



Detecção e caracterização molecular de *Leishmania* em cães do nordeste do Brasil

Anna Maria da Cruz Ferreira Evaristo¹, Ivo Wesley Gomes da Silva¹, Glauber Meneses Barboza de Oliveira^{1,2}, Ryan Emiliano da Silva², Jaciara de Oliveira Jorge Costa², Josir Laine Aparecida Veschi³, Arlei Marcili^{2,4}, Mauricio Claudio Horta^{1*}.

¹Laboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil. ²Laboratório de Doenças Parasitárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. ³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, Brasil. ⁴Programa em Medicina e Bem-Estar animal e Saúde Única, Universidade Santo Amaro, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO

OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi determinar a soroprevalência atual da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em cães domiciliados, os fatores associados à soropositividade, espécies circulantes de *Leishmania* e análise espacial em seis municípios das mesorregiões do Sertão e São Francisco, localizados no estado de Pernambuco, Brasil.

MÉTODOS

Amostras de sangue de 330 cães foram analisadas por meio de ensaios sorológicos e moleculares: teste rápido imunocromatográfico (DPP®); ensaio imunoenzimático (ELISA), teste de imunofluorescência indireta (IFAT) e reação em cadeia da polimerase (PCR). As sequências de nucleotídeos de quatro marcadores gênicos (kDNA, catepsina L-like, SSU-rDNA e gGAPDH) foram exploradas para realizar uma análise filogenética.

RESULTADOS

A soroprevalência geral foi de 13% (43/330) em cães simultaneamente positivos no DPP®, ELISA e IFAT, sendo 13,9% (23/165) no Sertão e 12,1% (20/165) no São Francisco. Os fatores associados à alta prevalência de anticorpos de *L. infantum* em cães foram morar no município de Petrolina ($P = 0,045$) e apresentar lesões oculares ($P = 0,049$) ($P \leq 0,05$). Aglomerados significativos de cães positivos foram encontrados em áreas rurais. Os valores de positividade obtidos por PCR com base nos genes kDNA e catepsina L-like foram 6,7% (22/330) e 2,4% (8/330), respectivamente. Na análise filogenética, observou-se que todos os isolados obtidos apresentaram 100% de similaridade com *Leishmania infantum*.

CONCLUSÕES

Pela primeira vez, *L. infantum* foi confirmado como o agente etiológico da LVC nesta região. Assim, a avaliação da estrutura genética de populações de *Leishmania* spp. é importante para compreender os padrões de transmissão de LVC.

DESCRITORES

Leishmaniose canina, Diagnóstico, Geoprocessamento, Filogenia.

Corresponding author:

Mauricio Claudio Horta.

Laboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Univasf, Campus Ciências Agrárias. Rodovia BR 407, km 12, Lote 543, Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/n, CEP: 56300-990 Petrolina, PE, Brail. E-mail: horta.mc@hotmail.com
ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-3834-8398>.

Copyright: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons

Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original author and source are credited.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é causada pelo parasita protozoário *Leishmania infantum* (sinônimo de *Leishmania chagasi*) na América e Europa, é transmitida aos humanos através das picadas de moscas flebotomíneas fêmeas infectadas¹. Esta doença é considerada como um grave problema de saúde pública devido à sua rápida propagação e distribuição global. Estima-se que aproximadamente 200.000 a 400.000 novos casos ocorrem todos os anos no mundo². Na América do Sul, 97% dos casos notificados estão localizados no Brasil³, onde de 2007 a 2018 foram notificados mais de 40.000 casos⁴.

Nos últimos 30 anos, o nordeste do Brasil tem sido considerado a principal região endêmica do país. O número de casos humanos tem aumentado, uma vez que as melhorias alcançadas nesta região têm sido insuficientes para mitigar o risco da doença entre as populações mais afetadas⁵. Entre 2010 e 2018, foram confirmados 21.621 casos humanos de LV nesta região, entre os quais 5,1% ocorreram no estado de Pernambuco, com um número médio de 107 casos por ano e taxa de incidência média anual de 1,17 casos por 100.000 habitantes⁴.

A LV é historicamente endêmica em Pernambuco, com casos amplamente distribuídos pelo estado e registrados em todas as mesorregiões (ou seja, região metropolitana do Recife, região da Mata Atlântica, Agreste, Sertão e São Francisco)^{6,7}, apesar das suas diferentes características sociais, econômicas e geográficas⁸. Os dados epidemiológicos obtidos ao longo dos últimos doze anos (2007-2018) através do Sistema Nacional de Informação sobre Doenças Notificáveis (SINAN) mostram que houve aumento no número de casos de LV nas Mesorregiões do São Francisco e Sertão de Pernambuco. Alguns municípios destas regiões (ou seja, Lagoa Grande, Ouricuri, Petrolina, Santa Maria da Boa Vista, Salgueiro e Serra Talhada) foram apontados como prioritários para o controle desta doença. Estas áreas são consideradas de risco moderado a grave de transmissão⁹.

Os cães domésticos são considerados como os principais hospedeiros reservatórios de *L. infantum* em áreas urbanas, o que causa leishmaniose visceral canina (LVC)¹⁰. A infecção canina geralmente precede a infecção humana, dada a ligação entre cães e humanos e a elevada capacidade dos cães infectados de transmitir o parasita para o vetor^{10,11}.

Até 2011, as estratégias propostas através do programa de controle de diretrizes criadas pelo Ministério da Saúde brasileiro (MSB) basearam-se na identificação de cães infectados a partir do título de positividade para anticorpos IgG anti-*Leishmania* séricos através de um teste de imunofluorescência indireta (IFAT) para Triagem e ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) como o teste de confirmação¹². Apesar da elevada especificidade do IFAT, em 2012 foi substituído por um teste imunocromatográfico (TR DPP®; plataforma de duplo percurso) de execução rápida e fácil¹³. No entanto, alguns estudos relataram que este teste apresenta baixa sensibilidade, especialmente entre cães que são clinicamente normais, e reações cruzadas com outras *Leishmania* spp. (por exemplo, *Leishmania braziliensis*) e *Trypanosoma* spp¹³.

De fato, a população canina pode estar infectada por outras espécies além de *Leishmania infantum*¹⁴, as reações cruzadas com outras cepas do agente podem superestimar a prevalência de *Leishmania* spp. em muitas regiões do Brasil. Assim, classificar os parasitas de *Leishmania* a nível de espécie, por meio de análise filogenética, é essencial para controlar e prevenir surtos devido a outras formas de leishmaniose¹⁵⁻¹⁶.

Estudos epidemiológicos têm sido realizados, pois são importantes para encontrar e caracterizar as principais áreas de alta incidência de LV¹⁷. A análise espacial é uma das técnicas empregadas, a qual é amplamente utilizada e pode também indicar a distribuição das populações vetoriais e identificar as principais áreas que mostram dependência espacial entre o LVC e a LV hu-

mana, contribuindo assim para o controle da doença¹⁸.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi determinar a infecção por *Leishmania* entre cães domiciliados, executando análise espacial sobre a LV canina em seis municípios da mesorregião do São Francisco e Sertão. Além disso, o objetivo foi avaliar os fatores que podem estar associadas à soropositividade canina nestas áreas e identificar as espécies de *Leishmania* que infectam a população canina destas regiões.

MÉTODOS

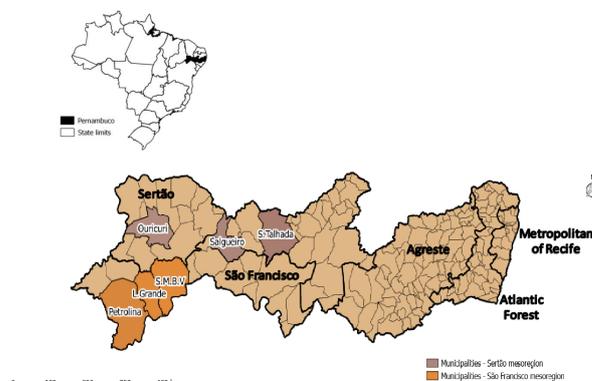
Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Investigação do uso de animais na Universidade Federal do Vale do São Francisco, sob o protocolo n.º. 0010/120215.

Área de estudo

O estado de Pernambuco está dividido em cinco mesorregiões (região metropolitana do Recife, Mata Atlântica, Agreste, Sertão e São Francisco) (Figura 1). Este estudo foi realizado em três municípios localizados na mesorregião do Sertão (Salgueiro, Serra Talhada e Ouricuri) e três na mesorregião do São Francisco (Petrolina, Lagoa Grande e Santa Maria da Boa Vista) (Figura 1). Esta zona situa-se na região semiárida, a uma altitude de 370-400 metros, dentro do bioma Caatinga também apresentando trechos de floresta decídua hiperxerófila¹⁹.

Figura 1. Mesorregiões do estado de Pernambuco e localização dos municípios da mesorregião do São Francisco (Petrolina, Lagoa Grande e Santa Maria da Boa Vista) e da mesorregião do Sertão (Ouricuri, Salgueiro e Serra Talhada), localizados no nordeste do Brasil.



Coleta de amostras e exame clínico

Este estudo foi realizado entre Agosto de 2016 e Janeiro de 2017. O tamanho da amostra foi determinado utilizando o *Software* Epi Info, versão 7.1, com 95% de intervalo de confiança, 2% de margem de erro e prevalência estimada de 11.2%²⁰. Considerando uma população infinita, a dimensão calculada da amostra necessária para o nosso estudo foram aproximadamente 330 cães, compreendendo 55 animais por município. Os pontos de amostragem foram selecionados de forma aleatória, e as amostras de sangue foram apenas coletadas de cães com seis meses ou mais que não haviam sido vacinados contra a leishmaniose.

As amostras de sangue foram obtidas de cada animal por meio de venopunção cefálica ou jugular, e foram colocados em tubos com EDTA. Depois da centrifugação, as amostras de sangue total foram separadas do coágulo de sangue e o sobrenadante do plasma, e depois foram armazenados a -20 °C até as análises sorológicas.

Cada cão foi examinado fisicamente por um veterinário para

identificar os principais sinais clínicos de LVC. Estes sinais poderiam incluir emaciação, epistaxe, icterícia, membrana da mucosa pálida (ocular e oral), apatia, linfadenomegalia (avaliação dos principais gânglios linfáticos poplíteos, pré-capulares e submandibulares), hepatoesplenomegalia (por meio de palpação abdominal), lesões oculares, alterações cutâneas (alopecia, dermatite, úlceras ou lesões nas orelhas, face e membros), caquexia, onicogribose e conjuntivite²¹.

Diagnóstico sorológico

As amostras de plasma assim obtidas foram testadas usando três diferentes testes sorológicos para detectar a presença de anticorpos IgG anti-*Leishmania*. Inicialmente, as amostras de soro foram rastreadas qualitativamente utilizando DPP®, produzido pela Fiocruz (Unidade Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil), e depois foram testadas utilizando kit comercial ELISA (IMUNODOT® *Leishmania*; Immunodot, Jaboticabal, São Paulo, Brasil). Todos os procedimentos para os ensaios DPP® e ELISA foram realizados conforme as instruções do fabricante. Finalmente, as amostras de soro foram testadas por meio do IFAT, como descrito anteriormente por Oliveira et al²². As formas promastigotas de *Leishmania infantum* (cepa CBT 153), originalmente isoladas dos gânglios linfáticos poplíteos de um cão naturalmente infectado, foram depositadas na Coleção Brasileira de Trypanosomatídeos (Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos), foram utilizadas como antígenos¹⁵. Amostras de soro Canino positivo e negativo foram utilizadas como controles. Para os cálculos de prevalência, apenas cães que foram soropositivos nos três testes (DPP®, IFAT e ELISA) foram considerados.

Fatores associados à soropositividade

Para cada cão amostrado, foi aplicado um questionário abrangente ao proprietário, a fim de obter informações sobre variáveis independentes que foram possivelmente associadas à sororeactividade para *L. infantum* (dependente variáveis); para descrever as características gerais e individuais da população canina e o seu ambiente; e para determinar os fatores associados a LVC nos seis municípios deste estudo.

Foram consideradas as seguintes variáveis: raça (mestiço ou puro-sangue); sexo (macho ou fêmea); idade (até 12, 13 a 84 ou > 84 meses); pelo de cão (claro ou escuro); tamanho (pequeno, médio ou grande); presença de área verde/árvore (sim ou não); zona urbana (sim ou não); zona rural (sim ou não); acesso às ruas (sim ou não); contato com outros animais (sim ou não); cuidados veterinários (sim ou não); contato com floresta/Caatinga (sim ou não); interação com a vida selvagem (sim ou não); presença de um galinheiro (sim ou não); e casos humanos de leishmaniose (dentro da residência e/ou bairro).

Análise espacial

As coordenadas geográficas das residências amostradas foram determinadas por meio do sistema de posicionamento global (GPS). Os dados foram combinado com o Software QGIS® v. 2.18, para criar mapas espaciais.

Com base no raio médio de voo do vetor da LV, de 250 m²³, zonas tampão de 250 m foram simuladas em torno de cães soropositivos, a fim de identificar zonas de maior risco para a presença de vetores infectados e, portanto, para a doença em cães e humanos.

Análise estatística

Para a análise sobre os fatores associados à soroprevalência, foi inicialmente realizada a análise univariável, na qual cada variável independente foi submetida a análise de associação em

relação à variável dependente (positividade nos testes sorológicos). A análise univariável foi realizada utilizando o teste de Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher²⁴. As variáveis que apresentaram o valor de $P \leq 0,2$ nestes testes foram selecionadas para a análise multivariável usando modelo de regressão logística²⁵. A colinearidade entre variáveis independentes foi verificada pela análise de correlação; para variáveis com forte colinearidade (coeficiente de correlação > 0,9), uma das duas variáveis foi excluída das análises múltiplas, de acordo com a sua relativa plausibilidade biológica²⁶. O nível de significância na análise múltipla foi de 5%. Os testes foram realizados utilizando o *Software* de análise estatística SPSS 20.0 para Windows.

Reação convencional em cadeia da polimerase (cPCR) e sequenciamento de DNA

As amostras de sangue foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit Wizard® de purificação do DNA genômico (Promega, Madison, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O DNA dos isolados de *Leishmania* foi extraído dos precipitados da cultura usando o método de fenol-clorofórmio¹⁵.

Para a triagem de amostras positivas, foram utilizados os iniciadores RV1 e RV2 para amplificar um fragmento de 145 pares de bases (pb) de *Leishmania spp.* kDNA²⁷, usando reagentes e condições térmicas descritas²⁸. Para amplificar um fragmento de 223 pb que correspondia a catepsina tipo L como um diagnóstico específico para *L. infantum*, os oligonucleotídeos iniciadores CatLeishF e CatLeishR foram utilizados, seguindo condições previamente descritas²⁹.

Os ensaios de PCR convencional (cPCR) foram realizados no termociclador Biocycler®, e os produtos de amplificação foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. As bandas foram coradas com brometo de etídeo e observadas sob transiluminação ultravioleta²⁸.

Análise filogenética

As sequências obtidas pela na cPCR foram alinhadas com as sequências recuperados do GenBank, usando Clustal X30, e foram ajustados manualmente usando GeneDoc v.2.6.0131. A árvore filogenética foi utilizada com a máxima parcimônia e análise Bayesiana. A máxima parcimônia foi implementada na versão PAUP 4.0b1032 com 500 réplicas do bootstrap. A análise Bayesiana foi realizada utilizando MrBayes v.3.1.233 com 1.000.000 de réplicas. As primeiras 25% das árvores foram desconsideradas e as árvores restantes foram utilizadas para calcular probabilidades bayesianas posteriores.

RESULTADOS

Os testes sorológicos para detectar a presença de anticorpos para *L. infantum* revelaram níveis de positividade de 27,9% (46/165), 37,6% (62/165) e 23,6% (39/165) na mesorregião Sertão; e 32,7% (54/165), 36,4% (60/165) e 23,6% (39/165) na mesorregião do São Francisco; por meio do DPP, ELISA e IFAT, respectivamente. Ao comparar os resultados entre os três testes de diagnóstico utilizados, foram observadas diferentes taxas de soroprevalência: DPP, 30,3% (100/330); ELISA, 37,0% (122/330); e IFAT, 23,6% (78/330).

A soroprevalência global foi de 13% (43/330), compreendendo 13,9% (23/165) na mesorregião do Sertão e 12,1% (20/165) na mesoregião do São Francisco. As taxas mais elevadas de positividade foram observadas nos municípios de Petrolina (25,4%), Serra Talhada (21,8%) e Ouricuri (12,7%) (Tabela 1).

Tabela 1. Soroprevalência da leishmaniose visceral canina (LVC) dos municípios da mesorregiões do São Francisco e Sertão. Apenas cães com resultados positivos nos três testes (DPP®, IFAT e ELISA) foram considerados soropositivos.

Municípios	Cães		Sorologia		Taxa de positividade
	(n)	(%)	Positivo	Negative	(%)
Petrolina	55	16,7	14	41	25,4
L.Grande	55	16,7	5	50	9,1
S.M.B.V	55	16,7	1	54	1,8
Salgueiro	55	16,7	4	51	7,2
Serra Talhada	55	16,7	12	43	21,8
Ouricuri	55	16,7	7	48	12,7
Total	330	100	43	287	13,0

* L. = (Lagoa), S.M.B.V = Santa Maria da Boa Vista, (n) = número de cães.

Em relação a possíveis associações entre variáveis independentes ($P \leq 0,20$) e a soropositividade entre os cães (Tabela 2), a variável viver no município de Petrolina foi selecionada para análise multivariada. Isto mostrou que houve uma diferença estatística significativa ($P \leq 0,05$) (Tabela 3).

Aproximadamente 48,5% (160/330) dos cães apresentavam sinais clínicos compatíveis com LVC e 62,8% (27/43) dos animais soropositivos apresentavam sinais clínicos. Estas incluíam as seguintes: úlceras ($P = 0,019$), onicogribose ($P = 0,084$), linfadenomegalia nos gânglios linfáticos poplíteos ($P = 0,017$), caquexia ($P = 0,145$), apatia ($P = 0,119$), hepatoesplenomegalia ($P = 0,000$) e lesões oculares ($P = 0,000$). Todos foram significativamente associados a presença de anticorpos contra *L. infantum* ($P \leq 0,20$) (Tabela 2). Entre estas variáveis independentes, as lesões oculares mostraram uma diferença significativa na análise multivariada ($P = 0,049$) e foi associada de forma significativa com soropositividade para *L. infantum* (Tabela 3).

Tabela 2. Análise univariada com a distribuição das variáveis associadas a *Leishmania spp.* em cães da região do São Francisco e mesorregião do Sertão, nordeste, Brasil.

Variável	Categoria	N° total de animais	Positivos (%)	RP ^a	IC 95% ^b	P-valor [*]
Linfonodo poplíteo	Não	235	24 (10,2)	2.19	1.14 - 4.23	0.017
	Sim	95	19 (20)			
Caquexia	Não	314	39 (12,4)	2.35	0.72 - 7.65	0.145
	Sim	16	4 (25)			
Apatia	Não	328	42 (12,8)	6.81	0.41 - 110.94	0.119
	Sim	2	1 (50)			
Hepatoesplenomegalia	Não	328	41 (12,5)	1.04	0.98 - 1.12	0.000
	Sim	2	2 (100)			
Úlceras	Não	319	39 (12,2)	4.10	1.14 - 14.65	0.019
	Sim	11	4 (36,4)			
Onicogribose	Não	288	34 (11,8)	2.03	0.89 - 4.62	0.084
	Sim	42	9 (21,4)			
Lesões oculares	Não	326	40 (12,3)	21.45	2.17 - 211.23	0.000
	Sim	4	3 (75)			
Municípios	Lagoa Grande	55	5 (9,1)	-	-	0.001
	Ouricuri	55	7 (12,7)			
	Petrolina	55	14 (25,4)			
	Salgueiro	55	4 (7,3)			
	S. M. Boa Vista	55	1 (1,8)			
	Serra Talhada	55	12 (21,8)			

S.M. Boa Vista: Santa Maria da Boa Vista

^aRazão de probabilidade; ^bintervalo de confiança 95%; ^{*} $P \leq 0.2$

Tabela 3. Análise multivariada dos fatores associados à infecção por *Leishmania* nos municípios do estudo.

Variável	Coefficiente estimado	Erro padrão	Wald Qui quadrado	Razão prevalência	95% intervalo de confiança	P-valor [*]
Município de Petrolina	1.313	0.656	4.003	3.718	1.027-13.458	0.045*
Lesão ocular	2.577	1.310	3.867	0.076	0.006-0.991	0.049*

^{*} $P \leq 0.05$

Os cães positivos e negativos de cada residência estavam amplamente distribuídos nos seis municípios do estudo (Figura 2). Entretanto, na análise das zonas tampão, aglomerados significativos de cães positivos foram observados na área rural de cada município (Figura 3).

Figura 2. Cães soropositivos para a presença de anticorpos anti-*Leishmania* nos municípios do estudo.

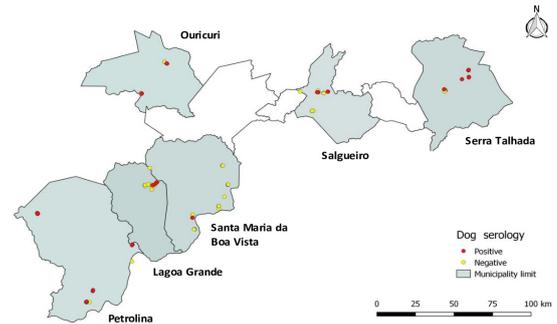
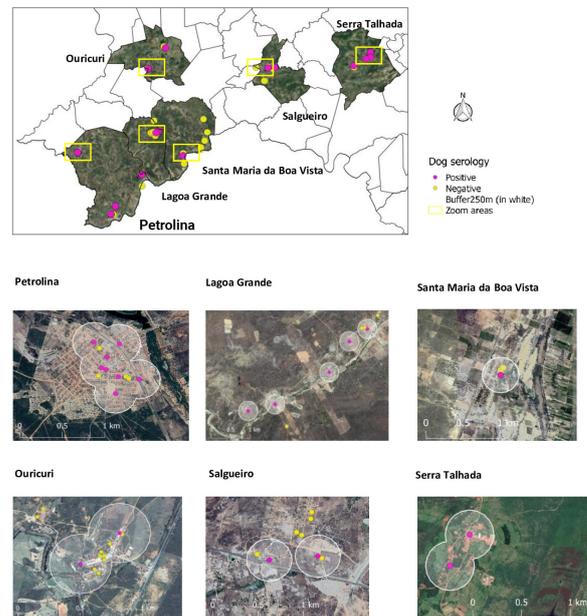


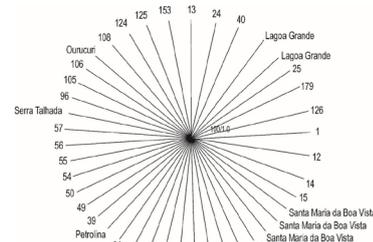
Figura 3. Localização do tampão com um raio médio de 250 m ao redor dos cães soropositivos para *Leishmania spp.* nos municípios do estudo. Aglomerados de cães positivos foram observados nas áreas rurais dos municípios.



Os produtos da cPCR de tamanho esperado foram amplificados de 22 amostras de cães (6,7%; $n = 330$) utilizando oligonucleotídeos gene-específico para o marcador genético kDNA de *Leishmania spp.* Além disso, oito amostras de cães (2,4%; $n = 330$) revelaram na PCR, a presença de *L. infantum* detectando o gene catepsina tipo L.

Oito seqüências [Lagoa Grande (2), Ouricuri (1), Petrolina (1), Santa Maria da Boa Vista (3) e Serra Talhada (1)] foram obtidas no sequenciamento de nucleotídeos a partir dos fragmentos amplificados (Figura 4). Na análise filogenética, observou-se que todas as seqüências de catepsina tipo L de *L. infantum* eram idênticas (Figura 4). Não houve segregação dos isolados de acordo com a origem geográfica das seqüências obtidas em cada região amostrada.

Figura 4. Dendograma baseado em seqüências catepsina do tipo L dos 36 isolados de *L. infantum* e 8 seqüências obtidas e utilizadas na análise da máxima parcimônia e da inferência bayesiana. Os valores de suporte são mostrados nos ramos (bootstrap/ probabilidade a posteriori).



DISCUSSÃO

Os cães desempenham um papel importante como reservatórios domésticos de *L. infantum* e são capazes de apresentar um parasitismo cutâneo intenso, contribuindo assim para a manutenção do ciclo de transmissão de LV em humanos. Assim, a detecção de infecção em cães é o principal meio para determinar a situação atual da LV em qualquer dado município³⁴.

A prevalência global de LVC (13%, compreendendo 13,9%, ou seja, 23/165, no Sertão; e 12,1%, ou seja, 20/165, no São Francisco) no presente inquérito foi superior ao que tinha sido anteriormente detectado em áreas endêmicas no nordeste do Brasil³⁵⁻³⁶.

De fato, ao longo dos últimos anos, tem ocorrido um aumento no número médio de casos de LV humana nas regiões do presente estudo. O município de Petrolina mostra o maior número médio de casos por 100.000 habitantes (14,8), seguido de Salgueiro (8,4), Santa Maria da Boa Vista (5,6), Ouricuri (5,2), Serra Talhada (4,5) e Lagoa Grande (2,3)⁴.

Os estudos epidemiológicos realizados ao longo dos últimos anos em Petrolina mostraram prevalências de LVC variando de 11,2% a 34%^{15,20}. Isto é considerado como uma área de transmissão intensa da LV⁶. Estes dados apoiam as conclusões do presente estudo, porque a maior taxa de soroprevalência (25,4%) na mesorregião do São Francisco foi encontrada neste município. Isto também destaca o fato de Petrolina permanecer frequentemente um município com taxas de infecção mais elevadas²⁰.

Apesar das prevalências em Lagoa Grande (9,1%) e Santa Maria da Boa Vista (1,8%) terem sido mais baixas da mesorregião do São Francisco, Evaristo et al³⁸. observaram, num estudo epidemiológico realizado nestas regiões, que estes municípios são zonas endêmicas com um elevado risco de transmissão. No entanto, é importante salientar que os estudos de prevalência dependem do tipo de teste sorológico empregado e o número de cães avaliados³⁴.

Na mesorregião do Sertão, a prevalência de anticorpos anti-*L. infantum* na população canina era maior no município de Serra Talhada (21,8%), seguido de Ouricuri (12,7%) e Salgueiro (7,2%). Apesar das prevalências observadas nestes municípios, não há estudos soroprevalências de LVC conduzidos nestas áreas, o que pode prejudicar a análise epidemiológica da doença e possibilita o seu crescimento silencioso¹¹.

A variação da soroprevalência da LVC entre as áreas estudadas aqui, pode ser associada ao status econômico e as suas características ambientais e geográficas⁴⁰.

No nosso estudo, 21,8% (72/330) dos cães foram soropositivos em ambos os testes DPP e ELISA. Além disso, quando os resultados dos três testes (DPP, ELISA e IFAT) foram considerados simultaneamente, a soropositividade diminuiu a 13,0% (43/330). Isto indica que a utilização combinada de dois testes com sensibilidade, como o DPP e o ELISA⁴¹, sem utilizar um teste com maior especificidade, como o IFAT, pode elevar a sensibilidade do resultado e gerar falsos positivos¹³.

A presença de manifestações clínicas contribui para a realização do diagnóstico precoce da doença e pode indicar a fase da infecção⁴². Neste trabalho, 62,8% dos cães soropositivos mostraram sinais clínicos de LVC. Úlceras, onicogribose, linfadenomegalia e caquexia foram os sinais clínicos mais prevalentes, semelhantes ao que foi observado por Assis et al⁴³. Além disso, a presença de lesões oculares foi significativamente associada a soropositividade para *Leishmania*. Os cães clinicamente infectados apresentam uma maior resposta humoral contra o parasita⁴⁴. São mais facilmente detectados em testes com sensibilidade, o que melhora o diagnóstico de casos clinicamente suspeitos. No entanto, o diagnóstico de cães infectados com ausência de sinais clínicos típicos de LVC ainda é um ponto crítico importante no diagnóstico da doença⁴⁵.

Observou-se que entre os cães, viver no município de Petrolina era um fator de risco de infecção com *Leishmania spp.*

Esta descoberta, juntamente com a elevada soroprevalência encontrada neste município, enfatiza a necessidade de mais ações de vigilância e controle contra esta doença. O objetivo precisa estar voltado para a diminuição da taxa de infecção entre os cães e, conseqüentemente, evitar o surgimento de novos casos humanos²⁰.

Em relação às zonas tampão de 250m que foram formadas em torno dos cães, foram observados agrupamentos de cães infectados nas zonas rurais dos municípios, indicando assim que a população vetorial infectada pode estar presente com maior frequência nestas áreas⁴⁶. A partir desta descoberta, as atividades de educação destinadas à saúde podem estar voltadas para a redução da população de insetos vetores concentrando-se nas áreas específicas de distribuição do vetor. Isto permite o controle mais eficaz contra a doença, na prevenção e diminuição do surgimento de novos casos caninos e humanos⁴⁷.

A detecção de genes espécies-específicos a partir de DNA tem sido aplicado para diagnóstico dos parasitas de *Leishmania* em casos clínicos de infecção canina e em estudos epidemiológicos⁴⁸⁻²⁹.

Em relação aos testes moleculares, verificou-se que a frequência de cães positivos era de 6,7% utilizando oligonucleotídeos iniciadores para o gene kDNA específico de *Leishmania spp.* No entanto, apenas 2,4% foram positivos quando se utilizou oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene semelhante ao cathepsina do tipo L, o qual é específico para *Leishmania infantum*. O gene semelhante ao cathepsina tipo L é um bom marcador para análise filogenética sobre o gênero *Leishmania*. Permite melhor diagnóstico clínico na diferenciação das formas clínicas da doença, melhorando assim o prognóstico clínico para os animais⁴⁹. Embora o gene kDNA tenha mostrado maior positividade que o gene da cathepsina, não foi específico para *Leishmania infantum*. Assim, é possível supor que outras espécies podem existir na região ou que podem ocorrer reações não específicas com outros agentes¹⁵.

Os marcadores baseados nos genes SSU-rDNA e gGAPDH não amplificaram. Isto pode indicar que eles têm sensibilidade e especificidade diferentes. Estas observações enfatizam a importância de, sempre que possível, realizar ensaios de PCR com oligonucleotídeos iniciadores que visam vários genes, especialmente em amostras como o sangue, em que a carga parasitária tende a ser baixa⁵⁰.

A identificação de *L. infantum* como a variante canina nos municípios do presente estudo contribui com novos conhecimentos sobre a epidemiologia do LVC⁴⁸. Portanto, em áreas endêmicas para a LV, é essencial manter as abordagens epidemiológicas atualizadas para identificar novas variantes do agente, contribuindo assim para um diagnóstico adequado da doença²⁹.

A presença do agente pode ser vista na mesorregião do São Francisco e Sertão, com elevada prevalência sorológica entre os cães domiciliados e agrupamentos de cães positivos na zona rural dos municípios. Pela primeira vez, a presença de *Leishmania infantum* foi caracterizada nesta região. No entanto, não foi observada diferença filogenética entre as estirpes obtidas. Os dados deste estudo indicam que há necessidade de mais estudos sobre as espécies de *Leishmania* identificadas nesta região, a fim de obter melhor compreensão da epidemiologia da LV e melhorar as medidas para controlar e prevenir esta doença.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Deborah Santos, Elaine Serafim e Eline Almeida pela valiosa ajuda durante o trabalho de campo; a Edmilson Júnior pelo apoio nas atividades laboratoriais; à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro (APQ-0724-5.05/15); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de Produtividade Científica à M.C. Horta.

REFERÊNCIAS

- World Health Organization WHO [Internet]. Leishmaniasis. Epidemiological situation; 2019 [cited 2020 Apr 16]. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/epidemiology/en/index.html>
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, denBoer N. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012; 7:e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>.
- PAHO - Pan American Health Organization [Internet]. Report Leishmaniasis; 2019 [cited 2020 Mar 10]. Available from: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51738/leishreport8_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y. (accessed 10.03.2020)). 2019.
- Sistema de Informação de Agravos de Notificação SINAN [Internet]. Casos de Leishmaniose Visceral humana; 2019 [cited 2020 Mai 15]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/cnv/leishvP E.def>. 2019.
- Machado CAL, Sevá AP, Dantas-Torres F, Horta MC. Spatial analysis and epidemiological profile of visceral leishmaniasis, northeastern Brazil: A cross-sectional study. *Acta Trop*. 2020; 208:105520. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105520>.
- Dantas-Torres F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. *Rev Saude Publica*. 2006; 40(3):537-541. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102006000300024>.
- Araujo AC, Gonçalves NNVM, Dantas-Torres F, Ferreira F, Horta MC. Visceral Leishmaniasis in Petrolina, State of Pernambuco, Brazil, 2007-2013. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2016a; 58:29. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201658029>.
- IBGE - Divisão territorial brasileira [Internet]. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2016 [cited 2020 Mar 25]. Available from: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pe>.
- Pernambuco [Internet]. Plano integrado de ações para o enfrentamento às doenças negligenciadas no Estado de Pernambuco/SANAR - 2015-2018. Recife: Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco; 2018 [cited 2020 Jul 10].
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trend Parasitol*. 2008; 24(7):324-330. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>.
- Laurenti MD, Rossi CN, Matta LVR, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC, Pimenta PFP, Marcondes M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol*. 2013; 196(3-4):296-300. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.017>.
- Grimaldi G, Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto IS, de Azevedo CT. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CLV rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012; 106(1):54-59. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.10.001>.
- Mendonça IL, Batista JF, Schallig H, Pires e Cruz MS, Alonso DP, Ribolla PM, Costa DL, Costa CHN. The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2017; 59:e39. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201759039>.
- Sanches LC, Martini CC, Nakamura AA, Santiago MEB, Lima BD, Lima VMF. Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and their implications for disease control. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2016; 25(4):465-469. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016071>.
- Marcili A, Sperana MA, da Costa AP, Madeira M de F, Soares HS, Sanches C de O, Acosta I da C, Giroto A, Minervino AH, Horta MC, Shaw JJ, Gennari SM. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. *Infect Genet Evol*. 2014;25:44-51. doi:10.1016/j.meegid.2014.04.001.
- Souza NA, Leite RS, Silva SO, Penna MG, Vilela LFF, Melo MN, Andrade ASR. Detection of Mixed *Leishmania* Infections in Dogs From an Endemic Area in Southeastern Brazil. *Acta Trop*. 2019; 193:12-17. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.02.0.
- Werneck GL, Costa CH, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiol Infect*. 2007; 35(2):195-201. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268806006881>.
- Lins TNB, Souza IB, Barros GMMR, Santos CVB, Silva RP, Alves LC, Carvalho GA, Ramos RAN. Seroprevalence and spatial distribution of canine leishmaniasis in an endemic region in Brazil: how has the situation changed after 10 years? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018; 51(5):680-682. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0087-2018>.
- IBGE - Cities [Internet]. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2011 [cited 2020 Oct 19]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/link.php?uf=ma>.
- Araujo AC, Costa AP, Silva IWG, Matos NNVG, Dantas ACS, Ferreira F, Horta MC. Epidemiological aspects and risk factors for infection by *Leishmania infantum chagasi* in dogs from municipality of Petrolina, Northeastern Brazil. *Vet Parasitol Reg Stud Rep*. 2016b; 3-4:41-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.07.001>.
- Amusatogui I, Sainz A, Rodríguez F, Tesouro MA. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur J Epidemiol*. 2003; 18(3):147-156. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1023090929302>.
- Oliveira CL, Moraes MHF, Machado-Coelho GLL. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: Challenges for control. *Cad Saude Publica*. 2008; 24:2953-2958. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200026>.
- Oliveira KM, Wainfas RL, Arnbio A, Figueiro R. Ecological and social determinants of leishmaniasis in the Legal Amazon, Brazil. *Acta Scient Technol*. 2013;1(2):13-19. <https://doi.org/10.17648/uezo-ast-v1i2.13>.
- Zar, JH. Biostatistical analysis. entice Hall: Upper Saddle River. 4nd ed; 1999. p.663.
- Hosmer, DW, Lemeshow S. Applied logistic regression. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons; 2000. p.375.
- Dohoo IR, Ducrot C, Fourichon C, Donald A, Hurnik D. An overview of techniques for dealing with large numbers of independent variables in epidemiologic studies. *Prevent Vet Med*. 1996; 29:221-239.
- Le fichoux Y, Rousseau D, Ferrua B, Ruetter S, Lelievre A, Grousseau D, Kubar J. Short- and long- term efficacy of hexadecylphosphocoline against established *Leishmania infantum* infection in Balb/c mice. *J Antimicrob Chemother*. 1998; 42: 654-658.
- Ravel S, Cuny G, Reynes J, Veas F. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* with in human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Trop*. 1995; 59:187-96. [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(95\)00079-T](https://doi.org/10.1016/0001-706X(95)00079-T).
- Silva RE, Sampaio BM, Tonhosolo R, Costa AP, Costa LES, Nieri-Bastos FA, Sperana MA, Marcili A. Exploring *Leishmania infantum* cathepsin asa new molecular marker for

- phylogenetic relationships and visceral leishmaniasis diagnosis. *Infect Dis.* 2019; 19:895. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4463-8>.
30. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25:4876-82.
 31. Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.J.R., Deerfield, D.W., 1997. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation *Emb News.* 4, 14.
 32. Wilgenbusch JC, Swofford D. Inferring evolutionary trees with PAUP/. *Curr. Protoc. Bioinform.* 2003; 64:6.
 33. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 2001; 17:754-755.
 34. Rondon FCM, Bevilaqua CML, Franke CR, Barros RS, Oliveira FR, Alcântara AC, Diniz AT. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. *Vet Parasitol.* 2008; 155 (1-2):24-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.014>.
 35. Brito FG, Langoni H, Silva RC, Rotondano TE, Melo MA, Paz GS. Canine visceral leishmaniasis in the Northeast Region of Brazil. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2016; 22, 15. <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0069-4>.
 36. Rocha MAN, Matos-Rocha TJ, Ribeiro CMB, Abreu SRO. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in State of Alagoas, Northeast, Brazil. *Braz Jour Biol.* 2018; 78:609-614. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.166622>.
 37. Pimentel DS, Ramos R, Santana MA, Maia CS, Carvalho GA, Silva HP, Alves LC. Prevalence of zoonotic visceral leishmaniasis in dogs in an endemic area of Brazil. *Rev Soc Bras Med Tro.* 2015; 48 (4):491-493. <http://dx.doi.org/10.1590/037-8682-0224-2014>.
 38. Evaristo AMDCF, Sevá ADP, Oliveira GMB, Silva IWGD, Ferreira MS, Souza EAR, Silva JAM, Azevedo SS, Horta MC. Canine leishmaniasis in the semi-arid region of Pernambuco, northeastern Brazil: epidemiology, factors associated with seropositivity and spatial analysis. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2020; 29 (2): e001120. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020027>.
 39. Silva RBS, Mendes RS, Santana LV, Souza HC, Ramos CPS, Souza AP, Andrade PP, Melo M.A. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. *Pesq Vet Bras.* 2016; 36 (7):625-629. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2016000700011>.
 40. Sevá AP, Mao L, Galvis-Ovallos F, Lima JMT, Valle D. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. *PLoS. Negl Trop Dis.* 2017; 11 (2):e0005353. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005353>.
 41. Ramírez L, Moura LD, Mateus NLF, Moraes MH, Nascimento LFM, Melo NJ, Taketa LB, Catecati T, Huete SG, Penichet K, Piranda EM, Oliveira AG, Steindel M, Barral-Netto M, Cruz MSPE, Barral A, Soto M. Improving the Serodiagnosis of Canine *Leishmania infantum* Infection in Geographical Areas of Brazil With Different Disease Prevalence. *Parasitol. Epidemiol Control.* 2019; 8:e00126. doi:10.1016/j.parepi.2019.e00126.
 42. Reis LC, Brito MEF, Souza MA, Pereira VRA. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. *Rev Patol Trop.* 2006; 35 (2):103-115. <https://doi.org/10.5216/rpt.v35i2.1899>.
 43. Assis J, Queiroz NM, Silveira RC, Nunes CM, Oliveira TM, Junior AC, Neves MF, Machado RZ, Buzetti WAS. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. *Rev Bras Parasitol Vet* 2010; 19:17-25. <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01901004>.
 44. Fernandez-Cotrina J, Iniesta V, Belinchón-Lorenzo S, Muñoz-Madrid R, Serrano F, Parejo JC, Gómez-Gordo L, Soto M, Alonso C, Gómez-Nieto LC. Experimental model for reproduction of canine visceral leishmaniasis by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 2013; 192 (1-3):118-128. doi:10.1016/j.vetpar.2012.10.002.
 45. Salomón OD, Pérez AA, Riarte AR, Casas N, Fragueiro-Frías V, Negri V, Santini MS, Liotta DJ. Performance of Rapid Tests for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis in Argentina. *Medicina (B Aires).* 2020; 80 (2): 103-.
 46. Abrantes TR, Werneck GL, Almeida AS, Figueiredo FB. Environmental factors associated with canine Visceral Leishmaniasis in an area with recent introduction of the disease in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2018; 34 (1): 7-10. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311x00021117>.
 47. Araujo AC, Costa AP, Silva IWG, Matos NNVG, Dantas ACS, Ferreira F, Horta MC. Epidemiological aspects and risk factors for infection by *Leishmania infantum* chagasi in dogs from municipality of Petrolina, Northeastern Brazil. *Vet Parasitol Reg Stud Rep.* 2016b; 3-4:41-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.07.001>.
 48. Souza NA, Leite RS, Silva SO, Penna MG, Vilela LFF, Melo MN, Andrade ASR. Detection of Mixed *Leishmania* Infections in Dogs From an Endemic Area in Southeastern Brazil. *Acta Trop.* 2019; 193:12-17. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.02.016.
 49. Silva-Almeida M, Pereira BAS, Ribeiro-Guimarães ML, Alves CR. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasit Vectors.* 2012; 5:160. doi: 10.1186/1756-3305-5-160.
 50. Sundar S, Singh A. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis : present and future developments. *Parasitol.* 2018; 145 (4):481-489. doi: 10.1017/S0031182017002116.