

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Epidemiologia, geoprocessamento e caracterização de espécies de  
*Leishmania* em amostras de medula de Leishmaniose visceral canina, no  
município de Campo Grande-MS**

**LAÍSA VIEIRA GNUTZMANN**

**Dourados - MS  
2018**

LAÍSA VIEIRA GNUTZMANN

**Epidemiologia, geoprocessamento e caracterização de espécies de *Leishmania* em amostras de medula de Leishmaniose visceral canina, no município de Campo Grande-MS**

Área do CNPq: Ciências da Saúde

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Doenças Crônicas e Infecto-Parasitárias

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Herintha Coeto Neitzke-Abreu

Co-orientador: Prof. Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Junior

Dourados - MS  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

G571e Gnutzmann, Laisa Vieira

Epidemiologia, geoprocessamento e caracterização de espécies de Leishmania em amostras de medula de Leishmaniose visceral canina, no município de Campo Grande-MS [recurso eletrônico] / Laisa Vieira Gnutzmann. -- 2019.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Herintha Coeto Neitzke-Abreu

Coorientador: Manoel Sebastião da Costa Lima Junior.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2018.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Geoprocessamento. 2. Epidemiologia. 3. Leishmania. 4. PCR. I. Neitzke-abreu, Herintha Coeto. II. Lima Junior, Manoel Sebastião Da Costa. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR LAÍSA VIEIRA GNUTZMANN, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "DOENÇAS CRÔNICAS E INFECTO-PARASITÁRIAS", REALIZADA NO DIA 12 DE SETEMBRO DE 2018.

Ao décimo segundo dia do mês de setembro do ano de dois mil e dezoito (12/09/2018), às 09h30, em sessão pública, realizou-se, na sala 103/5 do Bloco C, da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "Epidemiologia, geoprocessamento e caracterização de espécies de Leishmania em amostras de medula de Leishmaniose visceral canina, no município de Campo Grande- MS " apresentada pela mestranda LAÍSA VIEIRA GNUTZMANN, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores **Dra. Herintha Coeto Neitzke Abreu** (Presidente/orientador), **Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira** (membro titular/programa) e **Dr. Sebastião Martins de Souza Neto** (membro interno). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após o candidato ter apresentado a sua Dissertação, no tempo previsto de 30 até 40 minutos, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do candidato, no tempo previsto de até 240 minutos. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido o candidato considerado **APROVADO**, fazendo jus ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 12 de setembro de 2018.

Dra. Herintha Coeto Neitzke Abreu

Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira

Dr. Sebastião Martins de Souza Neto

ATA HOMOLOGADA EM: \_\_/\_\_/\_\_, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

Profa. Kely de Picoli Souza  
Pró-Reitora de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus, por sempre iluminar meu caminho, me abençoando e me dando forças em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Mateus e Nadir, por serem os melhores que alguém poderia ter. Por todos os ensinamentos e carinho que sempre tiveram e por sempre acreditarem em mim. São minha base e meu espelho de vida.

Ao meu noivo, Thiago, por todo apoio, paciência, amor e compreensão, principalmente nesta reta final do mestrado, e por estar sempre ao meu lado, nos momentos alegres e também nos difíceis me incentivando para seguir em frente e alcançar meus objetivos.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e às novas amigas que criei durante esse período do mestrado, que sem vocês seria tudo mais difícil. Por tantos momentos divididos, tanto de angústias como de vitórias, e que se tornaram verdadeiros amigos que levo para vida como um grande presente.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Herintha, por todo ensinamento e por sempre acreditar em meu potencial. Realmente sempre cumpriu com a palavra “orientadora”, me orientando em todos os momentos em que necessitei, muitas vezes até em períodos de férias em que lá eu estava mandando mensagens. Sem seu apoio e dedicação não seria possível a realização deste trabalho. Obrigada por tudo e por sua amizade.

Ao meu co-orientador Prof. Manoel, que mesmo de longe sempre esteve presente da forma que pôde para auxiliar nas dúvidas e enriquecer nosso trabalho com seu grande conhecimento. Obrigada pela disposição em sempre ajudar e contribuir com o trabalho.

Aos professores, estagiários, colegas e funcionários do LPCS que de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho.

Enfim, a todos aqueles que de uma maneira ou de outra contribuíram para que este percurso pudesse ser concluído. Obrigada!

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2 – A) Formas amastigotas dentro do macrófago; B) Promastigotas de <i>Leishmania</i> spp	14
Figura 2 – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	16

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
ELISA	Ensaio imunoenzimático
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPCS	Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD	Pesquisa direta
PVCLV	Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
RFLP	Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
RIFI	Reação de Imunofluorescência indireta
SDS	Dodecil sulfato de sódio
UFGD	Universidade Federal da Grande Dourados

## **Epidemiologia, geoprocessamento e caracterização de espécies de *Leishmania* em amostras de medula de Leishmaniose visceral canina, no município de Campo Grande-MS**

### **RESUMO**

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que são transmitidos pela picada da fêmea de flebotomíneos. O cão é o hospedeiro mais importante na região urbana e antecede as infecções humanas, sendo a leishmaniose visceral canina (LVC) uma importante doença devido ao grande número de cães infectados e ao intenso parasitismo que ocorre nesses animais. O objetivo do trabalho foi analisar a distribuição espacial e caracterizar o perfil epidemiológico da LVC em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Foi estabelecida a distribuição dos casos considerando as macrorregiões e bairros com o programa QGIS 2.18 e foi realizado diagnóstico parasitológico e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em cães com sorologia positiva para LVC. Foram analisados 412 cães fornecidos pelo Centro de Controle de Zoonoses, juntamente com uma ficha individual com dados epidemiológicos. O diagnóstico parasitológico foi realizado em 352 amostras de medula das quais foram submetidas à extração do DNA e à PCR com os *primers* FLC2/RLC2 que amplificam para *L. infantum*. A maioria dos cães tinha mais de um ano de idade (79%), eram do sexo feminino (57%), sem raça definida (76%) e de pequeno porte (47%). Os casos foram mais concentrados nas regiões Anhanduizinho e Lagoa. O diagnóstico parasitológico foi positivo em 241 (68,47%) amostras, enquanto a PCR identificou *L. infantum* em 293(83,24%) amostras. Torna-se evidente a necessidade de medidas de controle, principalmente em regiões com elevado número de casos de LVC, como controle vetorial, uso de coleiras e tratamento de cães doentes combinado à eutanásia.

**Palavras-chave:** Geoprocessamento. Epidemiologia. *Leishmania*. PCR.



## **Epidemiology, geoprocessing and characterization of *Leishmania* species in samples of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Campo Grande-MS**

### ***ABSTRACT***

Leishmaniasis are diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which are transmitted by the female bite of sandflies. The dog is the most important host for the transmission of the disease to humans, and canine visceral leishmaniasis (CVL) is a disease of great importance due to the large number of infected dogs and the intense parasitism in these animals. The objective of the study was to analyze the spatial distribution and characterize the epidemiological profile of LVC in Campo Grande, Mato Grosso do Sul. The distribution of the cases was established considering the macro regions and neighborhoods with the program QGIS 2.18 and a parasitological diagnosis and Polymerase Chain Reaction (PCR) in dogs with LVC positive serology. A total of 412 dogs provided by the Zoonoses Control Center were analyzed along with an individual file with epidemiological data. The parasitological diagnosis was performed on 352 marrow samples from which DNA extraction and PCR were performed with FLC2 / RLC2 primers amplifying for *L. infantum*. Most dogs were over one year old (79%), female (57%), non-breed (76%) and small (47%). The cases were more concentrated in the Anhanduizinho and Lagoa regions. The parasitological diagnosis was positive in 241 (68.47%) samples, whereas the PCR identified *L. infantum* in 293 (83.24%) samples. It is evident the need for control measures, especially in regions with a high number of LVC cases, such as vector control, use of collars and treatment of diseased dogs combined with euthanasia.

**Keywords:** Geoprocessing. Epidemiology. *Leishmania*. PCR.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Histórico	11
2.2 Distribuição das leishmanioses	12
2.3 Agente etiológico	13
2.4 Reservatórios	14
2.5 Vetores	15
2.6 Ciclo biológico	16
2.7 Aspectos clínicos da LVC	17
2.8 Diagnóstico da LVC	17
3 OBJETIVOS	19
4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
5 APÊNDICES	28
5.1 Artigo 1: Epidemiology and georeferencing of visceral canine leishmaniasis in Campo Grande, Mato Grosso do Sul	29
6 CONCLUSÕES	44
7 ANEXOS	45
7.1 Parecer de Aprovação do Comitê de Ética (CEUA)	46

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por parasitas protozoários com mais de 20 espécies de *Leishmania*. Existem três formas principais de leishmaniose: cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral ou calazar (LV) (WHO, 2017). Considerada primariamente como uma doença de caráter eminentemente rural, a LV se expandiu para áreas urbanas e se tornou um crescente problema de saúde pública.

Sabe-se que em áreas urbanas, o cão é o principal hospedeiro para a transmissão da doença ao homem (FEITOSA et al., 2000), sendo assim a leishmaniose visceral canina (LVC) é uma importante doença devido ao grande número de cães infectados e ao intenso parasitismo que ocorre nesses animais (SCHIMMING; SILVA, 2012). Além disso, tem alta incidência, letalidade e implicações econômico-sociais que ocorrem pela depleção da força de trabalho e gastos provenientes de seu tratamento (BORASCHI, 2007). A identificação de áreas específicas que apresentam o maior número de casos de LVC, que pode ser avaliada através de geoprocessamento, é fundamental para a tomada de medidas de controle da doença.

O diagnóstico da LVC pode ser realizado através de métodos clínicos, epidemiológicos, parasitológicos, imunológicos e moleculares. Em áreas endêmicas o diagnóstico clínico e epidemiológico é dificultado pela similaridade clínica com outras doenças (BRASIL, 2007). Além disso, a presença de diferentes espécies de *Leishmania* requer a correta identificação da espécie para melhor conhecimento da epidemiologia das leishmanioses. Assim, a utilização de exames laboratoriais é de suma importância para confirmação do diagnóstico, sendo necessário o uso de métodos de pesquisa mais sensíveis que possibilitem a detecção e a identificação das espécies de *Leishmania*, como a PCR (reação em cadeia da polimerase) (REITHINGER; DUJARDIN, 2007).

Apesar das informações obtidas em décadas de estudos dedicados às leishmanioses, ainda há muito para esclarecer sobre a epidemiologia, principalmente no que tange à identificação das espécies em determinadas localidades e de quais são os locais com maior concentração de casos de LVC. Assim, no presente estudo foi realizado o georreferenciamento utilizando os dados de número de cães positivos para LVC por regiões e por bairros, e a caracterização epidemiológica pela PCR para identificação de *Leishmania infantum* em amostras de sangue medular de cães com LVC de Campo Grande-MS. Esse estudo contribuirá no conhecimento da epidemiologia das leishmanioses no Mato Grosso do Sul, visto que essas informações são fundamentais para o planejamento das medidas de controle.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

As primeiras descrições feitas do parasito *Leishmania* ocorreram em 1898, quando Borovsky identificou em um paciente com a forma cutânea da doença (MEDEIROS, 2013). Em 1869, na Índia, a infecção recebeu o nome “kala-jwar” que quer dizer febre negra ou “kala-azar” que significa pele negra em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele ocorrido durante a doença (MARZOCHI et al., 1981). Em 1900, William Leishman identificou um protozoário no baço extraído de um soldado indiano que havia tido uma febre local conhecida como febre “Dum-Dum” ou “Kala-azar”, porém suas anotações não foram publicadas até 1903 quando Charles Donovan encontrou o mesmo parasito em outro paciente. No mesmo ano, Major Ross nomeou este parasito de *Leishmania donovani* criando o gênero *Leishmania* (PRATA; SILVA, 2005).

O primeiro relato do parasito no continente americano data de 1931, onde Migone descreve um caso no Paraguai de paciente proveniente do Estado de Mato Grosso (MT) (MEDEIROS, 2013), em que o paciente faleceu após não responder ao tratamento para malária. Em necropsia, foram observadas formas amastigotas no sangue, cujos sintomas eram altamente sugestivos de LV (MICHALICK; GENARO, 2005; MAIA-ELKHOURY et al., 2008; LAINSON, 2010)

No Brasil, o primeiro relato de LV ocorreu em 1934 por Penna que encontrou formas amastigotas de *Leishmania* em cortes histológicos de fígado de pessoas que morreram com suspeita de febre amarela. Em 1936, Evandro Chagas descreveu o primeiro caso *in vivo* de LV no Brasil e em 1937, Cunha e Chagas estabeleceram o seu agente etiológico, denominando-o de *Leishmania donovani chagasi* (MEDEIROS, 2013).

Em 1908, Charles Nicolle descreve a participação dos cães como reservatórios da leishmaniose através de estudos experimentais, e em 1920 e 1922, Cerqueira e Aragão, respectivamente, comprovam a participação de insetos na transmissão da doença (MEDEIROS, 2013).

Até o início da década de 1950, apenas 379 casos de LV foram notificados no Brasil, distribuídos em 13 estados, e acreditava-se que a transmissão da LV fosse exclusivamente rural (MAIA-ELKHOURY et al., 2008). De 1953 a 1965, a doença foi estudada em diversas regiões do país, demonstrando seu caráter endêmico e, posteriormente, iniciaram-se as primeiras campanhas governamentais para controle de LV no Brasil (MICHALICK; GENARO, 2005). No Estado de Mato Grosso do Sul (MS) os primeiros relatos da doença foram a partir de 1980 em Corumbá e Ladário (REGO-JR, 1983). Na capital, Campo Grande, o primeiro caso

autóctone canino foi registrado em 1998, e os primeiros casos humanos em 2002 (FURLAN, 2010).

## **2.2 Distribuição das leishmanioses**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 97 países e territórios são endêmicos para as leishmanioses (WHO, 2017). Nas Américas, os casos humanos de LV estão presentes em 12 países, no entanto 96% dos casos são relatados no Brasil. Em nível regional, a LV está classificada em três cenários epidemiológicos: países com transmissão em expansão (Argentina, Brasil e Paraguai), países com transmissão estável ou controlada (Colômbia e Venezuela) e países com transmissão esporádica (Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Bolívia, Guiana e México) (OPAS/OMS, 2017).

Em 2015, foi reportado nas Américas um total de 3.456 casos de LV e taxa de incidência de 2,27 casos por 100.000 habitantes. Os casos ocorreram em oito países, distribuídos em 56 departamentos/estados e 928 municípios (1 a 113 casos). Dos casos reportados, 95,1% seguem ocorrendo no Brasil (OPAS/OMS, 2017).

No Brasil, a LV apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciada, em função da sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (BRASIL, 2006).

Os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a periurbanização e a urbanização da LV, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e mais recentemente as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (BRASIL, 2006).

No Estado de Mato Grosso do Sul, de 2000 a 2015 foram confirmados 3.394 casos da doença. Em 2015, 127 casos novos de LV foram confirmados, em 21 municípios do Estado e a maior frequência encontrada foi em Campo Grande (77 (60,6%) casos), seguida por Três Lagoas (9 (7,1%) casos) e Corumbá (8 (6,3%) casos) (MATO GROSSO DO SUL, 2015).

Campo Grande apresenta uma situação peculiar pois, dos 1.521 casos registrados no Estado, de 2010 a julho de 2017, 109 casos foram a óbito, sendo que 47 (43,12%) deles ocorreram na capital. Além disso, dos 63 novos casos de LV no estado de janeiro a julho de 2017, 31 (49,2%) também ocorreram na capital (MATO GROSSO DO SUL, 2017). Atualmente, a LV é um importante problema de saúde pública em Campo Grande, com a notificação crescente de casos e óbitos (BOTELHO; NATAL, 2009).

Estudos em epidemiologia moderna e de planejamento, monitoramento e vigilância têm utilizado os sistemas de informação geográfica (SIG) para melhorar o entendimento de dados através da análise e visualização. Através do georreferenciamento dos dados é possível correlacionar dados de fatores ambientais, levantamento entomológico local e casos humanos e caninos com a disponibilidade de reservatórios e assim demonstrar áreas prioritárias e estabelecer ações de prevenção e controle da doença específicas para região em questão (BARCELLOS et al, 2008; CAMARGO-NEVES et al, 2001; SANTOS et al, 2013).

Muitos autores incluíram em seus trabalhos essas ferramentas que permitem a análise espacial da distribuição da LV, seja canina ou humana. Borges et al., 2014 realizaram a análise e representação espacial dos casos de LVC em Juatuba (MG), onde foram marcadas as coordenadas geográficas, obtendo-se a localização de cada imóvel participante, permitindo um resultado que auxilia na visualização de áreas com maior risco de transmissão.

Maia et al., 2014 realizaram a marcação e o armazenamento dos casos de LV em humanos e caninos em Petrolina (PE) utilizando-se as coordenadas planas obtidas através do georreferenciamento por meio do Sistema de Posicionamento Global (GPS), e os resultados permitiram concluir que a doença se encontra em fase de urbanização, sendo ainda bastante associada a áreas de transição entre o rural e o urbano.

O geoprocessamento pode auxiliar no planejamento de ações de controle de doenças adaptado para cada realidade sendo acessível ao poder público, para isso, é necessário a implantação do geoprocessamento na Administração Pública e capacitação de profissionais (ROCHA, 2018).

### **2.3 Agente etiológico**

*Leishmania* é um protozoário pertencente ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ASHFORD, 2000; LAINSON, 1987). Os protozoários da ordem Kinetoplastida possuem seu DNA localizado em duas estruturas: no núcleo (DNA cromossômico) e na mitocôndria ou cinetoplasto (kDNA). O kDNA é constituído em maxicírculos, 15% do DNA de toda a célula, presentes em 20 a 50 cópias por célula, e minicírculos, 35% do total de todo o DNA da célula, com 10.000 cópias por célula que se replicam independentemente (SHAPIRO; ENGLUND, 1995; SIMPSON; MOREL; SIMPSON, 1981)

É um parasito intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear e se apresentam de duas formas evolutivas distintas, promastigotas e amastigotas. As formas

promastigotas são flageladas dotadas de mobilidade presentes no intestino dos flebotomíneos vetores, já as formas intracelulares amastigotas não são flageladas, e estão presentes nas células dos hospedeiros mamíferos (UENO; WILSON, 2012). Morfologicamente, quando observados em sua forma amastigota, estes microorganismos são redondos a ovais, com 2 a 4µm de tamanho, contendo núcleo esférico e basofílico, e pequeno cinetoplasto em forma de bastonete (GONTIJO et al., 2011) (Figura 1).

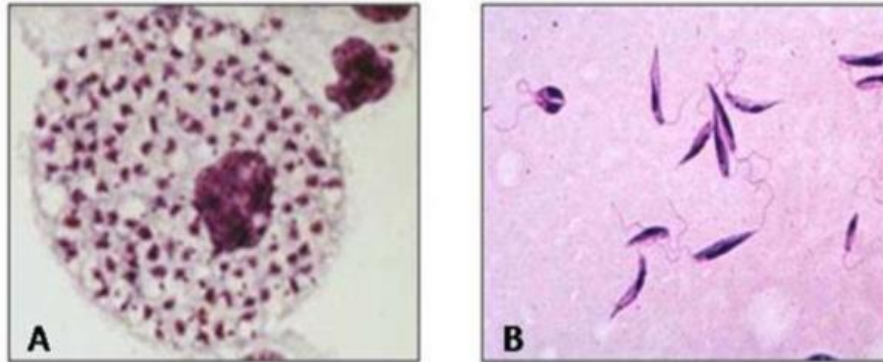


Figura 1: A) Formas amastigotas dentro do macrófago; B) Promastigotas de *Leishmania* spp.

O gênero *Leishmania* está dividido em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. A LV é causada por protozoários do subgênero *Leishmania*, que incluem *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* no Velho Mundo e *L. (L.) chagasi* no Novo Mundo. Embora haja diferenças no nome e origem geográfica, estudos moleculares sugerem que a *L. (L.) infantum* e a *L. (L.) chagasi* sejam a mesma espécie (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). No Brasil, o principal agente etiológico da LV é a *L. (L.) chagasi* (MONTEIRO et al., 2005), porém existem outras espécies de *Leishmania*, entre elas a *L. (L.) amazonensis* e a *L. (V.) braziliensis*, causadoras de LC (DANTAS-TORRES, 2009). Em algumas áreas do país, os ciclos de transmissão enzoótica de diferentes espécies de *Leishmania* podem estar sobrepostos e cães podem se tornar co-infectados. Casos de co-infecção por *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* em cães já foram descritos no sudeste do Brasil (MADEIRA et al., 2006). Além disso, existe ainda o relato de dois cães supostamente portadores de LVC que estavam, na verdade, infectados por *L. (L.) amazonensis* (TOLEZANO et al., 2007). Tal fato chama atenção para a necessidade de técnicas mais adequadas para identificar as espécies envolvidas com a infecção de cães vivendo em áreas endêmicas (DANTAS-TORRES, 2009).

## 2.4 Reservatórios

Os reservatórios silvestres de *Leishmania* são raposas e marsupiais enquanto na área urbana esse papel é do cão doméstico (COSTA, 2005). A presença do cão não é fator determinante para a infecção no homem, porém observa-se que a infecção canina geralmente precede à humana (MARCONDES; ROSSI, 2013; NUNES et al., 2001). A participação de outras espécies como galinhas, ovinos, equídeos, caprinos, suínos e felinos na epidemiologia da LV parece estar associada à capacidade de atração dos vetores ao peridomicílio ou atuação daquelas espécies como reservatórios do parasita (MORAES-SILVA et al., 2006).

O cão é o mais importante reservatório natural relacionado com casos humanos, e apresenta variações no quadro clínico da doença, passando de animais aparentemente sadios a oligossintomáticos podendo chegar a estágios graves da doença (MONTEIRO et al., 2005). A importância do cão na epidemiologia da doença se deve ao fato do mesmo apresentar altas prevalências de infecção quando comparadas à espécie humana, e também pelo elevado número de animais assintomáticos, que pode chegar a 80% da população infectada (BANETH et al., 2008; DANTAS-TORRES; DE BRITO; BRANDÃO-FILHO, 2006; PALTRINIERI et al., 2010). Esses servem de fonte de infecção para o vetor durante o repasto sanguíneo, pois alberga o parasita na derme e, muitas vezes, deixam de ser identificados numa população devido à ausência de sintomas, ou ainda, em função de resultados falso-negativos nos exames sorológicos (BANETH et al., 2008; LUVIZOTTO; FERRARI; MOREIRA, 2005; MATTOS JR et al., 2004).

Estima-se que aproximadamente 2,5 milhões de cães na Europa estejam infectados, e que na América do Sul o número de cães infectados também esteja na casa dos milhões, com as maiores taxas de infecção em países como o Brasil e a Venezuela (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012).

## 2.5 Vetores

Os vetores relacionados com a dispersão do agente são os insetos da família dos flebotomíneos, do gênero *Lutzomyia* (CAMARGO et al., 2007; FEITOSA et al., 2000). São conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros (ANVERSA; MONTANHOLI; SABINO, 2016). Os flebotomíneos são pequenos, de 1 a 3 mm, identificados preferencialmente na região peridomiciliar, em áreas com abrigo de animais, lixo e matéria orgânica em decomposição (FELICIANGELI, 2004). Entretanto, em áreas urbanizadas é frequente encontrá-los no interior das residências durante o período crepuscular. Os vetores realizam oviposição e desenvolvimento larval em áreas úmidas, com sombreamento e ricas em matéria orgânica (FELICIANGELI, 2004; KILLICK-KENDRICK, 1990). Contudo, o



desenvolvimento das formas imaturas também pode ser observado em ecossistemas aparentemente hostis como, por exemplo, em áreas desmatadas e regiões semiáridas (DIAS-LIMA; GUEDES; SHERLOCK, 2003). As fêmeas são hematófagas e possuem um hábito alimentar eclético, ingerindo sangue de seres humanos, cães, gatos, cavalos, jumentos, cabras, bois, porcos, galinhas e animais silvestres (MISSAWA; LOROSA; DIAS, 2008).

No Brasil, duas espécies estão relacionadas com a transmissão da doença: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (BRASIL, 2006). A primeira espécie é considerada a principal espécie transmissora da *L. (L.) chagasi* e, recentemente, *L. cruzi* foi incriminada como vetor no Estado de Mato Grosso do Sul. A distribuição de *L. longipalpis* é ampla e parece estar em grande expansão (MONTEIRO et al., 2005).

## 2.6 Ciclo biológico

O ciclo das diferentes espécies de *Leishmania* é similar, isto é, são heteroxênico e se completam utilizando hospedeiros, incluindo mamíferos e invertebrados (Figura 1) (BATES, 2007).

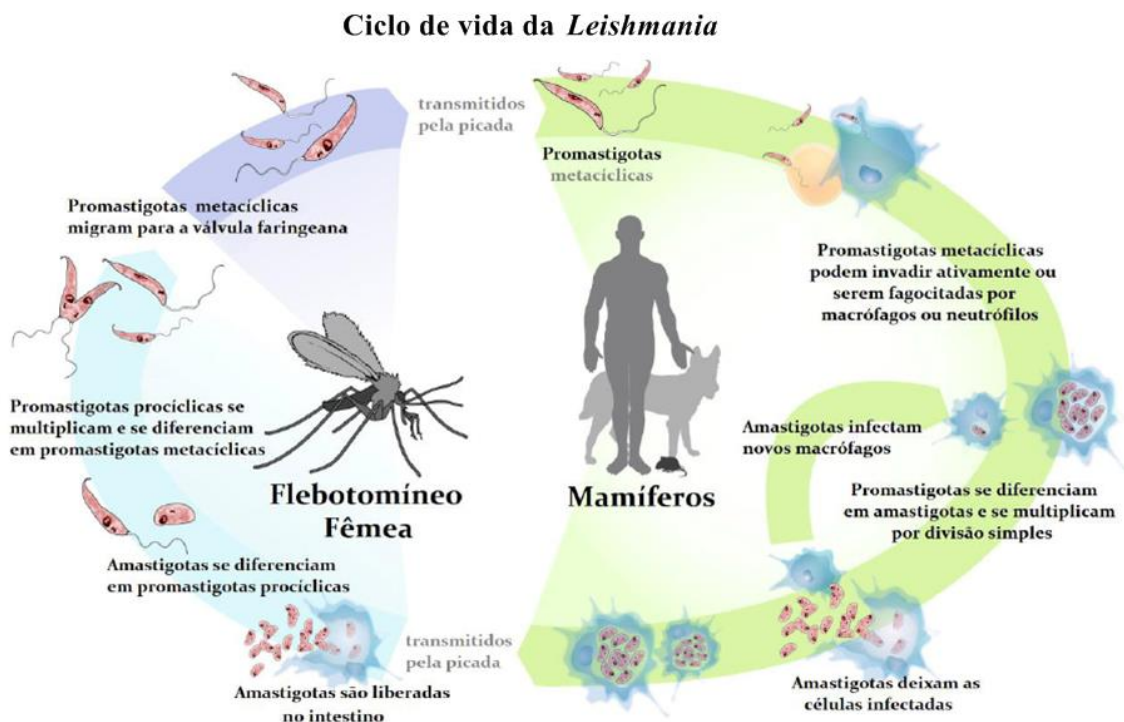


Figura 2: Ciclo de vida de *Leishmania*

Fonte:

Adaptado

de

[http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295\\_A\\_caminho\\_da\\_cura\\_da\\_leishmaniose\\_visceral\\_canina.html](http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295_A_caminho_da_cura_da_leishmaniose_visceral_canina.html)

A infecção do hospedeiro mamífero suscetível ocorre após a liberação das formas promastigotas no momento da picada da fêmea do vetor (UENO; WILSON, 2012). As promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos, e no seu interior transformam-se em formas amastigotas, no interior dos fagolisossomas, nos quais se multiplicam e provocam a ruptura do macrófago, com a possibilidade de infecção de outras células do organismo. A infecção dissemina-se da pele para os vários órgãos internos devido à mobilidade dos macrófagos infectados ou da presença de formas amastigotas no sistema circulatório (ROSYPAL et al., 2005).

Posteriormente, ocorre a infecção do vetor quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados com as formas amastigotas da *Leishmania* (BRASIL, 2006). Estando no interior do intestino do vetor, as formas amastigotas transformam-se em formas promastigotas. As formas promastigotas posteriormente dirigem-se para o aparelho bucal do flebótomo e são inoculadas no hospedeiro vertebrado, durante a sua refeição, perpetuando o ciclo do parasita e a infecção (ROSYPAL et al., 2005).

## 2.7 Aspectos clínicos da LVC

A LVC, causada por *L. (L.) infantum*, é uma doença sistêmica essencialmente crônica que, em animais susceptíveis, causa geralmente anemia, linfadenomegalia generalizada, hepatoesplenomegalia, perda progressiva de peso, epistaxe, lesões cutâneas, renais, oftálmicas, digestivas, locomotoras e neurológicas (FEITOSA et al., 2000; PALTRINIERI et al., 2010).

Praticamente todos os cães com LVC desenvolvem doença visceral ou sistêmica, sendo que 90% dos animais também apresentam algum envolvimento cutâneo. Os sinais viscerais mais comuns observados são linfadenopatia, emaciação, sinais possíveis de insuficiência renal (poliúria, polidipsia, vômito), neuralgia, poliartrite, poliomiosite, e outros sinais clínicos; sendo que aproximadamente um terço dos cães apresenta febre e esplenomegalia. Dentre os sinais cutâneos podemos citar hiperqueratose, pelagem seca e quebradiça, perda de pelos, e unhas anormalmente longas ou quebradiças, o que se constitui em um achado específico em alguns cães (TILLEY, 2008).

As lesões renais são consideradas como a principal causa de óbito na LVC. Alguns sinais neurológicos por meningites, encefalites e mielites podem também ser observados (RIBEIRO, 2007).

## 2.8 Diagnóstico da LVC

O diagnóstico da LVC pode ser realizado com base em dados clínicos e epidemiológicos, sendo confirmado pela presença do parasita (MARFURT et al., 2003). O diagnóstico clínico é difícil devido à variedade dos sinais clínicos e a semelhança com outras doenças, além desses fatores, muitas vezes o cão apresenta-se assintomático, o que torna necessário o diagnóstico laboratorial para confirmação da infecção (IKEDA-GARCIA et al., 2007).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares (BRASIL, 2006). O diagnóstico laboratorial clássico é o parasitológico, sendo um teste altamente específico, mas sua sensibilidade varia de acordo com o tipo de tecido, dependendo da demonstração das formas promastigotas dos parasitos em cultura, ou de formas amastigotas de *Leishmania* em esfregaços de aspirados de linfonodo, medula óssea, baço e fígado corados com Giemsa, Leishman ou Panótico e, além disso, requerem experiência laboratorial (ROMERO; BOELAERT, 2010; DISCH et al., 2003; LAURENTI, 2009). Os esfregaços de sangue podem ser examinados, mas apenas ocasionalmente são encontradas formas amastigotas de *Leishmania* em mononucleares (BONATES, 2003), não constituindo em exame de eleição para o diagnóstico.

A técnica de isolamento em cultura, apesar de ser 100% específica, é pouco utilizada hoje em dia como meio de diagnóstico, devido a desvantagens como a demora dos resultados, suscetibilidade à contaminação microbiana, dependência da carga parasitária, além de muitas vezes a dificuldade de execução devido à fraca adaptação do isolado ao meio (MAIA; CAMPINO, 2008).

O uso de inoculação em animais é complicado, pois requer um tempo consideravelmente longo para que haja o desenvolvimento da lesão, além de envolver aspectos éticos (NEITZKE-ABREU et al., 2013).

O diagnóstico sorológico compreende técnicas como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), fixação do complemento e aglutinação direta (BRASIL, 2006). Atualmente, para inquéritos em saúde pública os exames disponíveis para diagnóstico sorológico são teste rápido imunocromatográfico como triagem (DPP® teste rápido) e o ELISA, que expressa os níveis de anticorpos circulantes, como teste confirmatório da doença (BRASIL, 2011). O DPP® teste rápido é um teste qualitativo que utiliza dois antígenos recombinantes (K26 e K39) (GRIMALDI, 2012) e a combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal, e em casos de presença de anticorpos anti-leishmania na amostra testada, fornece o resultado positivo por meio de reação de cor (BIOMANGUINHOS, 2011).

A RIFI está baseada numa reação de anticorpos do soro dos animais com os parasitos (antígenos), sob forma promastigota (*Leishmania* sp.), fixados em lâminas de microscopia (BIOMANGUINHOS, 2008a), enquanto o ELISA, por sua vez, consiste na reação de soros com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* spp. cultivadas *in vitro*, inativadas e adsorvidos nas cavidades das microplacas (BIOMANGUINHOS, 2008b). É um teste rápido, de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a RIFI (GONTIJO; MELO, 2004; TÁVORA et al., 2007), permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos (GONTIJO; MELO, 2004). Assim, apesar dos avanços nas técnicas de diagnóstico sorológico, existem problemas com o aparecimento de falsos positivos, devido às reações cruzadas em cães com doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*), erliquiose e rickettsiose (GOMES et al., 2008).

Técnicas de biologia molecular como a PCR tem se demonstrado cada vez mais útil tanto no diagnóstico como na identificação das espécies de *Leishmania* devido sua alta sensibilidade, além da capacidade de identificar e amplificar sequências específicas do DNA do parasita em materiais biológicos diversos, como medula óssea, aspirados de linfonodos e sangue (NOLETO et al., 2017).

Vários sistemas baseados em PCR têm sido desenvolvidos para *Leishmania*. O melhor alvo para PCR e para as sondas de DNA tem sido o DNA presente nos minicírculos do cinetoplastos (kDNA) (GONTIJO; MELO, 2004). A maioria dos pesquisadores, baseia-se na amplificação de fragmento da região conservada do minicírculo de kDNA por estes estarem presentes em 10.000 a 20.000 cópias e por ser 10 vezes mais sensível que a da região variável (NUNES et al., 2007).

A PCR pode existir como método qualitativo, muito útil no diagnóstico imediato, especialmente em presença de resultados sorológicos duvidosos (GOMES et al., 2008). É importante ressaltar que outras técnicas, além da PCR, podem ser utilizadas para a caracterização de espécies de *Leishmania*, dentre elas a RFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) (LIMA JUNIOR et al., 2009), que é baseada na restrição de um fragmento de DNA por endonucleases que clivam esta molécula em sítios específicos gerando perfis de restrição (VOLPINI et al., 2004; ROMERO et al., 2009).

### **3 OBJETIVOS**

#### **GERAL**

Analisar a distribuição geoespacial e caracterizar a epidemiologia da LVC em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

## ESPECÍFICOS

Verificar a distribuição espacial dos casos de LVC;

Identificar *L. (L.) infantum* por PCR em amostras de medula de cães com sorologia positiva para LVC;

Pesquisar amastigota de *Leishmania* por pesquisa direta em amostras de sangue medular;

Ampliar os conhecimentos sobre a epidemiologia das leishmanioses no Mato Grosso do Sul.

## 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

ANVERSA, L.; MONTANHOLI, R. J. D.; SABINO, D. L. Avaliação do conhecimento da população sobre leishmaniose visceral. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 75, p. 01-08, 2016.

ASHFORD, R. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12, p. 1269-1281, 2000.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 4. ed. Philadelphia: **Elsevier Saunders**, 2012. p. 735-748.

BARCELLOS, C.; RAMALHO, W. M.; GRACIE, R.; MAGALHÃES, M. D. A. F.; FONTES, M. P.; SKABA, D. Georreferenciamento de dados de saúde na escala submunicipal: algumas experiências no Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v.17, n. 1, p.59-70, mar. 2008

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BIO-MANGUINHOS. Instituto de Tecnologia em Imunodiagnósticos. IFI Leishmaniose Visceral Canina. Imunoflorescência. Indireta para diagnóstico da leishmaniose visceral canina. BIO-MANGUINHOS, Rio de Janeiro, 2008a.

BIO-MANGUINHOS. Instituto de Tecnologia em Imunodiagnósticos. EIE Leishmaniose Visceral Canina. Ensaio Imunoenzimático para diagnóstico da leishmaniose visceral canina. BIO-MANGUINHOS, Rio de Janeiro, 2008b.

BIO-MANGUINHOS. Instituto de Tecnologia em Imunodiagnósticos. TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina. Teste rápido qualitativo para detecção de anticorpos de cão para *Leishmania*. **Bio-Manguinhos**, Rio de Janeiro, 2011.

BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar). **Vet News, Rio de Janeiro**, v. 61, p. 4-5, 2003.

BORASCHI, C. S. S., NUNES, C.M. . Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Clínica Veterinária**, n. 71, p. 44-48, 2007.

BORGES, L. F. N. M.; L. F., LOPES, E. G. P.; FREITAS, A. C. P.; SILVA, M. X.; HADDAD, J. P. A.; SILVA, J. A.; NICOLINO, R. R.; SOARES, D. F. M. Prevalência e distribuição espacial da leishmaniose visceral em cães do município de Juatuba, Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v. 44, n. 2, 2014.

BOTELHO, A. C.; NATAL, D. [First epidemiological description of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 5, p. 503-8, Sep-Oct 2009.

BRASIL, M. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. **Brasília: Ministério da Saúde, 120p**, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças transmissíveis. Nota Técnica conjunta nº 1/2011 CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS, 2011

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. p. 639 – 667.(Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 184 p. , 2007

CAMARGO, J.; TRONCARELLI, M.; RIBEIRO, M.; LANGONI, H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clín Vet**, v. 71, p. 86-92, 2007.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. D.; KATZ, G.; RODAS, L. A. C.; POLETTO, D. W.; LAGE, L. C.; SPÍNOLA, R. M. F.; CRUZ, O. G. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana-Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. 1263-1267, 2001.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 3-17, 2005.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 1, p. S1, 2009.

DANTAS-TORRES, F.; DE BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 140, n. 1, p. 54-60, 2006.

DIAS-LIMA, A. G.; GUEDES, M. L. S.; SHERLOCK, I. A. Horizontal stratification of the sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in a transitional vegetation between caatinga and tropical rain forest, state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 733-737, 2003.

DISCH, J.; MACIEL, F.; DE OLIVEIRA, M.; ORSINI, M.; RABELLO, A. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 4, p. 391-395, 2003.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M.; PERRI, S. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba–São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FELICIANGELI, M. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and veterinary entomology**, v. 18, n. 1, p. 71-80, 2004.

FURLAN, M. B. G. Epidemia de leishmaniose visceral no Município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 19, n. 1, p. 16-25, 2010.

GOMES, Y.; CAVALCANTI, M. P.; LIRA, R.; ABATH, F.; ALVES, L. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 45-52, 2008.

GONTIJO, B. B.; PAVÃO, F. F.; SILVA, F. S.; SILVA, F. D.; TAVARES, G. C.; COELHO, G. L. Esporotricose e Leishmaniose Tegumentar em cães e gatos: semelhanças e diferenças. **PUBVET**, v. 5, p. Art. 1245-1250, 2011.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRIMALDI, G. JR.; TEVA, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. B.; PINTO, I. D. S.; DE-AZEVEDO, C. T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54-59, 2012.

IKEDA-GARCIA, F. A.; LOPES, R. S.; MARQUES, F. J.; DE LIMA, V. M.; MORINISHI, C. K.; BONELLO, F. L.; ZANETTE, M. F.; PERRI, S. H.; FEITOSA, M. M. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Vet Parasitol**, v. 143, n. 3-4, p. 254-9, Feb 28 2007.

IKEDA-GARCIA, F. A.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Clínica Veterinária*, São Paulo, ano 12, n. 71, p.34-42, 2007.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and veterinary entomology**, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990.

LAINSON, R. Evolution, classification and geographical distribution. **The leishmaniasis in biology and medicine**, 1987.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, v. 6, n. 67, p. 13-23, 2009.

LIMA JUNIOR, M. S. D. C.; ANDREOTTI, R.; DORVAL, M. E. M. C.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. G. D.; MATOS, M. D. F. C. Identificação de espécies de Leishmania isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. 2009.

LUVIZOTTO, M.; FERRARI, H.; MOREIRA, M. Lesão nodular na cavidade oral de cão causada por Leishmania sp.-relato de casos. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 57, p. 18-9, 2005.

MADEIRA, M. D. F.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T.; PACHECO, R.; OLIVEIRA, F.; PEREIRA, S.; FIGUEIREDO, F.; BAPTISTA, C.; MARZOCHI, M. Mixed infection with Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) chagasi in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 5, p. 442-445, 2006.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L. D.; SENA, J. M. D.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274-287, 2008.

MAIA, C. S.; PIMENTEL, D. S.; SANTANA, M. A.; OLIVEIRA, G. M.; PEDROSA, N. A.; NASCIMENTO, L. A.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. Análise espacial da leishmaniose visceral americana no município de Petrolina, Pernambuco, Brasil. **Hygeia**, v. 10, n. 18, p. 167-176, 2014.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MARFURT, J.; NIEDERWIESER, I.; MAKIA, N. D.; BECK, H. P.; FELGER, I. Diagnostic genotyping of Old and New World Leishmania species by PCR-RFLP. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 46, n. 2, p. 115-24, Jun 2003.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J.; AMENDOEIRA, M. R. Leishmaniose Visceral (Calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 41, p. 69-84, 1981

MATO GROSSO DO SUL (Estado). Secretaria de Estado de Saúde. **Boletim CIEVS/MS**. Ano



III nº 01 Anual – Período de referência: Janeiro a Dezembro de 2015.

MATO GROSSO DO SUL. Informe Epidemiológico nº 5/ 2017 Leishmaniose visceral. Semana epidemiológica 1 a 28 de 2017.

MATTOS JR, D.; PINHEIRO, J.; MENEZES, R.; COSTA, D. Clinical and laboratorial aspects of seropositive dogs to leishmaniosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 119-122, 2004.

MEDEIROS, R.A. Caracterização da *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães provenientes da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, 2013.

MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Médica**. Atheneu, São Paulo, c. 10, v. 1, p. 67-83, 2005.

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. 2008.

MONTEIRO, É. M.; SILVA, J. C. F. D.; COSTA, R. T. D.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V. D.; COELHO, G. L. L. M.; ROCHA, M. F.; DIAS, C. L. F.; DIAS, E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. 2005.

MORAES-SILVA, E.; ANTUNES, F. R.; RODRIGUES, M. S.; DA SILVA JULIAO, F.; DIAS-LIMA, A. G.; LEMOS-DE-SOUSA, V.; DE ALCANTARA, A. C.; REIS, E. A. G.; NAKATANI, M.; BADARÓ, R. Domestic swine in a visceral leishmaniasis endemic area produce antibodies against multiple *Leishmania infantum* antigens but apparently resist to *L. infantum* infection. **Acta tropica**, v. 98, n. 2, p. 176-182, 2006.

NEITZKE-ABREU, H. C.; VENZAZZI, M. S.; BERNAL, M. V. Z.; REINHOLD-CASTRO, K. R.; VAGETTI, F.; MOTA, C. A.; SILVA, N. R.; ARISTIDES, S. M. A.; SILVEIRA, T. G. V.; LONARDONI, M. V. C. Detection of DNA from *Leishmania (Viannia)*: accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e62473, 2013.

NOGUEIRA, J. L. S., M.V.M.; PASSOS, C.C.; AMBRÓSIO, C.E. A importância da Leishmaniose Visceral Canina para a saúde pública: uma zoonose reemergente. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 13, 2009.

NOLETO, R. V.; JUNIOR, W. P. O.; BIGELI, J. G.; TELES, N. M. M.; OLIVEIRA, J. D. D. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pela técnica de PCR em sangue periférico em associação com os testes RIFI e ELISA em cães de Palmas, TO. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 2-6, 2017.

NUNES, C. M. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.

NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; NUNES, D. B.; ZINEZZI, R.; SAVANI, E.; ISHIKAWA, E.; CAMARGO, M.; D'AURIA, S. R. N.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 34, n. 3, p. 299-300, 2001.

Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2017. Disponível em: <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=29&Itemid=40754](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754)> . Acesso em 17 nov. 2017. OPAS/OMS, 2017

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

PRATA, A.; SILVA, L. A. Calazar. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**, Rio de Janeiro, v.1, p. 713-732, 2005.

REGO – JR, F.A. Ocorrência de casos de leishmaniose em cães no município de Corumbá- MS. In: **Anais do VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia**, São Paulo p.2, 1983

REIS, L. E. S.; COURA-VITAL, W.; ROATT, B. M.; BOUILLET, L. É. M.; KER, H. G.; DE BRITO, R. C. F.; DE MELO RESENDE, D.; CARNEIRO, M.; GIUNCHETTI, R. C.; MARQUES, M. J. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary parasitology**, v. 197, n. 3, p. 498-503, 2013.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.-C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2007.

RIBEIRO, V. Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. **Clín Vet**, v. 71, p. 66-76, 2007.

ROCHA, A. T. D. F. ANÁLISE ESPACIAL DAS CONDIÇÕES DE VULNERABILIDADE PARA LEISHMANIOSE VISCERAL EM TERESINA-PI, 2018.

ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America—a systematic review. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 1, p. e584, 2010.

ROMERO, G. A. S.; NORONHA, E. F.; PIRMEZ, C.; PIRES, F. E.; FERNANDES, O.; NEHME, N. S.; CUPOLILLO, E.; FIROOZMAND, L.; da GRACA, G. C.; VOLPINI, A.; SANTOS, S. L.; ROMANHA, A. J. Sensitivity and reproducibility of a PCR assay for *Leishmania* detection using skin biopsy imprints on filter paper. *Acta Tropica*, Amsterdam, v 109, p. 74–77, 2009

ROSYPAL, A.; LINDSAY, D. S.; TROY, G. C.; DUNCAN JR, R. B.; GOGAL JR, R. M.; FRANK, G. R. Characterization of canine leishmaniasis in the United States: pathogenesis, immunological responses, and transmission of an American isolate of *Leishmania infantum*. **Characterization of canine leishmaniasis in the United States: pathogenesis,**

**immunological responses, and transmission of an American isolate of *Leishmania infantum*, 2005.**

SANTOS, D. B. O.; MONTEIRO, T. P. B.; DA SILVA, C. N.; AVENIDA, U. F. R. A. A Distribuição Espacial da Leshimaniose Visceral Americana no município de Salvaterra-pa e sua relação com o índice de vegetação NDVI. Anais XVI Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 13 a 18 de abril de 2013.

SCHIMMING, B. C.; SILVA, J. R. C. P. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, p. 1-17, 2012.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 117-143, 1995.

SIMPSON, L.; MOREL, C.; SIMPSON, A. Biological role of extrachromosomal DNA. **Tropical diseases research series**, 1981.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 165, n. 1, p. 1-18, 2009.

TÁVORA, M. P. F.; PEREIRA, M. A. V. D. C.; SILVA, V. L.; VITA, G. F. Comparative validation study between the ELISA and RIFI techniques for diagnosing *Leishmania* sp in stray dogs caught in the municipality of Campos de Goytacazes, State of Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 482-483, 2007.

TILLEY, L. P. S. J., F.W.K. . **Consulta veterinária em cinco minutos. Espécies canina e felina**. 3. 2008.

TOLEZANO, J. E.; ULIANA, S. R.; TANIGUCHI, H. H.; ARAÚJO, M. F.; BARBOSA, J. A.; BARBOSA, J. E.; FLOETER-WINTER, L. M.; SHAW, J. J. The first records of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 149, n. 3, p. 280-284, 2007.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 8, p. 335-344, 2012.

VOLPINI, A. C.; PASSOS, V. M. A.; OLIVEIRA, G. C.; ROMANHA, A. J. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, Basel, v. 90, p. 31-37, 2004.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial pathogenesis**, v. 38, n. 4, p. 147-160, 2005.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/Leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Visceral leishmaniasis: control strategies and

epidemiological situation update in East Africa: report of a WHO bi-regional consultation  
Addis Ababa, Ethiopia, 9–11 March 2015. 2015.

## 5 APÊNDICES

**Artigo: Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo- Qualis B2**

<http://www.scielo.br/revistas/rimtsp/iinstruc.htm>

Epidemiology and georeferencing of visceral canine leishmaniasis in Campo Grande, Mato Grosso do Sul

Laísa Vieira Gnutzmann<sup>1</sup>, Leticia Surian Batalini<sup>2</sup>, Carolina Cella Conter<sup>3</sup>, Juliana Arena Galhardo<sup>4</sup>, Silvia Barbosa do Carmo<sup>5</sup>, Elisabete Friozi<sup>5</sup>, Manoel Sebastião da Costa Lima Junior<sup>6</sup>, Herintha Coeto Neitzke-Abreu<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), 79804-070, Dourados, MS, Brazil.

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), 79804-070, Dourados, MS, Brazil.

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá (UEM), 87020-900, Maringá, PR, Brazil.

<sup>4</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), 79074-460, Campo Grande, MS, Brazil.

<sup>5</sup>Control Center of Zoonoses (CCZ), 79074-460, Campo Grande, MS, Brazil.

<sup>6</sup>Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Aggeu Magalhães, 50740-456, Recife, PE, Brazil.

**Correspondence to:** Herintha Coeto Neitzke-Abreu, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), 79804-070, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. E-mail: [HerinthaAbreu@ufgd.edu.br](mailto:HerinthaAbreu@ufgd.edu.br)

## ABSTRACT

Visceral canine leishmaniasis (VCL) is a disease of clinical importance due to the large number of infected dogs and the intense parasitism seen in these animals. The objective was to analyze the spatial distribution and to characterize the epidemiological profile of VCL in Campo Grande, Mato Grosso do Sul. The distribution of the cases across regions and neighborhoods was established using the program QGIS 2.18 based on parasitological and polymerase chain reaction (PCR)-diagnoses of VCL in dogs that were serologically positive for *Leishmania*. A total of 412 dogs provided by the Control Center of Zoonoses, along with an individual file containing epidemiological data, were analyzed. Parasitological diagnosis was performed in 352 bone marrow samples and PCR was performed using the FLC2/RLC2 primers to detect for *Leishmania infantum*. Most dogs were over one year old (79%), female (57%), non-breed (76%), and until 10 kg (48%). The cases were more concentrated in the Anhanduizinho and Lagoa regions. The parasitological diagnosis found 241 (68.47%) samples to be positive, while 293 (83.24%) samples were found to be positive by PCR analysis. The distribution of VCL is closely related to socio-economic issues in society. It is evident that the limited control measures adopted by health agencies are ineffective and that we are far from eradicating the disease.

**KEYWORDS:** Geoprocessing, Epidemiology, *Leishmania*, PCR

## INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis is a major public health problem with increasing reports of cases and deaths. In Mato Grosso do Sul State (MS), among the 1,189 registered cases from 2001 to 2006, 577 (49%) occurred in the capital (Campo Grande)<sup>1</sup>. In urban areas, dogs are the main reservoir for the transmission of this disease to humans, and visceral

canine leishmaniasis (VCL) is an important disease due to the large number of infected dogs and the intense parasitism seen in these animals<sup>2</sup>.

VCL can be diagnosed based on clinical and epidemiological data, and confirmed by laboratory tests. Clinical diagnosis is difficult owing to the variety of symptoms presented and their similarity with those of other diseases; moreover, aside from these factors, dogs with VCL are often asymptomatic<sup>3</sup>. Laboratory diagnosis can be performed using parasitological, serological, and molecular methods<sup>4</sup>. Parasitological techniques are specific, but their sensitivity varies according to the type of tissue<sup>5</sup>, while serological techniques present cross-reactions with Chagas' disease, ehrlichiosis, and rickettsiosis<sup>6</sup>. Thus, molecular biology techniques such as polymerase chain reaction (PCR) have been increasingly used for diagnosis due to their sensitivity<sup>7</sup>, especially in the presence of unreliable serological results<sup>6</sup>.

Despite the information obtained from decades of studies dedicated to leishmaniasis, there is still much to clarify about the epidemiology of leishmaniasis, especially with regard to species identification and case distribution. The present study aims to perform spatial analysis and georeferencing, as well as characterize the epidemiological profile of VCL in Campo Grande, MS.

## **METHODS**

### *Place of study and animals*

The study was carried out in the Campo Grande municipality (latitude -20°26'34", longitude -54°38'47"), which is located in central MS and the Center-West region of Brazil (Figure 1); it has a territorial area of 8,092.95 km<sup>2</sup>, occupying 2.26% of the total area of the MS. It has an estimated population of 880 thousand and is 98.66% urbanized.



Campo Grande is divided into seven urban regions: Anhanduizinho, Bandeira, Centro, Imbirussu, Lagoa, Prosa, and Segredo, covering a total of 74 neighborhoods.

A total of 412 dogs from the Control Center of Zoonoses (CCZ) were analyzed. These dogs were serologically positive for VCL, as screened using DPP™ for Canine Visceral Leishmaniasis and confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and were referred to the CCZ for euthanasia from May to July, 2016. An individual file was obtained with information on their neighborhood, gender, breed, age, and clinical signs. This work was approved by the Ethics Committee for Animal Use, protocol 27/2016.

#### *Georeferencing*

A geographic information system was developed in the program QGIS 2.18, with a digital map of the Campo Grande municipality as a cartographic base and containing the divisions of the seven urban regions and the 74 neighborhoods. The SIRGAS2000 and the UTM coordinate systems were used as reference ellipsoids. Thematic maps were developed for the construction and visualization of the indicators using data on the number of VCL-positive dogs by region and neighborhood. The analyses were carried out at the Laboratory of Veterinary Epidemiology of the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

#### *Laboratory tests*

Bone marrow samples from 352 dogs were analyzed. The samples were collected by the CCZ after anesthesia of the animal for parasitological and PCR-based diagnoses.

#### *Parasitological diagnosis*

Glass slides with bone marrow smears were made for direct investigation of *Leishmania* amastigotes, stained with Giemsa, and observed under an optical microscope (1000× magnification).

#### *PCR*

DNA extraction was performed using a 20% sodium dodecyl sulfate (SDS) extraction protocol by Silveira *et al.*<sup>8</sup>.

After obtaining the DNA, the samples were subjected to PCR using the FLC2 (5'-GTC AGT GTC GGA AAC TAA TCC GC-3') and RLC2 (5'-GGG AAA TTG GCC TCC CTG AG-3') primers flanking a 230-bp fragment from the mini-circle region present in *L. infantum* kDNA, following the protocol of Gualda *et al.*<sup>9</sup>.

#### *PCR control*

Samples that were negative for the 230-bp fragment from *L. infantum* kDNA were consequently analyzed to detect the presence of inhibitors using canine  $\beta$ -actin gene-specific oligonucleotides as an internal control with the Forward (5'-CTT CTA CAA CGA GCT GCG CG-3') and Reverse (5'-TCA TGA GGT AGT CGG TCA GG-3') primers according to Silveira *et al.*<sup>8</sup>.

## **RESULTS**

Among the 412 dogs analyzed, majority of the dogs were older than one year (n=279; 79%), female (n=203; 57%), without a defined breed (n=268; 76%), small (n=167, 48%), and vaccinated against rabies (n=212, 60.2%).

VCL cases were notified in all seven urban regions, but predominantly in Anhanduizinho and Lagoa (141 and 77 cases, respectively). Among the 74

neighborhoods, 60 had cases of VCL, and the largest number of cases (26) occurred in the Aero Rancho neighborhood (Figure 1).

All dogs had at least one clinical sign and 321 (91.19%) had more than three clinical signs. The main signs were alopecia (84.96%), desquamation (80.5%), onychogryphosis (72.7%), purulent ocular secretion, ear tip injury, emaciation, deep anemia, lymphadenopathy, purulent nasal discharge, and hepatosplenomegaly.

Among the 352 dogs analyzed, 293 dogs (83.24%) were positive according to PCR, while 241 (68.47%) were positive according to parasitological analysis. Among the PCR-positive samples (293), 25.94% (76) were negative according to parasitological analysis. Among the PCR-negative samples (59), 40.68% (24) were positive according to parasitological analysis.

## **DISCUSSION**

Cases of leishmaniasis in humans are often preceded by canine cases<sup>10</sup>. It is estimated that, for each human case, there are about 200 infected dogs, which are the main urban reservoirs of leishmaniasis. The euthanasia of infected dogs, although recommended in Brazil, has been questioned since it has not reduced the incidence of human cases<sup>11</sup>. Furthermore, the low economic status of the more predominantly affected population makes the treatment of the dogs more difficult. Dog and vector control strategies should be rethought because of the endemic nature of the disease. Moreover, in some cities in Brazil, leishmaniasis actually kills more than dengue, a disease with increased control and educational campaigns.

Vector action is a key point in the control of leishmaniasis, but the recommended activities are difficult mainly due to the lack of knowledge in vector biology<sup>12</sup>, aside from the lack of material and/or human resources, the complexity and cost of action, and the

population recusation<sup>13</sup>. Environmental sanitation to prevent the reproduction and maintenance of the vector is important but is difficult to implement as it depends directly on the population. In our findings, we observed neighborhoods with high incidence as well as others that did not have VCL cases altogether. Neighborhood infrastructure issues are possibly directly influencing this uneven distribution. Neighborhoods with better infrastructure have lower incidences of VCL. Further studies are needed to demonstrate the occurrence of transmission in the urban area while taking local realities into consideration.

In view of this, the use of insecticide-impregnated collars is a promising measure to combat VCL<sup>12,14,15</sup>. However, this measure has barely been used and there have only been a few studies analyzing the use of this measure in a large population of dogs<sup>16</sup>.

In our study, the region with the highest number of cases was Anhanduizinho, which is composed of 14 neighborhoods and is the region with the largest population; it is also one of the fastest growing region in the city, followed by the Lagoa region, which is consistent with the findings reported by Furlan *et al.*<sup>17</sup> and Brazuna *et al.*<sup>16</sup>. However, in our study, we observed a growth in the number of cases in Bandeira (64 cases) compared to the previous studies that analyzed data from 2002 to 2006<sup>17</sup> and from 2009<sup>16</sup>. The Aero Rancho neighborhood had the largest number of cases, and it is located in the Anhanduizinho region. This neighborhood that is located in the periphery of the city, lacks basic sanitation infrastructure and is classified as a high-risk area for VCL. Moreover, the population density of this neighborhood has increased in the recent years, and is in a low positions in the overall ranking of neighborhoods based on Urban Quality of Life Index<sup>18</sup>.

Brazuna *et al.*<sup>16</sup> described the regions of Anhanduizinho and Lagoa as densely populated and with large areas of vegetation, which are favorable factors for the

reproduction of sand flies; these regions also have large populations of dogs. The high number of cases in Campo Grande can be attributed to multiple important environmental factors in the process of urbanization of the vector, such as the construction of streets, housing complexes, and leisure parks on the course of rivers, as well as the construction of houses in places where there was native vegetation<sup>1,17,19</sup>.

Additionally, the three main regions with the highest number of VCL cases comprise a large number of lagoons and special areas, but have less greenways. These factors combined with high population densities contribute to the high number of cases and thus represent a difficult challenge for epidemiological management based on vector control.

All the tested dogs presented classic signs of VCL. These animals are mostly dogs wandering from the periphery, have no access to treatment, and are widely exposed to co-infections<sup>8</sup>; consequently, these animals arrive at the CCZ in very weak conditions.

The choice of tissue for parasite research influences the sensitivity of the diagnosis<sup>4</sup>. The bone marrow is considered the largest hematopoietic organ and is a major lymphoid tissue<sup>20</sup>. Reports show that *L. infantum* presents tropism to lymphoid tissues such as bone marrow and spleen<sup>21</sup>, resulting in better infection detection using these tissues<sup>20,22</sup>. Although the collection of peripheral blood is easier, the concentration of the parasite in the blood is lower than that in the bone marrow, spleen, or lymph node<sup>23,24</sup>.

In our study, we did not evaluate the sensitivity and overall accuracy of the serological results, but a serologically positive result was used as an inclusion criterion. The advent of PCR, which is a highly sensitive and specific technique, brought vast improvements to the diagnosis of diseases, and VCL was no exception.

Some samples were found to be negative according to PCR, even though the animals presented the clinical signs characteristic of VCL. This may be due to several

factors, such as the choice of primers, the methodology for obtaining the genetic material, type of sample, parasitemia indexes, and the presence of inhibitors<sup>25,26</sup>. However, another parasitological factor that influenced the results obtained through PCR is the low hematogenic spread, which was also reported by other authors<sup>27,28</sup>. Conventional PCR with the primers used in this study is highly sensitive and is capable of detecting as low as 0.2 fg of *L. infantum*<sup>9</sup> DNA. However, the specificity of the technique for *L. infantum* DNA may have actually contributed to our negative results as cases of VCL due to infection with other *Leishmania* species have also been already reported<sup>29</sup>.

The diagnosis of VCL is complex and requires the use of different techniques to obtain a conclusive result. The use of PCR is important in doubtful cases, such as asymptomatic dogs<sup>6,8</sup>, and is particularly useful in identifying the species of parasite involved. Thus, the combined use of clinical, serological, and PCR-based methods is important for accurate diagnosis.

Although improvements have been made in the application of serological tests, they are still limited due to the possibility of cross-reactions<sup>30,31</sup>. In addition, most clinical signs of VCL are common to other pathologies, increasing the need for more specific diagnostic methods<sup>6,32</sup>.

The number of VCL cases that have been referred to the CCZ is an underestimation as there are likely to be more dogs with VCL that die without being diagnosed. We can conclude that the distribution of VCL has a close relationship with socio-economic issues in society. It is evident that the limited control measures adopted by health agencies are ineffective and that we are far from eradicating the disease.

## **AUTHORS' CONTRIBUTION**

LVG: data collection, analysis of the results and writing of the article; LSB, CCC, SBC, EF: data collection; JAG: analysis of the results; MSCLJ and HCNA: data collection, analysis of the results, and writing of the article.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no potential conflict of interest.

## FUNDING

Financial support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), and Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

## REFERENCES

1. Botelho AC, Natal D. First epidemiological description of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42(5):503-8.
2. Schimming BC, Silva JRCP. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. *Rev Cient Eletr Med Vet.* 2012:1-17.
3. Ikeda-Garcia FA, Lopes RS, Marques FJ, de Lima VM, Morinishi CK, Bonello FL, et al. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol.* 2007;143(3-4):254-9.
4. Brazil. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 120p. 2006.

5. Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(1):e584.
6. Gomes Y, Cavalcanti MP, Lira R, Abath F, Alves L. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J*. 2008;175(1):45-52.
7. Noleto RV, Junior WPO, Bigeli JG, Teles NMM, Oliveira JDDD. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pela técnica de PCR em sangue periférico em associação com os testes RIFI e ELISA em cães de Palmas, TO. *Rev Patol Tocantins*. 2017; 4(4):2-6.
8. Silveira APS, Vieira VBD, Batalini LS, Carmo SB, Friozi E, Arruda EJ, et al. PCR sensitivity in peripheral blood of dogs co-infected with *Leishmania* spp. and *Ehrlichia* spp. in endemic area of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018;51(6):843-7.
9. Gualda KP, Marcussi LM, Neitzke-Abreu HC, Aristides SMA, Lonardoni MVC, Cardoso RF, et al. New primers for detection of *Leishmania infantum* using polymerase chain reaction. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2015;57(5):377-83.
10. Sales DP, Chaves DP, dos Santos Martins N, Silva MIS. Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Canina e Humana no Estado do Maranhão, Brasil (2009-2012). *Rev Bras Ciênc Vet*. 2018;24(3).
11. Machado CJS, Silva EG, Vilani RM. O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. *Saúde Soc*. 2016;25(1):247-58.
12. 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.



13. Zuben APBV, Donalísio MR. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. *Cad Saúde Pública*. 2016;32(6):e00087415.
14. Belo VS, Struchiner CJ, Werneck GL, Barbosa DS, de Oliveira RB, Neto RGT, et al. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. *Vet Parasitol*. 2013;195(1-2):1-13.
15. Werneck GL, Costa CHN, de Carvalho FAA, e Cruz MDSP, Maguire JH, Castro MC. Effectiveness of insecticide spraying and culling of dogs on the incidence of *Leishmania infantum* infection in humans: a cluster randomized trial in Teresina, Brazil. *PLoS Neg Trop Dis*. 2014;8(10):e3172.
16. Brazuna JCM, Silva EA, Brazuna JM, Domingos IH, Chaves N, Honer MR, et al. Profile and geographic distribution of reported cases of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil, from 2002 to 2009. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(5):601-6.
17. Furlan, MBG. Epidemia de leishmaniose visceral no Município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006. *Epidemiol Serv Saúde*. 2010;19(1):16-25.
18. Teles APS, Herrera HM, Ayres FM, Brazuna JCM, de Abreu UGP. Fatores de risco associados à ocorrência da leishmaniose visceral na área urbana do município de Campo Grande/MS. *Hygeia*. 2015;11(21):35-48.
19. Araujo e Silva E, Andreotti R, Honer MR. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(4):420-5.
20. De Abreu RT, das Graças Carvalho M, Carneiro CM, Giunchetti RC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, et al. Influence of clinical status and parasite load

- on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. PloS one. 2011;6(5):e18873.
21. Ramos RAN, Ramos CAdN, Santos EMdS, Araújo FRd, Carvalho GAd, Faustino MAdG, et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in the bone marrow, lymph node and spleen of dogs. Rev Bras Parasitol Vet. 2013;22(3):346-50.
  22. Maia C, Afonso M, Neto L, Dionísio L, Campino L. Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve region, Portugal. J Vector Borne Dis. 2009;46(4):268.
  23. Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. Vet Parasitol. 2006;137(3):214-21.
  24. Quaresma PF, Murta SMF, de Castro Ferreira E, da Rocha ACVM, Xavier AAP, Gontijo CMF. 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(3):289-94.
  25. Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Reynes J, Lamothe J, Bastien P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. J Clin Microbiol. 2001;39(2):613-7.
  26. Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. J Clin Microbiol. 2002;40(7):2352-6.
  27. Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis

- endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):560-3.
28. Albuquerque A, Campino L, Cardoso L, Cortes S. Evaluation of four molecular methods to detect *Leishmania* infection in dogs. *Parasit Vectors.* 2017;10(1):57.
29. Sanches LDC, Martini CCD, Nakamura AA, Santiago MEB, Dolabela de Lima B, Lima VMFD. Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and their implications for disease control. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2016;25(4):465-9.
30. Matos HJd, Pinto AYdN, Miranda AMM, Silva FLC, Ramos FLdP. Reação cruzada nos testes sorológicos entre doença de Chagas e leishmaniose visceral em regiões endêmicas para ambas as doenças. *Rev Pan-Amazônica Saúde.* 2015;6(1):65-8.
31. Zanette MF, Lima VMFd, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RFC, et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(1):105-7.
32. Andrade GB, Barreto WTG, Santos LLD, Ribeiro LRR, Macedo GCD, Sousa KCMD, et al. Pathology of dogs in Campo Grande, MS, Brazil naturally co-infected with *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2014;23(4):509-15.

Figure 1

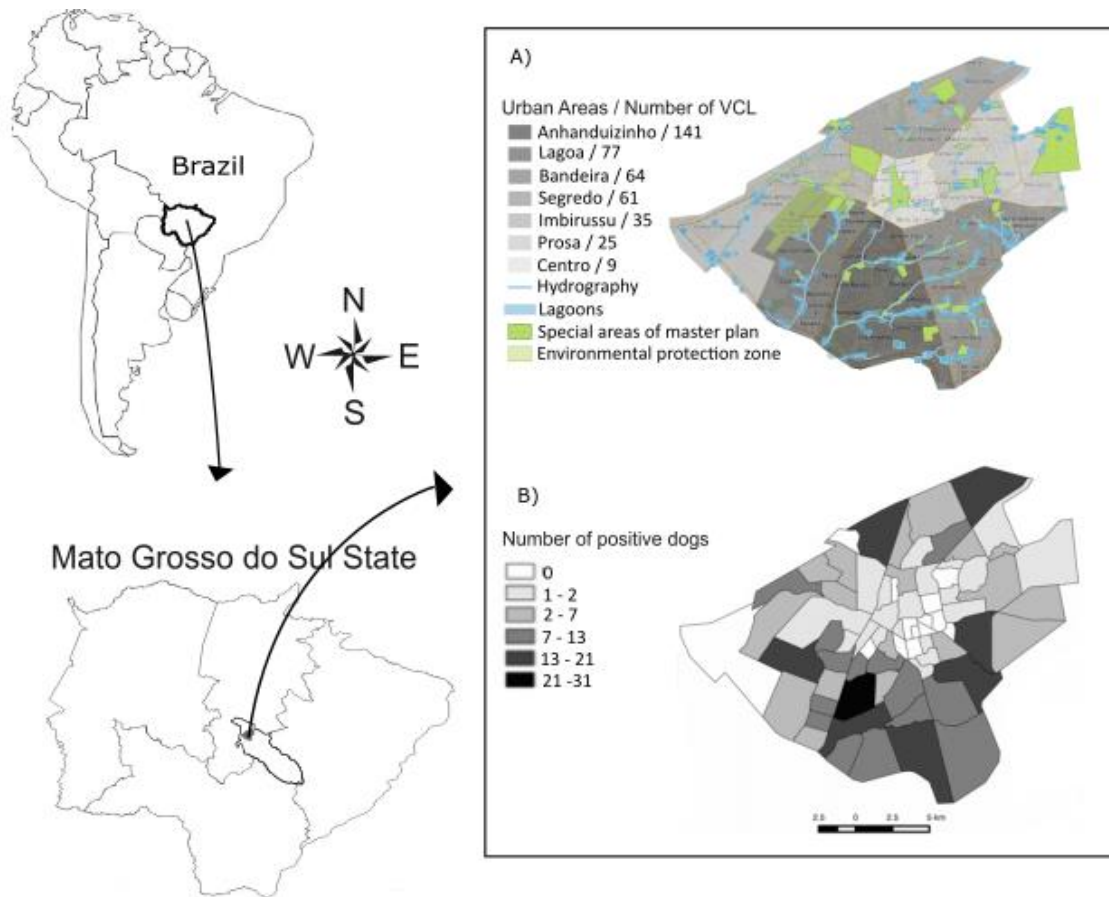


Figure legend

**Figure 1 - Visceral canine leishmaniasis cases in Campo Grande, Mato Grosso do Sul.** A) Hydrographic map and forests in Urban Areas; B) number of positive cases in neighborhoods.

## 6 CONCLUSÕES

O diagnóstico da LVC é complexo e requer o uso de diferentes técnicas para obtenção de um resultado conclusivo. O uso da PCR é importante em casos duvidosos, como em cães assintomáticos, além de possibilitar a identificação das espécies envolvidas. Assim, a combinação da clínica, sorologia e PCR é importante para a otimização do diagnóstico.

O número de casos encaminhados ao CCZ é subestimado pois acredita-se que há um número maior de cães com LVC que morrem habitualmente sem mesmo serem diagnosticados com LVC. Podemos concluir que a distribuição da LVC possui estreita relação com questões sociais e econômicas da sociedade. É evidente que as limitadas medidas de controle adotadas pelos órgãos de saúde são de baixa efetividade, dessa forma estamos cada vez mais longe da erradicação da doença.

**7 ANEXOS**

## 7.1 PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (CEUA)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 3 de agosto de 2016.

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Leishmaniose canina: perfil clínico, epidemiológico e identificação molecular de espécies de *Leishmania spp*", registrada sob o protocolo de nº 27/2016, sob a responsabilidade de *Herintha Coeto Neitzke Abreu* – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 01/07/2016.

<i>Finalidade</i>	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
<i>Vigência da autorização</i>	01/10/2016 a 30/10/2019
<i>Espécie/linhagem/raça</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>
<i>Nº de animais</i>	430
<i>Peso/idade</i>	Variável
<i>Sexo</i>	Variável
<i>Origem</i>	Centro de Controle de Zoonoses/CCZ - Campo Grande - MS

*Melissa Negrão Sepulveda*

Melissa Negrão Sepulveda  
Coordenadora CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFGD – Rua João Rosa Goes, 1761 – Vila Progresso.  
Dourados/MS. E-mail: ceua@ufgd.edu.br