endêmicas, pode atingir 60% a 80% da população infectada, servindo como fonte de infecção para o flebotomíneo e tendo um papel ativo na transmissão (62). Além disso, os sinais clínicos observados em cães podem ser comuns a outras patologias, como babesiose e erliquiose. Ainda a imunossupressão causada pela doença pode gerar infecções oportunistas que dificultam o diagnóstico clínico (67).

Em 1998, a região de Araçatuba foi a primeira em diagnosticar casos autóctones de LVC no estado de São Paulo. Desde então, verificou-se a expansão considerável da doença (68). O município de Bauru se destaca por ser uma região endêmica no centro-oeste do estado e com transmissão intensa da doença: somente entre 2014 e 2015, foram registrados 1484 casos de LVC (69).

O diagnóstico das leishmanioses é realizado por uma associação de informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais. De acordo com de Paiva-Cavalcanti et al. (70), a falta de uma metodologia laboratorial “padrão-ouro” de diagnóstico em humanos e em animais é uma limitação no controle da doença, pois a obtenção de dados epidemiológicos precisos está associada com a implantação de medidas mais efetivas.

Atualmente, o exame parasitológico é considerado “padrão-ouro” devido a sua alta especificidade, pois trata-se da visualização das formas amastigotas pelo microscópio óptico. A pesquisa direta pode ser realizada em raspado do bordo da lesão, biópsia com impressão do fragmento cutâneo em lâmina ou punção aspirativa da lesão quando se investiga a LT, enquanto que para LV, o parasitológico é realizado em amostras de tecidos como o baço, linfonodo e aspirado de medula óssea (28). Trata-se de uma metodologia invasiva e há variação da sensibilidade de acordo com o material utilizado: para esfregaço de

baço a sensibilidade varia de 93,1% a 98,7%, medula óssea de 52% a 85% e linfonodo 52% a 58%, relatado em humanos (71). De acordo com Laurenti (72), em cães, a sensibilidade na medula óssea varia de 50% a 83%, no linfonodo 30% a 85% e 71% a 91% quando analisados em ambos os tecidos.

A cultura é uma metodologia bastante informativa, porém mais demorada e requer treinamento, pois a sensibilidade e especificidade diagnóstica estão intimamente ligadas à experiência do técnico. Além disso, sua sensibilidade tende a ser mais baixa e variável, pois depende do número de parasitas e sua dispersão na amostra (39). O meio clássico mais utilizado é o NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) e a utilização de meio líquido (LIT - liver infusion tryptose, ou de Schneider) sobre o NNN aumenta a sensibilidade e acelera o crescimento da cultura (24, 73).

Os exames sorológicos são baseados na detecção de uma resposta humoral específica e há vários métodos descritos com sensibilidade e uma especificidade diagnóstica bastante variáveis (71). No entanto, há limitações importantes que podem acarretar um diagnóstico incorreto como as reações cruzadas com outras doenças e baixa acurácia do método em pacientes imunossuprimidos (59,74).

No Brasil, as técnicas mais utilizadas são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaios imunoenzimáticos (ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*) e imunocromatográficos (73).

A RIFI é uma técnica menos sensível do que o ELISA tanto para o diagnóstico de LT quanto para LV, em humanos (73, 75). No entanto, a RIFI é a técnica mais utilizada no país, em casos humanos, pois está amplamente distribuída por meio do programa de leishmanioses do Ministério da saúde. Reune algumas vantagens como fácil execução, rapidez, baixo custo, porém requer um microscópio de fluorescência e bastante treinamento técnico. Os resultados são expressos em títulos, assim, aceita-se como positivas títulos a partir de 80. De acordo com o Ministério da saúde, amostras humanas com título igual a 40 recomenda-se nova coleta após 30 dias (24). A sensibilidade do ensaio varia de 82% a 95% e a especificidade de 78% a 92%, de acordo com a preparação antigênica e da espécie de *Leishmania* utilizada (76).

O ELISA é expresso em unidades de absorbância à um raio de luz, em uma reação com diluições fixas (quantitativo) ou, na forma mais comum, apenas como reagente ou não reagente (qualitativo) (24). A sensibilidade varia entre 90% e 100% e a especificidade 71% a 100%, variando também de acordo com o antígeno utilizado, assim como na RIFI (76). O antígeno solúvel bruto (CSA - *crude soluble antigens*), a partir de uma suspensão de promastigotas em salina tamponada fosfatada, é a forma mais comum utilizada para revestir as placas de ELISA, porém foram observadas reações cruzadas com outros agentes (77). Com intuito de diminuir as reações cruzadas e aumentar a especificidade, alguns antígenos purificados sintéticos ou recombinantes foram identificados, como a proteína recombinante K39 (rK39 - sequência de 39 aminoácidos de uma região quinase altamente conservada de *L. infantum)* e que, atualmente, estão sendo amplamente utilizados nos métodos de ELISA e em plataformas imunocromatográficas (76).

Os testes imunocromatográficos ou testes rápidos (TR) permitem a detecção rápida de anticorpos para *Leishmania* spp.. O método utilizado em indivíduos, com quadro clínico sugestivo de LV, baseia-se na reação do sangue, soro ou plasma com o antígeno recombinante rK39 fixado em uma membrana de nitrocelulose presente no teste. No Brasil, inicialmente, era utilizado o Kalazar Detect® (InBios International), sendo que, a partir de 2015, foi substituído para o IT-LEISH® (Bio-Rad), no qual se mostrou mais sensível e específico. Em 2018, foi substituído pelo OnSite™ (Bio Advance Diagnóstico), também utilizando o rK39 e com as mesmas especificações técnicas do kit anterior (78,79).

Em áreas endêmicas para LV, o tratamento de indivíduos humanos, pode ser considerado em pacientes com manifestações clínicas e positividade em testes rápidos rK39, mas, em casos negativos, devem ser investigados mais profundamente por meio de outras metodologias (80). Sabe-se que em pacientes imunossuprimidos, há diminuição da sensibilidade aos testes sorológicos. Na Etiópia, houve diminuição na sensibilidade do TR de 87% para 77% em pacientes coinfectados com HIV (81) e, no Brasil, da Silva et al. (82), concluíram que pacientes coinfectados com HIV, com resultados negativos para rK39, devem ser investigados com testes sorológicos adicionais, que não se baseiem somente no antígeno rK39 ou aspirado de medula óssea.

Os métodos sorológicos para o diagnóstico de LVC preconizados pelo Ministério da saúde, eram o ELISA como método de triagem e a RIFI como confirmatório (68). A partir da nota técnica emitida pelo Ministério da saúde (83), em dezembro do ano de 2011, houve a substituição do protocolo, orientando a implantação do TR-DPP® (*Dual Path Plataform*, Biomanguinhos, Brasil) com o antígeno recombinante rK28 (fusão das proteínas rK9, rK26 e rK39) como teste de triagem, e o teste de ELISA (EIE-Biomanguinhos, Brasil) como confirmatório.

No entanto, pesquisadores apontam que os métodos sorológicos, utilizados para o diagnóstico de LVC, apresentam baixa sensibilidade ocasionando a manutenção dos animais infectados junto a população, colaborando com a manutenção do ciclo da doença (84,85). De acordo com Lopes et al. (85), em áreas endêmicas, um em cada cinco cães soronegativos estão infectados. Por outro lado, em áreas endêmicas, há grande exposição do cão ao parasita, ocasionando resultados sorológicos positivos, porém uma menor proporção desenvolve a doença (84). Por tanto, outras metodologias, principalmente as técnicas moleculares, têm sido amplamente estudadas e padronizadas.

As técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a PCR em tempo real (qPCR), são altamente sensíveis e específicas, e podem ser utilizadas em diferentes tipos de amostras, obtidas por meio de diversos tipos de procedimentos, invasivos ou menos invasivos, como em sangue periférico, swabs de lesão ativa, biópsias de linfonodo, baço, fígado e medula óssea (59,67,70,86). As amostras utilizadas podem ser provenientes de humanos (42), cães (87), flebotomíneos (88), animais silvestres (89), dentre outros.

Existem diversas sequências alvos e protocolos de PCR para identificação do gênero e espécie de *Leishmania*. Os alvos mais frequentes são: as proteínas de choque térmico (70Dka *heat shock proteins* – hsp70), DNA do minicírculo do cinetoplasto (kDNA), subunidade do RNA ribossomal (SSUrRNA), gene da glicose-6-fosfato desidrogenase (g6pd), região de espaçadores transcritos internos (*internal transcribed spacers* - ITS), entre outros (90). Vários autores optam pelo alvo kDNA, devido ao seu elevado número de cópias por célula, aumentando a sensibilidade do ensaio (91).

A performance dos ensaios moleculares, para o diagnóstico, tem se mostrado melhor do que a microscopia ou cultura, particularmente em casos de baixa parasitemia como na LMC, em amostras obtidas de maneira menos invasiva como sangue e conjuntiva, em casos de coinfecção com HIV, recidivas e casos assintomáticos (39,59,42,92).

Além disso, permitem acompanhar o tratamento instituído, verificar sua eficácia para que, posteriormente, os resultados negativos em ensaios moleculares possam indicar a cura clínica, por exemplo em casos de LV em humanos (93). Outra vantagem seria a capacidade de identificação da espécie envolvida, sendo importante para o prognóstico da doença, escolha do tratamento adequado e análises epidemiológicas, contribuindo para implementação de medidas de controle da doença (94).

A utilização da qPCR possibilita a quantificação parasitária de uma maneira fidedigna, rápida, com menor risco de contaminação devido ao menor manuseio da amostra (95). Inicialmente utilizada em modelos animais, visando estudos experimentais para novos fármacos (96).

Aplicada em amostras caninas, onde foi evidenciado que o quadro clínico mais grave há uma maior carga parasitária nos gânglios linfáticos, indicando uma associação entre a quantidade de parasitas e as manifestações clínicas (97). Porém é controverso, pois, de acordo com Quaresma et al. (98), não houve diferenças significativas na carga parasitária entre animais sintomáticos e assintomáticos, sendo observado uma maior quantidade de *Leishmania* na medula óssea do que no sangue periférico.

Em humanos, já foi descrito uma correlação entre uma maior carga parasitária com a presença de sinais clínicos (99) e uma associação com a resposta imune do indivíduo, importante para estudos sobre a patogenia da doença. Segundo Verma et al. (100), demostraram que a alta carga parasitária na LV está relacionada com um alto nível de interleucina-10 (IL-10), indicando-o como um marcador de severidade da doença. Além disso, a qPCR é bastante relevante e útil para monitorar a progressão da doença, após o início do tratamento, já evidenciado em casos com coinfecção com HIV (94, 101).

No Brasil, o Programa de Vigilância e Controle da LV (PVCLV), do Ministério da saúde, prevê medidas que possam diminuir a morbidade e letalidade e controlar o avanço das leishmanioses no país. Medidas que recomendam o controle vetorial, identificação e eliminação dos reservatórios caninos por meio dos inquéritos sorológicos, aperfeiçoamento das metodologias diagnósticas e rápida disponibilidade ao tratamento (46).

Entretanto, há mais de 50 anos as mesmas estratégias são aplicadas e não foi possível reduzir a incidência da doença a um nível aceitável (46,60,102). Pelo contrário, os casos continuam aumentando e a doença se expandindo geograficamente (60,103). Atualmente no estado de São Paulo, existem 82 municípios com transmissão humana e canina, seis com transmissão humana e 47 com transmissão canina (104).

Existe a necessidade de implantação de novas medidas para o controle da doença. Segundo Werneck (46), ações mais abrangentes como melhoria no tratamento dos pacientes com LV, ações educativas voltada à população, investimento em saneamento ambiental e priorizar pesquisa científica para guiar a incorporação de novas ferramentas de controle.

As geotecnologias são ferramentas úteis para o controle das doenças e, cada vez mais, estão sendo empregadas em saúde pública. Acarreta um melhor planejamento, monitoramento e avaliação das ações de saúde, consequentemente, redução nos gastos públicos e melhoria na implantação de novas políticas públicas (105, 106).

O geoprocessamento é um conjunto de técnicas de coleta, tratamento e exibição de informações referenciadas em uma determinada área geográfica. Pode-se citar o sensoriamento remoto, digitalização dos dados, automação de tarefas cartográficas, sistema de posicionamento global (GPS) e o sistema de informação geográfica (SIG) (107). O SIG possui capacidade de integrar diferentes níveis de informações (vetoriais, de superfície, endereços), permitindo a apresentação e associação dos dados em diferentes formas (tabelas, gráficos e mapas) (106).

Algumas vantagens da utilização das técnicas de geoprocessamento é a possibilidade de uma análise da difusão espacial das doenças e sua relação com

o meio ambiente, além da avaliação da saúde da população e na identificação de regiões sob alto risco de adoecer (106,108).

A utilização do geoprocessamento para as leishmanioses é descrita por diversos autores. Souza et al. (109) realizaram uma análise de aglomerados espaço-temporais de LV em Bauru no período de junho de 2003 a outubro de 2008 e verificaram que a doença estava aglomerada na região sudoeste. Ortiz e Anversa (110) também identificaram os principais bairros acometidos com LV, entre 2004 e 2012. Outras cidades no estado de São Paulo e Minas Gerais já realizaram estudos desta natureza (111, 112, 113).

Áreas com altas taxas de prevalência de LVC, significam maior risco para a população humana, por essa razão, o geoprocessamento dos casos de infecção canina também é de grande importância para o controle da doença. Camargo-Neves et al. (114) realizaram uma análise espacial da LV, no munícipio de Araçatuba (SP), (1998- 1999) e associaram os setores em que há ocorrência de infecção humana com locais com altas taxas de prevalência de infecção canina. Bavia et al. (115), reforçam uma forte correlação entre a presença de cães positivos e de indivíduos acometidos com a doença, significando que os cães são os principais elos da cadeia epidemiológica.

O conhecimento espacial tanto de casos humanos quanto caninos é importante para um controle efetivo da doença na região, principalmente em áreas endêmicas. Vários estudos demonstraram associações entre as características socioeconômicas como saneamento inadequado, baixa alfabetização e baixa renda e características ambientais como alta densidade de vegetação e o processo de urbanização com a presença da doença (116, 117, 118). A realização de análises espaciais das leishmanioses e associações com diversos fatores contribuem para delimitações de áreas com maior risco à população.

Com o passar dos anos, grandes avanços científicos foram alcançados em relação ao diagnóstico, tratamento e prevenção das leishmanioses, colaborando com a implementação e manutenção dos programas de controle. Entretanto, verifica-se ainda uma expansão de casos autóctones no país. Em vista disso, estudos que visam comparar as técnicas utilizadas para diagnóstico

e propor novas metodologias, como forma alternativa e/ou complementar, são de extrema importância. Além disso, o município de Bauru, área endêmica e um polo regional com papel importante na disseminação da LV, não possui trabalhos recentes de geoprocessamento de casos humanos e caninos. Assim, as análises espaciais da infecção irão colaborar com o um melhor planejamento de ações de vigilância e otimização de recursos públicos, contribuindo com a diminuição da incidência e prevalência da doença na região.

Objetivos

Objetivos

- Realizar o diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular de infecções por *Leishmania* spp. em amostras de cães e humanos provenientes dos municípios da região de Bauru, São Paulo, Brasil;
- Comparar as técnicas diagnósticas para a pesquisa de *Leishmania* spp.;
- Quantificar a carga parasitária em amostras dos cães e humanos;
- Realizar o geoprocessamento das amostras humanas e caninas provenientes de novos casos no município de Bauru, entre 2014 e 2016.

Referências

Referências[2]

1. World Health Organization. Zoonoses [Internet]. Geneva: WHO; 2018 [acesso em 05 Janeiro 2018]. Disponível em: http://www.who.int/topics/zoonoses/en.

2. Jones KE, Patel N, Levy M, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. Nature. 2008;451:990-4.

3. United States Agency for International Development. Emerging pandemic threats [Internet]. USA: USAID; 2016 [citado 6 Jan 2018]. Disponível em: https://www.usaid.gov/news-information/fact sheets/emerging-pandemic-threats-program.

4. Cutler SJ, Fooks AR, Van Der Poel WHM. Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. Emerg Infect Dis. 2010;16(1):1–7.

5. Zanella JRC. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância para saúde e produção animal. Pesqui Agropec Bras. 2016;51(5):510–9.

6. Oryan A, Akbari M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. Asian Pac J Trop Med. 2016;9(10):925-32.

7. Organização Pan-Americana da Saúde. Relatório da OMS informa progressos sem precedentes contra doenças tropicais negligenciadas [Internet]. Brasília: PAHO; 2017 [citado 10 Jan 2018]. Disponível em: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5401: relatorio-da-oms-informa-progressos-sem-precedentes-contra-doencas-tropicais-negligenciadas&Itemid=812.

8. World Health Organization. Neglected tropical diseases [Internet]. Geneva: WHO; 2018 [citado 7 Jan 2018]. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/.

[2] Segundo normas Vancouver: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references [Internet]. Bethesda: U. S. National Library of Medicine; 2009 [update 2009 May 12; cited 2009 Set 10]. Available from: http://www.nlm.nih.gov.bsd. uniform_requirements.html.

9. Fundação Oswaldo Cruz. Doenças Negligenciadas [Internet]. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2018 [citado 5 Mar 2018]. Disponível em: https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas.

10. Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. Rev Saude Publica. 2010;44(1):200-2.

11. Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmaniosis [Internet]. Washington: PAHO; 2017 [citado 10 Jan 2018]. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417&Itemid=40250&lang=en.

12. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immun Microbiol Infect Dis. 2004;(27):305-18.

13. World Health Organization. Leishmaniosis [Internet]. Geneva: WHO; 2018 [citado 10 Mar 2018]. Disponível em: http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis.

14. Brasil. Ministério da Saúde. Estudo sobre carga de doença no Brasil: estado atual e perspectivas [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 1998 [citado 12 Jan 2018]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Pesquisa_Saude/tela16_2.html.

15. Gontijo B, Carvalho MDR. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(1):71-80.

16. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. The leishmaniases in biology and medicine. London: Academic Press; 1987. p. 12-120.

17. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi Jr G. A revised Classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. Parasitol Today. 2000;16(4):142-4.

18. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(3):1-40.

19. Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. Annu Rev Microbiol. 1987;41:363-82.

20. Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. Annu Rev Microbiol. 1995;49:117-43.

21. David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Dermatol Ther. 2009;22:491-502.

22. Real F, Vidal RO, Carazzolle MF, Mondego JMC, Costa GGL, Herai RH, et al. The genome sequence of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*: Functional annotation and extended analysis of gene models. DNA Res. 2013;20(6):567-81.

23. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. Nat Genet. 2007;39(7):839-47.

24. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.

25. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int J Parasitol. 2007;37:1097-106.

26. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. Nat Rev Microbiol. 2011;9(8):604-15.

27. Galvis-Ovallos F, Da Silva MD, Da Silva Bispo GB, De Oliveira AG, Goncalves Neto JR, Malafronte RS, et al. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of Sao Paulo: Pintomyia fischeri as potential vector of *Leishmania infantum*. Parasite. 2017;24(2):1-10.

28. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.

29. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – a Review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(3):239-51.

30. Vries HJC, Reedijk SH, Schallig HDFH. Leishmaniasis: Recent developments in diagnosis and management. Am J Clin Dermatol. 2015;16(2):99-109.

31. Brasil. Ministério da Saúde. Casos de Leishmaniose Tegumentar. Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1990 a 2016 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2017 [citado 15 Jan 2018]. Disponível em: http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LT-Casos.pdf.

32. Brasil. Ministério da Saúde. Coeficiente de detecção de casos de Leishmaniose Tegumentar por 100.000 habitantes. Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1990 a 2016 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2017 [citado 15 jan 2018]. Disponível em: http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LT-Coef-Deteccao.pdf.

33. Brasil. Ministério da Saúde. Leishmaniose tegumentar americana (LTA). [Internet]. Brasília: MS; 2017 [citado 15 jan 2018]. Disponível em: http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar-americana-lta.

34. Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:937-54.

35. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. F1000 Res. 2017;6:750.

36. Barata RB. Cem anos de endemias e epidemias. Cienc Saude Colet. 2000;5(2):333-45.

37. São Paulo. Secretaria do Estado de São Paulo. Leishmaniose Tegumentar Americana [Internet]. São Paulo: Secretaria do Estado de São Paulo; 2017 [citado 20 Jan 2018]. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/lta/gve0717_not_res.htm.

38. São Paulo. Secretaria do Estado de São Paulo. Leishmaniose Tegumentar Americana [Internet]. São Paulo: Secretaria do Estado de São Paulo; 2017 [citado 20 Jan 2018]. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/lta/10lta9817_casos_conf.pdf.

39. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Primez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis. 2007;7(9):581-96.

40. Membrive NA, Kazuma FJ, Silveira TGV, Teixeira JJV, Reinhold-Castro KR, Teodoro U. Disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Southern Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2017;59:e37.

41. Machado-Coelho GLL, Caiaffa WT, Genaro Odair, Magalhães PA, Mayrink W. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2005;99(1):55–61.

42. Hossain F, Ghosh P, Khan MAA, Duthie MS, Vallur AC, Picone A, et al. Real-time PCR in detection and quantitation of *Leishmania donovani* for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis patients and the monitoring of their response to treatment. PLoS One. 2017;12(9):e0185606.

43. Savoia D. Decent updates and perspectives on leishmaniasis. J Infect Dev Ctries. 2015;9(6):588-96.

44. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7(5):e35671.

45. Organização Pan-Americana da Saúde. Informe Epidemiológico das Américas [Internet]. Washington: PAHO; 2018 [citado 15 Fev 2018]. Disponível em: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

46. Werneck GL. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo? Cad Saude Publica. 2016;2(6):eED010616.

47. Santa Catarina. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Dive/SC orienta sobre medidas de prevenção da leishmaniose visceral [Internet]. Santa Catarina: Dive/SC; 2017 [citado 20 Jan 2018]. Disponível em: http://www.dive.sc.gov.br/index.php/arquivo-noticias/579-dive-sc-orienta-sobre-medidas-de-da-leishmaniose-visceral.

48. Brasil. Ministério da Saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1990 a 2016 [Internet]. Brasília: MS; 2017 [citado 20 Jan 2018]. Disponível em: http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LV-Casos.pdf

49. Brasil. Ministério da Saúde. Coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.000 habitantes. Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1990 a 2016 [Internet]. Brasília: MS; 2017 [citado 20 Jan 2018]. Disponível em: http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LV-Coef_Incidncia.pdf.

50. Sevá ADP, Mao L, Galvis Ovallos F, Tucker Lima JM, Valle D. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(2):e0005353.

51. Cardim MFM, Rodas LAC, Dibo MR, Guirado MM, Oliveira AM, Chiaravalloti Neto F. Introdução e expansão da leishmaniose visceral americana em humanos no Estado de São Paulo, 1999-2011. Rev Saude Publica. 2013;47(4):691-700.

52. São Paulo. Grupo de Vigilância Epidemiológica. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral segundo LPI e ano de notificação, Estado de São Paulo, 2014 a 2017 [Internet]. São Paulo: Grupo de Vigilância Epidemiológica; 2018

[citado 20 Fev 2018]. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/leish/lv1417_lpi.pdf.

53. Ciaravolo RMC, Oliveira SS, Hiramoto RM, Henriques LM, Taniguchi HH, Junior AV, et al. Epidemiological classification of cities according to the program of surveillance and control of visceral leishmaniasis in the State of São Paulo. Updated in December 2014. BEPA. 2015;12(143):9-22.

54. Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RU, Malacco MAF. Incrimination of Lutzomyia cruzi as a vector of American Visceral Leishmaniasis. Med Vet Entomol. 1998;12:315-7.

55. Missawa NA, Lima GBM. Distribuição especial de Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) e Lutzomya cruzi (Mangabeira, 1938) no estado de Moto Grosso. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39(4):337-40.

56. Carvalho MR, Valença HF, Silva FJ, Pita-Pereira D, Araújo Pereira T, Britto C, et al. Natural *Leishmania infantum* infection in Migonemyia migonei (Franca,1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. Acta Trop. 2010;116:108-10.

57. Guimarães VC, Pruzinova K, Sadlova J, Volfova V, Myskova J, Brandão Filho SP, et al. Lutzomyia migonei is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. Parasit Vectors. 2016;9:159.

58. Figueiró Filho EA, Uehara SNO, Senefonte FRA, Lopes AHA, Geraldo Duarte, Beitune PE. Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy: a case report. Rev Bras Ginecol Obstet. 2005;27(2):92-7.

59. Lindoso JAL, Cunha MA, Queiroz IT, Moreira CHV. Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. HIV AIDS (Auckl). 2016;8:147-56.

60. Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2006;48(3):151-6.

61. Langoni H, Richini-Pereira VB, Scremin C, Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, 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 Zootec. 2015;22(4):580-90.

62. Marcondes M, Rossi CN. Visceral leishmaniasis in Brazil. Braz J Vet Res Anim Sci. 2013;50(5):341-52.

63. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends Parasitol. 2008;24(7):324-30.

64. Palatnik-de-Sousa CB, Santos WR, França-Silva JC, Costa RT, Reis AB, Palatnik M, et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2001;65(5):510-7.

65. Richini-Pereira VB, Marson PM, Hayasaka EY, Victoria C, da Silva RC, Langoni H. Molecular detection of *Leishmania* spp. in road-killed wild mammals in the Central Western area of the State of São Paulo, Brazil. J Venomous Anim Toxins Includ Trop Dis [Internet]. 2014;20:27 [citado 20 Fev 2018]. Disponível em:http://doi.org/10.1186/1678-9199-20-27 et al.

66. Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. Int J Parasitol Parasit Wildl. 2014;3(3):251-62.

67. Faria AR, Andrade HM. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. Rev Pan-Amaz Saúde. 2012;3(2):47-57.

68. São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do Estado de São Paulo. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac; 2006.

69. Paixao MS. Análise espacial e detecção de tripanosomatídeos em animais de produção de região endêmica para leishmaniose visceral [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2017.

70. Paiva-Cavalcanti M, Morais RCS, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, Gonçalves-de-Albuquerque SC, Tavares DHC, et al. Leishmaniases diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. Cell Biosci. 2015;5(31):1-10.

71. Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2011;105(1):1–6.

72. Laurenti MD. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. BEPA. 2009;6(67):13-23.

73. Dietze R. Diagnóstico sorológico e parasitológico da Leishmaniose Visceral. In: Organización Panamericana de la Salud. Consulta de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas. Rio de Janeiro: PANAFTOSA; 2006. p. 63-5.

74. Barroso-Freitas AP, Passos SR, Mouta-Confort E, Madeira MF, Schubach AO, Santos GPL, et al. Accuracy of na ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009;103:383-9.

75. Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010;8:419–33.

76. Assis TSM, Braga ASC, Pedras MJ, Barral AM, Siqueira IC, Costa CHN, et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para diagnóstico da leishmaniose visceral humana. Epidemiol Serv Saude. 2008;17(2):107-16.

77. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9:951-8.

78. Brasil. Unidade Técnica de Vigilância das Doenças de Transmissão Vetorial. Nota Informativa – CGDT/DEVIT/SVS/MS [Internet]. Brasília: MS; 2014 [citado 2 Fev 2018]. Disponível em: http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/29/Nota-Tecnica---teste-rapido-humano-IT.pdf.

79. Brasil. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Nota Informativa Nº 3/2018-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Esclarecimentos sobre a mudança na marca do teste rápido imunocromatográfico ofertado para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana no Sistema Único de Saúde (SUS). Brasília: Ministério da Saúde; 2018.

80. Moura AS, Lopes HM, Mourao MV, Morais MH. Performance of a rapid diagnostic test for the detection of visceral leishmaniasis in a large urban setting. Rev Soc Bras Med Trop. 2013;46(5):589-93.

81. Horst R, Tefera T, Assefa G, Ebrahim AZ, Davidson RN, Ritmeijer K. Field evaluation of rK39 test and direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis in a population with high prevalence of human immunodeficiency virus in Ethiopia. Am J Trop Med Hyg. 2009;80:929-34.

82. da Silva MRB, Brandão NAA, Colovati M, de Sousa MMP, de Lima LC, Dorta ML, et al. Performance of two immunochromatographic tests for diagnosis of visceral leishmaniasis in patients coinfected with HIV. Parasitol Res. 2017;117(2):419-27.

83. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Nota Técnica conjunta nº1, de 29 de dezembro de 2011. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

84. Martinez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O, Altet L. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. Parasit Vectors. 2011;4:57. doi: 10.1186/1756-3305-4-57.

85. Lopes EG, Sevá AP, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB, Hiramoto RM, et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. Epidemiol Infect. 2017;145(12):2436-44.

86. Boni SM, Oyafuso LK, Soler RdC, Lindoso JAL. Efficiency of noninvasive sampling methods (swab) together with Polymerase Chain Reaction (PCR) for

diagnosing American Tegumentary Leishmaniasis. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2017;59:e38.

87. Rolim F, Carvalho FLN, Bello GL, Gehlen M, Halon ML, Lemos RR, et al. Leishmaniose Visceral Canina: Detecção de DNA em Soro por PCR em Tempo Real. Rev Iniciaç Cient ULBRA. 2016;14:36-46.

88. Pita-Pereira D, Souza GD, Pereira TA, Zwetsch A, Britto C, Rangel EF. Lutzomyia (Pintomyia) fischeri (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American cutaneous leishmaniasis: detection of natural infection by *Leishmania* (*Viannia*) DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. Acta Trop. 2011;120:273-5.

89. Souza NP, Almeida ABPF, Freitas TPT, Paz RCR, Dutra V, Nakazato L, et al. *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(3):333-5.

90. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al. Leishmania infections: molecular targets and diagnosis. Mol Aspects Med. 2017;57:1-29.

91. Charles M, Françoise F, Laurie L, Henri D. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. J Clin Microbiol. 2004;42(11):5249-55.

92. Fraga TL, Brustoloni YM, Lima RB, Dorval ME, Oshiro ET, Oliveira J, et al. Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105(3):310-3.

93. Maurya R, Singh RK, Kumar B, Salotra P, Rai M, Sundar S. Evaluation of PCR for Diagnosis of Indian Kala-Azar and Assessment of Cure. J Clin Microbiol. 2005;43(7):3038-41.

94. Reithinger R, Dujardin J-C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. J Clin Microbiol. 2007;45(1):21-5.

95. Vitale F, Reale S, Vitale M, Petrotta E, Torina A, Caracappa S. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. Ann N Y Acad Sci. 2004;1026(1):139-43.

96. Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin J-F, Sulahian A, Rivollet D, et la. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. Clin Diagn Lab Immunol. 2001;8(4):828-31.

97. Manna L, Reale S, Vitale F, Gravino AE. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. Res Vet Sci. 2009;87:76-8.

98. Quaresma PF, Murta SM, Ferreira Ede C, Rocha-Lima AC, Xavier AA, Gontijo CM. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. Acta Trop. 2009;111:289-94.

99. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. J Clin Microbiol. 2004;42(11):5249-55.

100. Verma S, Kumar R, Katara GK, Singh LC, Negi NS, Ramesh V, et al. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. PLoS One. 2010;5(4):e10107.

101. Bossolasco S, Gaiera G, Olchini D, Gulletta M, Martello L, Bestetti A, et al. Realtime PCR assay for clinical management of human immunodeficiency vírus infected patients with visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2003;41(11):5080-4.

102. von Zuben APB, Donalísio MR. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. Cad Saude Publica. 2016;32(6):e00087415.

103. Sevá AP, Mao L, Galvis-Ovallos F, Tucker Lima JM, Valle D. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(2):e0005353.

104. São Paulo. Grupo de Vigilância Epidemiológica. Classificação epidemiológica para Leishmaniose Visceral dos municípios do Estado de São Paulo, 1999 a 2015 [Internet]. São Paulo: Grupo de Vigilância Epidemiológica; 2017 [citado 21 Mar 2018]. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/leish/lv_mapas.pdf.

105. Najar AL, Marques EC. Saúde e espaço: estudos metodológicos e técnicas de análise. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 1998.

106. Müller EL, Cubas MR, Bastos LC. Georreferenciamento como instrumento de gestão em unidade de saúde da família. Rev Bras Enferm. 2010;63(6):978-82.

107. Hino P, Villa TCS, Sassaki CM, Nogueira JA, Santos CB. Geoprocessamento Aplicado à Área da Saúde. Rev Lat Am Enfermagem. 2006;14(6):1-5.

108. Medronho RA, Werneck GL. Técnicas de análise espacial em Saúde. In: Medronho RA, Carvalho DM, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL, editores. Epidemiologia. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 427-46.

109. Souza VAF, Cortez LRPB, Dias RA, Amaku M, Ferreira Neto JS, Kuroda RBS, et al. Space-time cluster analysis of American visceral leishmaniasis in Bauru, São Paulo State, Brazil. Cad Saude Publica. 2012;28(10):1949-64.

110. Ortiz RC, Anversa L. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Bauru, São Paulo, Brazil, 2004-2012: a descriptive study. Epidemiol Serv Saude. 2015;24:97-104.

111. Vieira CP, Oliveira AM, Rodas LAC, Dibo MR, Guirado MM, Chiaravalloti Neto F. Temporal, spatial and spatiotemporal analysis of the occurrence of visceral leishmaniasis in humans in the City of Birigui, State of São Paulo, from 1999 to 2012. Rev Soc Bras Med Trop. 2014;47(3):350-8.

112. Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo

Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101(1):31-8.

113. Silva TAM, Coura-Vital W, Barbosa DS, Oiko CSF, Morais MHF, Tourinho BD, et al. Spatial and temporal trends of visceral leishmaniasis by mesoregion in a southeastern state of Brazil, 2002-2013. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(10):e0005950.

114. Camargo-Neves VLF, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spínola RMF, et al. Utilização de ferramentas de análise especial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana – Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. Cad Saúde Pública. 2001;17(5):1263-7.

115. Bavia ME, Carneiro DD, Gurgel HC, Madureira Filho C, Barbosa MG. Remote sensing and geographic information systems and risk of American visceral leishmaniasis in Bahia, Brazil. Parassitologia. 2005;47:165-9.

116. da Silva JP, Werneck, GL, Macedo EC, Carvalho H, Cruz MSP. Factors associated with *Leishmania chagasi* infection in domestic dogs from Teresina, State of Piauí, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2012;45(4):480-4.

117. Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. Trends Parasitol. 2006;22(12):552-7.

118. Figueiredo ABF, Werneck GL, Pires MS, Cruz MSP, Silva JP, Almeida AS. Uso e cobertura do solo e prevalência de leishmaniose visceral canina em Teresina, Piauí, Brasil: uma abordagem utilizando sensoriamento remoto orbital. Cad Saude Publica. 2017;33(10):e00093516.

Capítulo II

Artigo Científico 1

Comparison of different laboratory techniques for diagnosis of *Leishmania* spp. in human and canine samples from municipalities in the Center-West region of the state of São Paulo, Brazil.

Livia Carla Ramos Augusto[a,b], Bárbara Suares de Almeida[b], Debora de Oliveira Losnak[b], Kethlyn Magliani de Figueiredo[b], Luciana da Silva Ruiz[b], Laís Anversa[b], Samea Fernandes Joaquim[c], Jose Eduardo Tolezano[d], Diego Borin Nóbrega[e], Virgínia Bodelão Richini-Pereira[a,b].

[a] Department of Tropical Diseases and Imaging Diagnosis, Botucatu Medical School, Paulista State University – UNESP Univ Estadual Paulista; District of Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-000, Brazil.

[b] Adolfo Lutz Institute, Regional Laboratory of Bauru, SP, Brazil, Rubens Arruda St., 6. Altos da Cidade, Bauru, SP 17015-110, Brazil.

[c] Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Paulista State University - UNESP, Cx. Postal 560, District of Rubião Júnior 11 s/n, Botucatu, SP 18618-000, Brazil.

[d] Adolfo Lutz Institute, Center of Parasitology and Micology, São Paulo, SP, Brazil, Dr. Arnaldo Avenue, 355, São Paulo, SP, 01246-000, Brazil.

[e] Department of Production Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, 2500 University Drive N.W., Calgary, Alberta, Canada.

***Author for correspondence:**

Virgínia Bodelão Richini Pereira (virichini@yahoo.com.br)

Adolfo Lutz Institute, Regional Laboratory of Bauru

Rubens Arruda St., 6. – Bauru – SP – Brazil, CEP: 17015-110 27

Key words: leishmaniasis, diagnosis, polymerase chain reaction

Periodical: Nº D-18-12556, Veterinary Parasitology (Qualis Medicina II – B1).

Abstract

Leishmaniases are vector-borne diseases caused by obligate intracellular protozoan parasites of the genus *Leishmania*. The main diseases are: visceral (VL) and tegumentary (TL). Dogs are the major urban reservoirs of visceral leishmaniasis. The aims of the present study were to compare the conventional laboratory techniques used for the diagnosis of *Leishmania* spp. in human and canine blood samples with the molecular techniques and carry out the quantification of the parasite load. Twenty-six human samples with clinical suspicion of VL were evaluated through direct parasitological in bone marrow aspirate, rapid immunochromatographic test (RT), indirect immunofluorescent antibody test (IFAT), polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR (qPCR). In addition, twenty-two human samples with clinical suspicion TL were selected for the accomplishment of IFAT, PCR and qPCR. The canine samples were obtained through serological investigations carried out in 4,725 dogs by the Center for Zoonoses Control (CCZ) in Bauru, and by means of the positivity in RT (RT-DPP®) was realized the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), PCR and qPCR. In the twenty-six human samples analyzed for VL, the positivity obtained in parasitological, RT, IFAT, PCR and qPCR were: 80.8%, 80.8%, 73.1%, 84.6% and 84.6%. IFAT was the methodology that obtained less positivity and agreement with other methodologies. The parasite load was concentrated between 100 and 1,000 parasites/mL (68.2%) and there was no significant association with sex and age. In the twenty-two human samples analyzed for TL, the positivity obtained in the IFAT, PCR and qPCR were: 9.1%, 18.2 and 18.2%. The IFAT obtained lower positivity and negligible agreement with the molecular techniques and the parasite load of the samples were concentrated between 100 and 1,000 parasites/mL (100%). In the canine samples, 11.5% (543/4,725) of positivity were obtained for both techniques (RT-DPP® and ELISA). In RT-DPP® positive dogs, positivity in ELISA, PCR and qPCR were: 64.9%, 63.9% and 65%. The agreement was excellent between ELISA and molecular techniques. The parasite load was concentrated between 1,000 and 10,000 parasites/ml (73.9%). Molecular techniques in blood samples consist in a less invasive diagnostic alternative for both VL and TL in humans and, in dogs, can be used both for diagnosis and to complement the serological results.

Highlights

- Leishmaniases in humans and dogs represent an important public health problem.
- Comparation the conventional laboratory techniques and molecular techniques.
- Molecular techniques in blood samples consist in a less invasive diagnostic for leishmaniasis.

1. Introduction

Leishmaniases are vector-borne diseases caused by obligate intracellular protozoan parasites of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) (Gontijo and Carvalho, 2003). Leishmaniases are endemic in 98 countries and approximately 12 million people are infected and 350 million people are at risk (Desjeux, 2004; PAHO, 2017). They represent an important public health problem, due to its constant geographic expansion and tendency towards urbanization, previously restricted to rural areas and, today, observed in large urban centers (Werneck, 2010).

Leishmaniasis represents a group of distinct diseases, being the main ones: visceral leishmaniasis (VL) and tegumentary leishmaniasis (TL). In Brazil, the main species involved in VL is *Leishmania infantum* (*syn. chagasi*) and, in TL, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* and *Leishmania amazonensis* (Ministério da Saúde, 2014; Ministério da Saúde, 2017a).

According to the Ministry of Health, between 2000 and 2016, 398,103 cases of TL and 58,300 cases of VL were confirmed in the country (Ministério da Saúde, 2017b; Ministério da Saúde, 2017c). In the state of São Paulo (2014 - 2016), 1,128 cases of TL and 384 cases of VL, with 33 deaths, were confirmed, and only Bauru city, located in the Midwest, was responsible for 19% VL (Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, 2017a; Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, 2017b). Bauru city is considered a regional pole with an important role in the dissemination and expansion of VL (Cardim et al., 2013) and the high incidence of the disease in

the region indicates the need of studies that compare the different techniques used for diagnosis and evaluate inclusion of new methodologies.

Dogs (*Canis familiaris*) are considered the main urban reservoirs of VL due to their great susceptibility to infection by the parasite, high parasitemia in the skin and close relationship with humans (Dantas-Torres and Brandão-Filho, 2006). This animals are an important target for epidemiology and for VL control programs, since canine infection usually precedes human infection (Oliveira et al., 2001). The high prevalence of asymptomatic dogs in endemic areas can reach 60% to 80% of the infected population, requiring increasingly sensitive and specific methodologies for the correct identification of these animals, in order to obtain a more effective control of the disease (Marcondes et al. al., 2013).

The diagnosis of leishmaniasis is performed by an association of clinical, epidemiological and laboratory information. Conventional laboratory techniques used, as the parasitological and serological methods, have their limitations and, increasingly, molecular techniques are being explored and used as a complement and/or an accurate diagnostic alternative (de Paiva-Cavalcanti et al., 2015; Ghasemian et al., 2016).

Polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR (qPCR) are highly sensitive and specific methodologies and can be used for both diagnosis and treatment follow-up, in addition of being a useful tool for diagnosis in cases of low parasitic load, cases of HIV co-infection, relapsed and asymptomatic cases (Reithinger e Dujardin, 2007; Fraga et al., 2010; Lindoso et al., 2016; Houssain et al., 2017). Other advantages include the ability to identify the species involved and parasite quantification, important for the prognosis of the disease, choice of appropriate treatment and epidemiological analysis (Reithinger and Dujardin, 2007).

Considering that Bauru region is endemic for leishmaniasis, the present study aimed to compare the conventional techniques used for the diagnosis of *Leishmania* spp. in human and canine blood samples, with the molecular techniques and perform the quantification of the parasite load.

2 Material and methods

2.1 Ethical statement

The present study was approved by the Ethics Committee on the use of Animals (Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA) n. 10/2014 and Research Ethics Committee of Adolfo Lutz Institute (Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL) n. 1.131.447.

2.2 Area of study

The Adolfo Lutz Institute (Instituto Adolfo Lutz - IAL) is a National Laboratory in Public Health, which focuses on diagnostic, sanitary and epidemiological surveillance. The IAL - Regional Laboratory of Bauru (IAL CLR-Bauru) operates in 38 cities in the Midwest part of São Paulo state (Figure 1) and attends several programs such as the surveillance and control program for visceral leishmaniasis (Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral – PVCLV).

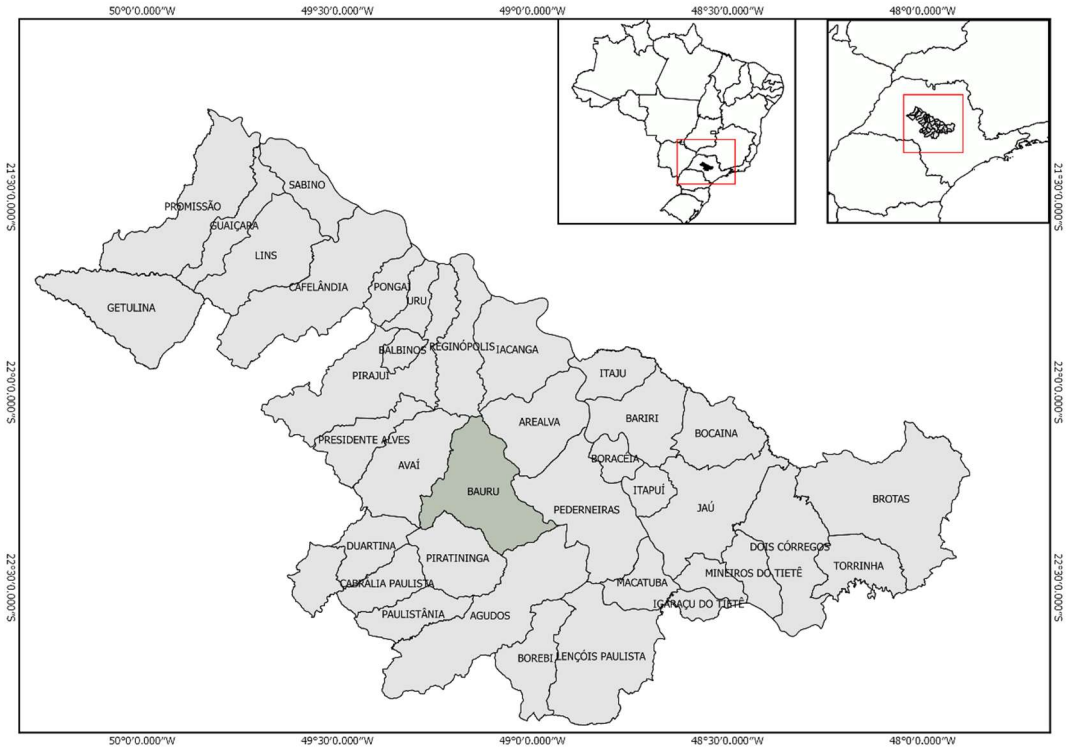


Fig. 1. Map with the location of the 38 cities in the Midwest of the state of São Paulo served by Adolfo Lutz Institute, highlighted Bauru city, São Paulo, Brazil.

2.3 Human Samples

Human samples, forwarded to the IAL CLR-Bauru, were analyzed through a previous suggestive clinical condition of VL and TL. Patients with relapsed and/or HIV co-infection were not included in the study, only cases with suspected primary infection. Twenty-six human cases with clinical suspicion of VL were selected to perform routine laboratory techniques, direct parasitological in bone marrow aspirate, immunochromatographic test or rapid test (RT), and indirect immunofluorescent antibody test (IFAT), and molecular techniques as complementary methodologies, polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR (qPCR). In addition, twenty-two human cases with clinical suspicion of TL were selected to perform the routine laboratory technique, IFAT, and molecular techniques, such as complementary methodologies, PCR and qPCR (Figure 2).

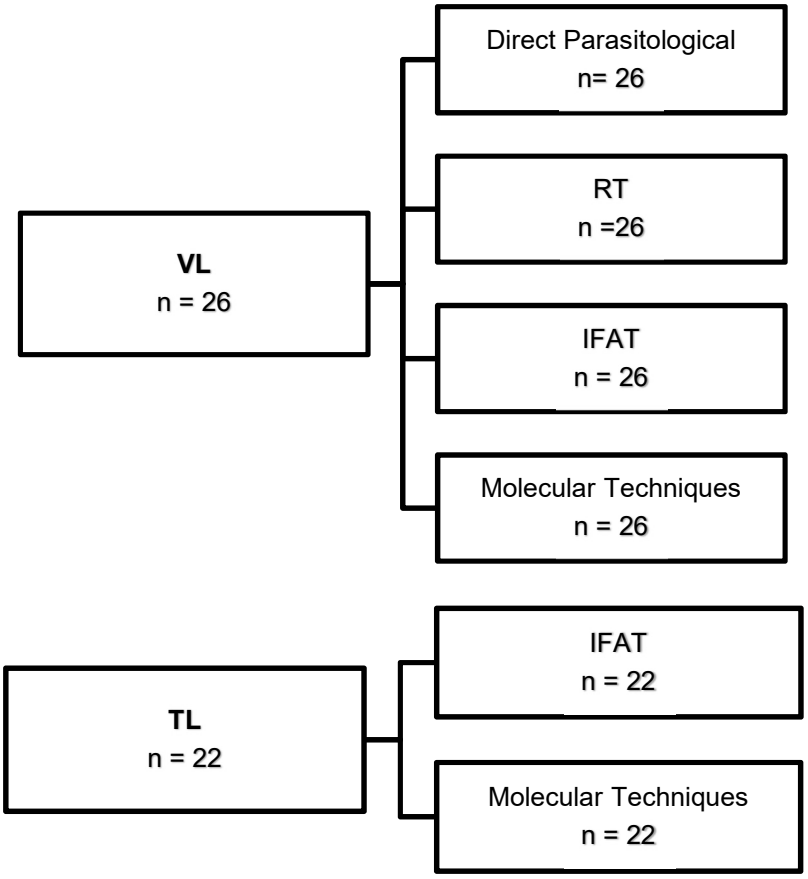


Fig. 2. Laboratory techniques performed in human cases through clinical suspicion of visceral (VL) and tegumentary leishmaniasis (TL). RT = rapid test; IFAT = indirect immunofluorescent antibody test.

2.4 Canine Sample

The canine serological investigation, in Bauru city carried out by the Zoonoses Control Center (CCZ) of Bauru in 4,725 animals. RT (RT-DPP ® - Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil) was performed as screening, detecting 837 positive samples. Later, in the RT-DPP® positive samples, the immunoenzymatic test (ELISA Leishmaniasis Visceral Canine - Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil) was performed as confirmatory and, at IAL CLR-Bauru, the molecular techniques PCR and qPCR were performed (Figure 3).

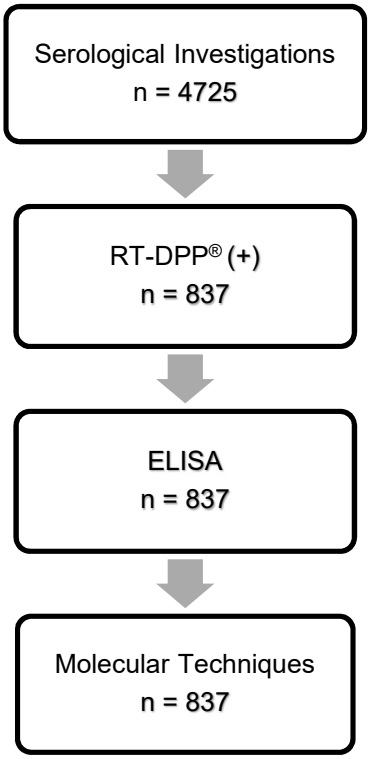


Fig. 3. Flowchart of the sequence of laboratory techniques performed on canine samples, from the serological investigations for the detection of canine visceral leishmaniasis. RT-DPP® (+) = positive rapid test; ELISA = immunoenzymatic assay.

3. Diagnostic Methods

3.1 Direct Parasitological Examination

The direct parasitological was performed on bone marrow aspiration punction swabs, colored with giemsa. The slides were visualized in immersion oil with the objective of 100x, in the optical microscope, to confirm the presence of the amastigote forms in the tissue.

3.2 Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT)

To perform IFAT it was used the human Leishmaniasis IFAT Kit (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) for the detection of antibodies to *Leishmania* spp. in human serum, with clinical suspicion for both VL and TL, according to the manufacturer's recommendations. The slides were visualized in a fluorescence microscope (Olympus BX51, JPY). We considered indeterminate results titration equal to 40 and positive titration results from 80.

3.3 Immunochromatographic Test or Rapid Test (RT)

The RT used in human serum samples was IT LEISH® (Biorad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France), which uses the recombinant K39 antigen to detect antibodies to *Leishmania* spp. The RT used for canine serum samples was RT-DPP® (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ), which uses a combination of recombinant K28 proteins from *L*. *chagasi* (*syn*. *L*. (*L*.) *infantum)* and protein A conjugated to colloidal gold to detect antibodies specific to *Leishmania* spp. in dogs. The tests were performed according to the manufacturer's recommendations.

3.4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

To perform ELISA, the EIE Visceral Canine Leishmaniasis Kit (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil) was used, which consists of the reaction of antibodies present in serum or plasma of dogs with soluble and purified antigens of *L. major-like*, obtained from *in vitro* culture. Tests were performed according to the manufacturer's recommendations. The optical density was measured using a spectrophotometer with a 450*n*m filter. The values of the negative controls were

used to calculate the cut-off point. The result was considered positive when equal to or greater than the cut-off.

3.5 Molecular Analyzes

3.5.1 DNA extraction and quantification

The DNA extractions from blood samples were performed using the Illustra blood genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Pittsburgh, USA), as instructed by the manufacturer. The quantification was evaluated in a spectrophotometer (Epoch-Biotek, USA).

3.5.2 Polymerase chain reaction (PCR)

The target sequence for analyzes of human and canine blood samples were for the ITS-1 (Internal Transcribes Spacer) region of ribosomal DNA, LITSR (5'CTGGATCATTTTCCGATG3') and L5.8S (5'TGATACCACTTATCGCACTT3'), were used for screening of Trypanosomatidae family (El Tai et al., 2000). PCR included positive controls from reference DNA strains *L. infantum* (MHOM / BZ / 1982) and *L. major* (MHOM / BZ / 1982) from the Leishmanias Collection of the Oswaldo Cruz Institute (CLIOC FIOCRUZ) and, as a negative control, ultrapure sterile water. Reactions were under the following conditions: each 0.2mL microtube received reaction buffer 10mM Tris HCl pH 8.0, 50mM KCl, 1.5mM MgCl2, 0.2mM dNTP, 10pM of each primer, 0.2 units of Taq Platinum DNA polymerase (Invitrogen) and 10ng of genomic DNA. Thus, each tube had 11 µL of the MIX-PCR and 1 µL of the DNA extraction product. Incubation was performed on the gradient thermal cycler (Life Technologies®, Carlsbad, USA).

3.5.3 Electrophoresis in agarose gel

An aliquot of 8 µl of each amplified product was added to 2 µl of run buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol, 70% Milli-Q water) and homogenized. As a molecular marker 4 µl of 100 bp ladder (Invitrogen, USA). The visualization of the amplified material was evaluated by the electrophoretic run on 1.5% agarose gel added with 0.1 µl/mL of SYBR Safe DNA

gel stain (Invitrogen, USA). The electrophoretic run was performed in a horizontal vessel containing 1X TBE (89 nM Tris-HCl, 89 mM boric acid and 20 mM EDTA) and 65V voltage for 60 minutes. After the end of the run, the amplified bands were visualized under ultraviolet light (296nm) and recorded using the transilluminator (Syngene, USA), and the image was captured by the digital documentation system.

3.5.4 Real-time PCR (qPCR)

To determine the parasitic load, the SYBR® Green system was used in the StepOne™ Plus Real Time PCR System (Life Technologies®, Carlsbad, USA). The standard curve was performed with the DNA samples from reference strains from the Leishmanias Collection of the Oswaldo Cruz Institute (CLIOC FIOCRUZ) at the decreasing concentrations of parasites/ml 10^5 10^4 10^3 10^2 10^1. The target sequence used was 70 kDa heat shock protein (hsp70), HSP70F (5' AGG TGA AGG CGA CGA ACG 3') and HSP70R (5' CGC TTG TCC ATC TTT GCT TC 3') (Hernández et al. 2014). The reactions were under the following conditions: 12.5 µL of Power SYBR® Green PCR master Mix (Life Technologies®, USA), 5 µM of each primer, 8.5 µL ultrapure water and 2 µL of sample, totaling a final volume of 25 µL. The amplification profile used was: 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 minute and one step for the dissociation curve of 95°C for 15s, 60°C for 1 minute and 95°C for 15s. The amount of DNA present in the samples was expressed in relation to the standard curve of each assay.

3.5.5 Statistical analysis

The calculation of the Kappa (k) coefficient of agreement and their respective intervals with 95% of confidence were performed using R version 3.4.1. Kappa coefficients were interpreted following Landis and Koch (1977): 1.00-0.81 excellent, 0.80-0.61 good, 0.60-0.41 moderate, 0.40-0.21 weak and 0.20-0.00 negligible agreement. Analysis of the categorical variables was used the Fisher exact test.

4 Results

4.1 Visceral leishmaniasis in humans

Of the 26 samples analyzed, 21 (80.8%) were positive in the direct parasitological in bone marrow aspirate, 21 (80.8%) were positive in the RT, 19 (73.1%) were positive to the IFAT with titration equal to 80, six (23.1%) were indeterminate to IFAT with titration equal to 40 and 22 (84.6%) were positive for both molecular techniques (PCR and qPCR). The molecular techniques were the methodologies that obtained the highest positivity among the analyzed samples (Table 1). Despite the predominance of males (72.7%) and the age group between 11 and 30 years (36.4%) in the individuals with VL, no significant differences were observed (Table 2).

Table 1. Positivity in different laboratory techniques for visceral leishmaniasis, performed in human samples.

	Number of samples (%)		
	Negative	Indeterminate	Positive
Parasitological[a]	5 (19.2)	-	21 (80.8)
RT[b]	5 (19.2)	-	21 (80.8)
IFAT[c]	1 (3.8)	6 (23.1)	19 (73.1)
PCR[d]	4 (15.4)	-	22 (84.6)
qPCR[e]	4 (15.4)	-	22 (84.6)

[a] parasitological = direct parasitological in bone marrow aspirate; [b] RT = Rapid Test (IT-LEISH®-Bio-Rad Laboratories); [c] IFAT = indirect immunofluorescent antibody Test (IFAT) (IFI Human Leishmaniasis - Bio-manguinhos); [d] PCR = polymerase chain reaction (LITSR / L5.8S); [e] qPCR = real-time PCR (hsp70).

Table 2. Association of demographic data with visceral leishmaniasis in humans.

Sex	VL[a] positive n=22 (%)	VL[a] negative n=4 (%)	OR (95%CI)	p-value
Male	16 (72.7)	3 (75.0)	0.89 (0.01-13.98)	1
Female	6 (27.3)	1 (25.0)	-	-
Age Group				
0 to 10 years	6 (27.3)	1 (25.0)	-	-
11 to 30 years	8 (36.4)	1 (25.0)	1.33 (0.01-117.57)	1
31 to 50 years	4 (18.2)	1 (25.0)	0.67 (0.01-65.28)	1
51 to 70 years	2 (9.1)	-	NA	1
> 70 years	2 (9.1)	1 (25.0)	0.33 (0.01-39.14)	1

[a] VL = visceral leishmaniasis; NA = not applicable. Fisher exact test

The level of agreement between the methodologies performed for VL was good and excellent between the parasitological, RT and molecular techniques. However, the IFAT was the methodology that obtained less positivity and moderate and weak agreement with the other methodologies, possibly due to the indeterminate results obtained (Table 3).

Table 3. Kappa coefficient of agreement with 95% confidence interval, referring to the laboratory techniques performed for visceral leishmaniasis in humans.

Laboratory techniques	Kappa agreement (IC 95%)	p-value
RT[a] versus parasitological[b]	0.752 (0.427 - 1.000)	< 0.001
RT versus IFAT[c]	0.426 (-0.461 -1.000)	< 0.001
RT versus PCR[d]	0.866 (0.611 - 1.000)	< 0.001
RT versus qPCR[e]	0.866 (0.611 - 1.000)	< 0.001
Parasitological versus IFAT	0.426 (-0.461 -1.000)	< 0.001
Parasitological versus PCR	0.866 (0.611 - 1.000)	< 0.001
Parasitological versus qPCR	0.866 (0.611 - 1.000)	< 0.001
IFAT versus PCR	0.386 (0.156 - 0.685)	< 0.001
IFAT versus qPCR	0.386 (0.148 - 0.676)	< 0.001
PCR versus qPCR	1.000 (1.000 - 1.000)	< 0.001

[a] RT = rapid test; [b] parasitological = direct parasitological in bone marrow swabs; [c] IFAT = indirect immunofluorescent antibody test; [d] PCR = polymerase chain reaction; [e] qPCR = real-time PCR.

When quantifying the parasite load in human samples for VL using qPCR, 15 (68.2%) samples were concentrated in the interval between 100 and 1,000 parasites/mL and seven (31.8%) samples covered > 1,000 parasites/mL (Table 4). Regarding the association between sex and age group with parasite load, no significant differences were observed (Table 5).

Table 4. Parasite quantification referring to the 22 samples positive for visceral leishmaniasis in humans.

Parasite quantification (parasites/mL)	Number of samples (%) (n =22)
> 1 ≤ 100	0 (0)
>100 ≤ 1.000	15 (68.2)
>1.000	7 (31.8)

Table 5. Association of demographic data with parasite quantification from human samples for visceral leishmaniasis.

	Parasite Quantification (parasites/mL)			
	> 100 ≤ 1.000 (n=15)	> 1.000 (n=7)	OR (95% CI)	p-value
Sex				
Male	10 (66.7)	6 (85.7)	0.22 (0.01-4.38)	0.62
Female	5 (33.3)	1 (14.3)	-	-
Age Group				
0 to 10 years	5 (33.3)	1 (14.3)	-	-
11 to 30 years	3 (20.0)	5 (71.4)	0.12 (0.01-2.21)	0.14
31 to 50 years	4 (26.7)	0	NA	-
51 to 70 years	1 (6.7)	1 (14.3)	0.2 (0.01-31.28)	0.46
> 70 years	2 (13.3)	0	NA	-

NA= not applicable. Fisher exact test.

4.2 Tegumentary Leishmaniasis in humans

In the samples analyzed with cases with clinical suspicion TL, there was a predominance of male (59.1%) and age group between 51 and 70 years (50%) (Table 6). Regarding to the laboratory techniques performed in the 22 samples, two (9.1%) were positive for IFAT with titration equal to 80; 12 (54.5%) were indeterminate to IFAT with titration equal to 40; and four (18.2%) were positive for both molecular analyzes (PCR and qPCR). The molecular techniques were the methodologies that obtained the highest positivity among the samples analyzed (Table 7).

The level of agreement between the methodologies performed for TL, was excellent between both molecular techniques and between IFAT and molecular techniques were negligible agreement. The IFAT was the methodology that obtained less positivity and agreement with the other methodologies, possibly due to the indeterminate results obtained, as well as in the visceral leishmaniasis in humans (Table 8). When quantifying the parasite load in the four human samples for TL, through qPCR, 100% of the samples were concentrated in the range of 100 to 1,000 parasites/mL.

335 **Table 6.** Demographic data of individuals with clinical suspicion of tegumentary leishmaniasis.

Characteristics	Tegumentary Leishmaniasis (n=22)
Sex	Number of samples (%)
Male	13 (59.1)
Female	9 (40.9)
Age group	
0 to 10 years	1 (4.5)
11 to 30 years	4 (18.2)
31 to 50 years	4 (18.2)
51 to 70 years	11 (50.0)
> 70 years	2 (9.1)

336

337 **Table 7.** Positivity in the different laboratory techniques for tegumentary leishmaniasis, performed
338 in human samples.

	Number of samples (%)		
	Negative	Indeterminate	Positive
IFAT[a]	8 (36.4)	12 (54.5)	2 (9.1)
PCR[b]	18 (81.8)	-	4 (18.2)
qPCR[c]	18 (81.8)	-	4 (18.2)

339 [a] IFAT = indirect immunofluorescent antibody test; [b] PCR = polymerase chain reaction
340 (LITSR/L5.8S); [c] qPCR = real-time PCR (hsp70).

341

342 **Table 8.** Kappa coefficient of agreement with 95% confidence interval referring to the laboratory
343 techniques performed for tegumentary leishmaniasis in humans.

Laboratory techniques	Kappa agreement (IC 95%)	p-value
IFAT[a] versus PCR[b]	0.205 (0.039 – 0.439)	p = 0.003
IFAT versus qPCR[c]	0.205 (0.043 – 0.432)	p = 0.003
PCR versus qPCR	1.000 (1.000 – 1.000)	p < 0.001

[a] IFAT = indirect immunofluorescent antibody test; [b] PCR = polymerase chain reaction (LITSR/L5.8S); [c] qPCR = real-time PCR (hsp70).

344

345 ## 4.3 Canine visceral leishmaniasis (CVL)

346 After the serological investigation in 4,725 dogs, by CCZ of Bauru city, 837
347 (17.7%) animals were positive in RT-DPP®. In the RT-DPP® positive dogs, the
348 ELISA test was performed, and a positivity was obtained in 543 dogs,
349 representing 11.5% (543/4,725) of the total dogs analyzed in the serological
350 investigation and 64.9% (543/837) among RT-DPP® positive dogs. When

351 performing the molecular techniques in the RT-DPP® positive samples, 535
352 (63.9%) samples were PCR positive and 544 (65%) were qPCR positive (Table
353 9). The level of agreement between the methodologies applied for CVL was
354 excellent between ELISA and the molecular techniques (Table 10). When
355 quantifying the parasitic load in canine samples, by performing qPCR, 402
356 (73.9%) samples were concentrated in the range of 1,000 to 10,000 parasites/mL
357 and 119 (21.9%) samples comprised >10,000 parasites/mL (Table 11).

358 **Table 9.** Positivity in the different laboratory techniques for canine visceral leishmaniasis, applied
359 to the 837 positive canine samples in the serological screening with the DPP rapid test.

	Number of samples (%)	
Laboratory techniques	Negative	Positive
ELISA[a]	294 (35.1)	543 (64.9)
PCR[b]	302 (36.1)	535 (63.9)
qPCR[c]	293 (35.0)	544 (65.0)

360 [a] ELISA= enzyme-linked immunosorbent assay (EIE - Bio-manguinhos); [b] PCR= polymerase
361 chain reaction (LITSR/L5.8S); [c] qPCR = real-time PCR (Hsp70).

362

363 **Table 10.** Kappa coefficient of agreement with 95% confidence interval referring to laboratory
364 techniques performed for canine visceral leishmaniasis.

Laboratory techniques	Kappa agreement (IC 95%)	p-value
ELISA[a] versus PCR[b]	0.97 (0.958 – 0.990)	<0.001
ELISA versus qPCR[c]	0.99 (0.983 – 1.000)	<0.001
PCR versus qPCR	0.98 (0.961 – 0.992)	<0.001

365 [a] ELISA= enzyme-linked immunosorbent assay (EIE - Bio-manguinhos); [b] PCR= polymerase
366 chain reaction (LITSR/L5.8S); [c] qPCR = real-time PCR (Hsp70).

367

368 **Table 11.** Parasite quantification of positive samples for canine visceral leishmaniasis.

Parasite Quantification (parasites/mL)	Number of samples (%) (n=544)
> 1 ≤ 100	0 (0)
>100 ≤ 1.000	23 (4.2)
>1.000 ≤ 10.000	402 (73.9)
>10.000	119 (21.9)

369

370 ## 5 Discussion

371 The development of effective programs for the control of leishmaniasis
372 requires applications of increasingly sensitive, and specific, methodologies and
373 an adequate treatment, in order to reduce the morbidity and mortality rate

(Ghasemian et al., 2016). Conventional methods, such as parasitology, require invasive procedures and a high level of knowledge by the health professional, while serological tests have important limitations that can lead to an incorrect diagnosis, as cross-reactions with other diseases and the low accuracy of the method in patients (Srivastava et al., 2011; Sundar et al., 2012, Lindoso et al., 2016)

For a long time it was believed that the parasites were absent or very few in the peripheral blood of patients with leishmaniasis (Lachaud, 2000). However, with the evolution of molecular techniques, it was possible to identify *Leishmania* in the peripheral blood, with high sensitivity and specificity, both in immunocompetent and immunosuppressed individuals and in the different diseases present in leishmaniasis (Antinori et al., 2007; Reithinger and Dujardin, 2007; Fraga et al., 2010; Martins et al., 2010; Hossain et al., 2017).

In the present study, the high sensitivity of PCR and qPCR, in peripheral blood, was demonstrated by the ability to detect the parasite, in both techniques, in 84.6% of the samples for VL and 18.2% of the samples for TL in humans. Junior et al. (2013) evaluated the use of PCR and qPCR in 100 peripheral blood samples from patients with clinical signs for VL and, both techniques, reported the same positivity (91.3%) with a sensitivity and specificity of 97.78% and 61.82% in the PCR and 91.3% and 29.6% in the qPCR, respectively. Muñoz et al. (2016) evaluated the parasitological diagnostic efficiency compared to PCR in skin and blood samples from 22 patients with suspected of TL and demonstrated that the parasitological was able to identify 85% of the positive cases, whereas PCR performed in the samples of skin identified 100%, and in blood samples identified 90% with 94.1% sensitivity and 60% specificity.

Parasitological examination is considered a "gold standard" for the diagnosis of leishmaniasis, although a lower and more variable sensitivity is described according to the sample used (Srivastava et al., 2011; Muñoz et al., 2016). Through this methodology, in the current study it was possible to identify 80.8% of individuals with VL. Several studies demonstrate higher sensitivity in molecular techniques when compared to parasitological examination. In addition to the use of molecular techniques in patients with negative results for the

406 parasitological (Osman et al., 1997; Romero et al., 2001; Antinori et a., 2007;
407 Fraga et al., 2010). Piarroux et al. (1994) analyzed 73 peripheral blood samples
408 from patients with suspected of VL and showed high sensitivity of PCR (82%)
409 when compared to parasitological (55%) and culture (55%).

410 Among the serological tests performed in humans, RT (rK39) identified
411 80.8% of individuals with VL. The use of the recombinant K39 antigen is
412 described as a very useful tool for the diagnosis of VL, but its performance may
413 vary according to the region applied, due to parasite diversity, differences in
414 antibody concentrations, age, nutritional status and immunological response in
415 individuals (Cunningham et al., 2012). In Brazil, its sensitivity is described
416 between 84.7% and 93% (Assis et al., 2008; Cunningham et al., 2012; Carvalho
417 et al., 2003). However, according to da Silva et al. (2017), there is a decrease in
418 sensitivity from 95.45% to 61.29% in patients co-infected with HIV. Ozerdem et
419 al. (2009) compared PCR, RT (rK39) and parasitological tests in 50 peripheral
420 blood samples from patients with suspected of VL in Turkey and demonstrated
421 that PCR is the most sensitive technique than the others analyzed.

422 The IFAT obtained the lowest positivity and agreement with the other
423 methodologies performed for both VL and TL, possibly due to the presence of
424 indeterminate results. Its performance is associated with disease time, clinical
425 form, species involved, and antigenic preparation used (Assis et al., 2008;
426 Barroso-Freitas et al., 2009; Ministério da Saúde, 2014). The major disadvantage
427 of IFAT is the possibility of cross-reactions with other diseases, mainly Chagas
428 disease (Pedras et al., 2008; Ministério da Saúde, 2014). Several authors
429 suggest that they should be replaced and/or complement with other serological
430 methods or by molecular techniques, considered to be more sensitive and
431 specific (Pedras et al., 2008; Neitzke-Abreu et al., 2013; Machado de Assis et al.,
432 2016).

433 Although there were no significant differences in sex and age group in
434 individuals with VL, several studies point to a higher incidence of the disease in
435 men. Probably, immunological and hormonal factors result in a higher
436 susceptibility of men to infection (Ortiz and Anversa, 2015; Reis et al., 2017; Lima
437 et al., 2018). Historically, children were more affected, but nowadays, in
438 Northeast, the average age of diagnosis has been increasing, due to the

decrease in parasite exposure and/or improvement in health, nutrition and health care (Lima et al., 2018). It can also be attributed to the presence of HIV coinfection, commonly observed in the age group between 18 - 50 years (Albuquerque, et al., 2014; Reis et al., 2017).

The parasitic quantification of the individuals with VL was concentrated in the interval between 100 and 1,000 parasites/mL. According to Mary et al., (2004), at the time of diagnosis of VL, the parasitemia in the blood can vary between 32 and 188,700 parasites/mL, with an average of 837 parasites/mL. In human serum, due to leukocyte lysis during collection, it may reach 585 parasites/mL (Weirather et al., 2011).

The sensitivity and specificity of qPCR for the diagnosis of VL in humans can vary between 29.6% and 100% and 91.3% and 100%, respectively (de Paiva-Cavalcanti, et al., 2015). Other studies demonstrated the correlation between a higher parasite load to the presence of symptomatology (Mary et al., 2006) and the importance of parasitic quantification for diagnosis, follow-up during treatment and prevention of recurrence (Houssain et al., 2017; Galluzzi et al., 2018). No significant differences were found in demographic data and parasitic quantification in individuals with VL. Mourão et al. (2014) also did not demonstrate statistical differences regarding to parasite load and symptoms, laboratory tests and a bad evolution of the disease, in children with VL.

Referring to individuals with TL, several studies mention the parasitic quantification biopsies and/or swab of the lesion as an alternative form of diagnosis (Jara et al., 2013; Boni et al., 2017; Gomes et al., 2017). However, in the current study it was possible to quantify four blood samples from individuals with a clinical suspicion TL, suggesting the possibility of blood being an alternative to research the disease. The sensitivity may vary from 54.76% and 73.81% in biopsy samples and 56.25% and 75% in swab samples (Gomes et al., 2017). Demonstrated by Jara et al. (2013), that high parasitic load in biopsies is associated with recent infection of the disease.

The study of human leishmaniasis should be performed in an integrated way with canine leishmaniasis. It is estimated that a relation of dog/inhabitant in the state of São Paulo is 1:4 (Alves et al., 2015) and it is believed that, in endemic

areas, the prevalence of CVL can reach a range of 5.9% to 29.8% (Coura-Vital et al., 2011).

In the present study, 11.5% (543/4,725) of positivity were obtained in both techniques performed in canine serological investigation. In Panorama city (SP), an endemic area, 974 dogs were analyzed and 5.6% (55/974) of positivity were detected for both tests (Lopes et al., 2017). The seropositivity is very variable, because there is influence of several factors, such as the characteristics of the evaluated area and the methodologies applied (Azevedo et al., 2008).

The use of serological methods to perform canine epidemiological investigation is still very questioned, due to the variations in sensitivity and specificity of the trials, collaborating with the maintenance of the infected animals in the population (Grimaldi et al., 2012; Martinez et al. 2011). According to Lopes et al. (2017), in endemic areas, one in five seronegative dogs are infected. On the other hand, in endemic areas, there is great exposure of the dog to the parasite, causing positive serological results, but a lower proportion develops the disease (Martinez et al., 2011).

According to Mendonça et al. (2017), the specificity of serological techniques is influenced by the prevalence of transmission in the region, resulting in the detection of false positive dogs. However, in the present study, in the endemic area, were demonstrated a high agreement between the applied methodologies, ELISA, PCR and qPCR, with few variations of positivities 64.9%, 63.9% and 65%, respectively. Fraga et al. (2016) demonstrated that the current protocol (TR-DPP® e ELISA) increased the accuracy of detecting true positive animals, both in symptomatic and asymptomatic animals, but the sensitivity is still limited, meaning the maintenance of false negative dogs.

The intensity of peripheral parasitism plays an important role in the transmission of *Leishmania*, in addition of being associated with disease severity (Torrecilha et al., 2016). Most canine blood samples (73.9%) were concentrated in the range 1,000 and 10,000 parasites/mL. Francino et al., (2006) demonstrated that the parasitological load in dog blood samples reached a range between 7 and 14,055 parasites/ml, and in bone marrow samples, between 13 and 12,287,840 parasites/ml. Quaresma et al. (2009) have identified a higher

parasitic load in the bone marrow than in the peripheral blood; however, blood samples may be a diagnostic and/or complement alternative for the serological tests, due to the qPCR's ability to detect lower parasite load and is easier to obtain on a large scale (Francino et al., 2006; Maia et al., 2009).

The study performed presented important limitations regarding to the number of samples in both human groups analyzed. It was also not possible to perform the parasitological, "gold standard", in the individuals with clinical suspicion of TL to compare with the other methodologies. In the canine samples, it was not possible to compare the RT-DPP® with the other applied techniques, because the RT was used as screening.

6 Conclusion

Our results indicate that molecular techniques in blood samples are a less invasive diagnostic alternative for both VL and TL in humans, due to the higher positivity between the samples analyzed and/or the excellent agreement with the conventional techniques. In relation to canine samples, the molecular techniques showed excellent agreement with the techniques applied in the serological investigation and can be used both for the diagnosis and to complement the serological results.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest regarding the content of this article.

Acknowledgements

The authors wish to thank The São Paulo Research Foundation, Brazil (FAPESP) for financial support, grant number (2015/17519-4), Milena Zambon Garcia and Maria José Gomes Marques for laboratory tests and Simone Tateishi for English review.

References

Albuquerque, L.C., Mendonca, I.R., Cardoso, P.N., Baldaçara, L.R., Borges, M.R.M.M., Borges, J.C., Pranchevicius, M.C.S., 2014. HIV/AIDS-related visceral leishmaniasis: a clinical and epidemiological description of

visceral leishmaniasis in northern Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 47, 38–46.

Alves, M.C.G.P., Matos, M.R., Reichmann, M.L., Dominguez, M.H., 2005. Dimensionamento da população de cães e gatos do interior do Estado de São Paulo. Rev. Saude Publica. 39, 891-897.

Antinori, S., Calattini, S., Longhi, E., Bestetti, G., Piolini, R., Magni, C., Orlando, G., Gramiccia, M., Acquaviva, V., Foschi, A., Corvasce, S., Colomba, C., Titone, L., Parravicini, C., Cascio, A., Corbellino, M., 2002. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. Clin. Infect. Dis. 44, 1602-1610.

Assis, T.S.M., Braga, A.S.C., Pedras, M.J., Barral, A.M., Siqueira, I.C., Costa, C.H.N. Holanda, T.A., Soares, V.Y.R., Biá, M., Caldas, A.J.M., Romero, G.A.S., Rabello, A., 2008. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para diagnóstico da leishmaniose visceral humana. Epidemiol. Serv. Saúde. 17, 107-116.

Azevedo, M.A., Dias, A.K., De Paula, H.B., Perri, S.H., Nunes, C.M., 2008. Canine visceral leishmaniasis evaluation in Poxoreo, Mato Grosso State, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 17, 123–127.

Barroso-Freitas, A.P., Passos, S.R., Mouta-Confort, E., Madeira, M.F., Schubach, A.O., Santos, G.P.L., Nascimento, L.D., Marzochi, M.C.A., Marzochi, K.B.F., 2009. Accuracy of na ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 103, 383–389.

Boni, S.M., Oyafuso, L.K., Soler, R.d.C., Lindoso, J.A.L., 2017. Efficiency of noninvasive sampling methods (swab) together with Polymerase Chain Reaction (PCR) for diagnosing American Tegumentary Leishmaniasis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 59, e38.

Cardim, M.F.M., Rodas, L.A.C., Dibo, M.R., Guirado, M.M., Oliveira, A.M., Chiaravalloti Neto, F., 2013. Introdução e expansão da leishmaniose

visceral americana em humanos no Estado de São Paulo, 1999-2011. Rev. Saúde Pública. 47, 691-700.

Carvalho, S.F., Lemos, E.M., Corey, R., Dietze, R., 2003. Perfomance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 68, 321-324.

Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, 2017a. Leishmaniose Tegumentar Americana: casos confirmados segundo GVE de notificação e ano de diagnóstico e segundo GVE de residência e ano de diagnóstico. Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. URL http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/lta/gve0717_not_res.htm.

Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, 2017b. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral segundo LPI e ano de notificação, Estado de São Paulo, 2014 a 2017. Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/leish/lv1417_lpi.pdf.

Coura-Vital, W., Marques, M.J., Veloso, V.M., Roatt, B.M., Aguiar-Soares, R. D.O., Reis, L.E.S., Braga, S.L., Morais, M.H.F., Reis, A.B., Carneiro, M., 2011. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. PLoS Negl. Trop. Dis. 5, 1-10.

Cunningham, J., Hasker, E., Das, P., El Safi, S., Goto, H., Mondal, D, Mbuchi, M., Mukhtar, M., Rabello, A., Rijal, S., Sundar, S., Wasunna, M., Adams, E., Menten, J., Peeling, R., Boelaert, M., 2012. A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. Clin. Infect. Dis. 55, 1312-1319.

da Silva, M.R.B., Brandão, N.A.A., Colovati, M., Sousa, M.M.P., Lima, L.C., Dorta, M.L., Ribeiro-Dias, F., Costa, D.L., Carlos Costa, H.N., Oliveira, M.A.P., 2017. Performance of two immunochromatographic tests for

598 diagnosis of visceral leishmaniasis in patients coinfected with HIV.
599 Parasitol. Res. 1-9.
600 Dantas-Torres, F., Brandão-Filho, S.P., 2006. Visceral leishmaniasis in
601 Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. Rev. Inst. Med.
602 Trop. São Paulo. 48, 151-156.
603 Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives.
604 Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 27, 305-318.
605 El Tai, N.O., Osman, O.F., El Fari, M., Presber, W., Schönian, G., 2000.
606 Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed space in clinical
607 samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by
608 single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Trans. R.
609 Soc. Trop. Med. Hyg. 94, 575-579.
610 Fraga, D.B., Pacheco, L.V., Borja, L.S., Tuy, P.G., Bastos, L.A., Solca MS.,
611 Amorim, L.D., Veras, P.S., 2016. The rapid test based in *Leishmania*
612 *infantum* chimeric rK28 protein improves the diagnosis of canine visceral
613 Leishmaniasis by reducing the detection of false-positive dogs. PLoS
614 Negl. Trop. Dis. 10, e0004333.
615 Fraga, T.L., Brustoloni, Y.M., Lima, R.B., Dorval, M.E., Oshiro, E.T., Oliveira,
616 J., Oliveira, A.L., Pirmez, C., 2010. Polymerase chain reaction of
617 peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in
618 children. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 105, 310-313.
619 Francino, O., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego,
620 L., Alberola, J, Ferrer, L., Sanchez, A., Roura, X., 2006. Advantages of
621 real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine
622 leishmaniosis. Vet. Parasitol. 137, 214–221.
623 Galluzzi, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Menotta, M., Magnani, M., 2018.
624 Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. Parasit.
625 Vectors. 11, 273.
626 Ghasemian, M., Javad, M., Lame, G., 2016. SYBR green-based detection of
627 *Leishmania infantum* DNA using peripheral blood samples. J. Parasit.
628 Dis. 40, 81–87.
629 Gomes, C.M., Cesetti, M.V., de Paula, N.A., Vernal, S., Gupta, G., Sampaio,
630 R.N.R., Roselino, A.M., 2017. Field validation of SYBR Green- and
631 TaqMan-based real-time PCR using biopsy and swab samples to

632 diagnose American tegumentary leishmaniasis in an area where
633 *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* is endemic. J. Clin. Microbiol. 55, 526–
634 534.
635 Gontijo, B., Carvalho, M.D.R., 2003. Leishmaniose tegumentar americana.
636 Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 36, 71-80.
637 Grimaldi, G., Teva, A., Ferreira, A.L., dos Santos, C.B., Souza, Pinto, I.,
638 Azevedo, C.T., Falqueto, A., 2012. Evaluation of a novel chromato-
639 graphic immunoassay based on Dual-Path Platform technology
640 (DPPCVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral
641 leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 106, 54–59.
642 Hernandez, C., Alvarez, C., Gonzalez, C., Ayala, M.S., Leon, C.M., Ramirez,
643 J.D., 2014. Identification of six New World *Leishmania* species through
644 the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping
645 assay. Parasit. Vectors. 7, 501.
646 Hossain, F., Ghosh, P., Khan, M.A.A., Duthie, M.S., Vallur, A.C., Picone, A.,
647 Howard, R.F., Reed, S.G., Mondal, D., 2017. Real-time PCR in detection
648 and quantitation of *Leishmania donovani* for the diagnosis of Visceral
649 Leishmaniasis patients and the monitoring of their response to treatment.
650 PLoS One. 12, e0185606.
651 Jara, M., Adaui, V., Valencia, B.M., Martinez, D., Alba, M., Castrillón, C.,
652 Cruz, M., Cruz, I., Van der Auwera, G., Llanos-Cuentas, A., Dujardin, J.-
653 C., Arevalo, J., 2013. Real-time PCR assay for detection and
654 quantification of *Leishmania* (*Viannia*) organisms in skin and mucosal
655 lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. J. Clin.
656 Microbiol. 51, 1826–1833.
657 Junior, M.S.C.L., Zorzenon, D.C.R., Dorval, M.E.C., Pontes, E.R.J.C.,
658 Oshiro, E.T., Cunha, R., Andreotti R., Matos, M.F.C., 2013. Sensitivity of
659 PCR and real-time PCR for the diagnosis of human visceral
660 leishmaniasis using peripheral blood. Asian Pac. J. Trop. Dis. 3, 10-15.
661 Lachaud, L., Dereure, J., Chabbert, E., Reynes, J., Mauboussin, J.M., Oziol,
662 E., 2000. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and
663 follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS
664 patients. J. Clin. Microbiol. 38, 236-240.

Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 33, 159–174.

Lima, Á.L.M., Lima, I.D., Coutinho, J.F.V., Sousa. Ú.P.S.T., Rodrigues, M.A.G., Wilson, M.E., Pearson, R.D., Queiroz, J.W., Jerônimo, S.M.B., 2018. Changing epidemiology of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil: a 25-year follow-up of an urban outbreak. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 111, 440–447.

Lindoso, J.A.L., Cunha, M.A., Queiroz, I.T., Moreira, C.H.V., 2016. Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. HIV/AIDS (Auckl). 8, 147–156.

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. Epidemiol. Infect. 145, 2436-2444.

Machado de Assis, T.S., Azeredo da Silva, A.L., Werneck, G., Rabello, A., 2016. Cost-effectiveness analysis of diagnostic tests for human visceral leishmaniasis in Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 110, 464-471.

Maia, C., Ramada, J., Cristovao, J.M., Goncalves, L., Campino, L., 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. Vet. J. 179, 142-144.

Marcondes, M., Rossi, C.N., 2013. Visceral leishmaniasis in Brazil. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 50, 341-352.

Martinez, V., Quilez, J., Sanchez, A., Roura, X., Francino, O., Altet, L., 2011. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. Parasit. Vectors. 4, 57.

Martins, L., Alexandrino, A., Guimaraes, G., 2010. Detection *of Leishmania braziliensis* DNA in American tegumentary leishmaniasis patients. Rev. Saude Publica. 44, 571–574.

Mary, C., Faraut, F., Drogoul, M.P., Xeridat, B., Schleinitz, N., Cuisenier, B., Dumon, H., 2006. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction

for therapeutic monitoring and patient follow-up. Am. J. Trop. Med. Hyg. 75, 858–863.

Mary, C., Faraut, F., Lascombe, L., Dumon, H., 2004. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. J. Clin. Microbiol. 42, 5249-5255.

Mendonça, I.L., Batista. J.F., 2017. The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of disease. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 59, e39.

Ministério da Saúde, 2014. Manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília, DF, Brasil. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf.

Ministério da Saúde, 2017a. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília, DF, Brasil. URL http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf.

Ministério da Saúde, 2017b. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília, DF, Brasil. http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LT-Casos.pdf.

Ministério da Saúde, 2017c. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília, DF, Brasil. http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LV-Casos.pdf.

Mourão, M.V., Toledo, Jr. A., Gomes, L.I., Freire, V.V., Rabello, A., 2014. Parasite load and risk factors for poor outcome among children with visceral leishmaniasis. A cohort study in Belo Horizonte, Brazil, 2010-2011. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 109, 147–153.

Munoz, E.B., Santander, S., Rojas-Silva, P., Cardenas, P.A., Fornasini, M., Cifuentes, S.C., Salvador, D., Baldeón, M.E., 2016. Diagnostic efficacy

of molecular techniques for detection and identification of *Leishmania* species in human whole blood and skin samples from Ecuador. Am. J. Trop. Med. Hyg. 95, 803–805.

Neitzke-Abreu, H.C., Venazzi, M.S., Bernal, M.V.Z., Reinhold-Castro, K.R., Vagetti, F., Mota, C.A., Silva, N.R., Mara, S., Aristides, A., Silveira, T.G.V., Lonardoni, M.V.C., 2013. Detection of DNA from *Leishmania* (*Viannia*): accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. PLOS One. 8, e62473.

Oliveira, C.L., Assunção, R.M., Reis, I.A., Proietti, F.A., 2001. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1997. Cad. Saúde Pública. 17, 1231-1239.

Ortiz, R.C., Anversa, L., 2015. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Bauru, São Paulo, Brazil, 2004-2012: a descriptive study. Epidemiol. Serv. Saúde. 24, 97-104.

Osman, O.F., Oskam, L., Zijlstra, E.D.E., Kroon, N.C.M., Schoone, G.J., Khalil, El-T.A.G., El-Hassan, A.M., Kager, P.A., 1997. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis, J. Clin. Microbiol. 35, 2454-2457.

Ozerdem, D., Eroglu, F., Genc, A., Demirkazik, M., Koltas, I.S., 2009. Comparison of microscopic examination, rK39, and PCR for visceral leishmaniasis diagnosis in Turkey. Parasitol. Res. 106, 197-200.

Paiva-Cavalcanti, M., Morais, R.C.S., Pessoa-e-Silva, R., Trajano-Silva, L.A.M., Gonçalves-de-Albuquerque, S.C., Tavares, D.H.C., Brelaz-de-Castro, M.C.A., Silva, R.F., Pereira, V.R.A., 2015. Leishmaniases diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. Cell Biosci. 5, 31.

Pan American Health Organization, 2017. Leishmaniosis Washington. URL http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417&Itemid=40250&lang=en.

Pedras, M.J., Gouvea Viana, L., Oliveira, E.J., Rabello, A., 2008. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 102, 172–178.

765 Piarroux, R., Gambarelli, F., Dumon, H., Fontes, M., Dunan, S., Mary, C.,
766 Toga, B., Quilici, M., 1994. Comparison of PCR with direct examination
767 of bone marrow aspiration, myeloculture and serology for diagnosis of
768 visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. J. Clin.
769 Microbiol. 32, 746-749.
770 Quaresma, P.F., Murta, S.M., Ferreira Ede, C., Rocha-Lima, A.C., Xavier,
771 A.A., Gontijo, C.M., 2009. Molecular diagnosis of canine visceral
772 leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and
773 quantification of parasite DNA by real-time PCR. Acta Trop. 111, 289-
774 294.
775 Reis, L.L., Balieiro, A.A., Fonseca, F.R., Gonçalves, M.J., 2017. Changes in
776 the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014.
777 Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 50, 638-45.
778 Reithinger, R., Dujardin, J.C., 2007. Molecular diagnosis of leishmaniasis:
779 current status and future applications. J. Clin. Microbiol. 45, 21–25.
780 Romero, G.A., Guerra, M.V., Paes, M.G., Cupolillo, E., Bentin, T.C., Macedo,
781 V.O., Fernandes, O., 2001. Sensitivity of the polymerase chain reaction
782 for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*)
783 *guyanensis*. Acta Trop. 79, 225-229.
784 Srivastava, P., Dayama, A., Mehrotra, S., Sundar, S., 2011. Diagnosis of
785 visceral leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 105, 1–6.
786 Sundar, S., Rai, M., 2002. Laboratory diagnosis of visceral
787 Leishmaniasis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9, 951-958.
788 Torrecilha, R.B.P., Utsunomiya, Y.T., Bosco, A.M., Almeida, B.F., Pereira,
789 P.P., Narciso, L.G., Pereira, D.C.M., Baptistiolli, L., Calvo-Bado, L.,
790 Courtenay, O., Nunes, C.M., Ciarlini, P.C., 2016. Correlations between
791 peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations
792 in dogs with visceral leishmaniasis. Prev. Vet. Med. 32, 83–87.
793 Weirather, J.L., Jeronimo, S.M., Gautam, S., Sundar, S., Kang, M., Kurtz,
794 M.A., Haque, R., Schriefer, A., Talhari, S., Carvalho, E.M., Donelson,
795 J.E., Wilson, M.E., 2011. Serial quantitative PCR assay for detection,
796 species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human
797 samples. J. Clin. Microbiol. 49, 3892-3904.

798 Werneck, G.L., 2010. Geographic spread of visceral leishmaniasis in
799 Brazil. Cad. Saúde Pública. 26, 644-645.

Artigo Científico 2

Análise espacial da leishmaniose visceral humana e canina no município de Bauru, SP, Brasil, entre 2014 e 2016.

Livia Carla Ramos Augusto[a,b], , Barbara Suares de Almeida[b], Kethlyn Magliani de Figueiredo[b], Luciana da Silva Ruiz[b], Laís Anversa[b], Jose Eduardo Tolezano[c], Cassiano Victória[d], Luiz Ricardo Paes de Barros Cortez[e], Valéria Camprigher[e], Virgínia Bodelão Richini-Pereira[a,b].

[a] Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP Univ Estadual Paulista; Distrito de Rubião Júnior s/n. Botucatu, SP 18618-000, Brasil.

[b] Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais Bauru, SP, Brasil, Rua Rubens Arruda, quadra 6. Altos da Cidade, Bauru, SP 17015-110, Brasil.

[c] Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia, São Paulo, SP, Brasil, Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, 01246-000, Brasil.

[d] Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista - UNESP; Distrito de Rubião Júnior s/n. Botucatu, SP 18618-000, Brasil.

[e] Centro de Controle de Zoonoses, Secretaria Municipal da Saúde, Prefeitura de Bauru, Rua Henrique Hunzicker, quadra 1. Jardim Bom Samaritano, Bauru, SP 17032-340.

Periódico: Parasites & Vectors (Qualis Medicina II – A2)

Resumo

A leishmaniose visceral (LV) constitui um importante problema de saúde pública. No Brasil, o Programa de Vigilância e Controle da LV (PVCLV) do Ministério da Saúde, prevê medidas para diminuir a morbidade, letalidade e controlar o avanço das leishmanioses no país. As análises espaciais são ferramentas importantes para a compreensão da epidemiologia das leishmanioses e auxiliam em um melhor planejamento de alocação dos recursos públicos, monitoramento, avaliação das ações de vigilância e consequentemente um controle mais efetivo da doença. O presente estudo teve como objetivo realizar a análise espacial dos casos de LV humana e canina (LVC), confirmados laboratorialmente e notificados, baseando-se na incidência da enfermidade, entre 2014 a 2016, no município de Bauru (SP), com intuito de identificar as áreas prioritárias para implementação de medidas de vigilância e de controle. A partir do critério clínico-laboratorial, foram confirmados 39 casos humanos de LV por meio do exame parasitológico direto em esfregaço de punção de medula óssea e exame sorológico por teste imunocromatográfico rápido (TR) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI). No mesmo período, foram realizados inquéritos sorológicos em 4725 cães por meio do TR e o ensaio imunoenzimático (ELISA), confirmando 543 casos de LVC. As localizações dos casos de LV humana e canina foram georreferenciadas, gerando mapas com a distribuição no município e análises de densidade utilizando o interpolador de Kernel. Foram identificadas cinco áreas com densidade alta de LV, localizadas nas regiões norte e oeste do município. Além disso, foram identificadas duas áreas com densidade alta de LVC, ambas localizadas na região norte. Em duas localidades, na região norte, houve sobreposição, compreendendo 369 (68%) casos de LVC notificados nos inquéritos sorológicos e 15 (38,5%) casos de LV humano. As análises espaciais são capazes de gerar informações úteis que auxiliam em um melhor planejamento de ações de vigilância e no controle da doença, além da otimização do uso de recursos públicos para a execução dessas ações.

Palavras-chave: análise espacial, leishmaniose visceral, epidemiologia.

1. Introdução

A leishmaniose visceral (LV) constitui um importante problema de saúde pública, devido ao significante aumento na incidência e, consequente, expansão geográfica nas últimas décadas. Alguns fatores que contribuem para esse aumento são: urbanização, mudanças climáticas, adaptação dos vetores à ambientes peridomiciliares, globalização e doenças imunossupressoras incluindo a co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (1-3).

Anualmente, 200 a 400 mil casos de LV são registrados no mundo (4). Cerca de 96% dos casos registrados nas Américas estão concentrados somente no Brasil (5). No Brasil, a LV é uma doença zoonótica, detectada nas cinco regiões do país, associado à infecção por *L. infantum* (*syn. L. chagasi*) (6,7).

A partir de 1980, a LV passou por um importante processo de urbanização. Anteriormente identificada somente em ambientes silvestres e rurais e, hoje, identificada em grandes centros urbanos (8). Os cães (*Canis familiaris*) são considerados os principais reservatórios da *L. infantum*, em ambientes urbanos, por essa razão, são alvos importantes para os programas de controle da doença. (9,10).

No Brasil, o Programa de Vigilância e Controle da LV (PVCLV) do Ministério da Saúde, prevê medidas para diminuir a morbidade e letalidade e controlar o avanço das leishmanioses no país (11). Medidas que recomendam o controle vetorial, identificação e eliminação dos reservatórios caninos por meio dos inquéritos sorológicos, aperfeiçoamento das metodologias diagnósticas e disponibilidade rápida ao tratamento (12,13). Entretanto, há mais de 50 anos as mesmas estratégias são aplicadas e ainda não foi obtido sucesso no controle da doença (10,11,13).

As análises espaciais são ferramentas importantes para a compreensão da epidemiologia das leishmanioses. A sua utilização acarreta em um melhor planejamento de alocação dos recursos públicos, monitoramento, avaliação das ações de vigilância, consequentemente, um controle mais efetivo da doença (14,15). Diversos trabalhos já foram realizados no estado de São Paulo (16-22) identificando regiões com maior concentração da LV humana e/ou canina, porém, há necessidade de explorar melhor a capacidade dessas técnicas em

gerar informações úteis e práticas para serem utilizadas pelas unidades de saúde pública.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo realizar a análise espacial dos casos de LV humana e canina, confirmados laboratorialmente e notificados, baseando-se na incidência da enfermidade, entre 2014 a 2016, no município de Bauru (SP), com intuito de identificar as áreas prioritárias para implementação de medidas de vigilância e de controle.

2. Material e Métodos

2.1 Aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL) n. 10/2014 e Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL) n. 1.131.447.

2.2 Local de Estudo

O município de Bauru localiza-se no centro-oeste do estado de São Paulo (22º18’54’’S,49º 03’39’’W), com uma área de 667,684 km^2 (Figura 1). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população é estimada em 371.000 habitantes com densidade demográfica de 515 habitantes/km^2. O clima é tropical com temperatura média de 22,6ºC, vegetação composta por Cerrado e Mata Atlântica (23).

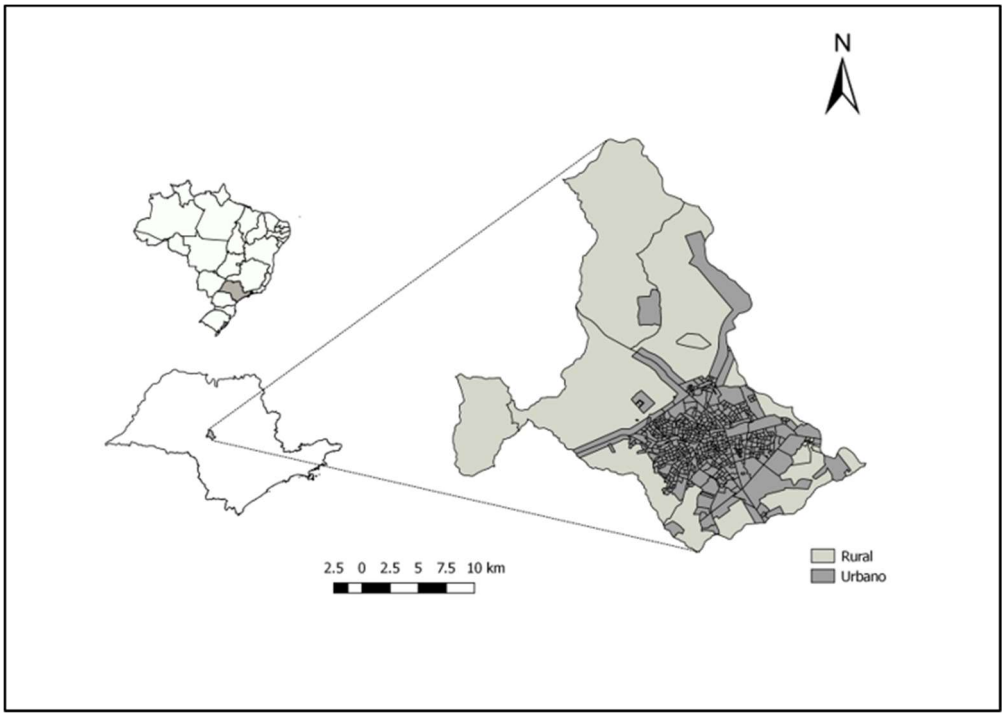


Fig. 1. Localização do município de Bauru, São Paulo, Brasil, destacando o perímetro urbano e rural.

2.3 Amostras Humanas

De acordo com a base de dados do Sinan Net e TabWin, entre 2014 a 2016, foram notificados 71 casos de LV pelo Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (CVE-SP), no município de Bauru. Entre os 71 casos notificados, um caso foi descartado, 22 casos tratavam-se de recidivas, nove casos obtiveram um diagnóstico clínico-epidemiológico e 39 casos obtiveram um diagnóstico clínico-laboratorial, sendo, portanto, estas últimas (39) objeto de análise deste estudo. Todas as amostras foram encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz (IAL CLR-Bauru II), para realização do exame parasitológico direto em esfregaço de punção de medula óssea e exame sorológico pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e teste imunocromatográfico rápido (TR), para confirmação do diagnóstico da LV.

2.4 Amostras Caninas

Os inquéritos sorológicos caninos no município de Bauru foram realizados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ). Os inquéritos consistiram em uma

busca ativa de cães infectados em uma determinada área, onde foram coletadas amostras de sangue tanto de cães sintomáticos quanto assintomáticos, para realização do ensaio imunocromatográfico rápido (TR-DPP®) e ensaio imunoenzimático (ELISA). A busca ativa de cães infectados foi realizada em um raio mínimo de 200m ao redor dos casos humanos positivos. No município de Bauru, entre 2014 a 2016, foram realizados inquéritos sorológicos em 4725 cães, sendo confirmados 543 animais com leishmaniose visceral canina (LVC), por meio dos testes preconizados pelo Ministério da Saúde (TR-DPP® e ELISA).

2.5 Métodos de Diagnóstico

2.5.1 Exame Parasitológico Direto

O exame parasitológico direto foi realizado em esfregaços de punção aspirativa de medula óssea, coradas com giemsa. As lâminas foram visualizadas em óleo de imersão com a objetiva de 100x, no microscópio óptico, para a confirmação da presença das formas amastigotas no tecido.

2.5.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Para realização da RIFI utilizou-se o Kit IFI- Leishmaniose humana (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ) para detecção de anticorpos para *Leishmania* spp. em soro humano, de acordo com as recomendações do fabricante. As lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX51, JPY). Foram considerados resultados indeterminados titulação igual a 40 e resultados positivos titulação a partir de 80.

2.5.3 Teste imunocromatográfico rápido (TR)

Conforme recomendação do Ministério da Saúde brasileiro, o TR utilizado neste período, em amostras de soro humano foi o IT LEISH® (Biorad Laboratories, Marnes-la-Coquette, França), o qual utiliza o antígeno recombinante K39 para detectar anticorpos para *Leishmania* spp.. O TR utilizado para as amostras de soro canino foi o TR-DPP® (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ), o qual utiliza uma combinação de proteínas recombinantes K28 de

L. chagasi (sinônimo: *L*. (*L*.) *infantum*), e a proteína A conjugada ao ouro coloidal para detecção de anticorpos específicos para *Leishmania* spp. em cães. Os testes foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

2.5.4 Ensaio imunoenzimático (ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*)

Para a realização do teste ELISA utilizou-se o kit EIE Leishmaniose Visceral Canina (BioManguinhos, Rio de Janeiro, Brasil), o qual consiste na reação de anticorpos presentes no soro ou plasma de cães com antígenos solúveis e purificados de *L. major-like* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Os testes foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 450*n*m e o valor dos controles negativos foram utilizados para o cálculo do ponto de corte. O resultado foi considerado positivo quando a absorbância foi igual ou superior ao *cut-off*.

2.6 Análise Espacial

A análise espacial incluiu os 39 casos humanos de LV confirmados laboratorialmente pelo IAL CLR-Bauru II e nos 4725 cães analisados nos inquéritos sorológicos, destacando os 543 cães com LVC, no município de Bauru. As coordenadas dos casos humanos e caninos foram obtidos por meio de geocodificação de endereços, utilizando-se para isso a extensão MMQGIS do software QGIS 2.18 Las Palmas, onde os endereços foram importados de arquivos com dados separados por vírgula (CSV), utilizando-se, como sistema de projeção, a Universal Transversa de Mercator (UTM) e como *datum* planimétrico o sistema SIRGAS2000. Após a geocodificação, a camada de pontos foi exportada como um arquivo no formato “shapefile”, para utilização no software ArcGIS 10.1 – ESRI. Após a importação os dados para este software, foram gerados mapas com a distribuição dos casos humanos e caninos no município de Bauru, bem como foram realizadas análises de densidade dos casos de LV e LVC, utilizando-se o interpolador de Kernel, considerando-se um raio fixo de 200 metros, por se tratar da distância média de voo do inseto vetor da LV (24).

3. Resultados

Os resultados dos exames laboratoriais realizados nas 39 amostras humanas, estão descritos na Tabela 1. Foram identificadas, no mapa de estimador de intensidade de Kernel, cinco áreas com densidade alta de LV em humanos, localizadas nas regiões norte e oeste (Figura 2).

Tabela 1. Resultados obtidos nos exames laboratoriais dos casos confirmados de leishmaniose visceral humana

Resultados	**Exames Laboratoriais**		
	Parasitológico	RIFI[a]	TR[b]
Negativo	1	2	7
Positivo	38	29	31
Indeterminado	-	7	-
Não realizado	-	1	1
Total	39	39	39

[a] RIFI= reação de imunofluorescência indireta; [b] TR=teste imunocromatográfico (IT LEISH®)

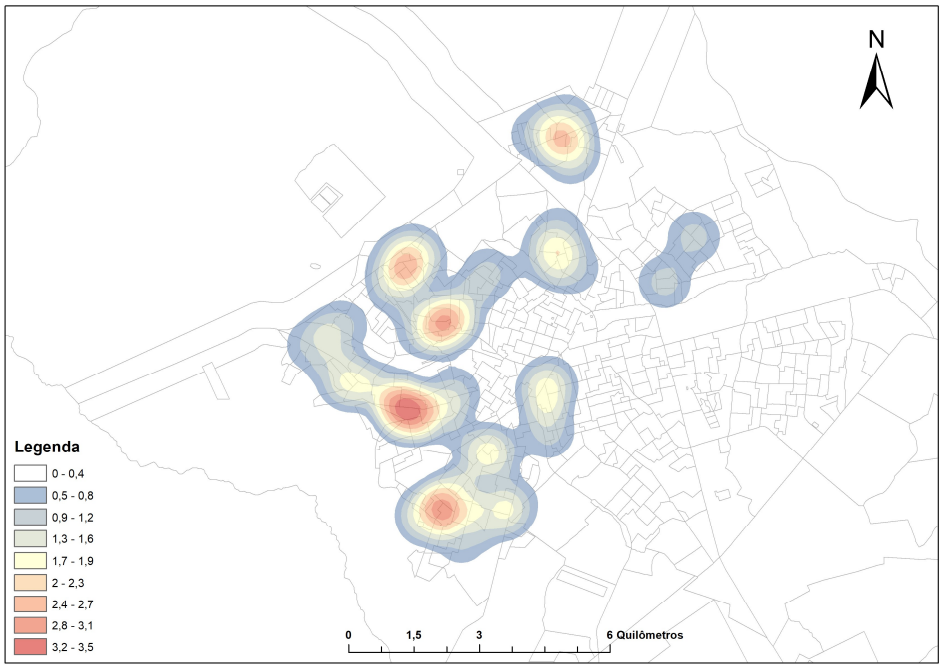


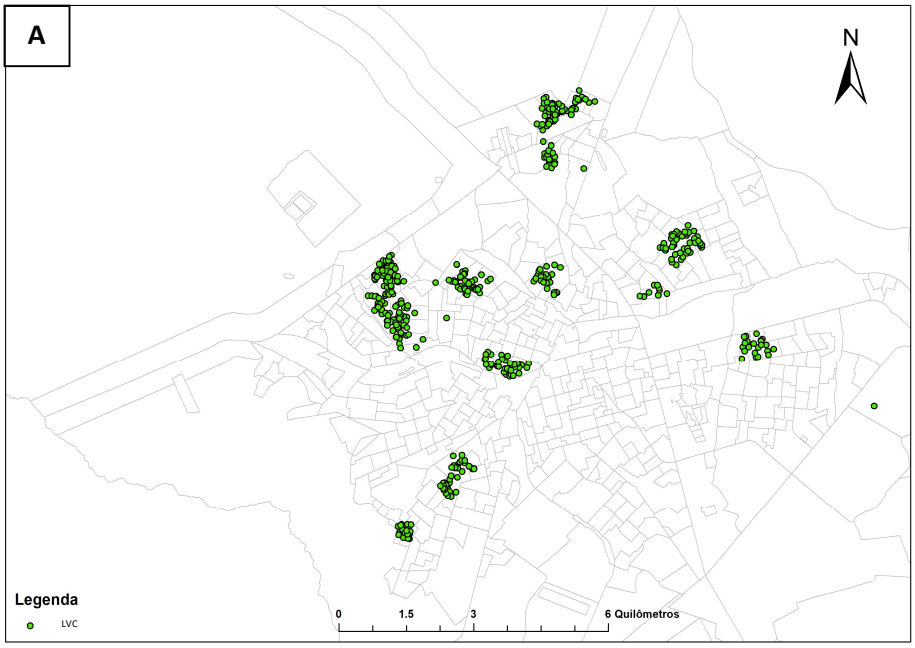
Fig. 2. Mapa de estimador de intensidade Kernel referente aos casos confirmados laboratorialmente de leishmaniose visceral humana no município de Bauru, entre 2014 a 2016.

A Figura 3 representa o mapa de estimador de intensidade de Kernel dos casos de LVC, identificando duas áreas com alta densidade, localizadas na região norte, e uma menor área na região leste. A Figura 4 representa todas as

áreas compreendidas nos inquéritos sorológicos caninos, entre 2014 a 2016, destacando os casos de LVC.



Fig. 3. Mapa de estimador de intensidade Kernel referente aos casos confirmados laboratorialmente de leishmaniose visceral canina no município de Bauru, entre 2014 a 2016.



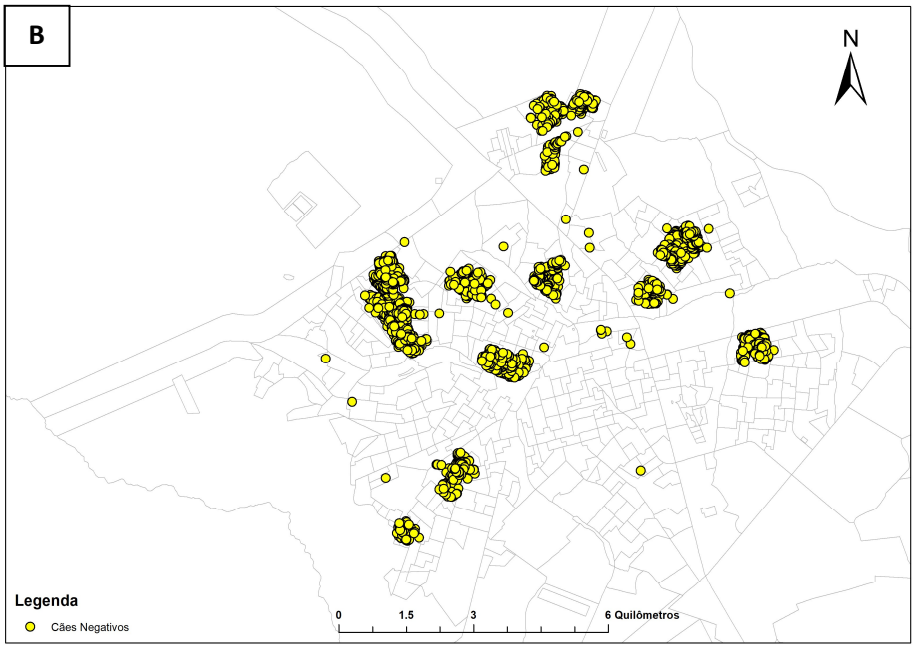


Fig. 4. Análise espacial dos inquéritos sorológicos caninos realizados no município de Bauru, entre 2014 a 2016, destacando os casos positivos para leishmaniose visceral canina (A) e os casos negativos (B).

A análise espacial demonstrou duas áreas, localizadas na região norte, com alta densidade de casos de LV humano e canino, ambas na periferia do município e na zona urbana. As duas regiões compreenderam 369 (68%) casos de LVC notificados nos inquéritos epidemiológicos e 15 (38,5%) casos de LV humano. A região oeste apresentou casos humanos isolados e não foi observado inquéritos sorológicos caninos realizados no mesmo período e nessas áreas específicas, representando 8,7% dos casos de LVC notificados nos inquéritos epidemiológicos e 41% dos casos de LV humano (Tabela 2 e Figura 5).

Tabela 2. Distribuição geográfica dos 543 casos de leishmaniose visceral canina (LVC) e 39 casos de leishmaniose visceral (LV) humana na zona urbana do município de Bauru, São Paulo, 2014 a 2016.

Zona Urbana de Bauru - SP	**Casos de LVC**		**Casos de LV Humano**	
	n	**%**	**n**	**%**
Centro				
Centro	-	-	3	7,7
Total	**-**	**-**	**3**	**7,7**
Leste				
Beija Flor	8	1,5	-	-
Jardim Maria Clélia	-	-	1	2,6

Jardim Redentor	23	4,2	-	-
Jardim Silvestre	8	1,5	-	-
Jardim Mary Dota	35	6,4	1	2,6
Jardim Nova Bauru	17	3,1	-	-
Vila Santa Luzia	12	2,2	1	2,6
Total	**103**	**19,0**	**3**	**7,7**
Norte				
Jardim Bela Vista	41	7,6	-	-
Fortunato Rocha Lima	30	5,5	1	2,6
Jardim Fonte Castelo	-	-	1	2,6
Jardim Godoy	28	5,2	-	-
Jardim Petrópolis	43	7,9	1	2,6
Parque Jaraguá	116	21,4	4	10,3
Parque Santa Cecília	-	-	1	2,6
Parque Santa Edwirges	6	1,1	3	7,7
Parque São Geraldo	2	0,4	-	-
Núcleo Habitacional Vanuire	-	-	1	2,6
Pousada da Esperança II e II	103	19,0	3	7,7
Total	**369**	**68,0**	**15**	**38,5**
Oeste				
Núcleo Bauru XVI	-	-	1	2,6
Jardim Eugênia	-	-	1	2,6
Jardim Terra Branca	-	-	2	5,1
Jardim Vitória	28	5,2	2	5,1
Parque Santa Cândida	-	-	2	5,1
Vila Alto Paraíso	-	-	1	2,6
Vila Industrial	-	-	5	12,8
Vila Nipônica	19	3,5	1	2,6
Vila Souto	-	-	1	2,6
Total	**47**	**8,7**	**16**	**41,0**
Sul				
Jardim Solange	-	-	1	2,6
Vila Independência	4	0,7	-	-
Vila Ipiranga	20	3,7	1	2,6
Total	**24**	**4,4**	**2**	**5,1**

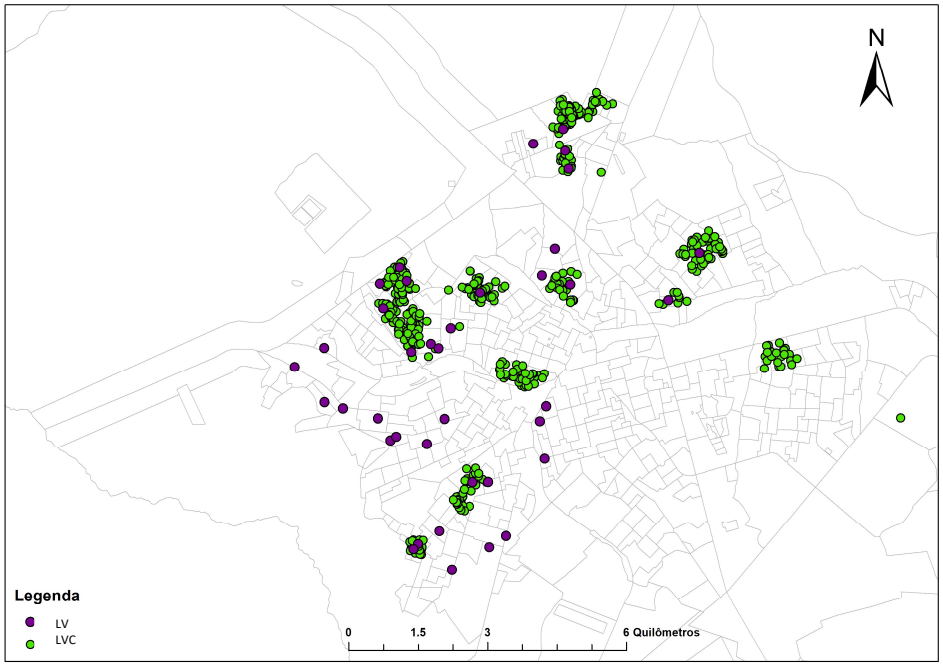


Fig. 5. Análise espacial dos casos de leishmaniose visceral humana (roxo) e canina (verde) no município de Bauru, entre 2014 a 2016.

4. Discussão

A análise espacial realizada dos casos de LV humana (2014 - 2016) ocorreram em área urbana e com alta densidade nos setores periféricos do município. Estudos anteriores também observaram processo de urbanização evidente no município e alta densidade de casos humanos de LV nas áreas: norte e oeste (18,20). Tal fato demonstra a persistência da ocorrência da doença nessas áreas, sugerindo a presença de condições ideais para sua permanência e manutenção.

Vários estudos demonstraram que as características sociodemográficas como a falta de saneamento básico, infraestrutura inadequada e a alta densidade populacional associada as más condições de vida incluindo grande quantidade de animais e matéria orgânica, favorecem a proliferação dos vetores e a manutenção dos reservatórios. Além disso, nesses locais, há grande suscetibilidade da população à infecção, colaborando ainda mais para o aumento da incidência da doença (19,25,26,27).

No atual estudo, não foi possível realizar a associação espacial dos casos de LV humana e canina, pois, os cães georreferenciados são pertencentes

somente aos inquéritos sorológicos realizados entre 2014 a 2016. No entanto, diversos autores já associaram os locais em que há ocorrência de infecção humana com locais com altas taxas de prevalência de infecção canina (16,28,29,30,31).

As duas áreas na região norte, identificadas com alta densidade de infecção humana e canina, estão próximas a áreas de vegetação e das rodovias Marechal Rondon e Comandante João Ribeiro de Barros. As características ambientais influenciam diretamente na taxa de incidência de doença como a presença de vegetação densa e rasteira, solo exposto e áreas densamente ocupadas (32). A proximidade das residências com a vegetação favorece a interação do ciclo silvestre e peridoméstico da doença, colaborando com a manutenção dos vetores e uma maior probabilidade de infecção (33). De acordo com Cardim et al. (34), as rodovias, principalmente a Marechal Rondon, desempenham um papel importante na expansão da LV, devido ao grande fluxo de pessoas, animais, serviços e mercadorias, além ser uma conexão entre regiões endêmicas e não endêmicas.

No período analisado ocorreram diversos casos isolados de LV em humanos na região oeste do município, entretanto, no mesmo período não foram realizados inquéritos sorológicos caninos nessas determinadas áreas. Os mesmos podem ter sido realizados anteriormente ou posteriormente ao estudo, sendo, então, uma limitação importante do trabalho. Autores apontam que a infecção canina costuma preceder e são mais prevalentes do que a infeção humana, (28,33,35), sugerindo a presença de altos índices de LVC também nessa região do município, igualmente descrita na região norte.

As ações de controle aplicadas aos cães infectados estão associadas diretamente com diminuição da prevalência da infecção humana, indicando a importância desses animais na ocorrência da doença. Em vista disso, a identificação dos locais com alta prevalência da infecção canina é de suma importância para um controle efetivo da doença. Atualmente, há crescente resistência social a eutanásia canina, principal medida de controle indicada ao reservatório doméstico. Além disso, estão sendo propostas novas pesquisas que buscam como alternativas como a vacinação e o uso de coleiras impregnadas

com inseticidas (11,36). Recentemente foi aprovado o tratamento da LVC com o fármaco miltefosina, porém ainda não recomendado pelo Ministério da Saúde como medida de controle prevista no PVCLV.

5. Conclusão

A análise espacial, entre 2014 e 2016, permitiu a identificação de duas áreas prioritárias na região norte com alta densidade de casos de LV humano e canino e duas áreas na região oeste do município com alta densidade de casos de LV humano. As geotecnologias são capazes de gerar informações úteis que auxiliam em um melhor planejamento de ações de vigilância e no controle da doença, além da otimização do uso de recursos públicos para a execução dessas ações.

Referências

1. Daszak, P, Cunningham, AA. & Hyatt, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife — threats to biodiversity and human health. Science. 2000; 287: 443–449.
2. Cutler SJ, Fooks AR, Van Der Poel WHM. Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. Emerg Infect Dis. 2010;16(1):1–7.
3. Zanella JRC. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância para saúde e produção animal. Pesqui Agropec Bras. 2016;51(5):510–9.
4. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7(5):e35671.
5. Organização Pan-Americana da Saúde. Informe Epidemiológico das Américas [Internet]. Washington: PAHO; 2018 [citado 15 Fev 2018]. Disponível em: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1990 a 2016 [Internet]. Brasília: MS; 2017 [citado 20 Jan 2018]. Disponível em: http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LV-Casos.pdf
8. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual,desafios e perspectivas. Rev. Bras. Epidemiol. 2004; 7(3): 338–349.
9. Otranto D, Paradies P, Sasanelli M, Spinelli R, Brandonisio O. Rapid Immunochromatographic Test for Serodiagnosis of Canine Leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology. 2004; 42(6): 2769–2770.
10. Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2006;48(3):151-156.
11. von Zuben APB, Donalísio MR. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. Cad Saude Publica. 2016;32(6):e00087415.
12. São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do Estado de São Paulo. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac; 2006.
13. Werneck GL. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo? Cad Saude Publica. 2016;2(6):eED010616.
14. Müller EL, Cubas MR, Bastos LC. Georreferenciamento como instrumento de gestão em unidade de saúde da família. Rev Bras Enferm. 2010;63(6):978-82.
15. World Health Organization. Control of the Leishmaniases. Report of a Meet-ing of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases [Internet]. Geneva: WHO; 2010 [acesso em 01 março 2018]. Disponível

em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO TRS 949 eng.pdf.

16. Camargo-Neves VLF, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spínola RMF, et al. Utilização de ferramentas de análise especial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana – Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. Cad Saúde Pública. 2001;17(5):1263-7.
17. Paulan SC, Silva HR, Lima EACF, Flores EF, Tachibana VM, Kanda ZC, et al. Spatial distribution of Canine Visceral Leishmaniasis in Ilha Solteira, São Paulo Brazil. Eng Agríc. 2012; 32(4): 765-774.
18. Souza VAF, Cortez LRPB, Dias RA, Amaku M, Ferreira Neto JS, Kuroda RBS, et al. Space-time cluster analysis of American visceral leishmaniasis in Bauru, São Paulo State, Brazil. Cad Saude Publica. 2012;28(10):1949-64.
19. Vieira CP, Oliveira AM, Rodas LAC, Dibo MR, Guirado MM, Chiaravalloti Neto F. Temporal, spatial and spatiotemporal analysis of the occurrence of visceral leishmaniasis in humans in the City of Birigui, State of São Paulo, from 1999 to 2012. Rev Soc Bras Med Trop. 2014;47(3):350-8.
20. Ortiz RC, Anversa L. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Bauru, São Paulo, Brazil, 2004-2012: a descriptive study. Epidemiol Serv Saude. 2015;24:97-104.
21. Cardim MFM, Rodas LAC, Dibo MR, Guirado MM, Oliveira AM, Chiaravalloti Neto F. Introdução e expansão da leishmaniose visceral americana em humanos no Estado de São Paulo, 1999-2011. Rev Saude Publica. 2013;47(4):691-700.
22. Cardim MFM, Vieira CP, Chiaravalloti-Neto F. Spatial and spatiotemporal occurrence of human visceral leishmaniasis in Adamantina, State of São Paulo, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2015; 48(6):716-723.
23. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE [Internet]. Brasil: Brasília; 2017 [acesso em 25 março 2018]. Disponível em: https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/bauru.
24. Alexander B, Young, DG. Dispersal of phlebotomine sand flies (diptera: psychodidae) in a colombian focus of Leishmania (viannia) braziliensis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1992; 87: 397-403.

25. Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. TRENDS in Parasitology. 2006; 22(.12): 552-557.
26. de Almeida AS, Medronho RA, Werneck GL. Identification of Risk Areas for Visceral Leishmaniasis in Teresina, Piaui State, Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2011; 84(5): 681–687.
27. Ursine RL, Dias JVL, Morais HA, Pires HHR. Human and canine visceral leishmaniasis in an emerging focus in Araçuaí, Minas Gerais: spatial distribution and socio-environmental factors. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2016; 111(8): 505-511.
28. Oliveira CL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1997. Cad Saúde Pública. 2001; 17:1231-1239.
29. Bavia DCME, Lobão WRJ, Oliveira CMF, et al. Identificação de áreas de risco para leishmaniose visceral americana, através de estudos epidemiológicos e sensoriamento remoto orbital, em Feira de Santana, Bahia, Brasil (2000–2002). Revista Baiana de Saúde Pública. 2004; 28(1):19-32.
30. Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101(1):31-8.
31. Barbosa DS, Belo VS, Rangel MES, Werneck GL Spatial analysis for identification of priority areas for surveillance and control in a visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. Acta Tropica. 2014; 13: 56–62.
32. de Almeida AS, Werneck GL, Resendes APC. Classificação orientada a objeto de imagens de sensoriamento remoto em estudos epidemiológicos sobre leishmaniose visceral em área urbana. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2014; 30(8):1639-1653.
33. Figueiredo ABF, Werneck, GL, Pires, MS et al. Uso e cobertura do solo e prevalência de leishmaniose visceral canina em Teresina, Piauí, Brasil: uma abordagem utilizando sensoriamento remoto orbital. Cad. Saúde Pública. 2017; 33(10): e00093516.

34. Cardim MFM, Guirado MM, Dibo MR, Chiaravalloti Neto F. Visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil: spatial and space-time analysis. Rev Saúde Pública. 2016; 50:48.

35. 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.

36. Sevá AP, Ovallos FG, Amaku M, Carrillo E, Moreno J, Galati EAB, et al. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. PLoS ONE. 2016; 11(7): e0160058.

Conclusão

Conclusão

As técnicas moleculares em amostras de sangue constituem uma alternativa menos invasiva de diagnóstico tanto para LV quanto para LT em humanos, devido a alta positividade entre as amostras analisadas e/ou excelente concordância com o exame parasitológico e o sorológico. A carga parasitária das amostras humanas para LV e LT se concentrou no intervalo entre 100 e 1.000 parasitas/mL.

As técnicas moleculares, quando realizadas nas amotras caninas, apresentaram excelente concordância com as técnicas aplicadas nos inquéritos epidemiológicos e podem ser utilizadas tanto para o diagnóstico quanto para complementar os resultados sorológicos. A carga parasitária das amostras caninas se concentrou no intervalo entre 1.000 e 10.000 parasitas/mL.

A análise espacial, entre 2014 e 2016, permitiu a identificação de duas áreas prioritárias na região norte com alta densidade de casos de LV humano e canino e duas áreas na região oeste do município com alta densidade de casos de LV humano. As geotecnologias são capazes de gerar informações úteis que auxiliam em um melhor planejamento de ações de vigilância e no controle da doença, além da otimização do uso de recursos públicos para a execução dessas ações.

Apêndices

Apêndice 1

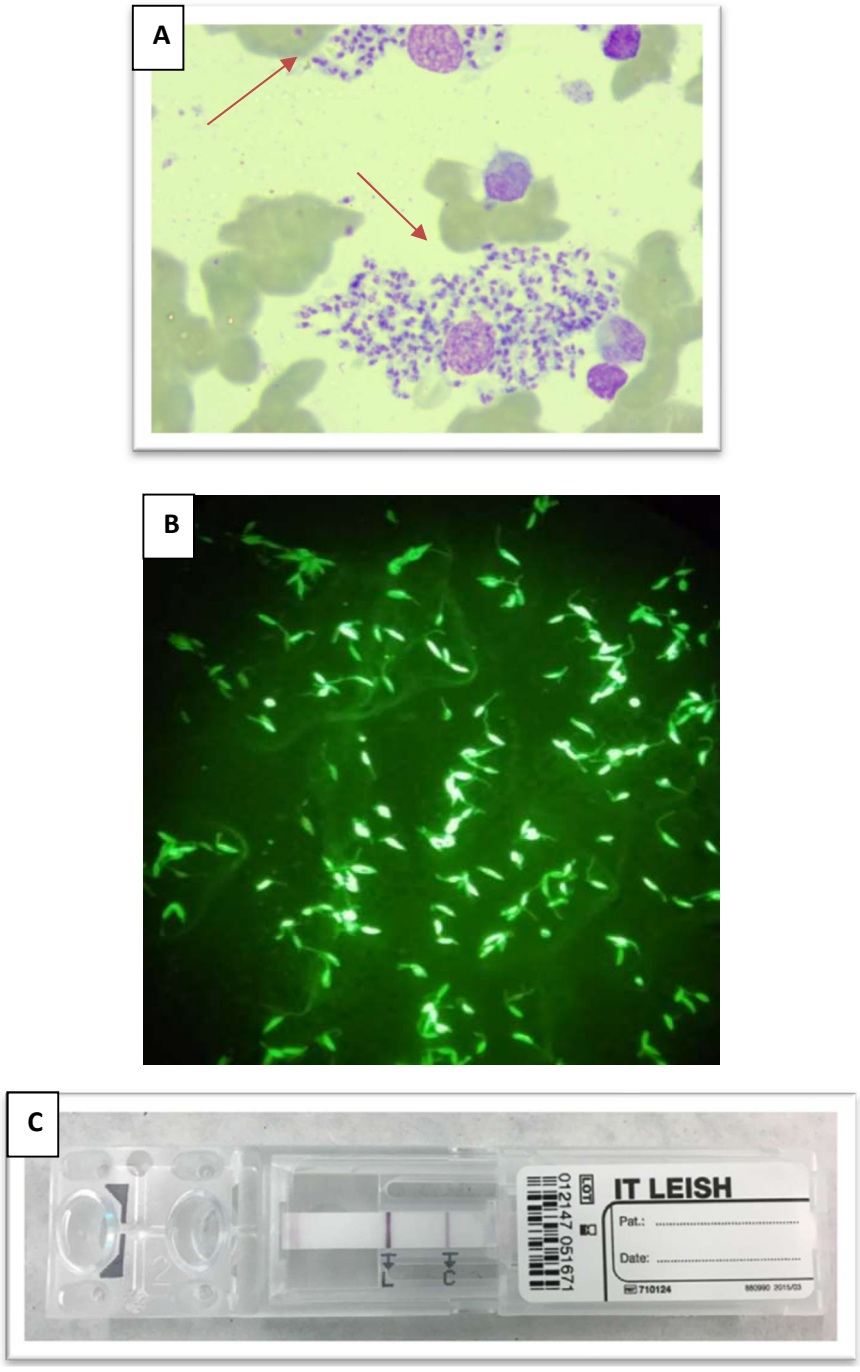


Figura 1: A: Exame parasitológico direto em esfregaço de medula óssea, com a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp.. (seta vermelha). Aumento 100x. B: Soro de pacientes com LV reagentes ao Kit IFI- Leishmaniose humana (Bio-manguinhos, Brasil). Aumento de 40x. C: Soro de paciente com LV reagente ao IT LEISH® (Biorad Laboratories, Marnes-la-Coquette, França). Fonte: Arquivo do CLR Bauru-II.

Apêndice 2

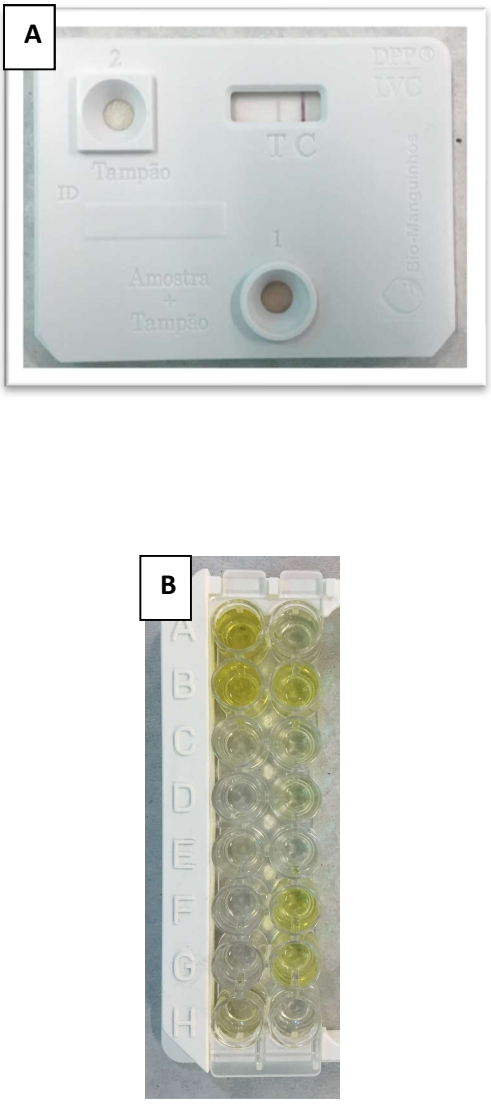


Figura 2: A: Soro de cão reagente ao TR-DPP® (Bio-Manguinhos, Brasil); B: Teste imunoenzimático realizado com o kit EIE Leishmaniose Visceral Canina (BioManguinhos, Rio de Janeiro, Brasil). Fonte: Arquivo do CLR-Bauru-II.

Apêndice 3

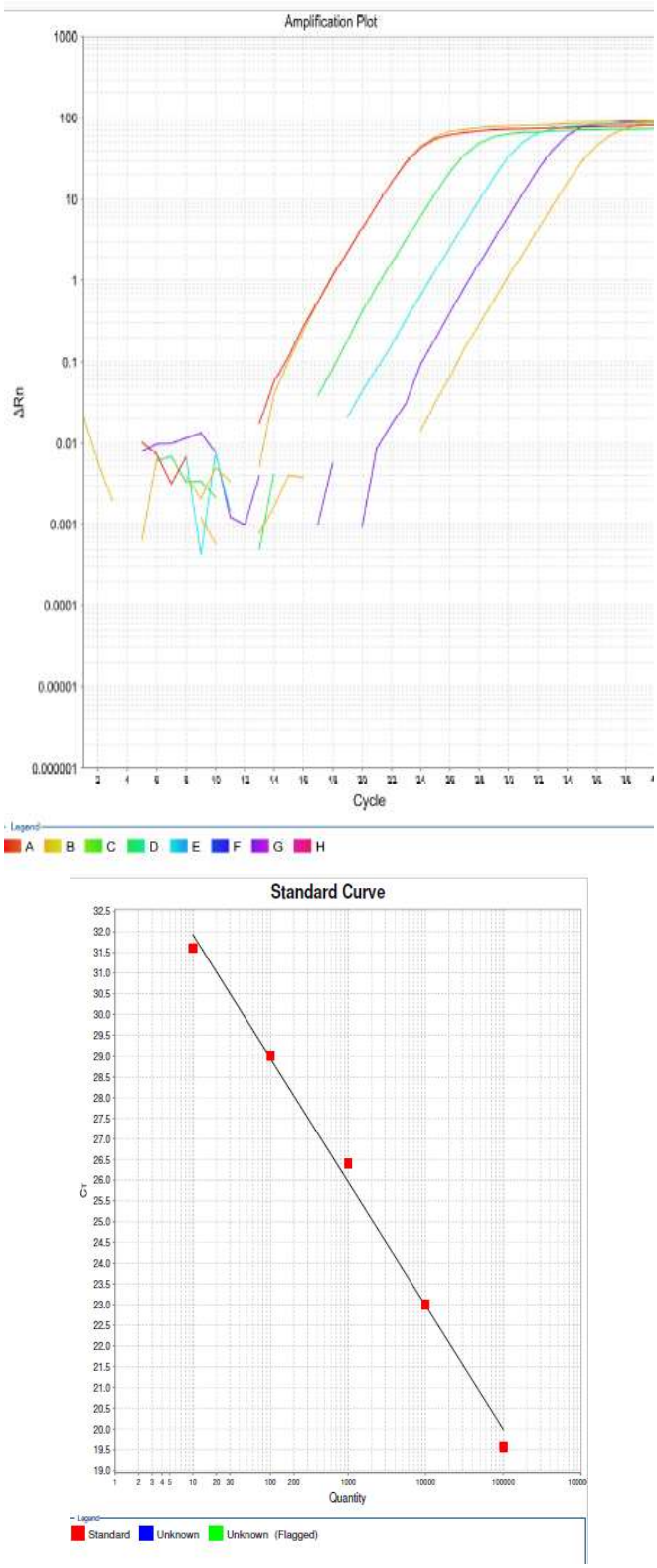


Figura 3: Padronização da curva-padrão com as amostras de DNA de cepas de referência procedentes da Coleção de Leishmanias do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC FIOCRUZ) nas concentrações decrescentes de 10^5 10^4 10^3 10^2 10^1 parasitas/mL. Fonte: Arquivo do CLR Bauru-II.

Apêndice 4

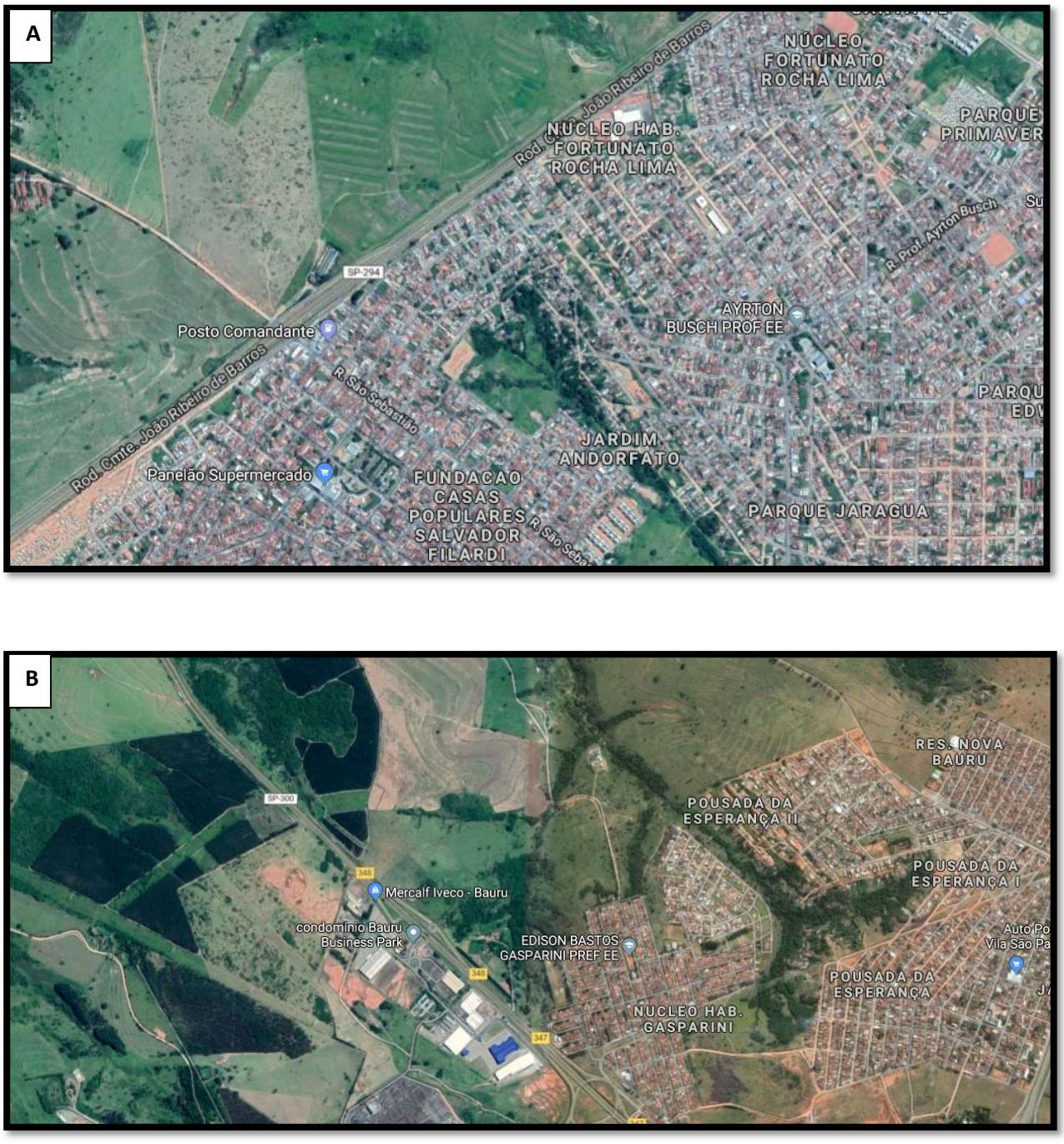


Figura 4: Localização por satélite de duas áreas com alta densidade de casos de leishmaniose visceral humana e canina, no município de Bauru, São Paulo, Brasil, entre 2014 a 2016 (A e B). Fonte: Google Maps.

Anexos

Anexo 1

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Epidemiologia molecular de Leishmania em amostras provenientes de cães e humanos e suas implicações em Saúde Pública na região de Bauru, São Paulo (versão 2)

Pesquisador: Virginia Bodelão Richini Pereira
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 43559515.0.0000.0059
Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz
Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.131.447
Data da Relatoria: 18/06/2015

Apresentação do Projeto:
Idem ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 24/04/2015.

Objetivo da Pesquisa:
Idem ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 24/04/2015.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Idem ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 24/04/2015.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Análise ética com base no parecer consubstanciado do CEPIAL de 24/04/2015 e resposta à pendência.

Em Carta ao CEPIAL de 30/04/2015, a pesquisadora responsável esclarece os pontos a seguir.
1. Metodologia, em relação às amostras humanas.
2. Participação do Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru, instituição que fornecerá o resultado de positividade dos 50 blocos de parafina de material de biópsia de leishmaniose.
3. Armazenamento do material biológico humano.
Os blocos de parafina estão armazenados no Instituto Lauro de Souza Lima e constam no fluxo

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3085-2869 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Anexo 2

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-IAL

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

CEUA-IAL

ANEXO E

São Paulo, 17 de fevereiro de 2014.

Parecer Projeto 10/2013 – CEUA-IAL

Venho pela presente informar que o projeto de pesquisa intitulado **"Epidemiologia molecular de Leishmania em amostras provenientes de humanos e animais e suas implicações em saúde pública na região de Bauru, São Paulo"**, sob coordenação da Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira, Pesquisadora Científica do Núcleo de Ciências Biomédicas do Centro de Laboratórios Regionais de Baurú do Instituto Adolfo Lutz - Central, foi considerado **APROVADO**, e poderá ser realizado conforme procedimentos delineados apresentados a esta Comissão.

O presente projeto utilizará no total 1.000 amostras de CÃES dos sexos masculino ou feminino.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios **ANUAIS** à CEUA-IAL, no intuito de acompanharmos os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e sanitários e permitindo também a elaboração de relatórios anuais que são realizados por esta CEUA-IAL e que são encaminhados ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme a Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Atenciosamente,

Raquel dos Anjos Fazioli
Coordenadora da CEUA-IAL

RAF/raf

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, n° 355
11° Andar – Salas 1102 – Cerqueira César
São Paulo – SP – CEP: 01246-902
Tel: (11) 3068-2887 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br

Anexo 3

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CONSELHO TÉCNICO CIENTÍFICO – CTC / IAL

São Paulo, 22 de maio de 2015.

Projeto: **CTC 64 G/ 2014**

"Epidemiologia molecular de Leishmaniose em amostras provenientes de humanos e animais e suas implicações em saúde pública na região de Bauru, São Paulo."

Coordenação: **Virginia Bodelão Richini Pereira**

Prezado(s) Coordenador(es),

Comunicamos que o projeto foi **aprovado quanto ao Mérito Científico** pelo Conselho Técnico Científico do IAL com **Ciência da Direção Geral** e cadastro final **Nº CTC-IAL 64 G/2014.**

Atenciosamente,

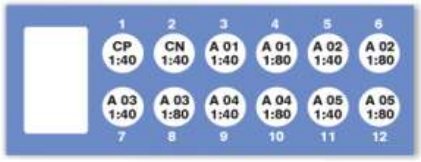
MARIA DO CARMO SAMPAIO TAVARES TIMENETSKY
PRESIDENTE DO CTC/IAL

1ª Via: Coordenador
2ª Via: Diretor de Centro
3a Via: CTC

Anexo 4

Procedimento para realização da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) - IFI Leishmaniose Humana (Bio-manguinhos, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante:

- Realizar o protocolo para determinar o número de lâminas a serem preparadas, considerando o número de amostras e suas diluições (1:40 e 1:80).



- Os controles positivos e negativos devem estar presentes em todas as reações e as amostras teste devem ser submetidas ao ensaio de fluorescência pelo menos nas diluições 1:40 e 1:80.
- Pingar 10µl do antígeno em cada orifício da lâmina, tendo o cuidado de mantê-lo homogeneizado durante o preparo. Deixar secar a lâmina por 24h em temperatura ambiente ou por duas horas a 37ºC para uma boa fixação.
- Preparar o tampão fosfato pH 7,2 (PBS), conforme as quantidades determinadas abaixo:

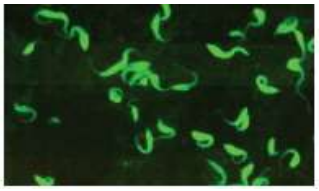
Sais	Quant.
Cloreto de Sódio (NaCl) PA 0,15M	8,77 g
Fosfato de Sódio Dibásico Anidro (Na_2HPO_4) PA 0,0072M	1,02 g
Fosfato de Sódio Monobásico Anidro (NaH_2PO_4) PA 0,0028M	0,34 g
Água destilada q.s.p. (quantidade suficiente para)	1000 mL

- Diluir as amostras (1:40 e 1:80) e os controles (1:40) em PBS. Para diluição das amostras, adicionar no 1º tubo 10µl da amostra (soro) e 390µl de PBS para obter a diluição 1:40 e no 2º tubo adicionar 100µl da diluição anterior e 100µl de PBS para obter a diluição 1:80. Para diluição dos controles adicionar 10µl do controle (negativo ou positivo) e 390µl de PBS.
- Adicionar 10µl das diluições nos respectivos poços da lâmina sensibilizada.
- Incubar as lâminas em câmera úmida por 30 minutos a 37ºC.
- Lavar as lâminas três vezes em PBS, nas cubas de lavagem por 5 minutos cada banho.

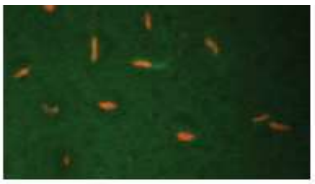
- Por último, lavar rapidamente com água destilada.
- Colocar as lâminas para secar por, aproximadamente, 10 minutos a 37ºC.
- Preparar a solução PBS-Azul de Evans (AE) momentos antes do uso, conforme as especificações abaixo:

nº lâminas	Vol. PBS	Vol. Azul de Evans (0,1%)
2	480 µL	20 µL
4	960 µL	40 µL
6	1440 µL	60 µL

- Adicionar 15µl da diluição do conjugado, realizado anteriormente, e incubar por 30 minutos a 37ºC.
- Lavar as lâminas três vezes em PBS, nas cubas de lavagem por 5 minutos cada banho.
- Por último, lavar rapidamente com água destilada.
- Colocar as lâminas para secar por, aproximadamente, 10 minutos a 37ºC.
- Adicionar 3 a 4 gotas de glicerina tamponada sobre as lâminas, cobrindo-as com a lamínula. Mantê-las ao abrigo da luz e umidade, até o momento da leitura.
- Realizar a leitura no microscópio de fluorescência e objetiva de 40x. Focalizar primeiramente nos controles e proceder a leitura das amostras.



Amostra Reagente - As amostras que, a partir da diluição 1:40, apresentarem fluorescência na membrana do parasito.



Amostra Não Reagente - As amostras que não apresentarem fluorescência.

Anexo 5

Procedimento para realização do teste imunocromatográfico – IT-LEISH® (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, França), de acordo com as instruções do fabricante:

- Abra a embalagem de alumínio e retire todo o material.
- Pegue o dispositivo, coloque-o horizontalmente numa superfície plana, escreva o nome ou o número do doente no rótulo.
- Abra a ampola de tampão, adicione 1 gota de tampão ao primeiro poço (poço de conjugado) e 4 gotas ao segundo poço (poço de lavagem). Deixe assentar por 1 minuto.
- Pegue na pipeta, aperte-a e coloque a extremidade aberta na gota de sangue, soro ou plasma.
- Adicione ao primeiro poço todo conteúdo da amostra (8-12µl), apertando suavemente a pipeta.
- Mexa suavemente com a extremidade superior da pipeta e deixe assentar por 1 minuto. Elimine a pipeta num recipiente adequado para resíduos.
- Desmonte do dispositivo IT: segure no dispositivo com os poços entre o polegar e o indicador, e com a outra mão, destaque o suporte da tira reativa (com o rótulo). Volte a colocar os poços numa superfície plana, introduza as pernas do suporte da tira reativa nos orifícios ao lado do poço do conjugado de modo que a extremidade da tira reativa alcance o fundo do poço do conjugado. Deixe assentar por 10 minutos (quando utilizar soro ou plasma, deixe assentar por 5 a 10 minutos). A mistura de sangue/conjugado ou soro ou plasma/conjugado deve então estar completamente absorvida.
- Transfira a tira reativa para o segundo poço (poço de lavagem) e deixe assentar por 10 minutos (quando utilizar soro ou plasma, deixe assentar por 5 minutos). O campo de reação deve estar completamente isento de sangue/soro/plasma. A faixa de controle deve estar claramente visível.
- Retire a tira reativa do poço de lavagem e volte a encaixá-la na peça de plástico transparente. Feche os poços com a tampa, liberte-os por fartura e quebre as duas pernas de plástico transparente. Descarte num recipiente adequado para resíduos.

- Leia a reação e interprete os resultados como abaixo:



Reação negativa – indica ausência de anticorpos específicos detectáveis.



Reação positiva – indica presença de anticorpos contra *Leishmania* spp..

- Resultados válidos – a faixa de controle (C) deve ser claramente visível e o campo de reação deve estar isento de sangue/plasma/soro.
- Resultados inválidos – a tira reativa não estiver suficientemente limpa e a faixa do controle (C) não estiver presente, mesmo que exista uma faixa reativa (L) presente.

Anexo 6

Procedimento para realização do teste imunocromatográfico – TR-DPP® (Bio-Manguinhos, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante:

- Certifique que a amostra a ser testada esteja à temperatura ambiente. Caso esteja refrigerada ou congelada, permitir que a mesma alcance a temperatura ambiente antes de ser testada.
- Retirar o número necessário de componentes do TR-DPP®, colocá-lo na superfície plana e certifique-se que os componentes estejam à temperatura ambiente, no momento do uso.
- Retirar o suporte de teste do envelope laminado e identificá-lo com o nome do animal ou número de identificação, além do número do lote do kit de onde o suporte foi retirado.
- Verificar a integridade dos componentes e a existência de duas linhas na janela (1 cor azul e 1 cor verde).
- Pipetar 5µl com auxílio das micropipetas automáticas no poço #1 (amostra+ tampão).
- Virar o frasco de tampão e manter na vertical sobre o poço #1 (amostra+ tampão) e adicionar 2 gotas do tampão lentamente.
- Aguardar 5 minutos. Após esse tempo, as linhas da janela desapareceram. Caso ao contrário, descartar o suporte.
- Virar o frasco de tampão e manter na vertical sobre o poço #2 (tampão) e adicionar 4 gotas do tampão lentamente.
- Deixar o teste correr por 10 minutos em temperatura ambiente. Caso não haja migração após 3 minutos, descartar o teste.
- Leitura do teste, não ler os resultados após 25 minutos da adição do tampão.
- Interpretação: **Amostra Não Reagente** – ausência de anticorpos para *Leishmania* na amostra e não exclui a possibilidade de infecção por *Leishmania.* **Amostra Reagente** – presença de anticorpos detectáveis para *Leishmania.* **Resultados inválidos** – ausência de ambas as linhas (Teste - T e Controle - C) e a presença somente da linha teste T.

Anexo 7

Procedimento para realização do teste imunoenzimático – EIE - Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante:

- Os componentes do kit armazenados na temperatura 2ºC a 8ºC, assim como os componentes armazenados na temperatura -20ºC, soros controles, strips sensibilizados, devem ser retirados de sua temperatura de conservação antes do início do teste e utilizados, retornando-os à temperatura logo após o uso.
- O conjugado deve ser retirado de sua temperatura de conservação apenas no momento da sua utilização, sem a necessidade de descongelamento retornando para conservação imediatamente, após o uso.
- Preparo do diluente de amostras/conjugado:

nº Strips	nº reações	Diluente de amostras/conjugado 5x	Lecitina de leite (pesar)	Água destilada
01	Até 16	3ml	0,3g	12ml
02	Até 32	6ml	0,6g	24ml

- Diluir em tubos 5µl dos controles e das amostras de soros ou plasmas de cães a serem analisadas, previamente homogeneizadas, em 500µl do diluente de amostra/conjugado (1:100).
- Distribuir na placa sensibilizada, 100µl dos controles e amostras já diluídos, da seguinte forma:

CP
CP
CN
CN
CN
SS

SS
Amostra

CP= controle positivo; CN = controle negativo; SS=sem soro

- Tampar as placas e incubar a 37ºC ±1ºC por 30 minutos.
- Preparar o tampão de lavagem:

  Obs: este tampão é sujeito a cristalização, caso isso ocorra, coloque em banho-maria a 37ºC até a dissolução dos cristais.
- Volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

nº Strips duplas	nº placas	Tampão de Lavagem (20x)	Água destilada
Até 03	1/2	20ml	380ml
Até 06	1	25ml	475ml

- Destampar cuidadosamente a placa, aspirar o conteúdo e lavar 6 vezes com tampão de lavagem. Aguardar 30 a 60 segundos entre cada lavagem.
- Diluir o conjugado no diluente de amostra/conjugado, preparando anteriormente.
- Preparo do conjugado:

nº Strips	nº reações	Diluente de amostras/conjugado diluído	Conjugado
01	Até 16	5ml	5µl
02	Até 32	5ml	5µl

- Homogeneizar bem e distribuir 100µl da diluição do conjugado em cada orifício dos strips.
- Tampar as placas e incubar a 37ºC ±1ºC por 30 minutos. Aspirar e lavar conforme descrito anteriormente.
- Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro (ao abrigo da luz).

- Preparo do substrato:

nº Strips duplas	nº reações	Diluente substrato	Cromógeno (TMB)	Substrato H2O2
01	Até 16	2,5ml	25µl	5ml
02	Até 32	4ml	40µl	8ml

- Distribuir 100µl do substrato rapidamente em todos os orifícios.
- Deixar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos.
- Bloquear a reação adicionando 50µl de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. Em seguida, proceder a leitura das microplacas.
- Ligar o espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro 450nm para leitura e sem a utilização de filtro de referência (620-630nm).
- Para o cálculo do *cut-off* (CO) deve-se calcular a média das densidades óticas (DO) dos controles negativos dentro da faixa cinza de validação do teste. Caso seja encontrada alguma densidade ótica for da faixa de validação do teste, esta deverá ser descartada e a média deverá ser realizadas utilizando-se das demais densidades óticas.
- Validação do teste:

  Controle Positivo ≥0,500 de DO

  Controle Negativo ≥0,050≤0,120 de DO

- Cálculo

  CO= média dos controles negativos X 2

  Faixa cinza= CO x 1,2

Amostras Não Reagentes	**Faixa Cinza**	**Amostras Reagentes**

Anexo 8

Protocolo de extração de DNA para pesquisa de *Leishmania* spp. em amostras de soro ou sangue total utilizando o kit de extração Kit Illustra blood genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare, Pittsburgh, EUA),

- Ligar fluxo por 30 minutos na luz ultra-violeta e colocar os materiais a serem utilizados.
- Em microtubos identificados de 1,5 ml acrescentar 20µl de proteinase K (20mg/mL) e 200µL soro ou sangue total.
- Homogeneizar em agitador (*vortex*) por 10 segundos.
- Acrescentar 400µL de tampão de lise (*lysis buffer*).
- Incubar por 10 minutos, em temperatura ambiente, no agitador (*vortex*);
- Centrifugar a 11.000 G por 30 segundos a 1 minuto, para decantação de detritos.
- Colocar coluna no tubo coletor, identificar e aplicar toda a amostra na coluna GFX.
- Centrifugar a 11.000 G por 1 minuto e desprezar o sobrenadante do tubo coletor.
- Aquecer a 70°C o tampão de eluição (*elution buffer*).
- Acrescentar 500µL de tampão de lise (*lysis buffer*) na coluna GFX, centrifugar 11000 G por 1 minuto e desprezar o sobrenadante do tubo coletor.
- Acrescentar 500µL de tampão de lavagem (*wash buffer*) na coluna GFX, centrifugar 11000 G por 3 minuto e desprezar o tubo coletor.
- Colocar a coluna GFX em um microtubo de 1,5mL (*DNAse-free*) identificado;
- Adicionar 200µl do tampão de eluição (*elution buffer*) diretamente na matriz da coluna GFX.
- Incubar por 1 minuto, em temperatura ambiente.
- Centrifugar a 11.000 G por 1 minuto.
- Obtém-se a amostra de DNA a qual foi armazenada à -20 °C em freezer.

Anexo 9

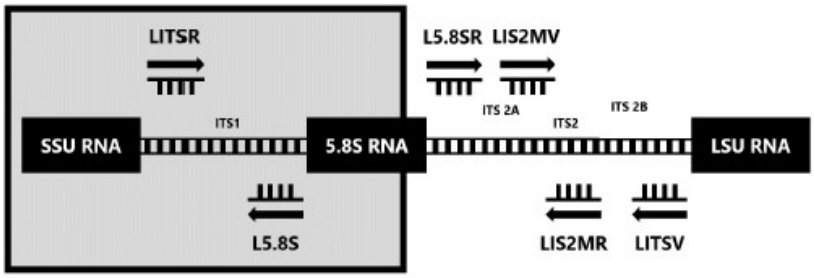
Quantificação de DNA das amostras extraídas utilizando o quantificador Biotech Epoch®, EUA.

- Calibrar o aparelho utilizando 2µL de água ultrapura nas cavidades de leitura indicadas no aparelho.
- Após a calibração acrescentar 2µL de cada amostra de DNA para leitura de quantificação.

Ácidos nucleicos absorvem luz à 260nm (comprimento de onda eletromagnética), enquanto proteínas absorvem luz à 280nm. A estimativa de pureza de DNA na amostra é verificada pela relação de absorbância 260/280. Valores dessa relação entre 1,8 a 2,0 são considerados ótimos para DNA. Valores abaixo de 1,8 podem indicar excesso de proteínas.

Anexo 10

Amplificação da região ITS-1 do DNA ribossomal com a utilização dos primers LITSR e L5.8S.



Anexo 10: Representação do espaço de transcrição interno (ITS) da região ribossomal. A demarcação no esquema, representa a região ITS-1. Fonte: El Tai et al., 2000[3]

[3] El Tai, N.O.; Osman, O.F.; El Fari, M.; Presber, W.; Schönian, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed space in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Transaction Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene, v.94, p. 575-579, 2000.