



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ELOIZA TELES CALDART

**INVESTIGAÇÃO ESPACIAL E MOLECULAR DAS  
LEISHMANIOSES EM HUMANOS E ANIMAIS NO NORTE  
DO PARANÁ**

---

Londrina  
2019

**ELOIZA TELES CALDART**

**INVESTIGAÇÃO ESPACIAL E MOLECULAR DAS  
LEISHMANIOSES EM HUMANOS E ANIMAIS NO NORTE  
DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal da Universidade Estadual de  
Londrina como requisito parcial para a obtenção do  
título de Doutor.

Orientador: Italmir Teodorico Navarro  
Co-orientadora: Regina Mitsuka-Breganó

Londrina  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Caldart, Eloiza Teles.

Investigação espacial e molecular das leishmanioses em humanos e animais do Norte do Paraná / Eloiza Teles Caldart. - Londrina, 2019.  
106 f. : il.

Orientador: Itamar Teodorico Navarro.

Coorientador: Regina Mitsuka-Breganó.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, , 2019.  
Inclui bibliografia.

1. Vigilância epidemiológica ativa - Tese. 2. Saúde única - Tese. 3. Sentinela - Tese. 4. Atropelamento - Tese. I. Navarro, Itamar Teodorico . II, Mitsuka-Breganó, Regina. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. . IV. Título.

ELOIZA TELES CALDART

**INVESTIGAÇÃO ESPACIAL E MOLECULAR DAS LEISHMANIOSES  
EM HUMANOS E ANIMAIS NO NORTE DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal da Universidade Estadual de  
Londrina como requisito parcial para a obtenção do  
título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof Dr Itamar Teodorico Navarro  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa Dra Silvia Cristina Osaki  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

---

Profa Dra Daniela Dib Gonçalves  
Universidade Paranaense - UNIPAR

---

Profa Dra Luciane Holsback Silveira Fertoni  
Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

---

Profa Dra Ivete Conchon Costa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 22 de março de 2019.

Aos três meninos que dão vida à minha vida.

## AGRADECIMENTOS

De início agradeço a Deus pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal oferecidas, pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho e por confiar que seria capaz de cumprir as missões dadas até aqui.

Agradeço aos meus pais por todo o alicerce de caráter, força de vontade e gosto pela educação, por terem se esforçado muito para que eu tivesse a melhor formação possível, o que certamente facilitou muito minha chegada ao quinto grau acadêmico.

Agradeço a minha irmã Ana Carolina por ser minha irmã e por me ensinar de maneira tão natural que o tamanho da dificuldade depende unicamente da importância que você dá a ela.

Ao meu esposo Marlon e aos meus filhos Yan e Yuri não sou apenas grata, mas ciente de que cada passo foi dado com a força do sorriso deles me incentivando e com o jeito leve deles de levar a vida me mostrando que cada dificuldade era só mais uma que com amor conseguiríamos superar.

Ao meu orientador prof Itamar Navarro agradeço a confiança dada desde o início da minha caminhada na UEL, por enxergar a minha família como uma vantagem na minha trajetória acadêmica e não como um entrave e pela liberdade pela qual toda mente curiosa é ávida.

A minha co-orientadora prof<sup>a</sup> Regina Mitsuka-Breganó agradeço pelo fato de ter trocado o CCB pelo CCA em tempo de fazer parte da minha vida acadêmica, por ser exemplo de mulher que mesmo firme, acolhe; que enxerga nossas necessidades, que com empatia compreende os anseios das incertezas da carreira acadêmica e não nos deixa desistir.

Agradeço às contribuições dadas pelas bancas de qualificação e de defesa do doutorado, ambas formadas por mulheres maravilhosas que fazem ciência: Alice Alfieri, Liza Ogawa, Roberta Freire, Daniela Dib, Silvia Osaki, Luciane Holsback e Ivete Conchon.

Sou grata por cada dia dividido na vida com minha amiga Fernanda Ferreira, foram dias de luta, dias de glória; mas acima de tudo foram dias de propósito, pois não saímos do conforto do lar se não for para dar o nosso melhor.

Agradeço às minhas amigas Aline Ticiani, Juliana Bernardes e Andressa Rorato pela parceria na vida e na ciência, pelos sorrisos, pelos puxões de orelha, pelo incentivo, pelas comilanças e por existirem.

Aos alunos de iniciação científica Bianca Soares, Stéphanie Dalmassa,

Amanda Bertão e Mateus Dutra por oportunizarem minhas primeiras experiências de orientação e pelo fato de que o sucesso de vocês passou a ser sinônimo do meu sucesso.

Sou grata a todos os professores, funcionários, graduandos e pós-graduandos do departamento de medicina veterinária preventiva da UEL que, de alguma forma, desejaram a felicidade da minha família.

Sou grata a todos os meus familiares pelo suporte, pelo incentivo, pela compreensão e mesmo não compreendendo muito bem o que eu fazia não ficavam perguntando se eu só estudava.

São tantas pessoas a quem sou grata que peço desculpas por não poder nomear a todas.

Por fim, só Deus sabe o quanto sou grata por estar entregando essa tese de doutorado para assumir o cargo de Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> colaboradora na Universidade Estadual de Londrina. É uma luta de, no mínimo, 15 anos se concretizando. É um novo ciclo que se inicia, cheio de entusiasmo, com o mesmo amor pela vida de sempre e, se for da vontade de Deus, em companhias maravilhosas novamente!

“Ao amor, todo o crédito.”

Eloiza Teles Caldart

CALDART, Eloiza Teles. **Investigação espacial e molecular das leishmanioses em humanos e animais no Norte do Paraná.** 2019. 106 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

As leishmanioses são agravos zoonóticos negligenciados cujas principais formas clínicas são: tegumentar e visceral; a primeira é endêmica no Norte do Paraná em seres humanos e em animais, enquanto que da segunda nenhum caso autóctone foi registrado na mesma região até o momento. O objetivo da presente tese de doutorado foi investigar a ocorrência das leishmanioses em humanos e animais de municípios do Norte do Paraná do ponto de vista espacial e molecular com a finalidade de fornecer informações aos gestores de saúde que auxiliem na tomada de decisão e elaboração de novos programas de prevenção e controle. Foram georreferenciados os casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) humana notificados de 2007 a 2016 nas 18<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup> e 15<sup>a</sup> regionais de saúde (RS) do Paraná. Desses casos foram avaliados aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, bem como foi analisada a influência de variáveis climáticas, econômicas e ambientais. No período do estudo houve picos de casos em 2008, 2012 e 2015, demonstrando o já conhecido perfil cíclico do agravo. A forma clínica cutânea foi predominante (88,3%), casos novos corresponderam a 90,8% das notificações, 7,8% foram recidivas, 92,2% dos casos evoluíram para cura, 3,0% abandonaram o tratamento. Foi notificado óbito por LTA em quatro indivíduos. Na análise de regressão foi observado que quanto menor a proporção de Mata Atlântica remanescente, maior a incidência de LTA no município. Por meio da análise de agrupamentos pode-se observar que em municípios da 15<sup>a</sup>RS foi observada concentração de abandono de tratamento em relação aos casos curados. Em se tratando de leishmaniose visceral (LV), realizou-se vigilância epidemiológica ativa de casos caninos e em fauna silvestre atropelada. Em um canino errante do município de Londrina (17<sup>a</sup>RS) a positividade foi relatada para o gênero *Leishmania* em testes sorológicos, moleculares e citológicos; o diagnóstico oficial de LV foi feito pelo Laboratório Central do Paraná (LACEN) e, por meio de de um relatório oficial, iniciou-se a investigação para a verificação de autoctonia. No entanto, nem o vetor, nem novos casos caninos, nem a origem do animal doente foram identificados. Com relação à vigilância em animais silvestres atropelados, amostras de medula óssea, linfonodo, baço, fígado e pele de ponta de orelha de 66 mamíferos coletados em ruas e rodovias de 24 municípios do Norte do Paraná foi testada para a presença de DNA de *Leishmania* spp., constatou-se que um tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) estava infectado com o parasito *Leishmania* do subgênero *Viannia*. Os dados apresentados no presente trabalho demonstram que medidas preventivas e de educação em saúde voltadas a LTA devem ser direcionadas às áreas de maior degradação da mata nativa; bem como, as consequências do abandono do tratamento devem ser melhor esclarecidas aos pacientes. Levando-se em consideração o risco da entrada da LV no Norte do Paraná através municípios endêmicos do oeste paulista, a vigilância epidemiológica ativa e precoce da mesma deve ser constante. Para tal, a metodologia padronizada pelo presente estudo pode ser empregada, a técnica baseada na detecção de DNA de *Leishmania* em fauna silvestres atropelada demonstrou ser efetiva.

**Palavras-chave:** Vigilância epidemiológica ativa. Georreferenciamento. Atropelamento. Sentinela. Saúde única.

CALDART, Eloiza Teles. **Spatial and molecular investigation of the leishmaniasis in humans and animals in North of Paraná.** 2019. 106 p. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected zoonotic diseases whose main clinical forms are: tegumentary and visceral; the first is endemic in the north of Paraná in humans and animals, while no autochthonous case of the second has been recorded in the same region to date. The objective of the present thesis was to investigate the occurrence of leishmaniasis in humans and animals from the municipalities of the North of Paraná from the spatial and molecular point of view, in order to provide information to health managers that help in decision making and new prevention and control programs. The cases of human American tegumentary leishmaniasis (ATL) notified from 2007 to 2016 in the 18th, 17th, 16th and 15th regional health centers (RHC) of Paraná were georeferenced. From these cases, clinical, epidemiological and laboratory aspects were evaluated, as well as the influence of climatic, economic and environmental variables. During the study period there were case peaks in 2008, 2012 and 2015, demonstrating the already known cyclic profile of the disease. The cutaneous clinical form was predominant (88.3%), new cases corresponded to 90.8% of the notifications, 7.8% were relapses, 92.2% of cases evolved to cure, and 3.0% abandoned treatment. Death was reported by ATL in four individuals. In the regression analysis it was observed that the lower the proportion of remaining Atlantic Forest, the higher the incidence of ATL in the municipality. By means of cluster analysis it can be observed that in municipalities of the 15th RHC the concentration of treatment abandonment was observed in relation to the cured cases. About visceral leishmaniasis (VL), active epidemiological surveillance of canine cases and on run-over wildlife was carried out. In a street dog from the municipality of Londrina (17<sup>a</sup> RHC) the positivity was reported for the genus *Leishmania* in serological, molecular and cytological tests; the official diagnosis of VL was made by the Central Laboratory of Paraná (LACEN) and, through an official report, the investigation was begun for the verification of autochthony. However, neither the vector, nor new canine cases nor the origin of the diseased animal were identified. Regarding surveillance in wild animals, samples of bone marrow, lymph node, spleen, liver and ear-tipped skin of 66 mammals collected on streets and highways of 24 municipalities in the North of Paraná were tested for the presence of *Leishmania* spp. DNA. One lesser-anteater (*Tamandua tetradactyla*) was found to be infected with the *Leishmania* parasite of the subgenus *Viannia*. The data presented in the present study demonstrate that preventive and health education measures focused on ATL should be directed to the areas of greater degradation of the native forest; as well as the consequences of discontinuation of treatment should be better informed to patients. Taking into account the risk of VL entering the North of Paraná through endemic municipalities in the west of São Paulo, the active and early epidemiological surveillance of the disease must be constant. For this, the methodology standardized by the present study can be used, the technique based on the detection of *Leishmania* DNA in wild animals run over proved to be effective

**Key words:** Active epidemiological surveillance. Georeferencing. Running over. Sentinel. One health.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Referencial Teórico

- Figura 1** – Classificação do gênero *Leishmania* em subgêneros, complexos e espécies .....14
- Figura 2** – Árvore filogenética das espécies de *Leishmania* de acordo com sequências obtidas do gene DHFR representativas das principais espécies do gênero.....16
- Figura 3** – *Leishmania* na forma amastigota dentro do macrófago (A). *Leishmania* na forma promastigota em meio de cultura (B) .....18
- Figura 4** – Ciclo de vida *Leishmania* spp. ....18

### Artigo A

- Figura 1** – Mapa do estado do Paraná, com destaque para os municípios participantes do projeto de pesquisa .....46
- Figura 2** – Incidência da leishmaniose tegumentar americana nos anos 2007 a 2016 nos municípios pertencentes às 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> regionais de saúde do estado do Paraná. Incidência média no período (A). Incidência por ano (B).....49
- Figura 3** – Número de casos de leishmaniose tegumentar americana por ano (2007 a 2016) por regional de saúde (15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup>) do estado do Paraná .....51
- Figura 4** – Incidência de casos de leishmaniose tegumentar americana notificados por município nas 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> regionais de saúde do estado do Paraná no período de 2007 a 2016 de acordo com o uso do solo .....56
- Figura 5** – Análise de agrupamentos para avaliar a concentração de recidivas em relação aos casos novos de leishmaniose tegumentar americana notificados nas 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> regionais de saúde no período de 2007 a 2016.....57
- Figura 6** – Análise de agrupamentos para avaliar a concentração de abandono de tratamento em relação aos casos curados de leishmaniose tegumentar americana notificados nas 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> regionais de saúde do estado do Paraná no período de 2007 a 2016.....58
- Figura 7** – Análise de agrupamentos para avaliar a concentração de casos de forma clínica mucosa em relação aos casos cuja forma clínica foi cutânea de leishmaniose tegumentar americana notificados nas 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> regionais de saúde do estado do Paraná no período de 2007 a 2016. ....59

## Artigo B

Figure 1 –	Presence of amastigote forms compatible with <i>Leishmania</i> spp. inside and outside the cytoplasm of macrophages. ....	69
------------	---	----

## Artigo C

Figure 1 –	Map of the state of Paraná, with emphasis on the municipalities participating in the research project. ....	76
Figure 2 –	Transects traveled weekly in the active search of wild animals run over in municipalities of the North of Paraná from November 2016 to October 2018. ....	78
Figure 3 –	Geographic distribution of trampled wild animals collected in streets and highways of 24 municipalities belonging to the 15 th, 16 th, 17 th and 18 th regional health centers of the state of Paraná from November 2016 to October 2018. ....	81
Figure 4 –	Conservation status of trampled wild animals collected from streets and highways of 24 municipalities belonging to the 15 th, 16 th, 17 th and 18 th regional health centers of the state of Paraná from November 2016 to October 2018. ....	81
Figure 5 –	Kernel map demonstrating the concentration of trampled wild animals collected on streets and highways of 24 municipalities belonging to the 15 th, 16 th, 17 th and 18 th regional health centers of the state of Paraná from November 2016 to October 2018. ....	82
Figure 6 –	Figure 6. Phylogenetic reconstruction by the Maximum Likelihood method with 1000 bootstraps, Tamura-Nei evolution model. ....	83

## LISTA DE TABELAS

### Artigo A

- Tabela 1** – Características dos 1451 casos de leishmaniose tegumentar americana notificados nas 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> regionais de saúde do estado do Paraná no período de 2007 a 2016. . 52
- Tabela 2** – Características clínicas dos 1451 casos de leishmaniose tegumentar americana notificados nas 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> regionais de saúde do estado do Paraná no período de 2007 a 2016..... 54
- Tabela 3** – Características do diagnóstico laboratorial dos 1451 casos de leishmaniose tegumentar americana notificados nas 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> regionais de saúde do estado do Paraná no período de 2007 a 2016 ..... 55

### Artigo C

- Table 1** –. Results of DNA extraction and polymerase chain reactions for DNA amplification of *Leishmania* spp. of bone marrow, lymph node, spleen, liver and skin of the ear tip of wild animals run over in municipalities of the North of Paraná from November 2016 to October 2018..... 82
- Table 2** –. PCR for *Leishmania* spp. and DNA sequencing results for wild animals run over in municipalities of Northern Paraná from November 2016 to October 2018..... 83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACL	<i>American cutaneous leishmaniasis</i>
BAB	<i>Blood agar base</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
CBEE	Centro brasileiro de estudos em ecologia de estradas
CDC	<i>Center for disease control</i>
CEP	Comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CRMV	Conselho regional de medicina veterinária
CVL	<i>Canine visceral leishmaniasis</i>
DAT	<i>Direct agglutination test</i>
DER	Departamento de estradas de rodagem
DHFR	Dihidrofolato redutase timidilato sintetase
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
GP	Glicoproteína
GPS	<i>Global Positioning System</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
IC	Intervalo de confiança
IDH-M	Índice de desenvolvimento humano –município
IFAT	<i>indirect immunofluorescence test</i>
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL	Interleucina
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
IUCN	<i>International union for conservation of nature</i>
kDNA	DNA cinetoplastideal
LACEN	Laboratório central do Paraná
LB	Linfócito B
LF	Leishmaniose felina
LFT	Linfócito T
LPG	Lipofosfoglicanos

LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral americana
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
MS	Ministério da saúde
nPCR	<i>nested-PCR</i>
ON	Óxido nítrico
OR	<i>Odds ratio</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PKC	Proteína kinase C
pb	Pares de base
RHC	<i>Regional health center</i>
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
RPPN	Reserva particular de patrimônio natural
RS	Regional de saúde
SINAN	Sistema de informação de agravos de notificação
SISBIO	Sistema de autorização e informação em biodiversidade
SL	<i>Spliced leader</i>
T	Transecto
TGF $\beta$	Fator de transformação do crescimento $\beta$
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
Th	<i>T helper</i>
UBS	Unidade básica de saúde
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UV	Ultravioleta
VL	<i>Visceral leishmaniasis</i>
VP	Vacúolo parasitóforo
WHO	<i>World health organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
2.1	O GÊNERO <i>Leishmania</i> .....	12
2.1.1	Taxonomia.....	12
2.1.2	Genética.....	14
2.1.3	Ciclo Biológico.....	17
2.2	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR .....	18
2.2.1	Vetores.....	19
2.2.2	Hospedeiros e Reservatórios .....	20
2.2.3	Panorama Brasileiro .....	21
2.2.4	Panorama Paranaense .....	22
2.3	LEISHMANIOSE VISCERAL .....	23
2.3.2	Vetores.....	24
2.3.3	Hospedeiros e Reservatórios .....	24
2.3.4	Panorama Brasileiro .....	24
2.3.5	Panorama Paranaense .....	25
2.4	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR.....	26
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	26
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
3.1	OBJETIVO GERAL.....	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
<b>4</b>	<b>ARTIGO A – LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E ANÁLISE ESPACIAL DOS CASOS HUMANOS NOTIFICADOS NO NORTE DO PARANÁ DE 2007 A 2016</b> .....	43
<b>5</b>	<b>ARTIGO B – CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN LONDRINA, PARANÁ - INVESTIGATION AND CASE REPORT</b> .....	65

<b>6</b>	<b>ARTIGO C – EVALUATION OF AN ACTIVE AND EARLY EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE METHODOLOGY OF VISCERAL LEISHMANIASIS BY MOLECULAR DETECTION IN RAN OVER WILD FAUNA.....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>92</b>
	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>93</b>
	APÊNDICE A – Ficha de identificação do projeto silvestres atropelados .....	94
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>96</b>
	ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Evolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina.....	97
	ANEXO B – Ficha de notificação de leishmaniose tegumentar americana.....	101
	ANEXO C – Ofício de aprovação de projeto de pesquisa emitido pela comissão de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Londrina .....	103
	ANEXO D – Ofício de aprovação de projeto de pesquisa emitido pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO.....	104

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente aquisição de animais de companhia, o estreitamento da relação homem-animal e a entrada do homem no meio silvestre devido ao processo de urbanização têm aumentado o risco de transmissão de zoonoses como, por exemplo, as leishmanioses. O protozoário causador das leishmanioses pertence gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae) e infecta numerosas espécies de mamíferos (GRAMICCIA, 2011).

Na natureza, todas as espécies de *Leishmania* são transmitidas ao hospedeiro vertebrado pela picada de fêmeas hematófagas de várias espécies de flebotomíneos (Classe Insecta, Ordem Díptera, Família Psychodidae), conhecidos popularmente como mosquito-palha, birigui, asa-dura, cangalhinha, entre outros, dependendo da região. Estes insetos medem de 1 a 3 mm de comprimento, habitam primariamente florestas, não se distanciando muito do seu local de procriação (máximo 300m), apresentam atividade crepuscular e noturna, permanecendo, durante o dia em repouso em lugares sombreados e úmidos e realizam a postura em meio terrestre rico em matéria orgânica da qual a sua fase larvária se alimenta (FORATTINI, 1973).

Infecções pelo supracitado parasito podem levar a doenças com amplo espectro de sinais clínicos; essas são, coletivamente, conhecidas como leishmanioses e são consideradas negligenciadas (DUJARDIN et al., 2008). As circunstâncias de transmissão das leishmanioses estão mudando continuamente com relação a fatores ambientais, demográficos e de comportamento humano que levam a alterações no alcance e na densidade de vetores e reservatórios, aumentando a exposição humana e animal a flebotomíneos infectados (DUJARDIN et al., 2008; GRAMICCIA, 2011; SCHÖNIAN et al., 2011).

A magnitude do problema de saúde pública representado pelas leishmanioses, combinado com a complexidade de sua epidemiologia, faz necessário esclarecer todos os elos na rede de transmissão dessa doença negligenciada.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O GÊNERO *Leishmania*

#### 2.1.1 Taxonomia

A classificação atual das espécies neotropicais de *Leishmania* segundo Monteiro (2016) é:

Reino Protista: formado por seres eucariontes, unicelulares.

Sub-reino Protozoa: esse reino inclui organismos com tamanho entre um e 50 mm, que possuem organelas com função de alimentação, locomoção, osmorregulação e reprodução, também chamados protozoários.

Filo Sarcomastigophora: os organismos pertencentes a esse filo apresentam locomoção por meio de pseudópodes e/ou flagelos.

Subfilo Mastigophora: apresentam um ou mais flagelos. Se reproduzem principalmente de forma assexuada por fissão binária.

Classe Zoomastigophorea: essa classe inclui organismos heterotróficos que não possuem cloroplastos.

Ordem Kinetoplastida: possuem cinetoplastos, uma organela citoplasmática estrutural e funcionalmente semelhante à mitocôndria, com abundante DNA mitocondrial, o Kinetoplastidae DNA (kDNA).

Família Trypanosomatidae: parasitas do sangue, linfa e/ou tecidos, transmitidos geralmente por insetos picadores. Corpo em forma de folha ou arredondado. Apresentam um ou dois flagelos, livres ou não, associados ou não à membrana ondulante.

Gênero *Leishmania*: esse gênero é caracterizado por organismos digenéticos (heteroxenos) e apresentam em seu ciclo de vida principalmente duas formas evolutivas: a forma promastigota, que é flagelada e extracelular, e a forma amastigota, que é intracelular e sem movimentos.

Subgênero *Leishmania*: parasitas pertencentes a esse subgênero apresentam o ciclo de vida no inseto hospedeiro limitado aos intestinos médio e anterior.

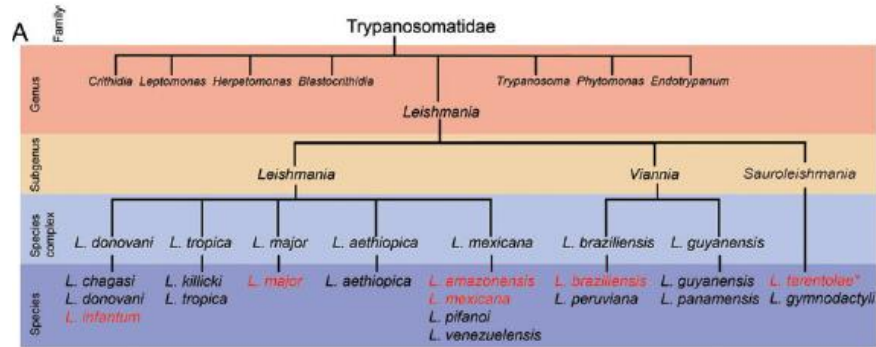
Subgênero *Viannia*: parasitas pertencentes a esse subgênero apresentam o ciclo de vida no intestino posterior do inseto hospedeiro; porém, ocorre uma migração dos parasitas para os intestinos médio e anterior.

Subgênero *Sauroleishmania*: esse subgênero abriga espécies de *Leishmania* consideradas mais primitivas e que infectam lagartos no Velho Mundo.

Os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* são divididos em cinco e dois complexos, respectivamente, conforme Figura 1. O termo “complexo” emergiu na literatura no início da era genômica associado à taxonomia e ao agrupamento de organismos que pertencem a diferentes espécies, mas possuem padrões similares de acordo com suas características morfológicas, fisiológicas e/ou fenotípicas (ALMEIDA et al., 2013). O

conceito de complexos para agrupar as espécies de *Leishmania* foi inicialmente proposto baseado nas características bioquímicas e biológicas dos isolados (SCHÖNIAN et al., 2011). Atualmente há autores que defendem o abandono dessa terminologia (FRAGA, et al, 2010).

Figura 1: Classificação do gênero *Leishmania* em subgêneros, complexos e espécies.



Fonte: Adaptado de Real et al. (2013).

A classificação atual das espécies de *Leishmania* é baseada no método de isoenzima também chamado *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE). Dentro do sugênero *Leishmania*, o complexo *L. donovani* inclui as espécies: *L. donovani*, *L. archibaldi* e *L. infantum* que é considerada sinônimo de *L. chagasi*. O complexo *L. tropica* inclui: *L. tropica*, *L. killicki* e *L. aethiopica*. O complexo *L. major* inclui: *L. major*, *L. gerbilli*, *L. arabica* e *L. turanica*. O complexo *L. mexicana* inclui: *L. mexicana*, *L. aristidesi*, *L. venezuelensis*, *L. forattinii* e *L. amazonensis* que é considerada sinônimo de *L. garnhami*. Dentro do sugênero *Viannia* (exclusivamente endêmico na região neotropical), o complexo *L. braziliensis* inclui as espécies: *L. braziliensis* e *L. peruviana*. O complexo *L. guyanensis* inclui as espécies: *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. shawi*. Outras espécies desse subgênero são: *L. naiffi*, *L. lainsoni*, *L. lindenbergi*. Dentro do subgênero *Sauroleishmania* estão as espécies: *L. tarentolae*, *L. colombiensis*, *L. equatorensis*, *L. hertigi*, *L. herreri* e *L. deanei* (SCHÖNIAN et al., 2011). Outras espécies de *Leishmania* já foram reportadas na literatura, mas não necessariamente são consideradas espécies verdadeiras quando analisadas pelo método de MLEE.

### 2.1.2 Genética

Com relação ao número de cromossomos, os genomas de *L. (L.) infantum*, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) major* apresentam 36, enquanto que o de *L. (V.) braziliensis* tem 35 e

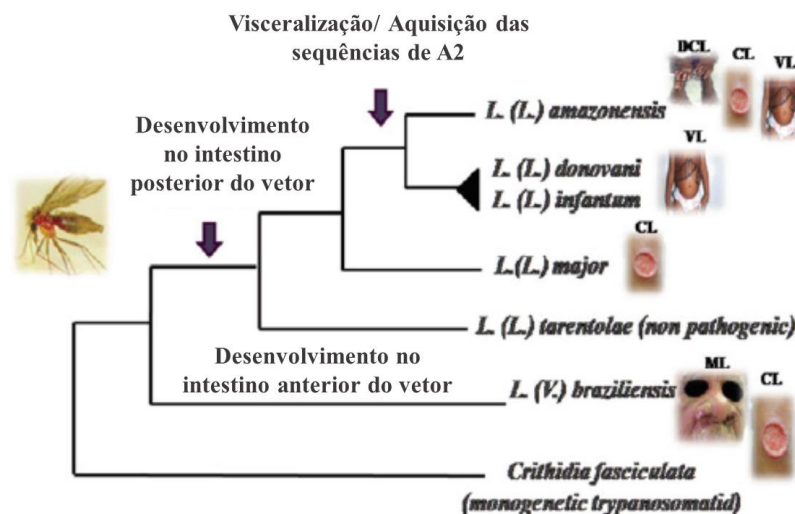
*L. (L.) mexicana* tem 34 (BRITTO et al., 1998; PEACOCK et al., 2007; REAL et al., 2013) por terem ocorrido fusões cromossômicas ao longo da evolução do parasita. Os genomas das espécies de *Leishmania* tem alto grau de sintenia (PEACOCK et al., 2007; DOWNING et al., 2011; ROGERS et al., 2015; RAYMOND et al., 2012) o que significa que a ordem dos genes dentro dos cromossomos é conservada nas diferentes espécies. O grau de sintenia é usado para aferir a proximidade filogenética entre as espécies. As leishmanias são consideradas diplóides, pois carregam duas cópias da maior parte dos seus cromossomos (BASTIEN et al., 1992; PEACOCK et al., 2007; DOWNING et al., 2011). No entanto, pode ocorrer aneuploidia e variação no número de cópias cromossômicas entre espécies e até entre isolados da mesma espécie (DOWNING et al., 2011; ROGERS et al., 2011; MANNAERT et al., 2012; STERKERS, et al., 2012). Essa variação no número de cópias cromossômicas pode ser responsável por variações fenotípicas em termos de patogenicidade e virulência nos diferentes isolados (PALETTA-SILVA, et al., 2011) por alterar o nível de expressão de determinadas proteínas (ZHANG; MATLASHEWSKI, 2010; ROGERS et al., 2011; FERNANDES et al., 2014). As comparações entre os genomas das diferentes espécies de *Leishmania* também mostram um número reduzido de genes espécie-específicos, a função da maioria deles não é conhecida e acredita-se que podem estar relacionados com o tropismo do parasita e com o quadro clínico (PEACOCK et al., 2007; SMITH et al., 2007).

A principal forma de reprodução de parasitos do gênero em questão é assexuada por divisão binária o que dá às populações uma identidade genética clonal. No entanto, é sabido que a recombinação sexual pode ocorrer entre espécies e até entre populações com espécies diferentes (TIBAYRENC; AYALA, 2013), podendo gerar, em teoria, híbridos de diferentes espécies (raro), mas o que se percebe é a manutenção da característica clonal das populações até o momento (VAN DER AUWERA; DUJARDIN, 2015).

Característica importante da estrutura genômica do gênero *Leishmania* é a existência de matrizes em tandem de genes duplicados (PEACOCK et al., 2007). Na falta de um controle transcricional regulado, como o encontrado em outros eucariotos, acredita-se que essa duplicação de genes permita o aumento da expressão gênica de proteínas específicas (ROGERS et al., 2011). Um bom exemplo é a família de genes/proteínas A2, descobertas pela primeira vez em *L. (L.) infantum* (CHAREST; MATLASHEWSKI, 1994); diversas evidências indicam que ela seja uma das mais elegíveis candidatas a fator de virulência e visceralização em leishmaniose (ZHANG et al., 2008). Farahmand et al. (2011) estudaram essa família de genes em isolados do Irã e descobriram que em espécies causadoras de

leishmaniose tegumentar (LT) este gene está presente em apenas uma cópia, enquanto que em espécies causadoras de leishmaniose visceral (LV) ela está presente em multicópias. Zhang et al. (2014) realizaram sequenciamento de nova geração de genoma completo em isolados de *L. (L.) donovani* do Sri-Lanka cujos pacientes apresentavam duas formas clínicas diferentes da doença, LV e LT, e verificaram que um dos polimorfismos encontrados entre os isolados foi o número de cópias do gene A2; encontrado em menor número nos isolados causadores de doença cutânea. Fernandes et al. (2014) usaram sequências do Dihidrofolato Redutase Timidilato-sintetase (DHFR), um gene constitutivo conservado e funcionalmente equivalente entre todas as espécies de *Leishmania*, para retratar uma filogenia de diferentes espécies desse gênero. A topologia dessa árvore sugere que as sequências de A2 foram, provavelmente, adquiridas por um ancestral comum de *L. (L.) donovani* / *L. (L.) infantum* / *L. (L.) amazonensis* depois da divergência do ancestral compartilhado com *L. (L.) major* (Figura 2). Rogers et al (2015), compararam os genomas de *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) mexicana* e *L. (V.) braziliensis* e encontraram 56 genes codificantes que se apresentavam em múltiplas cópias nas quatro espécies; a variação no número de cópias encontrada é considerável, alguns exemplos desses genes são: PSA2, Glicorpotéina 46 (GP46), amastina e Glicorpotéina 63 (GP63).

Figura 2: Árvore filogenética das espécies de *Leishmania* de acordo com sequências obtidas do gene DHFR representativas das principais espécies do gênero. Mostra que a capacidade de visceralização coincide com o possível ganho completo das sequências da família gênica A2, dando origem, então, a algumas espécies capazes de visceralizar e outras não.



Fonte: Fernandes et al. (2014).

Os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* são altamente conservados no que diz respeito à sintonia, apresentam poucos genes parálogos espécie-específicos. No subgênero *Sauroleishmania* genes importantes para o estágio intracelular não são encontrados (RAYMOND et al., 2012).

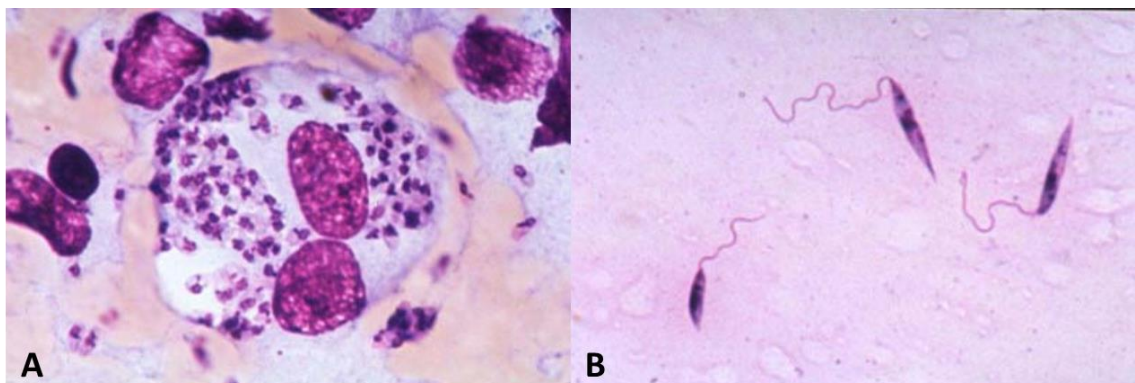
### 2.1.3 Ciclo Biológico

Na natureza, todas as espécies de *Leishmania* são transmitidas ao hospedeiro vertebrado pela picada de fêmeas de flebotomíneos pertencentes a várias espécies do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (Insecta, Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Conhecidos popularmente, dependendo da região, como mosquito-palha, birigui, asa-dura, cangalhinha, entre outros, estes insetos medem de 1 a 3 mm de comprimento, habitam primariamente florestas, não se distanciando muito do seu local de procriação, no máximo 300m. Possuem atividade crepuscular e noturna, permanecendo em repouso durante o dia em lugares sombreados e úmidos, realizam a postura em meio rico em matéria orgânica da qual a sua fase larvária se alimenta (FORATTINI, 1973).

O ciclo de vida de protozoários do gênero *Leishmania* é digenético (heteroxeno), vivem alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores assumindo em cada um deles uma forma evolutiva diferente: amastigota e promastigota respectivamente. Nos hospedeiros vertebrados, representados na natureza por mamíferos de várias ordens e espécies, as espécies de *Leishmania* assumem a forma amastigota, arredondada ou ovalada e imóvel (2-6 $\mu$ m), que se multiplica por divisão binária obrigatoriamente, dentro de células do sistema monocítico fagocitário (SFM). (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987) A forma amastigota (Figura 3A), que é suscetível à ação dos neutrófilos (células com grande potencial de produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico) multiplica-se no interior dos macrófagos livrando-se do ataque dos neutrófilos. À medida que a multiplicação ocorre, os macrófagos se rompem liberando parasitos que são fagocitados por outros macrófagos. Quando o flebotomíneo se alimenta do sangue de um hospedeiro, infecta-se com os amastigotas que, então, se transformam em promastigotas procíclicos (Figura 3B) que por um processo denominado metaciclo-gênese tornam-se promastigotas metacíclicos (GOSSAGE et al., 2003), deixam de se reproduzir e tornam-se infectantes. A metaciclo-gênese ocorre na luz do trato digestivo dos flebotomos, os parasitos sofrem modificações bioquímicas em sua superfície perdendo sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino médio, ao final desse

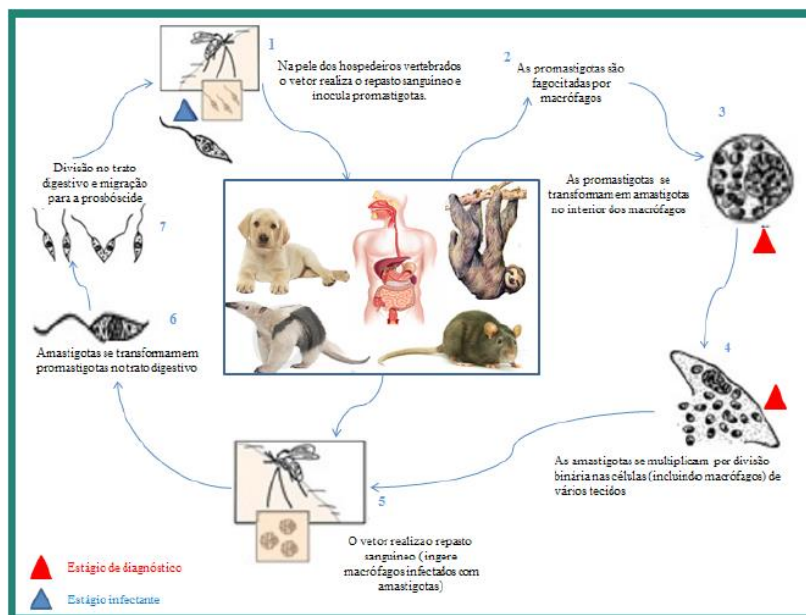
processo as promastigotas metacíclicas destacam-se e migram para a faringe e cavidade bucal e são transmitidas para novos hospedeiros por meio do repasto sanguíneo do flebotomíneo juntamente com a saliva do inseto vetor (GONTIJO; CARVALHO, 2003). O ciclo no hospedeiro vetor se completa em três a cinco dias nas espécies dos complexos *mexicana* e *braziliensis* (GENARO et al., 1995a) e a partir de 15 horas nas espécies do complexo *donovani* (GENARO et al., 1995b). Detalhes do ciclo constam na Figura 4.

Figura 3: *Leishmania* na forma amastigota dentro do macrófago (células coradas por May Grunwald Giemsa) (A). *Leishmania* na forma promastigota em meio de cultura (B).



Fonte: Pereira (2005).

Figura 4: Ciclo de vida *Leishmania* spp.



Fonte: Manual Técnico: Leishmanioses Caninas. CRMV-PR, 2015.

2.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Segundo Alvar et al., (2012), a LT é mais amplamente distribuída ao redor do mundo do que a LV. Cerca e 1/3 dos casos ocorre em uma dessas três regiões: Américas, Mediterrâneo, Ásia. Cerca de 220.000 casos de LT são notificados por ano no mundo; considerando-se a sub-notificação, calcula-se que 1,2 milhões de casos ocorram anualmente. Os 10 países com o maior número de casos estimados são: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, juntos contabilizam 70 a 75% da incidência global de LT (ALVAR et al., 2012). A LTA é uma das principais doenças transmitidas por vetores emergentes e re-emergentes nas Américas (CHAVES et al., 2008), é potencialmente ameaça de desfiguração clínica (AZULAY; AZULAY JUNIOR, 1995). A LTA tem como agentes etiológicos no Brasil: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffii*, *L. (V.) lindenberg*, *L. (V.) shawi* e, a mais prevalente, *L. (V.) braziliensis* (BRASIL, 2017).

### 2.2.1 Vetores

As espécies mais importantes de flebotomíneos que atuam como vetores da LTA no Brasil são: *Lutzomyia flaviscutellata*, pouco antropofílica e de hábitos noturnos, transmissora de *L. (L.) amazonensis*. *Lu. welcomei*, *Lu. pessoai* e *Lu. migonei*, bastante antropofílicas, de hábitos diurnos e transmissoras de *L.(V.) braziliensis*. A *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani* transmissoras da *L.(V.) guyanensis*, antropofílicos e de hábitos peridomiciliares (BARRET; SENRA, 1989; CAMARGO et al., 2003).

Diversos trabalhos científicos investigaram a fauna de flebotomíneos no estado do Paraná (CERINO, 2009; CRUZ et al., 2013; CRUZ et al., 2012; DIAS-SVERSUTTI et al., 2007; MELO et al., 2013; MEMBRIVE et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2000; REIS et al., 2011; SANTOS et al., 2012; SILVA et al., 2008) e as espécies com a maior abundância em todos eles foram: *Lu. neivai*, *Lu. pessoai*, *Lu. migonei*, *Lu. whitmani*, *Lu. fischeri* e *Lu. intermedia*, nessa ordem.

Os vetores conhecidos de *L. (L.) amazonensis* são *Lu. flaviscutellata*, *Lu. reducta* e *Lu. olmeca nociva* (BRASIL, 2017; LAINSO; SHAW, 1968; FREITAS, 1898). Esses vetores são menos antropofílicos, o que pode explicar uma menor incidência de infecção humana pela espécie de *Leishmania* em questão. Nos estados de Santa Catarina e Paraná os vetores de *L. (L.) amazonensis* nunca foram relatados; no entanto, levando em consideração a existência de casos da doença por esse parasita (HOFFMANN, 2012;

MARLOW, 2014) podemos pensar em algumas hipóteses: existe um vetor desconhecido transmitindo *L. (L.) amazonensis* nesses estados, ou os estudos que temos até o momento estão desatualizados ou não estão sendo realizados de forma adequada para a captura desse tipo de flebótomo. *Lu. flaviscutellata* é fortemente atraído por roedores, mas não muito por seres humanos (LAINSON; SHAW, 1968; SHAW; LAINSON, 1972; RANGEL, 2009), o uso de armadilhas do tipo Disney (DORVAL, 2007), as quais utilizam roedores como isca, geralmente apresentam maior taxa de sucesso na captura dessa espécie de vetor (CARVALHO, 2014).

Carvalho et al. (2014), em estudo recente, utilizaram modelagem matemática e previram uma expansão do *Lu. flaviscutellata* em direção ao Sul na América do Sul caso continuem ocorrendo alterações climáticas. Além disso, alguns autores vem encontrando o DNA de *L. (L.) amazonensis* em diferentes espécies de flebotomíneos, sugerindo que possam estar atuando como vetores *Lutzomyia ovalesi* na Venezuela, *Lutzomyia anglesi* na Bolívia e *Martinsmyia minasensis* em Minas Gerais, Brasil (BARRIOS, 1994; MARTINEZ, 1999; RÊGO, 2015).

### 2.2.2 Hospedeiros e Reservatórios

Um reservatório pode ser uma espécie ou um complexo de espécies responsáveis por manter determinado parasito/agente etiológico na natureza. Um sistema de reservatórios pode ser considerado único em uma dada escala espaço-temporal. De fato, a transmissão das espécies de *Leishmania* no ambiente selvagem ainda representa um complexo quebra-cabeças, cujos elos não foram identificados por completo (ROQUE; JANSEN., 2014). Geralmente, existe uma espécie atuando como reservatório principal para uma dada espécie de *Leishmania* em um foco particular, enquanto outros mamíferos na mesma área geográfica, possivelmente, tem menor importância na transmissão da doença e, por isso, são considerados reservatórios secundários ou hospedeiros acidentais (WHO, 2010).

Segundo Dantas-Torres et al. (2010), os reservatórios primários da leishmaniose tegumentar americana (LTA) são pequenos mamíferos, particularmente roedores silvestres; no entanto, ainda há especulação quanto ao papel do cão como um importante reservatório dessa doença; o que se afirma com certeza é que os cães são bons sentinelas auxiliando na avaliação da distribuição da doença no ambiente. Roedores sinantrópicos, como *Rattus rattus*, *Mus musculus* e *Rattus norvegicus* tem sido relatados como hospedeiros de algumas espécies de *Leishmania* spp. (ROQUE; JANSEN, 2014 e LARA-SILVA et al., 2014)

havendo evidências de que a espécie *R. rattus* (rato de telhado) possa atuar como reservatório de *L. (V.) braziliensis* (ROQUE; JANSEN, 2014). Segundo o manual técnico das leishmanioses caninas publicado pelo Conselho Regional de Medicina Veterinária do estado do Paraná (CRMV-PR) em 2015, a eutanásia nos cães com diagnóstico confirmado para LTA ainda é indicada para redução de riscos para os humanos (CRMV-PR), no entanto, não é obrigatória. Já a versão mais recente do manual de vigilância em leishmaniose tegumentar do Ministério da Saúde (MS) afirma que não é recomendada eutanásia objetivando o controle de animais domésticos com LT (BRASIL, 2017).

Autores em diversos países, como França (PRATLONG et al., 2004); Itália (POLI et al., 2002; PENNISI et al., 2004); Suíça (RÜFENACHT et al., 2005); Espanha (SOLANO-GALLEGO et al., 2007) e Brasil (SAVANI et al., 2004; SOUZA et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2006; ROSSI, 2007; SILVA et al., 2008; SERRANO et al., 2008) observaram a ocorrência da infecção por *Leishmania* em felinos. Apesar de serem susceptíveis e ter contato direto com humanos, o papel dos felinos na epidemiologia das leishmanioses ainda não foi esclarecido, pois esses animais podem ser assintomáticos ou ter a doença associada às outras doenças que causam imunossupressão. Algumas características comportamentais dos felinos, como caça predatória noturna e trânsito de até 1,5 km de distância de suas residências, co-habitando áreas silvestres e domésticas, favoreceriam a infecção e disseminação do parasito por essa espécie (SILVA, 2008; UNDERHILL-DAY, 2005). A forma cutânea é a mais relatada em felinos e, ocorrem principalmente no nariz, seguido pelas orelhas, ou em ambos (DANTAS-TORRES, 2006). Conforme consta na literatura, os gatos infectados geralmente apresentam envolvimento dos linfonodos e do sangue, indicando a disseminação de *Leishmania* nos hospedeiros felinos (ALVES-MARTIN, 2013). As manifestações oculares são comuns nas leishmanioses caninas, dois casos foram relatados em gatos (HERVÁS, 2001; LARUELLE-MAGALON, 1996). Em áreas endêmicas, a leishmaniose felina (LF) deve ser incluída como diagnóstico diferencial de uveíte e úlceras corneanas (LEIVA, 2005).

### 2.2.3 Panorama Brasileiro

Na década de 80, a LTA foi assinalada em 19 estados brasileiros e desde 2003 o Brasil tem casos confirmados em todos os seus estados (ALVAR et al., 2012). A doença ocorre em ambos os sexos e todas as faixas etárias; entretanto, na média do país, predomina os maiores de 10 anos, representando 90% dos casos e o gênero masculino, 74%

dos casos (BRASIL, 2014).

Em se tratando de animais, atualmente o Brasil é o detentor do maior número de casos de LF do mundo, mas sua distribuição no país permanece incerta, sendo relatada em diversos estados brasileiros (ALVES-MARTIN, 2013). Ainda não está claro se as baixas prevalências da LF em áreas endêmicas são devidas às falhas na detecção de anticorpos ou ao fato dos gatos apresentarem resistência natural à leishmaniose.

Infecção por *L. (V.) braziliensis* em cavalos foi relatada pela primeira vez em 1927 na Argentina e em 1959 em um asno no Brasil (MAZZA, 1927). A partir daí, a infecção por *Leishmania* em cavalos vem sendo reportada com frequência em países do Novo Mundo como Brasil, Venezuela, Porto Rico, Estados Unidos da América (TRUPPEL, 2014). Equídeos, considerados animais domésticos e de tração, estão em constante movimento em áreas endêmicas para leishmanioses, servindo como fonte de alimento para flebotomíneos e permitindo a sua proliferação e, conseqüentemente, a manutenção do ciclo peridoméstico das leishmanioses (CERQUEIRA et al., 2003; TRUPPEL et al., 2014). Embora sejam susceptíveis às leishmanioses, o papel dessa espécie animal na cadeia de transmissão das leishmanioses não foi bem elucidada (KOUAM et al., 2010).

#### 2.2.4 Panorama Paranaense

No estado do Paraná ocorrem 98% dos casos humanos de LTA da região Sul do Brasil (PONTELLO JR et al., 2013) e são registrados casos caninos autóctones em três regiões: Vale do Ribeira, Central e Norte (CASTRO et al., 2007). Os agentes etiológicos relatados até o momento são *L. (L.) amazonensis* (SILVEIRA et al., 1990; HOFFMANN et al., 2012) e *L. (V.) braziliensis* (SILVEIRA et al., 1999; CASTRO et al., 2002). Os vetores *Lu. whitmani*, *Lu. neivai*, *Lu. migonei*, *Lu. pessoai*, comumente relacionados a *L. (V.) braziliensis*, foram reportados no Norte do Paraná por Membrive et al. (2004), Oliveira et al. (2000) e Silva et al. (2008a).

Estudos soroepidemiológicos de LTA canina realizados na região Norte do Paraná tem demonstrado prevalências entre 4,4% e 55,2% entre os anos 1996 e 2012 para cães de origem rural e/ou urbana. Lonardoní et al. (2006) e Silva-Filho et al. (2012) demonstraram prevalências de 19,0% (24/126) e 8,3% (14/169), respectivamente, para cães de assentamentos rurais nas cidades de Mariluz, Alvorada do Sul e Arapongas. Os autores Costa (2016) e Zulpo et al. (2012) estudaram animais da região urbana e periurbana da cidade de Londrina e encontraram soropositividade de 9,6% (13/135) e 11,6% (13/112),

respectivamente. Os animais estudados por da Costa (2016) eram residentes em locais de reciclagem e nas adjacências de mata urbana. Castro et al. (2007) estudaram diversas cidades da região Norte do estado, inclusive Londrina, e observaram prevalência de 18,4% (39/212), usando ELISA como método diagnóstico, enquanto os demais trabalhos supracitados utilizaram RIFI. Reis et al. (2011) avaliaram cães urbanos em Bela Vista do Paraíso, cidade caracterizada por grande quantidade de mata em área urbana, e encontraram uma prevalência de 45,4% (222/489) utilizando RIFI e 38,7% (189/489) utilizando ELISA como método de diagnóstico. O Paraná apresenta, além da região Norte, outras duas regiões endêmicas para LTA, Central e Vale do Ribeira. A soropositividade canina encontrada por Castro et al. (2007) nas três regiões endêmicas do estado do Paraná foi de 13,9% (57/410). Silva-Filho et al. (2012) observaram, em cães de assentamentos rurais, associação estatística quanto a proximidade das residências à mata (até 200m).

Com relação a LF, Matos et al. (2018), em estudo realizado no Norte do Paraná, observaram 8,5% (58/679) dos gatos com positividade para *Leishmania* spp. e concluíram que gatos mantidos em organizações não governamentais de proteção animal apresentaram maior sororeatividade.

Equinos também estão expostos às leishmanioses no Paraná. Evers et al. (2017), avaliaram a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em equinos de abatedouro, dentre os animais do estado do Paraná a soroprevalência foi de 48,02% (73/152). Em área endêmica para LTA no Norte Central do Paraná Vedovello-Filho et al. (2007), detectaram DNA de *Leishmania* subgênero *Viannia* em três de 42 animais estudados (7,31%) e detectaram anticorpos anti-*Leishmania* spp. em 72,6% desses animais usando teste de aglutinação direta, por fim sugeriram sua participação no ciclo epidemiológico da LTA.

### 2.3 LEISHMANIOSE VISCERAL

A LV tem como agente etiológico no Brasil a *L. (L.) infantum* (sinonímia de *L. (L.) chagasi*) e é uma doença negligenciada. Segundo Alvar et al. (2012), as leishmanioses têm ampla distribuição geográfica, sendo assinaladas em todos os continentes, exceto Austrália e Antártica. Cerca de 58.000 casos novos de LV são notificados por ano no mundo; considerando-se a sub-notificação, estima-se que 0,2 a 0,4 milhões de casos ocorram anualmente. Mais de 90% deles ocorrem em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. Usando uma taxa global de letalidade de 10%, alcançamos uma estimativa de 20.000 a 40.000 mortes por ano, dado que está de acordo com outras

estimativas da *World Health Organization* (WHO, 2008). Os dados de mortalidade são escassos e geralmente representam apenas mortes ocorridas em hospitais. A taxa de letalidade reportada no Brasil em 2006 foi de 7,2%, sendo que nosso país notifica uma média de 3481 casos por ano (ALVAR et al., 2012).

### 2.3.1 Vetores

No Brasil, duas espécies de flebotomíneos, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. Sendo a primeira considerada a principal espécie transmissora da *L. (L.) infantum* no Brasil. A segunda espécie foi incriminada, recentemente, como vetora no estado de Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2014). Carrapatos e pulgas tem sido investigados como possíveis vetores de *L. (L.) infantum* no Brasil (COUTINHO et al., 2005; COUTINHO; LINARDI, 2007); no entanto, nenhuma prova convincente de que eles são vetores competentes foi encontrada (DANTAS-TORRES, 2009).

### 2.3.2 Hospedeiros e Reservatórios

Humanos e cães são considerados os principais hospedeiros dessa zoonose. Cães domésticos são reservatórios primários da LV humana no Novo Mundo (DESJEUX, 2004) e grande parte dos animais infectados é assintomática (MOSHFE et al., 2009). A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem. No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (BRASIL 2014).

Há evidências científicas acerca do potencial de reservatório de gatos naturalmente infectados por *L. infantum*, quando testados por xenodiagnóstico. Demonstrou-se, na Itália, que o *P. perniciosus* e, no Brasil, o *Lu. longipalpis* foram infectados após se alimentarem em gatos naturalmente infectados com *L. infantum* (MAROLI, 2007; SILVA, 2010).

### 2.3.3 Panorama Brasileiro

Na década de 90, aproximadamente noventa por cento (90%) dos casos

notificados de LV ocorreram na Região Nordeste. À medida que a doença se expande para as outras regiões e atinge áreas urbanas e periurbanas, esta situação vem se modificando. Os dados epidemiológicos revelam a periurbanização e a urbanização da leishmaniose visceral, 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 2014) o que comprova sua capacidade de adaptação a diferentes ecótopos. Na maior parte dos estados brasileiros já foram registrados casos autóctones de LV, sendo a maioria na região Nordeste do país (BRASIL, 2014). É prova da franca expansão geográfica dessa doença o que tem ocorrido na região Sul nos últimos anos. O vetor foi identificado pela primeira vez em 2009 no Rio Grande do Sul (BRASIL, 2010), estado que apresenta 19 casos humanos confirmados; Santa Catarina teve os primeiros casos caninos notificados em 2011 e o primeiro caso humano notificado em agosto de 2017 (WENZEI, 2017).

A doença é mais frequente em crianças menores de 10 anos (54,4%), provavelmente devido à imaturidade da resposta imunológica celular, e o gênero masculino é proporcionalmente o mais afetado (60%) (BRASIL, 2014).

#### 2.3.4 Panorama Paranaense

O estado do Paraná era considerado região indene para a LV até 15 de julho de 2015 quando o primeiro caso humano autóctone foi notificado (ANP, 2015) na cidade de Foz do Iguaçu. Segundo dos Santos, Ferreira; Bisetto-Junior (2012) o flebotomíneo transmissor do parasito causador da LV já era encontrado na cidade desde 2012, provavelmente vindo da tríplice fronteira (Brasil, Paraguai e Argentina). Bisetto-Junior, Thomaz-Soccol; Navarro (2014) relataram o isolamento do agente em cães sintomáticos da mesma cidade em 2014. Apesar dos esforços dos órgãos municipais e estaduais de saúde, não foi possível conter a propagação do vetor e a dispersão do agente entre os cães e seres humanos, levando a dois óbitos humanos em apenas dois anos. Até o momento, o flebotomíneo vetor foi encontrado em Foz do Iguaçu, Santa Teresinha de Itaipu e Medianeira (comunicação pessoal de Prof<sup>ra</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanete Thomaz-Soccol), os quais são municípios vizinhos. Casos caninos alóctones são diagnosticados frequentemente em municípios como Curitiba e Londrina (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009), levando em consideração que cães são os principais reservatórios dessa doença para humanos, constatamos o intenso risco ao

qual o estado está submetido, bastando a expansão geográfica do vetor para que essa importante zoonose se instale.

#### 2.4 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

A epidemiologia molecular é a aplicação de ferramentas moleculares para responder perguntas de estudos epidemiológicos, principalmente relacionados a patógenos. Em se tratando de leishmanioses, são técnicas indispensáveis para se definir um bom diagnóstico, prognóstico e medidas de prevenção e controle; visto que, são a única forma de confirmarmos qual a espécie do parasito envolvido. Van der Auwera et al. (2015) afirmam que o Brasil alberga oito espécies de *Leishmania*, as quais causam amplo espectro de quadros clínicos; no entanto, a confirmação do agente infectante é, aparentemente, não considerada importante por diversos autores de trabalhos científicos, pois eles se mantêm cegamente confiantes em dados epidemiológicos.

Na última década a PCR tem sido introduzida com sucesso e tem provado ser um ferramenta sensível e poderosa para detectar *Leishmania* de forma direta em amostras clínicas, bem como para caracterização dos parasitos (SCHÖNIAN et al., 2003). No entanto, é preciso ser criterioso na escolha da técnica e dos *primers* levando em consideração os objetivos que quer alcançar e os recursos financeiros disponíveis (VAN DER AUWERA et al., 2015). Ao analisar os resultados também é necessário lembrar que um resultado positivo na PCR é um marcador de infecção ou exposição recente e não de doença (DEBORGGRAEVE et al., 2008).

#### REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. A.; ARAÚJO, R. Highlights on molecular identification of closely related species. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 67–75, 2013.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANOS, J.; JANNIN, J.; den BOER, M, the WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS one**, San Francisco, v. 7, n. 5, e35671, 2012.

ALVES-MARTIN, M. F. Avaliação diagnóstica para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em gatos domésticos procedentes da Associação Protetora dos Animais do município de Ilha

Solteira, SP, Brasil. 2013. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2013.

ANP. AGÊNCIA DE NOTÍCIAS DO PARANÁ. Available in: <http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=84980>. Accessed in december 23, 2015.

AZULAY, R. D.; AZULAY JR, D. R. Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, Malden, v. 34, n. 5, p. 303-307, 1995.

BARRETT, T.V.; SENRA, M. Leishmaniasis in Manaus. **Parasitology Today**, Oxford, v.5, p. 255, 1989.

BARRIOS, M.A.; RODRIGUEZ, N.; FELICIANGELI, D.M.; ULRICH, M.; TELLES, S.; PINARDI, M.E.; CONVIT, J. Coexistence of two species of *Leishmania* in the digestive tract of the vector *Lutzomyia ovallesi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**;5, Baltimore, v. 51, p. 5, p. 669-675, 1994.

BASTIEN, P.; BLAINEAU, C.; PAGES, M. *Leishmania*: sex, lies and karyotype. **Parasitology Today**, Oxford, v. 8, p. 174–7, 1992.

BISETTO-JUNIOR, A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; NAVARRO, I.T. Leishmaniose Visceral no estado do Paraná. **Revista do Conselho Regional de Medicina Veterinária do Paraná**, Curitiba, n 41, p. 6-7, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota técnica conjunta da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul. **Situação da Leishmaniose Visceral na fronteira do Estado do Rio Grande do Sul com a Argentina**. Brasília, 2010.

BRITTO, C.; RAVEL, C.; BASTIEN, P.; BLAINEAU, C.; PAGE`S, M.; DEDET, J. P.; WINCKER, P. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal

rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. **Gene**, Amsterdam, v. 222, n. 1, p. 107–117, 1998.

CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.1, n. 1, p. 34-37, 2003.

CARVALHO, B. M.; RANGEL, E. F.; READY, P. D.; VALE, M. M. Ecological niche modelling predicts southward expansion of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *flaviscutellata* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), vector of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in South America, under climate change. **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 11, e0143282, 2014.

CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; AUGUR, C. LUZ, E. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*: Epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). **Experimental Parasitology**, New York, v. 117, n. 1, p. 13- 21, 2007.

CASTRO, E. A., SOCCOL, V. T., MEMBRIVE, N., LUZ, E. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 5, p. 445-452, 2002.

CERINO DA, TEODORO U, SILVEIRA TGV. Sand flies (Diptera: Psychodidae) in the urban area of the municipality of Cianorte, Paraná state, Brazil. **Neotropical entomology**, Londrina, v. 38, n. 6, p. 853-858, 2009.

CERQUEIRA, E. J. L.; SHERLOCK, I.; GUSMÃO, A.; BARBOSA JUNIOR, A. A.; NAKATANI, M. Inoculação experimental de *Equus asinus* com *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, n.6, p.695-701, 2003.

CHAREST, H; MATLASHEWSKI, G. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 14, n. 5, p. 2975-2984, 1994.

CHAVES, L. F. COHEN, J. M.; PASCUAL, M.; WILSON, M. L. Exclusion Modifies Climate and Deforestation Impacts on a Vector-Borne Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n. 2, e176, 2008.

COSTA, L.; CALDART, E. T.; RUFFOLO, B. B.; TOLEDO, R. S.; DIAS, R. C. F.; NAVARRO, I. T.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L. Leishmaniasis in dogs from recycling centers and from a neighborhood with adjacent forest in an urban area of Londrina, Paraná, Brazil. **Sêmima: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 3, p. 1407-1414, 2016.

COUTINHO, M. T.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam v. 128, n. 1-2, p. 149-155, 2005.

COUTINHO, M. T.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, Amsterdam v. 147, n. 3-4, p. 320-325, 2007.

CRMV-PR. CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO PARANÁ. **Manual Técnico: Leishmanioses caninas**. Curitiba- Paraná, 2015.

CRUZ, C. F. R.; CRUZ, M. F. R.; GALATI, E. A. B. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in rural and urban environments in an endemic area of cutaneous leishmaniosis in southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 3, p. 303-311, 2013.

CRUZ, M. F. R.; GALATI, E. A. B.; CRUZ, C. F. R. Ecological aspects of the sandfly fauna (Diptera, Psychodidae) in an American cutaneous leishmaniosis endemic area under the influence of hydroelectric plants in Paranapanema river, State of Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 4, p. 430-436, 2012.

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

DANTAS-TORRES, F.; SIMÕES-MATTOS, L.; BRITO, F. L. C.; FIGUEREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A. G. Leishmaniose felina: revisão de literatura. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 61, p. 32-40, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; de PAIVA-CAVALCANTI, M.; FIGUEREDO, L. A.; MELO, M. F.; da SILVA, F. J.; da SILVA, A. L.; ALMEIDA, E. L.; BRANDÃO-FILHO, S. P.

Cutaneous and visceral leishmaniasis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 170, n. 3- 4, p. 313- 317, 2010.

DEBORGGRAEVE, S.; BOELAERT, M.; RIJAL, S.; de DONCKER, S.; DUJARDIN, J. C.; HERDEWIJN, P.; BUSCHER, P. Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical visceral leishmaniasis in Nepal and its role in diagnosis of disease. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 13, n. 11, p. 1378-1383, 2008.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DIAS-SVERSUTTI ADC, SCODRO RBDL, REINHOLD-CASTRO KR, NEITZKE HC, TEODORO U. Preliminary study on feeding preference of *Nyssomyia neivai* (Pinto) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) in a rural area of the state of Paraná, South Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 6, p. 953-959, 2007.

DORVAL MEMC, OSHIRO ET, CUPOLLILO E, CASTRO ACC, ALVES TP. Occurrence of American tegumentary leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State associated to the infection for *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 43-46, 2006.

DOWNING, T.; IMAMURA, H.; DECUYPERE, S.; CLARK, T. G.; COOMBS, G. H.; COTTON, J. A.; HILLEY, J. D.; de DONCKER, S.; MAES, I.; MOTTRAM, J. C.; QUAIL, M. A.; RIJAL, S.; SANDERS, M.; SCHÖNIAN, G.; STARK, O.; SUNDAR, S.; VANAERSCHOT, M.; HERTZ-FOWLER, C.; DUJARDIN, J. C.; BERRIMAN, M. Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance, **Genome Research**, Nova York, v. 21, n. 12, p. 2143–2156, 2011.

DUJARDIN, J. C.; CAMPINO, L.; CAÑAVATE, C.; DEDET, J. P.; GRADONI, L.; SOTERIADOU, K.; MAZERIS, A.; OZBEL, Y.; BOELAERT, M. Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, n. 7, p. 1013-1018, 2008.

EVERS, F. FERREIRA, F. P., NAVARRO, I. T., MITSUKA-BREAGANNÓ, R., PAGLIARI, S., MÔNICA, T. C., NINO, B. S. L., FREIRE, R. L. Presence of anti-*Leishmania*

spp. antibodies in slaughter horses in Brazil. **Sêmima: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 6, p. 3921-3926, 2017.

FARAHMAND, M.; SHIRAZI, H. A.; NAHREVANIAN, H.; HAJJARAN, H. Molecular analysis of A2-genes encoding stage-specific S antigen-like proteins among isolates from Iranian cutaneous and visceral leishmaniasis. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, Mashhad, v. 14, n. 5, p. 407-413, 2011.

FERNANDES, A. P.; CANAVACI, A. M. C.; MCCALL, L. I.; MATLASHEWSKI, G. A2 and other visceralizing proteins of *Leishmania*: Role in pathogenesis and application for vaccine development. **Subcellular Biochemistry**, London, v. 74, p. 77-101. 2014.

FORATTINI, O. P. **Entomologia médica**. v. 4. 1ª ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1973. 658p.

FRAGA, J.; MONTALVO, A. M.; de DONCKER, S.; DUJARDIN, J. C.; VAN DER AUWERA, G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 238–245, 2010.

FREITAS RA, BARRETT TV, NAIFF RD. *Lutzomyia reducta* Feliciangeli et al., 1988, a host of *Leishmania amazonensis*, sympatric with two other members of the flaviscutellata complex in southern Amazonas and Rondonia, Brazil (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 3, p. 363-369, 1989.

GENARO, O.; SILVA, A. L. F. F.; MICHALICK, M. S. M.; COSTA, C. A.; MAYRINK, W.; DIAS, M. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 9 ed. São Paulo:Atheneu, 1995a. p.41-60.

GENARO, O.; SILVA, A. L. F. F.; MICHALICK, M. S. M.; COSTA, C. A.; MAYRINK, W.; DIAS, M. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 9 ed. São Paulo:Atheneu, 1995b. p.64-81.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GOSSAGE, S. M.; ROGER, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 33, n. 10, p. 1027-1034, 2003.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 181, n. 1, p. 23-30, 2011.

HERVÁS, J.; CHACON, M.; DE LARA, F. Granulomatous (psuedotumoral) iridocyclitis associated with leishmaniasis in a cat. **Veterinary Research**, X, v. 149, n. x ,p. 624-625. Pubmed; PMID 11761295, 2001.

HOFFMANN, A. R.; NAVARRO, I. T.; CAMARGO-JUNIOR, V. E.; CALDART, E. T.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; PEREIRA, P. M. *Leishmania amazonensis* em cão com quadro clínico de leishmaniose visceral no Estado do Paraná, Brasil – relato de caso. **Sêmima: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, s. 2, p. 3265-3270, 2012.

KIRKPATRICK, C. E.; FARRELL, J. P.; GOLDSCHMIDT, M. H. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infection in domestic cats. **Experimental Parasitology**, v. 58, n. 2, p. 125–131, 1984.

KOUAM, M. K.; DIAKOU, A.; KANZOURA, V.; PAPADOPOULOS, E.; GAJADHAR, A. A.; THEODOROPOULOS, G. A seroepidemiological study of exposure to *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Echinococcus* and *Trichinella* in equids in Greece and analysis of risk factors. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 170, n. 1, p. 170-175, 2010.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. *Leishmanias* and leishmaniasis of the New World, with particular reference to Brazil. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 76, n. 2, p. 93-114, 1974.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. **British Medical Bulletin**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 44-48, 1972.

LAINSON R, SHAW JJ. Leishmaniosis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniosis incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian Basin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 62, n. 3, p. 385-395, 1968.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis. In: COX, F. E. G.; WAKELIN, D.; GILLESPIE, S. H.; DESPOMMIER, D. D. Topley & Wilson's **Microbiology and Microbial Infections: parasitology**. 10<sup>a</sup> ed. London: Hodder Arnold ASM Press; 2005. p. 313-49.

LARA-SILVA, F. O.; BARATA, R. A.; MICHALSKY, E. M.; FERREIRA, E. C.; LOPES, M. O. G.; PINHEIRO, A. C. FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. *Rattus norvegicus* (Rodentia: Muridae) infected by *Leishmania (Leishmania) infantum* (syn.Le. chagasi) in Brazil. **BioMed Research International**, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/592986>, 2014.

LARUELLE-MAGALON C, TOGA I. Un cas de leishmaniose feline. **Practical Médecine Chirurgica Animales de Compania**. n. 31, p. 255-261, 1996.

LEIVA M, LLORET A, PEÑA T, ROURA X. Therapy of ocular and visceral leishmaniosis in a cat. **Veterinary Ophthalmology**, Ohio, v. 8, n. 1, p. 71-75, 2005.

LIMA, H.; RODRIGUEZ, N.; BARRIOS, M. A.; AVILA, A.; CANIZALES, I.; GUTIERREZ, S. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 4, p. 412–414, 2008.

LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V.; ALVES, W. A. et al. Human and canine American cutaneous leishmaniasis in Mariluz, Paraná State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 12, p. 2713-2716, 2006.

MANNAERT, A.; DOWNING, T.; IMAMURA, H.; DUJARDIN, J. C. Adaptive mechanisms in pathogens: universal aneuploidy in *Leishmania*. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 9, p. 370–376, 2012.

MAROLI, M.; PENNISI, M. G.; DI MUCCIO, T.; KHOURY, C.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 145, n. 3-4, p. 357-360, 2007.

MARLOW, M. A.; MATTOS, M. S.; MAKOWIECKY, M. E.; EGER, I.; ROSSETTO, A. L.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Divergent profile of emerging cutaneous Leishmaniasis in Subtropical Brazil: New Endemic Areas in the Southern Frontier. **PLoS one**, San Francisco, v. 8, n. 2, e56177, 2014.

MARTINEZ, E.; L. E. PONT; TORREZ, M.; TELLERIA, J.; VARGAS, F.; DUJARDIN, J. C.; DUJARDIN, J. P. *Lutzomyia nuneztovari anglesi* (Le pont & Desjeux, 1984) as a vector of *Leishmania amazonensis* in a sub-Andean leishmaniasis focus of Bolivia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 61, n. 5, p. 846-849, 1999.

MATOS, A. M. R. N.; CALDART, E. T.; FERREIRA, F. P.; MONTEIRO, K. C.; SOUZA, M.; BRUNIERI, D. T. S. C.; HILST, C. L. S.; MASCARENHAS, N. M. F.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T. Antibodies anti-trypanosomatides in domestic cats in Paraná: who is at highest risk of infection?. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 232-236, 2018.

MAZZA, S. Leishmaniasis cutânea en el caballo observación de la misma em el perro. **Boletín Inst Clínico Quir rgico**, n. 3, p. 462-464, 1927.

MELO, S. C. C. S. D.; CELLA, W.; MASSAFERA, R.; SILVA, N. M. M. G.; MARQUI, R.; CARVALHO, M. D. D. B.; TEODORO, U. Phlebotomine sandflies in rural locations in the State of Parana, southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 55, n. 6, p. 407-410, 2013.

MEMBRIVE, N.A.; RODRIGUES, G.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V.; TEODORO, U. Flebotomíneos de municípios do norte do estado do Paraná, sul do Brasil. **Entomología y Vectores**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 673-680, 2004.

MOLYNEUX, D. H.; KILLICK-KENDRICK, R. Morphology, ultrastructure and life cycles. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in biology and medicine: biology and epidemiology**. vol. 1, London: Academic Press, 1987, p.122-168.

MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. Editora Roca. 2016.

MOSHFE, A.; MOHEBALI, M.; EDRISSIAN, G.; ZAREI, Z.; AKHOUNDI, B.; KAZEMI, B.; JAMSHIDI, S.; MAHMOODI, M. Canine visceral leishmaniasis: Asymptomatic infected

dogs as a source of *L. infantum* infection. **Acta Tropica**, Basel, v. 112, n. 2, p. 101–105, 2009.

OLIVEIRA, F. J. A.; COSTA, I. C.; NUNES, V.; OLIVEIRA, O.; OLIVEIRA NETO, B. P.; OLIVEIRA, J. E. Leishmaniose tegumentar americana: Flebotomíneos de área de transmissão do Parque Arthur Thomas na região de Londrina – PR. **Biosaúde**, Londrina, v. 2, p. 81-87, 2000.

PALETTA-SILVA, R.; VIEIRA, D. P.; VIEIRA-BERNARDO, R.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C.; VANNIER-SANTOS, M. A.; LOPES, A. H.; MEYER-FERNANDES, J. R. *Leishmania amazonensis*: characterization of na ecto-30-nucleotidase activity and its possible role in virulence, **Experimental Parasitology**, Nova York, v. 129, n. 3, p. 277–283, 2011.

PEACOCK, C. S.; SEEGER, K.; HARRIS, D.; MURPHY, L.; RUIZ, J. C.; QUAIL, M. A.; PETERS, N.; ADLEM, E.; TIVEY, A.; ASLETT, M.; KERHORNOU, A.; IVENS, A.; FRASER, A.; RAJANDREAM, M. A.; CARVER, T.; NORBERTCZAK, H.; CHILLINGWORTH, T.; HANCE, Z.; JAGELS, K.; MOULE, S.; ORMOND, D.; RUTTER, S.; SQUARES, R.; WHITEHEAD, S.; RABBINOWITSCH, E.; ARROWSMITH, C.; WHITE, B.; THURSTON, S.; BRINGAUD, F.; BALDAUF, S. L.; FAULCONBRIDGE, A.; JEFFARES, D.; DEPLEDGE, D. P.; OYOLA, S. O.; HILLEY, J. D.; BRITO, L. O.; TOSI, L. R.; BARRELL, B.; CRUZ, A. K.; MOTTRAM, J. C.; SMITH, D. F.; BERRIMAN, M. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, Nova York, v. 39, n. 7, p. 839–847, 2007.

PENNISI, M. G. VENZA, M.; REALE, S.; VITALE, F.; Lo GIUDICE, S. Case report of leishmaniasis in four cats. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 28, s. 1, p. 363-366, 2004.

PEREIRA, E. F. A. Variabilidade Genética e Diagnóstico Molecular da *Leishmania* spp., pelas Técnicas de RAPD e PCR, no estado do Paraná e Casos Importados. 2005. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2005.

PONTELLO-JÚNIOR, R.; GON, A. S.; OGAMA, A. American cutaneous leishmaniasis: epidemiological profile of patients treated in Londrina from 1998 to 2009. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 5, p. 748-53, 2013.

PRATLONG, F.; RIOUX, J. A.; MARTY, P.; FARAUT-GAMBARELLI, F.; DEREURE, J.; LANOTTE, G.; DEDET, J. P. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 9, p. 4077-4082, 2004.

RANGEL, E. F., LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, p. 937–954, 2009.

RAYMOND, F.; BOISVERT, S.; ROY, G.; RITT, J. F.; LÉGARÉ, D.; ISNARD, A.; STANKE, M.; OLIVIER, M.; TREMBLAY, M. J.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M.; CORBEIL, J. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. **Nucleic Acids Research**, London, v. 40, n. 3, p. 1131–1147, 2012.

REAL, F.; VIDAL, R. O.; CARAZZOLLE, M. F.; MONDEGO, J. M. C.; COSTA, G. G. L.; HERAI, R. H.; WURTELE, M.; de CARVALHO, L. M.; FERREIRA, R. C.; MORTARA, R. A.; BARBIÉRI, C. L.; MIECZKOWSKI, P.; da SILVEIRA, J. F.; BRIONES, M. R. S.; PEREIRA, G. A. G.; BAHIA, D. The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. **DNA Research**, Oxford, v. 20, p. 567–581, 2013.

RÊGO, F. D.; RUGANI, J. M. N.; SHIMABUKURO, P. H. F.; TONELLI, G. B.; QUARESMA, P. F.; GONTIJO, C. M. F. Molecular Detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cutaneous leishmaniosis focus at Xakriabá indigenous reserve, Brazil. **PLoS one**, San Francisco, v. 10, n. 4, p. e0122038, 2015.

REIS, H. R.; LOPES-MORI, M. R.; REIS, C. R.; FREIRE, R. L.; MARANA, E. R. M.; CHRYSSAFDIS, A. L.; TEDIM, A. V.; RUFFOLO, B. B.; BUGNI, F. M.; CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; NABUT, L. B.; NAVARRO, I. T. Soroprevalência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) canina e fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Bela Vista do Paraíso, Paraná. **Sêmima: Ciências Agrárias**, Londrina v. 32, n. 3, p. 1083-1094, 2011.

ROGERS, M. B.; HILLEY, J. D.; DICKENS, N. J.; WILKES, J.; BATES, P. A.; DEPLEDGE, D. P.; HARRIS, D.; HER, Y.; HERZYK, P.; IMAMURA, H.; OTTO, T. O.; SANDERS, M.; SEEGER, K.; DUJARDIN, J. C.; BERRIMAN, M.; SMITH, D. F.; HERTZFOWLER, C.; MOTTRAM, J. C. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Research**, Nova York, v. 21, n. 12, p. 2129–2142, 2015.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, San Francisco, v. 3, n. 3, p. 251–262, 2014.

ROSSI, C. N. Ocorrência de *Leishmania* sp em gatos do município de Araçatuba-São Paulo - Brasil. 2007. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2007.

RÜFENACHT, S.; SAGER, H.; MÜLLER, N.; SCHAERER, V.; HEIER, A.; WELLE, M. M.; ROOSJE, P. J. Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. **The Veterinary Record**, London, v. 156, n. 17, p. 542-545, 2005.

SANTOS, D. R.; FERREIRA, A. C.; BISETTO-JUNIOR, A. O primeiro registro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae), no Estado do Paraná, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 45, n. 5, p. 643-645, 2012.

SAVANI, E. S. M. M.; OLIVEIRA-CAMARGO, M. C.; CARVALHO, M. R.; ZAMPIERI, R. A.; SANTOS, M. G.; D'AURIA, S. R.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. The first record in the Americas an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia Couty, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam v. 120, n. 3, p. 229-233, 2004.

SCHÖNIAN, G.; KUHL, K.; MAURICIO, I. L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. **Parasitology**, Cambridge, v. 138, n.4, p. 405–425, 2011.

SCHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H. D.; PRESBER, W.; JAFFE, C. L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and

imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Nova York, v. 47, n. 1, p. 349–358. 2003.

SERRANO, A. C. M.; NUNES, C. M.; SAVANI, E. S. M.; D´AURIA, S. R. N.; BONELLO, F. L.; VASCONCELOS, R. O.; de LIMA, V. M. F.; BRESCIANI, K. D. S. Leishmaniose em felino na zona urbana de Araçatuba - SP - relato de caso. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 76, p. 36-40, 2008.

SHAW, J. J., LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: VI. Observations on the seasonal variations of *Lutzomyia flaviscutellata* in different types of forest and its relationship to enzootic rodent 16 leishmaniasis (*Leishmania mexicana amazonensis*). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 66, n. 5, p. 709–717, 1972.

SILVA, A. M.; CAMARGO, N. J.; SANTOS, D. R.; MASSAFERA, R.; FERREIRA, A. C.; POSTAI, C.; CRISTÓVÃO, E. C.; KONOLSAISENII, J. F.; BISETTO-JR, A.; PERINAZO, R.; TEODORO, U.; GALATI, E. A. B. Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. **Neotropical Entomology**, Londrina v. 37, n. 2, p. 209-225, 2008a.

SILVA, M. A.; SOUZA CÂNDICO, C. D.; PITA-PEREIRA, D.; BRAZIL, R. P.; CARREIRA, J. C. The first record of american visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 105, n. 1, p. 92-94, 2008.

SILVA, S. M.; RABELO, P. F. B.; GONTIJO, N. F.; RIBEIRO, R. R.; MELO, M. N.; RIBEIRO, V. M.; MARQUES, M. S.; MICHALICK, M. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam .2010; (174):150-154.Pubmed; PMID 20832944.

SILVEIRA, T. G. V., ARRAES, S. M. A. A., BERTOLINI, D. A., TEODORO, U., LONARDONI, M. V. C., ROBERTO, A. C. B. S., RAMOS, M.; SOBRINHO, A. N.; ISHIKAWA, E.; SHAW, J. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 4, p. 413-423, 1999.

SILVEIRA, T. G. V., TEODORO, U., ARRAES, S. M. A. A., LONARDONI, M. V. C., DIAS, M. L. G. G., SHAW, J. J., ISHIKAWA, E. A. Y., LAINSON, R. An Autochthonous case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Laison &

Shaw, 1972 from the North of Paraná State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, p. 475–476, 1990.

SILVA-FILHO, M. de F.; TAMEKUNI, K.; TOLEDO, R. S.; DIAS, R. C. F.; LOPES-MORI, F. R.; MITSUKA-BREGANÓS, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; GARCIA, J. L.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T. Infection by *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. in humans and dogs from rural settlements in Northern Paraná State, Brazil. **Sêmima: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, s. 2, p. 3251-3264, 2012.

SMITH, D. F.; PEACOCK, C. S.; CRUZ, A. K. Comparative genomics: From genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 37, n. 11, p. 1173–1186, 2007.

SOLANO-GALLEGO, L.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; INIESTA, L.; QUINTANA, J.; PASTOR, J.; ESPADA, Y.; PORTÚS, M.; ALBEROLA, J. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 76, n. 4, p. 676 -680, 2007.

STERKERS, Y.; LACHAUD, L.; BOURGEOIS, N.; CROBU, L.; BASTIEN, P.; PAGES, M. Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*. **Molecular Microbiology**, Boston, v. 86, n. 1, p. 15–23, 2012.

TEODORO, U.; BALDUÍNO, J.; THOMAZ-SOCCOL, V.; BARBOSA, O. C.; FERREIRA, M. E.; LOZOVEI, A. L.; SILVEIRA, T. G. V.; ROBERTO, A. C. B. S. Environmental sanitation and peri-domiciliar organisation as auxiliary practices for the control of phlebotomines in Paraná state, southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 42, n. 3, p. 307-314, 1999.

THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E. A.; NAVARRO, I. T.; DE FARIAS, M. R.; DE SOUZA, L. M.; CARVALHO, Y.; BISPO, S.; MEMBRIVE, N. A.; MINOZZO, J. C.; TRUPPEL, J.; BUENO, W.; LUZ, E. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 46-51, 2009.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. How clonal are *Trypanosoma* and *Leishmania*? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 264–269, 2013.

TRUPPEL, J. H., OTOMURA, F., TEODORO, U., MASSAFERA, R., DA COSTA-RIBEIRO, M. C. V., CATARINO, C. M., THOMAZ-SOCCOL, V. Can equids be a reservoir of *Leishmania braziliensis* in endemic areas? **PloS one**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. e93731, 2014.

UNDERHILL-DAY JC. A Literature review of urban effects on lowland healths and their wildlife. **English Nature** 2005.

VAN DER AUWERA, G.; DUJARDIN, J. C. Species typing in dermal leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, London, v. 28, n. 2, p. 265-294, 2015.

VEDOVELLO FILHO, D.; JORGE, F. A., LONARDONI, M. V. C., TEODORO, U., SILVEIRA, T. G. V. American cutaneous leishmaniasis in horses from endemic areas in the North-Central mesoregion of Paraná state, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, Reino Unido, v. 55, n. 3, p. 149–155, 2008.

WENZEI, K. Santa Catarina tem primeiro caso de leishmaniose visceral humana. Jornal de Santa Catarina, Florianópolis, 17, ago. 2017. Notícias. Available in: <<http://jornaldesantacatarina.clicrbs.com.br/sc/noticia/2017/08/santa-catarina-tem-primeiro-caso-deleishmaniose-visceral-humana-9872502.html>>. Accessed in september 4. 2017.

WHO. World Health Organization. **The Global Burden of Disease: 2004 update**. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 2004. 84 p.

WHO. World Health Organization. **Control of the Leishmaniasis: Report of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**. Geneva, 22–26 March 2010. WHO Technical Report Series 949.

ZHANG, W. W; MATLASHEWSKI, G. Screening *Leishmania donovani* specific genes required for visceral infection. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 77, n. 2, p. 505–517, 2010.

ZHANG, W.; PEACOCK, C. S.; MATLASHEWSKI, G. A genomic-based approach combining in vivo selection in mice to identify a novel virulence gene in *Leishmania*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n. 6, e248, 2008.

ZHANG, W. W.; RAMASAMY, G.; MCCALL, L. I.; HAYDOCK, A.; RANASINGHE, S.; ABEYGUNASEKARA, P.; SIRIMANNA, G.; WICKREMASINGHE, R.; MYLER, P.; GREG MATLASHEWSKI, G. Genetic analysis of *Leishmania donovani* tropism using a naturally attenuated cutaneous strain. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 10, n. 7, e1004244, 2014.

ZULPO, D. L.; LEITE, J. H. A. de C.; CUNHA da, I. A. L.; BARROS; L. D.; TARODA, A.; CAMARGO-JÚNIOR, V. E. SANTOS, H. L. E. P. L.; GARCIA, J. L. Ocorrência de anticorpos contra *Leishmania* spp., *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em soros de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina – PR. **Sêmima: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 1897-1906, 2012.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar as leishmanioses em humanos e animais do Norte do Paraná sob o ponto de vista espacial e molecular.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos casos de leishmaniose tegumentar americana humana notificados no Norte do Paraná entre 2007 e 2016.

- Georreferenciar e analisar a influência de variáveis climáticas, econômicas e ambientais na ocorrência de leishmaniose tegumentar americana humana no Norte do Paraná.

- Realizar vigilância epidemiológica ativa e precoce da entrada da leishmaniose visceral no Norte do Paraná por meio de fauna silvestre atropelada e de busca ativa de casos caninos.

- Avaliar uma nova metodologia de vigilância epidemiológica ativa da leishmaniose visceral em área não endêmica por meio de animais sentinelas, neste caso, silvestres atropelados, o que permite ser precoce sem causar impacto direto sobre a fauna.

#### 4 ARTIGO A

### **LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E ANÁLISE ESPACIAL DOS CASOS HUMANOS NOTIFICADOS NO NORTE DO PARANÁ DE 2007 A 2016**

### **AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS: EPIDEMIOLOGICAL PROFILE AND SPATIAL ANALYSIS OF HUMAN CASES NOTIFIED IN THE NORTH OF PARANÁ FROM 2007 TO 2016**

Eloiza Teles Caldart, Anaiá da Paixão Sevá, Fernanda Pinto Ferreira, Aline Ticiani Pereira Pachol, Juliana Silva de Oliveira, Isadora de Britto Cortela, Juliana Correa Bernardes, Regina Mistsuka-Breganó, Itamar Teodorico Navarro

#### **RESUMO**

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma dermatozoonose de notificação compulsória com relevante morbidade. O presente estudo objetivou avaliar os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos casos de leishmaniose tegumentar americana notificados em 89 municípios da região Norte do estado do Paraná entre os anos de 2007 e 2016; bem como, analisar a influência de variáveis climáticas, econômicas e ambientais na prevalência dessa doença. Os dados das fichas de notificação de LTA foram obtidos e as residências dos pacientes foram georreferenciadas. O programa EpiInfo foi utilizado no cálculo de frequências e produção de gráficos. Cálculos de incidência para cada município e de proporção de cobertura vegetal por área de município foram realizados com o programa computacional QGIS. Foi realizada análise espacial de estimativa local para avaliação de agrupamentos de casos graves ou abandono de tratamento com o programa Satscan. Para avaliação da significância de cada variável foi utilizado o modelo de regressão linear múltipla com o programa R. Os 1451 casos notificados foram georreferenciados, 44,4% da 15ªRS, 11,9% da 16ªRS, 24,8% da 17ªRS e 19,1% da 18ªRS. No período do estudo houve picos de casos em 2008, 2012 e 2015, demonstrando o já conhecido perfil cíclico do agravo. A forma clínica cutânea foi predominante (88,3%), casos novos corresponderam a 90,8% das notificações, 7,8% foram recidivas, 92,2% dos casos evoluíram para cura, 3,0% abandonaram o tratamento. Foi notificado óbito por LTA em quatro indivíduos. Na análise de regressão foi observado que quanto menor a proporção de Mata Atlântica remanescente, maior a incidência de LTA no município, corroborando com a hipótese de que a LTA se expande em locais de desmatamento. Por meio da análise de agrupamentos pode-se observar que em municípios da 15ªRS foi observada concentração de abandono de tratamento em relação aos casos curados. Os dados apresentados no presente trabalho demonstram que medidas preventivas e de educação em saúde devem ser principalmente direcionadas a áreas de maior degradação da mata nativa; bem como, o desmatamento deve ser contido para que se possa evitar a expansão da LTA no Norte do Paraná. Além disso, demonstram a necessidade de ações imediatas por parte dos gestores nos municípios da 15ªRS principalmente no sentido de conscientizar os pacientes com relação às consequências do abandono do tratamento.

**Palavras-chave:** Georreferenciamento. Recidiva. Urbanização. Notificação. Prevenção.

## ABSTRACT

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a notifiable dermatozoonosis with relevant morbidity. The present study aimed to evaluate the clinical, epidemiological and laboratory aspects of the cases of American cutaneous leishmaniasis reported in 89 municipalities in the Northern region of the State of Paraná between 2007 and 2016; as well as to analyze the influence of climatic, economic and environmental variables on the prevalence of this disease. The data of the ACL notification sheets were obtained and the patients residences were georeferenced. The EpiInfo program was used in the calculation of frequencies and production of graphs. Incidence calculations for each municipality and proportion of vegetation coverage by area of municipality were carried out using the QGIS computer program. A spatial analysis of local estimation was carried out to evaluate groupings of severe cases or abandonment of treatment with the Satscan program. To evaluate the significance of each variable, the multiple linear regression model was used with program R. The 1451 reported cases were georeferenced, 44.4% of the 15 th RH, 11.9% of the 16 th RH, 24.8% of the 17 th RH and 19.1% of the 18 th RH. During the study period there were case peaks in 2008, 2012 and 2015, demonstrating the already known cyclic profile of the disease. The cutaneous clinical form was predominant (88.3%), new cases corresponded to 90.8% of the notifications, 7.8% were relapses, 92.2% of cases evolved to cure, and 3.0% abandoned treatment. Death was reported by LTA in four individuals. In the regression analysis it was observed that the lower the proportion of remaining Atlantic Forest, the higher the incidence of ATL in the municipality. By means of cluster analysis it can be observed that in municipalities of the 15 th RH the concentration of treatment abandonment was observed in relation to the cured cases. The data presented in the present study demonstrate that preventive and health education measures should be mainly directed to areas of greater degradation of the native forest; as well as, deforestation must be contained in order to avoid the expansion of the LTA in the North of Paraná. In addition, they demonstrate the need for immediate actions by managers in the 15 th RH municipalities, mainly in the sense of making patients aware of the consequences of abandoning treatment.

**Key words:** Georeferencing. Relapse. Urbanization. Notification. Prevention.

## Introdução

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma dermatozoonose com relevante morbidade, aproximadamente 1/3 dos casos ocorre em uma dessas três regiões do mundo: Américas, Mediterrâneo e Ásia (ALVAR et al., 2012). Cerca de 220.000 casos de LT são notificados por ano no mundo; considerando-se a sub-notificação, calcula-se que 1,2 milhões de casos seja o número real. Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru são os países com maior incidência em todo o mundo, juntos contabilizam 70 a 75% da incidência global de LT (ALVAR et al., 2012).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma das principais doenças transmitidas por vetores emergentes e re-emergentes nas Américas (CHAVES et al., 2008) e é considerada uma potencial ameaça à vida ou de desfiguração clínica (AZULAY; AZULAY JUNIOR, 1995). No Brasil é uma doença de notificação compulsória, ocorre em todas as faixas etárias e ambos os sexos, entretanto, maiores de 10 anos representam 90% dos casos e o sexo masculino, 74% dos casos (BRASIL, 2017). Na década de 80, a LTA foi assinalada em 19 estados brasileiros e desde 2003 o Brasil tem casos confirmados em todos as unidades federadas (ALVAR et al., 2012).

Os agentes etiológicos da LTA no Brasil são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg*, *L. (V.) shawi* e, a mais prevalente, *L. (V.) braziliensis* (BRASIL, 2017). No estado do Paraná ocorrem 98% dos casos humanos de LTA da região Sul do Brasil (PONTELLO JUNIOR; GON; OGAMA,2013) e 3% dos casos nacionais, as espécies de *Leishmania* envolvidas são *L. (L.) amazonensis* (SILVEIRA et al., 1990) e *L. (V.) braziliensis* (SILVEIRA et al., 1999; CASTRO et al., 2002). Os vetores *Lutzomyia whitmani*, *Lu. neivai*, *Lu. migonei*, *Lu. pessoai*, comumente relacionados à *L. (V.) braziliensis*, foram reportados no Norte do Paraná por Membrive et al. (2004), Oliveira et al. (2000) e Silva et al. (2008). Por outro lado, os vetores de *L. (L.) amazonensis* nunca foram reportados no estado (CALDART et al., 2017).

A compreensão dos padrões espaciais de doenças com o uso de técnicas de geoprocessamento é importante para a orientação adequada das medidas de prevenção, vigilância e controle, possibilitando monitorar unidades territoriais de significância epidemiológica e servir como ferramenta para a tomada de decisão dos órgãos competentes das esferas municipal, estadual e federal (PRADO et al., 2011; BRASIL, 2016).

O presente estudo objetivou avaliar os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos casos de leishmaniose tegumentar americana humana notificados no Norte do Paraná entre 2007 e 2016, bem como georreferenciar e analisar a influência de variáveis climáticas, econômicas e ambientais nesses casos.

## **Material e Métodos**

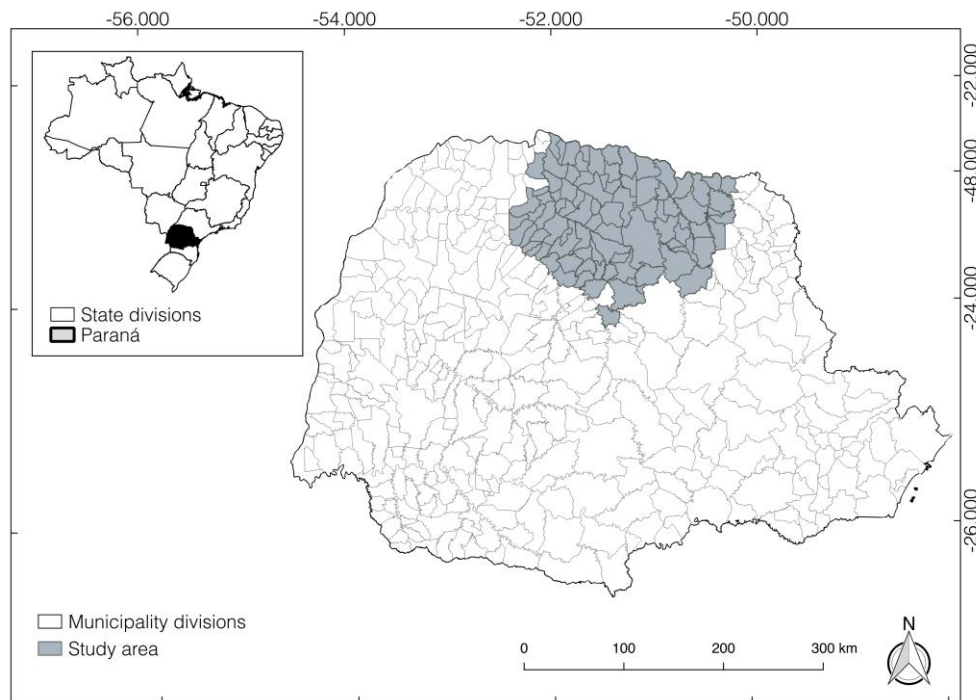
### *Aspectos Éticos*

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CEP-UEL) em 24.01.2017 sob o número 1.896.849 (Anexo A).

### *Área de Estudo*

O estado do Paraná é dividido em 22 regionais de saúde (RS), os municípios participantes do estudo são os atendidos pelas 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> RS (Figura 1), totalizando 89 municípios cujos municípios sede são Maringá, Apucarana, Londrina e Cornélio Procópio, respectivamente.

Figura 1: Mapa do estado do Paraná, com destaque para os municípios participantes do projeto de pesquisa.



Fonte: Caldart e colaboradores.

### *Coleta de dados*

Os dados das fichas de notificação de LTA (Anexo B) de 22,3% (89/399) dos municípios paranaenses de um período de 10 anos (2007 a 2016) foram obtidos junto às regionais de saúde.

Dados climáticos a partir da classificação de Köppen, que considera altitude, temperatura, pluviosidade e latitude foram obtidos (ALVARES et al., 2013). Os aspectos da cobertura de uso do solo, como: áreas não florestadas, áreas de Mata Atlântica e área urbana,

foram extraídas no banco de dados do MapBiomas (Fundação SOS Mata Atlântica <http://mapas.sosma.org.br>). Dados de número de casos de LTA e tamanho populacional por município foram obtidos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), o que permitiu calcular a incidência por município. O índice de desenvolvimento humano dos municípios (IDH -M) foi obtido do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no censo de 2010.

Foram realizados os cálculos de áreas de cada município e da cobertura vegetal utilizando o programa QGIS (Versão 2.18), assim como a proporção de cada tipo de cobertura nos municípios pelo programa computacional R (Versão 0.99.467 – © 2009-2015) (R CORE TEAM, 2016).

### *Georreferenciamento*

A residência de todos os pacientes incluídos no estudo foram georreferenciadas por meio do *Global Positioning System* (Sistema de Posicionamento Global-GPS) de acordo com o endereço fornecido na ficha de investigação de LTA do SINAN. Nos casos em que não foi possível localizar o endereço do paciente, o endereço da unidade básica de saúde (UBS) onde ele foi atendido foi utilizado.

### *Análise espacial*

O método para a estimativa de *cluster* local escolhido foi a varredura espacial, desenvolvida por Kulldorff; Nagarwalla (1995). Entretanto, foi realizada adaptação das características da LTA ao método taxas de bi-variáveis; recidivas, abandono de tratamento e leishmaniose mucosa foram relacionados aos seus opostos (caso novo, cura e leishmaniose cutânea). Cada bi-variável foi analisada separadamente na área de estudo. Para cada *cluster* em potencial, calculou-se o teste da razão de verossimilhança (nível de significância de 5%) comparando-se a hipótese de que o risco da variável é maior no interior do círculo contra a hipótese de que o risco é igual para as áreas dentro e fora do círculo (WHELLER, 2007; PFEIFFER et al., 2008; KULLDORFF, 1997). O programa utilizado nesse estudo para a análise de *cluster* local foi o SaTScan® versão 9.4.2. Todos os mapas gerados foram realizados no programa QGIS (versão 2.18).

### *Análises estatísticas*

As informações das fichas de notificação foram armazenadas em planilhas no programa Excel, os cálculos de frequências e produção de gráficos para a descrição dos

aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos casos supracitados foram realizados por meio do programa Epi Info 7 (CDC-Atlanta). Para a comparação de incidências entre as RS foram utilizados os testes de Shapiro, e então Kruskal Wallis.

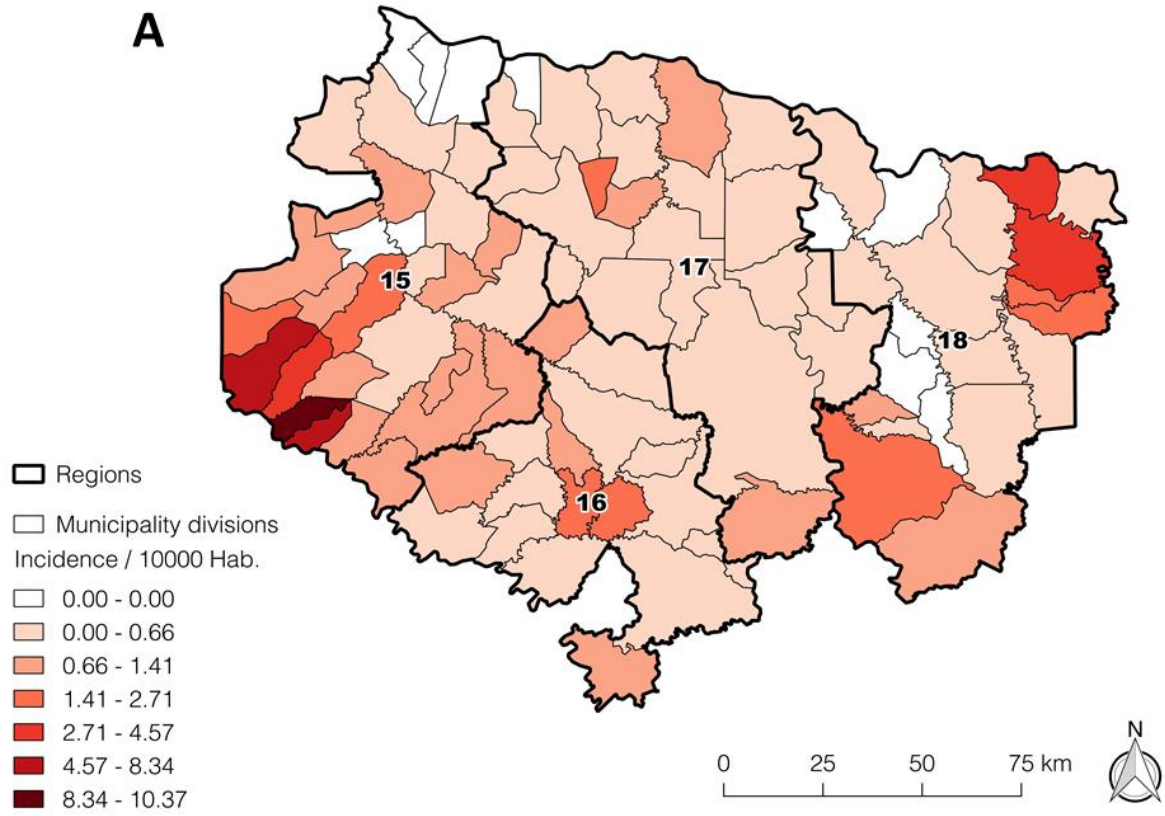
Para avaliação da significância de cada variável com relação à incidência foi utilizado o modelo de regressão linear múltipla. A incidência de casos (casos/10000 habitantes) foi considerada como variável dependente e a classificação climática de Köppen, proporção de áreas de Mata Atlântica remanescente e área urbana como variáveis independentes. Todas as variáveis apresentaram valores de  $p < 0.20$  na análise univariada, por isso foram incluídas no modelo de regressão múltipla, em que os valores de significância foram considerados com  $p < 0,05$ . Para tal análise foi utilizado o programa estatístico R (Versão 0.99.467 – © 2009-2015).

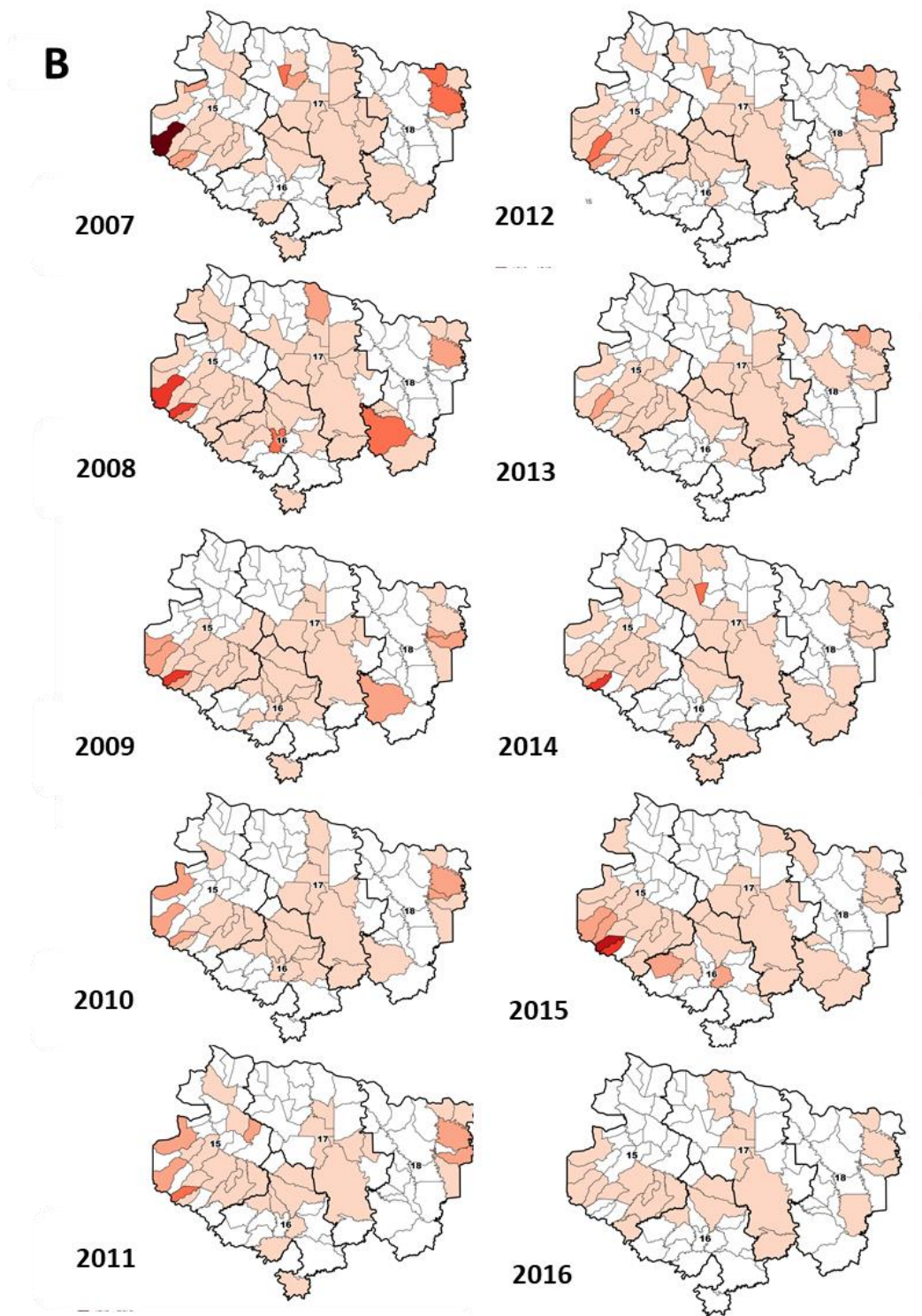
## **Resultados e Discussão**

Foram notificados 1451 casos de LTA nas RS participantes do projeto no período de 2007 a 2016, dentre eles, 44,3% (643/1451) foram notificados na 15ªRS, 11,9% (172/1451) na 16ªRS, 24,8% (360/1451) na 17ªRS e 19,1% (276/1451) na 18ªRS. Em 26,1% (378/1451) dos casos notificados, o endereço da unidade básica de saúde (UBS) de atendimento foi georreferenciado devido a incompletude do endereço do paciente na ficha de notificação, os percentuais de endereço incompleto por RS foram: 19,4%, 54,1%, 28,2% e 18,6%, respectivamente. A 16ªRS apresentou o maior percentual de endereços incompletos, provavelmente devido ao grande número de casos em área rural (45,9%) (Tabela 1), os quais, em sua maioria, apresentavam os nomes das propriedades ao invés do endereço. A ficha de notificação de LTA apresenta um campo para inserção das coordenadas geográficas do endereço do paciente, o qual não foi preenchido em nenhuma das utilizadas no presente estudo, sugere-se que esse campo passe a ser usado imediatamente, facilitando a execução de estudos semelhantes ao presente e permitindo análises mais precisas.

Levando-se em consideração a incidência média de casos no período, foi observada maior incidência nos municípios da 15ª RS (Figura 2), no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa ( $X^2= 3,514$ ,  $p= 0,3189$ ) entre as RS.

Figura 2. Incidência de leishmaniose tegumentar americana nos anos 2007 a 2016 nos municípios pertencentes às 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> regionais de saúde do estado do Paraná (A) incidência média no período. (B) incidência por ano.





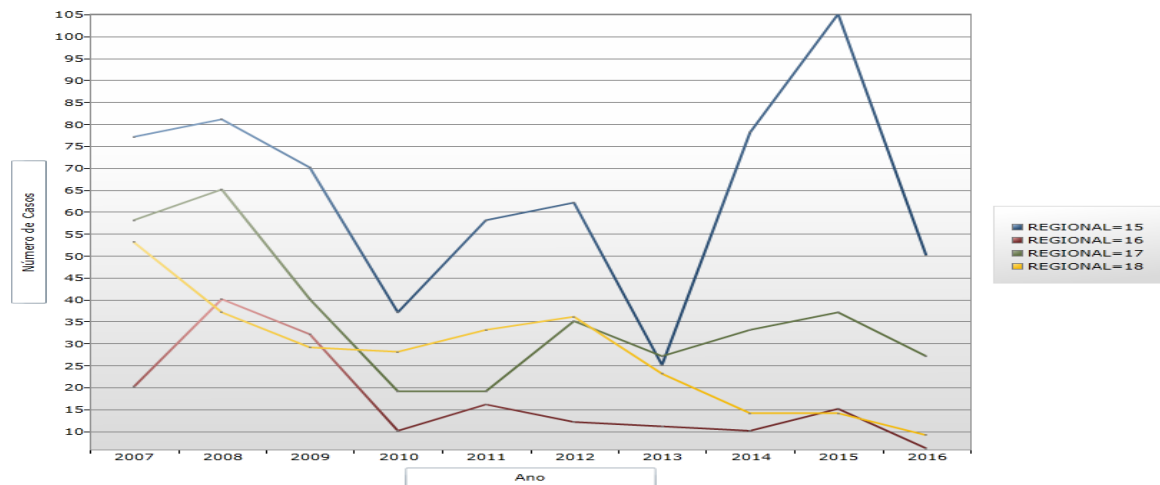
Fonte: Caldart e colaboradores.

Dos 89 municípios participantes do estudo, 78 (87,6%) tiveram casos notificados no período. As maiores incidências médias (casos/10000 habitantes) foram observadas em: Doutor Camargo (2,0), São Jorge do Ivaí (1,6), Ivatuba (1,2), Ourizona (0,8) e Nova Esperança (0,7) da 15ªRS; Itambaracá (0,9), Bandeirantes (0,9), São Jerônimo da Serra

(0,5) e Abatiá (0,5) da 18ªRS e Miraselva (0,5) da 17ªRS. As altas incidências em Doutor Camargo e São Jorge do Ivaí concordam com estudos anteriores (ROBERTO et al. 1997; CURTI et al., 2009; MONTEIRO et al., 2009; NASSIF et al., 2016).

Conforme Figura 3, no período do estudo houve picos de casos em 2007/2008, 2011/2012 e 2015. Esses resultados demonstram um perfil cíclico da doença já citado em diversos outros estudos em vários estados brasileiros (RESENDE, 2004; CONDINO et al., 2009; NASSER; DONALISIO; VASCONCELOS, 2009; CARVALHO et al., 2010). No caso do presente estudo essa ciclicidade é de aproximadamente quatro anos, o que pode ocorrer em decorrência do fenômeno *El Niño* por exemplo (CHAVES et al., 2006; TOLEZANO et al., 2007; ALCÂNTARA et al., 2016). Segundo Alcântara et al. (2016), a modificação climática favorece a multiplicação do vetor levando a um aumento de casos de LTA.

Figura 3. Número de casos de leishmaniose tegumentar americana por ano (2007 a 2016) por regional de saúde (15ª, 16ª, 17ª e 18ª) do estado do Paraná.



Fonte: Caldart e colaboradores.

Dentre os pacientes, 69,9% (1014/1451) eram do gênero masculino, 7,6% (111/1451) tinham idade entre 0 e 14 anos e 7,5% (109/1451) eram analfabetos (Tabela 1).

Avaliando as características dos casos incluídos no presente estudo apresentadas na Tabela 1, pôde-se observar um perfil diferente de pacientes na 18ªRS quando comparada às demais: mais da metade dos casos (51,8%) do gênero feminino, mais da metade dos casos (52,9%) na faixa etária de 50 anos ou mais e analfabetos foram mais acometidos (22,9%) do que nas outras regionais. Até a década de 90 a LTA apresentava um perfil exclusivamente ocupacional, estando associada principalmente a homens em idade produtiva

e que trabalhavam em áreas de florestas ou próximo a elas; no entanto, mudanças na epidemiologia vem ocorrendo (MARTINS et al., 2014), de acordo com Pontello Junior; Gon; Ogama, (2013) e Lima et al., (2002), essas diferenças indicam uma adaptação do vetor a ambientes peridomésticos. No que diz respeito a zona de residência dos pacientes, também é observada uma inversão epidemiológica nas 15<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> RS, as quais já apresentam mais da metade dos casos notificados em pacientes residentes em área urbana, 82,9%, 67,8% e 61,2%, respectivamente.

Tabela 1. Características dos 1451 casos de leishmaniose tegumentar americana notificados nas 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> regionais de saúde do estado do Paraná no período de 2007 a 2016.

	15RS		16RS		17RS		18RS		Todas as RS do estudo	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Sexo</b>										
masculino	549	85,4	113	65,7	219	60,8	133	48,9	1014	69,9
feminino	94	14,6	59	34,3	141	39,17	143	51,8	437	30,1
<b>Idade (anos)</b>										
0-14	29	4,5	16	9,3	39	10,8	27	9,8	111	7,6
15-29	101	15,7	24	13,9	58	16,1	33	11,9	216	14,9
30-49	246	38,3	72	41,9	123	34,2	70	25,4	511	35,2
≥50	267	41,5	60	34,9	140	38,9	146	52,9	613	42,2
<b>Grau de instrução</b>										
analfabeto	15	2,4	11	6,7	21	6,1	62	22,9	109	7,5
até 8 anos	369	58,2	107	64,8	156	45,2	157	58,1	789	55,8
mais de 8 anos	145	22,9	16	9,7	59	17,1	48	17,8	268	18,9
não determinado	105	16,6	31	18,8	109	31,6	3	1,1	248	17,5
<b>Zona</b>										
urbana	532	82,9	66	38,4	244	67,8	169	61,2	1011	69,7
rural	104	16,2	79	45,9	109	30,3	99	35,9	391	26,9
periurbana	3	0,5	23	13,4	6	1,7	3	1,1	35	2,4
ignorada	3	0,5	4	2,3	1	0,3	5	1,8	13	0,9

Fonte: Caldart e colaboradores.

Conforme Tabela 2, o critério de confirmação da LTA foi laboratorial em 86,3% (1252/1451) dos casos e clínico-epidemiológico nos demais; a forma clínica cutânea foi predominante (88,3%, 1281/1451), casos novos corresponderam a 90,8% (1317/1451) das notificações, a cura foi relatada em 92,2% (1240/1451) dos casos, enquanto 2,9% (40/1451) abandonaram o tratamento.

Coinfecção com HIV foi observada em 0,8% dos casos (12/1451), no entanto, 459 pacientes (31,6%) tinham o estatus de HIV ignorado. O diagnóstico da coinfecção *Leishmania*-HIV pode ter implicações na abordagem da leishmaniose quanto à indicação terapêutica, ao monitoramento de efeitos adversos, à resposta terapêutica e à ocorrência de recidivas (BRASIL, 2017). Recomenda-se maior atenção dos profissionais de saúde no sentido de solicitar o teste rápido para HIV em todos os casos de LTA.

Foi notificado óbito por LTA em 0,3% dos indivíduos (4/1451), todos apresentavam a forma mucosa da doença e idade acima de 70 anos, três eram da 15ª RS, um dos casos era recidiva (Tabela 2). Idosos apresentam maior risco de ir a óbito por LTA por apresentarem comorbidades que podem ser exacerbadas com o tratamento (BRASIL, 2017), esse achado reforça a necessidade de avaliação clínica rigorosa antes da prescrição do medicamento e acompanhamento durante o tratamento (NASSIF et al., 2016).

Em 8,1% (117/1451) dos casos não houve sucesso no tratamento inicial com antimoniato de meglumina, sendo a anfotericina B escolhida como segunda opção em 53,0% (62/117) desses casos (Tabela 2). O antimoniato de meglumina vem sendo usado há mais de 90 anos no Brasil (RATH et al., 2003) e é o medicamento de primeira escolha para tratamento da LTA segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2017), apesar de apresentar considerável nefrotoxicidade. No entanto, outros estudos relataram a ocorrência de falha no tratamento por esse medicamento, devido, principalmente, a resistência por parte dos parasitos (PONTELLO JUNIOR; GON; OGAMA, 2013; STRAZZULLA et al., 2013; NASSIF et al., 2016). A anfotericina B (AB) é a segunda droga de escolha no Brasil, não é indicada para cardiopatas, hepatopatas e, especialmente, nefropatas; além disso, exige a internação do paciente para que seja administrada com segurança. Em pacientes com insuficiência renal a molécula indicada é anfotericina B desoxicolato (NEVES et al., 2011), por apresentar uma menor nefrotoxicidade. Segundo Rath et al. (2003), a indústria pouco tem contribuído no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da leishmaniose

Tabela 2. Características clínicas dos 1451 casos de leishmaniose tegumentar americana notificados nas 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> regionais de saúde do estado do Paraná no período de 2007 a 2016.

	15RS		16RS		17RS		18RS		Todas as RS do estudo	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Forma clínica</b>										
cutânea	557	86,6	145	84,3	314	87,2	265	96,0	1281	88,3
mucosa	86	23,4	27	15,7	46	12,8	11	4,0	170	11,7
<b>Tipo de caso</b>										
novo	582	90,5	161	93,6	318	88,3	256	92,7	1317	90,8
recidiva	55	8,6	10	5,8	28	7,8	20	7,2	113	7,8
<b>Coinfecção com HIV</b>										
sim	6	0,9	0	0	6	1,7	0	0,0	12	0,8
não	503	78,2	92	53,5	188	52,2	197	71,4	980	67,5
ignorado	134	20,8	80	46,5	166	46,1	79	28,7	459	31,6
<b>Critério diagnóstico</b>										
laboratorial	577	89,7	155	90,1	263	73,0	257	93,1	1252	86,3
clínico-epidemiológico	66	10,3	17	9,9	97	26,9	19	6,9	199	13,7
<b>Resposta ao tratamento</b>										
cura	560	91,9	125	88,0	298	91,7	257	95,5	1240	92,2
abandono	24	3,9	4	2,8	12	3,7	0	0,0	40	2,9
morte por LTA	3	0,5	0	0,0	0	0,0	1	0,4	4	0,3
morte por outras causas	19	3,1	6	4,2	8	2,5	6	2,2	39	2,9
transferência de caso	2	0,3	5	3,5	3	0,9	0	0,0	10	0,7
mudança de diagnóstico	1	0,2	2	1,4	4	1,2	5	1,9	12	0,9
<b>Droga usada</b>										
antimoniato de meglumina	600	93,3	158	94,6	320	91,7	273	98,9	1351	93,1
anfotericina B	6	0,9	2	1,2	10	2,9	2	0,7	20	1,4
pentamidina	2	0,3	0	0	3	0,9	0	0,0	5	0,4
outros	30	4,7	5	2,9	11	3,1	1	0,4	47	3,2
não usado	5	0,8	2	1,2	5	1,4	0	0,0	12	0,8
<b>Droga usada em caso de falha</b>										
pentamidina	8	1,5	3	2,4	13	7,3	7	2,7	31	2,9
anfotericina B	24	4,7	8	6,3	27	15,2	3	1,2	62	5,8
outros	17	3,3	1	0,8	4	2,2	2	0,8	24	2,2

Fonte: Caldart e colaboradores.

Conforme Tabela 3, a pesquisa direta pelo parasito foi o exame laboratorial mais solicitado pelos médicos (65,2%; 835/1281), seguido do teste de Montenegro (55,0%; 705/1281) e a histologia (29,3%; 376/1281) nos casos de forma cutânea de LTA. Em se tratando da forma mucosa, o teste de Montenegro foi solicitado em 57,6% casos (98/170), a histologia em 37,6% (60/170) e o exame parasitológico em 35,3% (60/170). Em 10,6% (154/1451) dos casos nenhum dos três exames supracitados foram solicitados, 78,6% (121/154) eram casos novos. Os municípios da 17<sup>a</sup>RS foram os que mais concluíram o diagnóstico por meio do critério clínico-epidemiológico (26,9%). Dentre os 121 casos cujo diagnóstico foi clínico-epidemiológico (sem solicitação de exame laboratorial), quatro foram a óbito por outras causas, um foi transferido e dois tiveram mudança de diagnóstico. Levando-se em consideração a disponibilidade dos exames laboratoriais na rede pública de saúde e os riscos inerentes ao tratamento, situações como essa devem ser investigadas em específico

pelas RS com o intuito de verificar se houve falha de conduta profissional ou dificuldades para coleta e envio de material para diagnóstico.

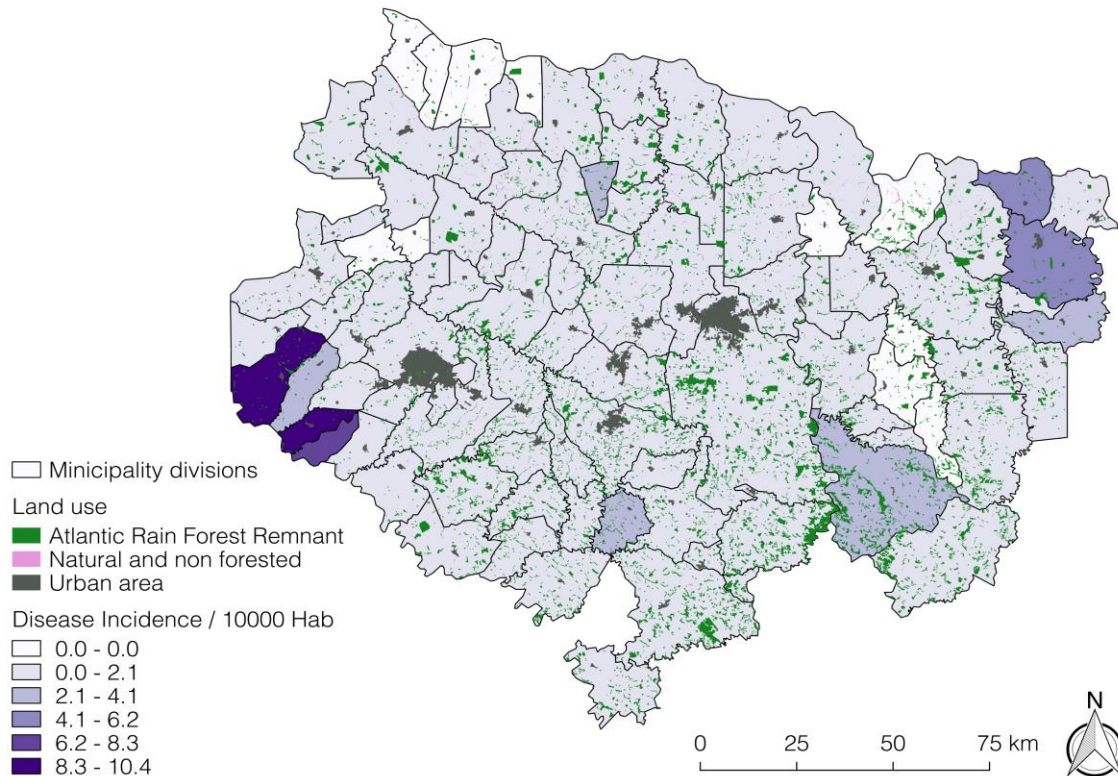
Tabela 3. Características do diagnóstico laboratorial dos 1451 casos de leishmaniose tegumentar americana notificados nas 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> regionais de saúde do estado do Paraná no período de 2007 a 2016.

Teste/resultados	Forma cutânea n = 1281			Forma mucosa n = 170		
	n	%	IC* 95%	n	%	IC 95%
<b>Exame parasitológico</b>						
positivo	749	58,5	55,7 - 61,1	49	28,8	22,1 - 36,3
negativo	86	6,7	5,5 - 8,2	11	6,5	3,3 - 11,3
não realizado	446	34,8	32,2 - 37,4	110	64,7	57,0 - 71,9
<b>Teste de Montenegro</b>						
positivo	655	51,3	48,4 - 53,9	90	52,9	45,1 - 60,6
negativo	50	3,9	2,9 - 5,1	8	4,7	2,0 - 9,0
não realizado	576	44,9	42,3 - 47,7	72	42,3	34,8 - 50,1
<b>Histologia</b>						
presença do parasito	187	15,2	13,3 - 17,3	19	11,9	7,3 - 18,0
compatível	119	9,7	8,1 - 11,4	29	18,2	12,6 - 25,1
não compatível	70	5,7	4,5 - 7,1	12	7,5	3,9 - 12,8
não realizado	857	69,5	66,9 - 72,0	99	62,2	54,2 - 69,8

Fonte: Caldart e colaboradores.

Na análise de regressão as variáveis altitude, temperatura, pluviosidade, clima e IDH-M não se mostraram como uma influência significativa na incidência da LTA nos municípios. Por outro lado, foi observado que quanto menor a proporção de Mata Atlântica remanescente, maior a incidência de LTA no município ( $p=0,004$ ) (Figura 4), corroborando com a hipótese de que a LTA humana se expande em locais com desmatamento (CHAVES et al., 2006). Lima et al. (2002), por meio de imagens de sensoriamento remoto no Paraná observaram que municípios com alto grau de destruição da mata nativa apresentam uma maior concentração de casos de LTA. Essa associação ocorre por que o parasito *Leishmania*, seus vetores e reservatórios estão presentes em áreas de florestas não modificadas pelo ser humano, quando o homem invade e modifica essas áreas, passa a ter contato íntimo com o ciclo de transmissão. Além disso, as modificações ambientais acarretam em mudanças na ecologia do parasito, seus vetores e reservatórios que precisam se adaptar para sobreviver, dessa forma, encontram abrigo em ambientes peridomésticos formando novas áreas de risco (VALERO, 2017).

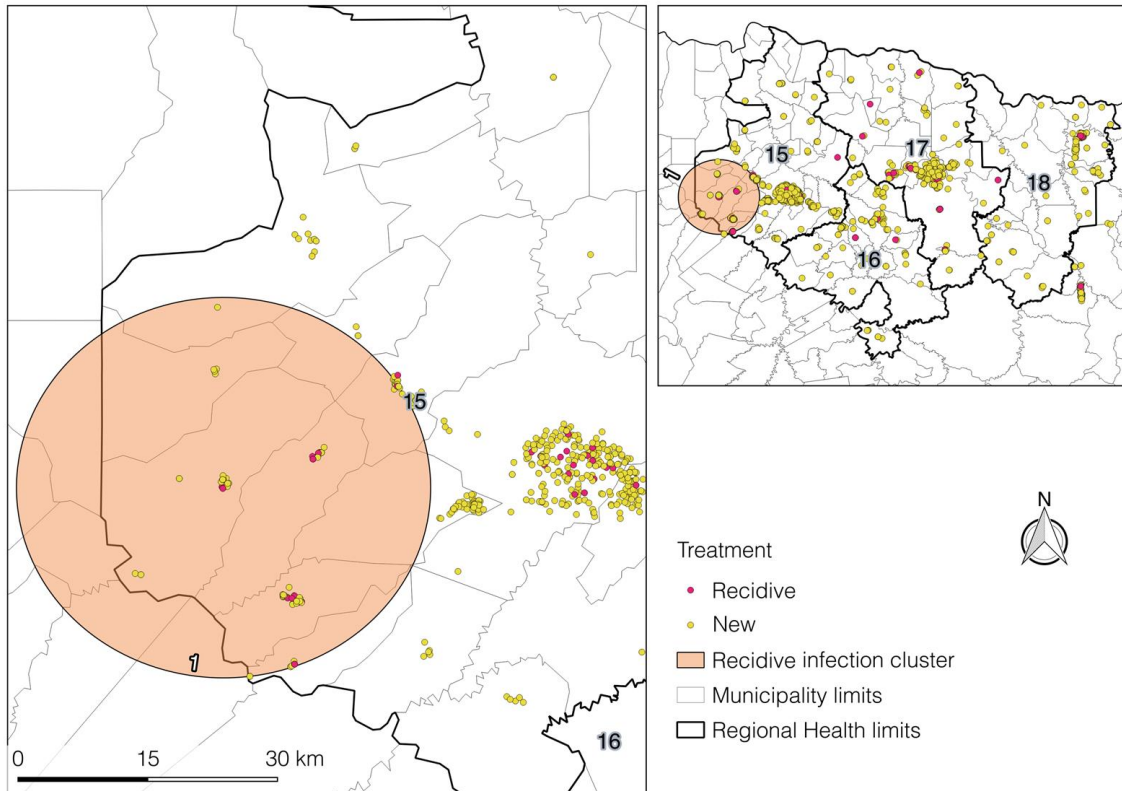
Figura 4. Incidência de casos de leishmaniose tegumentar americana notificados nos municípios das 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> regionais de saúde do estado do Paraná no período de 2007 a 2016 de acordo com o uso do solo.



Fonte: Caldart e colaboradores.

Por meio da análise de agrupamentos, quando avaliada a concentração de recidivas em relação à casos novos, foi observado um *cluster* na 15<sup>a</sup>RS não significativo estatisticamente ( $p=0,0680$ ) (Figura 5). Ainda que sem significância estatística, é uma informação intrigante, visto que o *cluster* abrange vários dos municípios de maior incidência de LTA do presente estudo e também de estudos prévios (ROBERTO et al. 1997; CURTI et al., 2009; MONTEIRO et al., 2009; NASSIF et al., 2016), demonstrando que os indivíduos residentes nesses municípios sofrem elevada pressão de infecção, provavelmente devido à grande quantidade de vetores e reservatórios infectados.

Figura 5. Análise de grupamentos para avaliar a concentração de recidivas em relação aos casos novos de leishmaniose tegumentar americana notificados nas 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> regionais de saúde no período de 2007 a 2016.

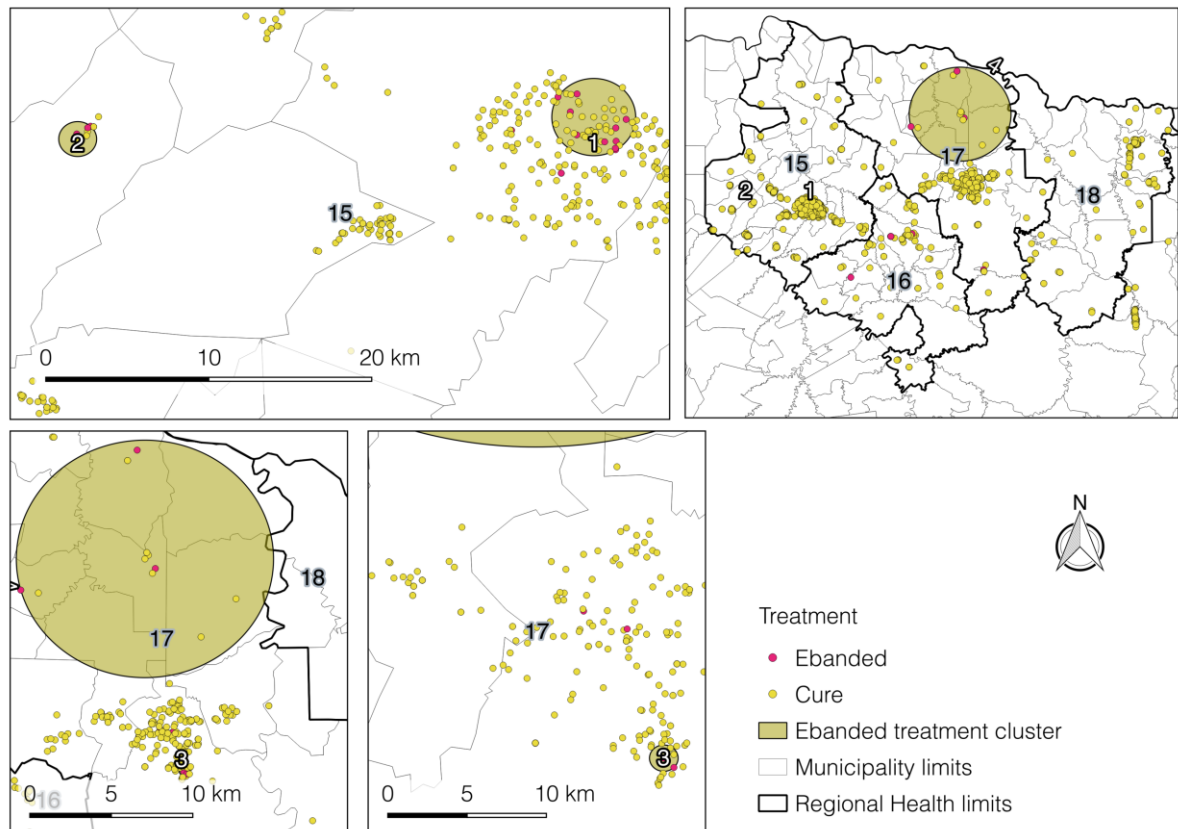


Fonte: Caldart e colaboradores.

Em municípios da 15<sup>a</sup>RS foram observados *clusters* estatisticamente significativos de abandono de tratamento em relação aos casos curados, são eles: Maringá (*cluster 1*,  $p=0,0003$ ) e Ourizona (*cluster 2*,  $p=0,031$ ) (Figura 6). Segundo Nassif et al. (2016), o abandono do tratamento pode levar ao desenvolvimento da forma mucosa da LTA, observar a ocorrência de um *cluster* da ocorrência de abandono de tratamento na RS com maior ocorrência leishmaniose mucosa (23,4%) e com elevado percentual de recidivas (8,5%) sugere um padrão de comportamento inadequado dos pacientes e demonstra a necessidade de um acompanhamento de abandono de tratamento e maior conscientização desses pacientes e treinamento do pessoal envolvido. São escassos os estudos que explicam as causas do abandono do tratamento da LTA (ALCÂNTARA et al., 2016); levando-se em consideração que o tratamento é oferecido pelo sistema único de saúde (SUS) no Brasil e que o prognóstico é bom quando tratada adequadamente, sugerimos que o tempo de tratamento e os efeitos adversos são os principais fatores que influenciam na desistência, demonstrando, mais uma

vez, a necessidade de investimento massivo no desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento de LTA.

Figura 6. Análise de grupamentos para avaliar a concentração de abandono de tratamento em relação aos casos curados de leishmaniose tegumentar americana notificados nas 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> regionais de saúde do estado do Paraná no período de 2007 a 2016.



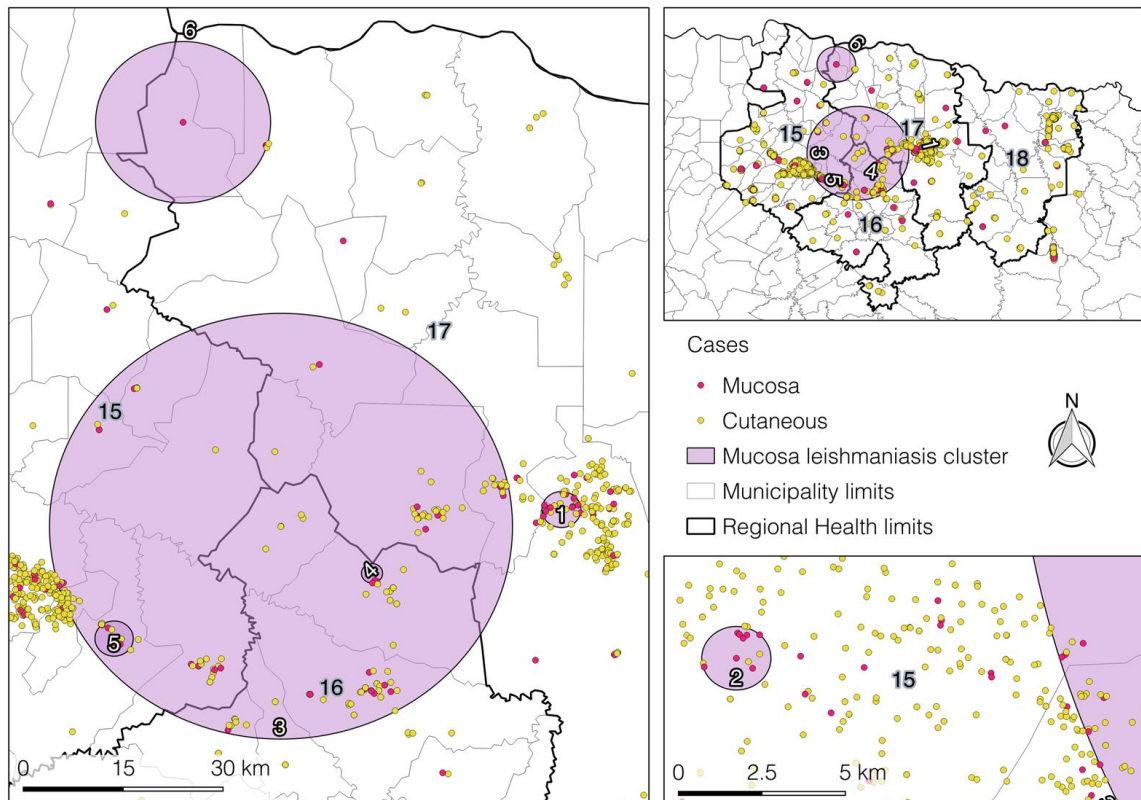
Fonte: Autores

Seis *clusters* de casos de LTA cuja forma clínica era mucosa foram identificados na análise de agrupamentos, no entanto, somente os *clusters* 1 ( $p=0,0008$ ), 2 ( $p=0,0110$ ) e 3 ( $p=0,0410$ ) apresentaram significância estatística (Figura 7). O agrupamento 1 envolve os municípios de Cambé e Londrina (17<sup>a</sup>RS), enquanto que o 2 foi identificado no município de Maringá (15<sup>a</sup>RS). O grupamento 3 envolve 20 municípios, sete da 17<sup>a</sup>RS (Cambé, Londrina, Pitangueiras, Rolândia, Jaguapitã, Prado Ferreira e Miraselva), cinco da 16<sup>a</sup> RS (Apucarana, Arapongas, Cambira, Sabáudia e Jandaia do Sul), por fim, oito das 15<sup>a</sup>RS (Astorga, Mandaguari, Marialva, Maringá, Munhoz de Melo, Santa Fé, Sarandi e Iguaraçu).

A 15<sup>a</sup>RS apresentou mais casos de LTA com forma clínica mucosa do que as demais (23,4%) no presente estudo (Tabela 2), resultado que corrobora com Nassif et al.

(2016), que afirmam que a forma clínica mucosa vem apresentando aumento progressivo nos municípios da 15ªRS. Essa forma clínica pode estar associada a cepas específicas da espécie *L. (V.) braziliensis* na região Norte do Paraná (SILVEIRA et al., 1999; CASTRO et al., 2002) e também pode ter relação com a ocorrência de abandono de tratamento, como já previamente citado.

Figura 7. Análise de grupamentos para avaliar a concentração de casos de forma clínica mucosa em relação aos casos cuja forma clínica foi cutânea de leishmaniose tegumentar americana notificados nas 15ª, 16ª, 17ª e 18ª regionais de saúde do estado do Paraná no período de 2007 a 2016.



Fonte: Caldart e colaboradores.

Estudos epidemiológicos e de análise espacial são importantes, pois permitem avaliar o perfil dos pacientes e estabelecer padrões, desta forma geram informações que colaboram para que as ações de prevenção e controle sejam direcionadas e efetivas.

## Conclusão

Os dados apresentados no presente trabalho demonstram que medidas preventivas e de educação em saúde devem ser principalmente direcionadas a áreas de maior

degradação da mata nativa; bem como, o desmatamento deve ser contido para que se possa evitar a expansão da LTA no Norte do Paraná. Além disso, demonstram a necessidade de ações imediatas por parte dos gestores nos municípios da 15ªRS principalmente no sentido de conscientizar os pacientes com relação às consequências do abandono do tratamento.

## Referências

1. ALCÂNTARA, L. R. S.; DEMARCHI, I. G.; ARISTIDES, S. M. A. Evolution of american tegumentary leishmaniasis cases reported in Paraná state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 58, n. 57, p. 1-7, 2016.
2. ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANOS, J.; JANNIN, J.; den BOER, M, the WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS one**, San Francisco, v. 7, n. 5, e35671, 2012.
3. ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, Stuttgart, v. 22, n. 6, p. 711 – 728, 2013.
4. AZULAY, R. D.; AZULAY JR, D. R. Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, Malden, v. 34, p. 303-307, 1995.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2017.
6. BRASIL, Ministério da Saúde. **Guia de vigilância em saúde**. Brasília: 1 ed. 2016.
7. CALDART, E. T.; FREIRE, R. L.; FERREIRA, F. P.; RUFFOLO, B. B.; SBEGHEN, M. R.; MAREZE, M.; GARCIA, J. L.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T. Leishmania in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 17-27, 2017.
8. CARVALHO, M. S. L.; BREDT, A.; MENEGHIN, E. R. S.; OLIVEIRA, C. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar

- americana no Distrito Federal, Brasil, 2006 a 2008. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 19, n. 3, p. 227-237, 2010.
9. CASTRO, E. A.; SOCCOL, V. T.; MEMBRIVE, N.; LUZ, E. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 35, n. 5, p. 445-452, 2002.
10. CHAVES, L. F.; COHEN, J. M.; PASCUAL, M.; WILSON, M. L. Exclusion Modifies Climate and Deforestation Impacts on a Vector-Borne Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n. 2, e176, 2008.
11. CHAVES, L. F.; PASCUAL, M. Climate cycles and forecast of cutaneous leishmaniasis, a nonstationary vector-borne disease. **Plos Medicine**, San Francisco, v. 3, n. 8, p. e295, 2006.
12. CONDINO, M. L. F.; GALATI, E. A. B.; HOLCMAN, M. M.; SALUM, M. R. B.; SILVA, D. C.; NOVAES JÚNIOR, R. A. Leishmaniose tegumentar americana no Litoral Norte Paulista, período 1993 a 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, n. 6, p. 635-641, 2009.
13. CURTI, M. C. M.; SILVEIRA, T. G. V.; ARRAES, S. M. A. A.; BERTOLINI, D. A.; ZANZARINI, P. D.; VENAZZI, E. A. S.; FERNANDES, A. C. S.; TEIXEIRA, J. J. V.; LONARDONI, M. V. C. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana na região Noroeste do Estado do Paraná. **Revista Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**, Araraquara, v. 30, n. 1, p. 63-68, 2009.
14. KULLDORFF, M.; NAGARWALLA, N. Spatial disease clusters: detection and inference. **Statistics in medicine**, v. 14, n. 8, p. 799-810, 1995.
15. KULLDORFF, M. A spatial scan statistic. **Communications in Statistics: Theory and Methods**, v. 26, n. 6, p.1481–1496, 1997.
16. LIMA, A. P.; MINELLI, L.; COMUNELLO, E.; TEODORO, U. Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoriamento remoto orbital, no estado do Paraná, sul do Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 7, p. 681-92, 2002.

17. MARTINS, A. L. G. P., BARRETO, J. A., LAURIS, J. R. P., MARTINS, A. C. G. P. American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 1, p.52-58, 2014.
18. MEMBRIVE, N.A.; RODRIGUES, G.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V.; TEODORO, U. Flebotômíneos de municípios do norte do estado do Paraná, sul do Brasil. **Entomología y Vectores**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 673–680, 2004.
19. MONTEIRO, W. M.; NEITZKE, H. C.; SILVEIRA, T. G. V.; LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; FERREIRA, M. E. M. C. Pólos de produção de leishmaniose tegumentar americana no norte do Estado do Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, p.1083-1092, 2009.
20. NASSER, J. T.; DONALISIO, M. R.; VASCONCELOS, C. H. Distribuição espacial dos casos de leishmaniose tegumentar americana no município de Campinas, Estado de São Paulo, no período de 1992 a 2003. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.42, n.3, p. 309-314, 2009.
21. NASSIF, P. W.; CASTILHO-PERES, M.; ROSA A. P. Z.; SILVA, A. L.; ARISTIDES, S. M. A.; LONARDONI, M. V. C.; TEIXEIRA, J. J. V.; SILVEIRA, T. G. V. Clinical, laboratory, and therapeutic characteristics of American tegumentary leishmaniasis in the 15 th State Health Division, Northwest Paraná State, Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 49, n. 5, p. 593-601, 2016.
22. NEVES, L. O.; TALHARI, A. C.; GADELHA, E. P. N.; SILVA JÚNIOR, R. M.; GUERRA, J. A. O.; FERREIRA, L. C. L.; TALHARI, S. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 6, p. 1092-1101, 2011.
23. OLIVEIRA, F. J. A.; COSTA, I. C.; NUNES, V.; OLIVEIRA, O.; OLIVEIRA NETO, B. P.; OLIVEIRA, J. E. Leishmaniose tegumentar americana: Flebotômíneos de área de transmissão do Parque Arthur Thomas na região de Londrina – PR. **Biosaúde**, Londrina, v. 2, p. 81-87, 2000.

24. PFEIFFER, D.; ROBINSON, T.; STEVENSON, M.; STEVENS, K. B.; ROGERS, D. J.; CLEMENTS, A. C. **Spatial analysis in epidemiology**. Oxford: Oxford University Press, 2008.
25. PONTELLO JUNIOR, R.; GON, A. S.; OGAMA, A. American cutaneous leishmaniasis: epidemiological profile of patients treated in Londrina from 1998 to 2009. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 5, p. 748-53, 2013.
26. PRADO, P. F.; ROCHA, M. F.; SOUSA, J. F.; CALDEIRA, D. I.; PAZ, G. F.; DIAS, E. S. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n.5, p.561-566, 2011.
27. R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2016.
28. RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; ANDRADE JUNIOR, H. F.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, São Paulo, v.26, n. 4, p. 550-555, 2003.
29. RESENDE, S. M. Análise eco-epidemiológica da leishmaniose tegumentar americana em uma área endêmica da microrregião de Caratinga, Minas Gerais (Brasil), submetida a ensaio comunitário com vacina antilta. 2004. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2004.
30. ROBERTO, A. C. B. S.; LIMA, A. P.; PEIXOTO, P. R. F.; MISUTA, N. M.; FUCUSHIGUE, Y.; FERREIRA, M. E. M. C.; TEODORO, U. Avaliação da terapia com antimoniato de N-metil glucamina e de notificação da leishmaniose tegumentar. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 72, p.129-136, 1997.
31. SILVA, A. M.; CAMARGO, N. J.; SANTOS, D. R.; MASSAFERA, R.; FERREIRA, A. C.; POSTAI, C.; CRISTÓVÃO, E. C.; KONOLSAISENII, J. F.; BISETTO-JR, A.; PERINAZO, R.; TEODORO, U.; GALATI, E. A. B. Diversidade, distribuição e abundância

de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. **Neotropical Entomology**, Londrina v. 37, n. 2, p. 209-225, 2008a.

32. SILVEIRA, T. G. V.; ARRAES, S. M. A. A.; BERTOLINI, D. A.; TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; ROBERTO, A. C. B. S.; RAMOS, M.; SOBRINHO, A. N.; ISHIKAWA, E.; SHAW, J. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 4, p. 413-423, 1999.

33. SILVEIRA, T. G. V.; TEODORO, U.; ARRAES, S. M. A. A.; LONARDONI, M. V. C.; DIAS, M. L. G. G.; SHAW, J. J.; ISHIKAWA, E. A. Y.; LAINSON, R. An Autochthonous case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Laison & Shaw, 1972 from the North of Paraná State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, p. 475–476, 1990.

34. STRAZZULLA, A.; COCUZZA, S.; PINZONE, M. R.; POSTORINO, M. C.; COSENTINO, S.; SERRA, A.; NUNNARI, G. Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease. **BioMed Research International**, v. 2013, ID 805108, 2013.

35. TOLEZANO, J. E.; TANIGUCHI, H. H.; HIRAMOTO, R. M.; MESQUITA, R. T.; TEIXEIRA, D.; AURELIANO, D. P.; TOLEZANO, L. F. C. El Niño southern oscillation e a leishmaniose tegumentar americana no Brasil, 1990-2004. In: **Anais do XLIII Congresso Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, II Encontro de Medicina Tropical dos Países de Língua Portuguesa e I Encontro da Sociedade Brasileira de Medicina de Viagens**. Campos do Jordão, p.132, 2007.

36. VALERO, N. N. H. Fatores de risco ambientais e socioeconômicos associados com a leishmaniose. 2017. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ecologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2017.

37. WHEELER, D. C. A comparison of spatial clustering and cluster detection techniques for childhood leukemia incidence in Ohio, 1996–2003. **International Journal of Health Geographics**, v. 6, n. 1, p. 1, 2007.

## 5 ARTIGO B

DOI: 10.5433/1679-0359.2018v39n3p1371

Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 39, n. 3, p. 1371-1376, maio/jun. 2018

### CASE REPORTS/RELATOS DE CASOS

#### **Canine visceral leishmaniasis in Londrina, Paraná - investigation and case report**

#### **Leishmaniose visceral canina em Londrina, Paraná - investigação e relato de caso**

Eloiza Teles Caldart<sup>1\*</sup>; Cíntia Peres Camilo<sup>2</sup>; Andressa Maria Rorato Nascimento De Matos<sup>3</sup>; Fernanda Pinto Ferreira<sup>1</sup>; Aline Ticiani Pereira Paschoal<sup>3</sup>; Weslem Garcia Suhett<sup>4</sup>; Odilon Vidotto<sup>5</sup>; Regina Mitsuka-Breganó<sup>5</sup>; Itamar Teodorico Navarro<sup>5</sup>

#### **Abstract**

Dogs are considered the main reservoirs of visceral leishmaniasis for humans, which also present a chronic and severe clinical picture when affected. The objective of the present report was to describe a canine visceral leishmaniasis case diagnosed in Londrina, an indene city, and its investigation. A street animal with extensive dermatological lesions, onychogryphosis, mild anemia and leukopenia was attended at a veterinary hospital in Londrina, where positivity was reported for *Leishmania* spp. in serological tests. Cytology was positive in bone marrow, PCR and parasite culture were positive in skin, spleen, liver, lymph node and bone marrow, and DNA sequencing confirmed the species of the parasite as *L. (L.) infantum*. The official diagnosis was made by the Central Laboratory of Paraná, and through an official report, an investigation of the case was started for the confirmation of autochthony. An active search for the vector and other canine cases in the neighborhood was carried out along with a search for information on the origin of the animal in question. However, the species, *Lutzomyia longipalpis*, new canine cases, or origin of the sick animal were not identified. Although, the present case cannot be confirmed as autochthonous, we suggest that it is necessary to disseminate the present report to serve as a warning to veterinarians and other public health professionals in the northern region of Paraná to be attentive to suspicious cases and to not fail to investigate these cases to the end.

**Key words:** *Leishmania (L.) infantum*. *Lutzomyia longipalpis*. Street dog.

## Resumo

Os cães são considerados os principais reservatórios da leishmaniose visceral para os humanos e também apresentam quadro clínico crônico e grave quando acometidos. O objetivo do presente relato foi descrever um caso de leishmaniose visceral canina diagnosticado em Londrina, um cidade indene, e sua investigação. Um animal de rua com extensas lesões dermatológicas, onicogribose, anemia leve e leucopenia foi atendido em um hospital veterinário em Londrina, onde a positividade foi relatada para *Leishmania* spp. em testes sorológicos. A citologia foi positiva na medula óssea, a PCR e a cultura parasitária foram positivas na pele, baço, fígado, linfonodo e medula óssea. Com o sequenciamento de DNA confirmamos as espécies do parasita como *L. (L.) infantum*. O diagnóstico oficial foi feito pelo Laboratório Central do Paraná e, através de um relatório oficial, iniciou-se a investigação do caso para a verificação de autoctonia. Foi realizada uma busca ativa do vetor e outros casos caninos suspeitos no bairro, bem como a procura de informações sobre a origem do animal doente. No entanto, a espécie *Lutzomyia longipalpis* não foi identificada, nem novos casos caninos foram identificados ou mesmo a origem do animal doente esclarecida. Embora o presente caso não possa ser confirmado como autóctone, sugerimos que seja necessário divulgar o presente relato para servir de aviso aos veterinários e outros profissionais de saúde pública na região norte do Paraná para estarem atentos a casos suspeitos e não deixar de investigar esses casos até o fim.

**Palavras-chave:** *Leishmania (L.) infantum*. *Lutzomyia longipalpis*. Cão errante.

## Introduction

The main etiologic agent of human and canine visceral leishmaniasis (VL) in Brazil is *Leishmania (Leishmania) infantum*, and its vectors are *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi*; the latter has been incriminated as a vector so far only in Mato Grosso do Sul state (SANTOS et al., 1998). Approximately 58,000 new human cases of VL are reported annually in the world; Brazil annually reports an average of 3,481 cases with an average mortality rate of 7.2% (ALVAR et al., 2012). The transmission conditions of leishmaniasis are continually changing in relation to environmental, demographic and human behavioral factors that lead to changes in the geographical reach and density of vectors and reservoirs, which increase human and animal exposure to infected sandflies (CALDART et al., 2017). What has occurred in the southern region of Brazil in recent years is proof of the frank geographical expansion of this disease. The vector was first identified in 2009 in Rio Grande

do Sul (BRASIL, 2010), a state that now represents 19 confirmed human cases. Santa Catarina had the first canine case reported in 2011 and the first human case reported in August 2017 (WENZEI, 2017); thus far, the vector has not been found in this state. In the state of Paraná, the vector was first described in 2012 in Foz do Iguaçu (SANTOS et al., 2012), the southwest region of the state (500 km from Londrina), and in 2013, autochthonous canine cases had already shown faster agent expansion (BISETTO-JUNIOR et al., 2014), and the first human case was reported in 2015. Despite the efforts of the municipal and state health agencies, it was not possible to contain the vector propagation and agent dispersion between dogs and humans, leading to two deaths in just two years in Foz do Iguaçu. It has been reported that the vector has already advanced approximately 60 km, having been found in the municipality of Medianeira (verbal communication). Allochthonous canine cases are frequently diagnosed in municipalities, such as Curitiba and Londrina (THOMAZ-SOCCOL et al., 2009). Taking into account that dogs are the main reservoir of this disease for humans, the intense risk to the state is clear and depends on whether the geographical expansion of the vector to this important zoonosis is stalled.

Visceral canine leishmaniasis is spreading rapidly from cities in the western part of São Paulo state (Presidente Prudente, 167 km from Londrina), which is the most feasible route to be traveled by the disease (parasite and vector) toward the northern border of the Paraná state (D'ANDREA et al., 2015); these two states are separated by the Paranapanema River. The objective of the present report was to describe a canine visceral leishmaniasis case diagnosed in Londrina and its investigation.

## **Materials and Methods**

In January 2017, a female canine of undetermined breed, of approximately seven to twelve months of age, was attended after being found on the street. An anamnesis and physical examination were done, blood and serum were collected for hemogram and for indirect immunofluorescence test (IFAT) (OLIVEIRA et al., 2009) and an enzyme immunoassay (ELISA) (SZARGIKI et al., 2009) for the detection of anti-*Leishmania* spp. antibodies was performed. A serum sample was sent to the Central Laboratory of the State of Paraná (LACEN), where a series of official tests (rapid test and ELISA) were performed.

After clinical and laboratory diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL), euthanasia was recommended, since the animal had no responsible person and carried a severe zoonosis at an advanced stage, posing a risk to public health. A necropsy of the

animal was performed, as well as bone marrow puncture for cytology and the collection of organ fragments for PCR of the ITS1 gene (SCHÖNIAN et al., 2003) and parasite culture. The parasite culture was performed in diphasic medium Blood Agar Base (BAB) and Schneider.

The investigation of the case was carried out together with the Health Surveillance Unit of the Municipality and with the 17th Regional Health Center of the State of Paraná to verify the autochthony of the same. Falcon automatic light traps were placed where the animal was found (-23.324970°; -51.185379°), for three consecutive days from 6:00 p.m. to 6:00 a.m., for the collection of sandflies in the month of March, which is suitable for this type of collection because it still presents high temperature and humidity. Municipal agents of endemics made an active search from house to house for new cases in the neighborhoods where the sick dog was found and took photos of the sick animal with the objective of identifying a possible owner.

This study was approved by the Ethics and Animal Experimentation Committee of Londrina State University (UEL) and was approved (n°124/16) for execution.

## **Results and Discussion**

The animal presented claudication in the right anterior limb with the absence of proprioception, increased volume and angular deviation of the carpo-radio-ulnar joint, extensive lesions of the skin, with alopecia, epidermal collars, crusting, scaling, hyperpigmentation, hyperkeratosis and onychogryphosis (Apêndice A). In the radiographic examination, an ulna fracture was identified with bad union and osteopenia. The hemogram showed mild anemia with hematocrit of 32% and leukopenia of 4200.

Regarding the serological tests, the animal had a titer of 320 to IFAT and positivity to the ELISA. In cytology, promastigote forms were observed inside and outside the cytoplasm in bone marrow macrophages (Figure 1). The PCR and parasite culture were positive in skin, spleen, liver, lymph node and bone marrow samples. The parasite species, *L. (L.) infantum*, was confirmed after DNA sequencing of the ITS1 gene. At necropsy, abdominal fluid and increased splenic white pulp were observed. The tests carried out at LACEN, and both ELISA and the rapid test were positive, leading to the official confirmation of the case and triggering of its investigation.

Figure 1. Presence of amastigote forms compatible with *Leishmania* spp. inside and outside the cytoplasm of macrophages.



The active search from house to house could neither find any new suspected cases in the neighborhood nor obtain information about the origin of the sick animal. *Lutzomyia longipalpis* was not captured in any of the traps for sandfly collections, although the search was made during the period of great circulation of the vectors. Thus, the investigation was inconclusive, not allowing for the notification of this case as the first autochthonous case in the municipality of Londrina.

Because the place where the animal was found is close to a highway, we can suggest that it may even have come, for example, from São Paulo. The animal's age makes us think that it may have acquired the disease through transplacental transmission.

According to reports from residents and watchmen, the place where the animal was found, a valley bottom (Apêndice B), is a place where animals are abandoned, which makes the investigation more complex, since the animal possibly did not acquire the disease in that neighborhood. The absence of vectors does not exclude the possibility of local infection. Santa Catarina state has notified of CVL cases since 2011, and so far, the vector has not been identified in the state (WENZEL, 2017). In Rio Grande do Sul state, the vector was identified one year after the notification of the first CVL case (BRASIL, 2010).

A study published in 2017, concerned with synanthropic rodents from the municipality of Londrina, reported a specimen of the species *Rattus rattus* harboring the protozoan *L. (L.) infantum* in blood (CALDART et al., 2017). Although the present case cannot be confirmed, as autochthonous together with the discovery in the roof rat, we suggest that it is necessary to disseminate the present report to serve as a warning to veterinarians and other public health professionals in the northern region of Paraná to be attentive to suspicious cases and to not fail to investigate these cases to the end.

## Conclusion

The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in the present case was based on evident clinical signs, physical examination, complementary exams and an official LACEN report. Although the present case cannot be confirmed as autochthonous, we suggest that it is necessary to disseminate the present report to serve as a warning to veterinarians and other public health professionals in the northern region of Paraná to be attentive to suspicious cases and to not fail to investigate these cases to the end.

### **Acknowledgements**

The authors are grateful to the teams of Environmental Surveillance of the municipality of Londrina and of the 17th Regional Health Center of the Paraná state.

### **References**

ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. den; The WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

BISETTO-JUNIOR, A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; NAVARRO, I. T. Leishmaniose visceral no Estado do Paraná. Revista do Conselho Regional de Medicina Veterinária do Paraná, Curitiba, v. 41, n. 1, p. 6-7, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Nota técnica conjunta da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul sobre a situação da Leishmaniose Visceral na fronteira do estado do Rio Grande do Sul com a Argentina. Brasília, 2010. 3 p. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/>>. Acesso em: 6 maio 2016.

CALDART, E. T.; FREIRE, R. L.; FERREIRA, F. P.; RUFFOLO, B. B.; SBEGHEN, M. R.; MAREZE, M.; GARCIA, J. L.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T. Leishmania in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of Leishmania (*Leishmania*) amazonensis. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 17-27, 2017.

D'ANDREA, L. A. Z.; SILVA FONSECA, E. da; PRESTES-CARNEIRO, L. E.; GUIMARÃES, R. B.; YAMASHITA, R. C.; SOARES, C. N.; HIRAMOTO, R. M.; TOLEZANO, J. E. The shadows of a ghost: a survey of canine leishmaniasis in Presidente Prudente and its spatial dispersion in the western region of São Paulo state, an emerging focus of visceral leishmaniasis in Brazil. *BMC Veterinary Research*, London, v. 11, n. 1, p. 273-x, 2015.

OLIVEIRA, T. M. F. de S.; FURUTA, P. I.; CARVALHO, D. de; MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, Jaboticabal, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2009.

SANTOS, D. R. dos; FERREIRA, A. C. A. C.; BISETTO JUNIOR, A. The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Paraná, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 45, n. 5, p. 643-645, 2012.

SANTOS, S. O. dos; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. D. P.; FREITAS, R. A. D.; MALACCO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, Medford, v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.

SCHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H. D. F. H.; PRESBER, W.; JAFFE, C. L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 349-358, 2003.

SZARGIKI, R.; CASTRO, E. A. de; LUZ, E.; KOWALTHUK, W.; MACHADO, Â. M.; THOMAZ-SOCCOL, V. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 47-52, 2009.

THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E. A.; NAVARRO, I. T.; RODRIGUES DE FARIAS, M.; MARIA DE SOUZA, L.; CARVALHO, Y.; BISPO, N. S.; MEMBRIVE, A.; MINOZZO, J. C.; TRUPPEL, J.; BUENO, W.; LUZ, E. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina

no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 46-51, 2009.

WENZEI, K. Santa Catarina tem primeiro caso de leishmaniose visceral humana. *Jornal de Santa Catarina*, Florianópolis, 17, ago. 2017. Notícias. Disponível em: <<http://jornaldesantacatarina.clicrbs.com.br/sc/noticia/2017/08/santa-catarina-tem-primeiro-caso-deleishmaniose-visceral-humana-9872502.html>>. Acesso em: 4 set. 2017.

## 6 ARTIGO C

**EVALUATION OF AN ACTIVE AND EARLY EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE METHODOLOGY OF VISCERAL LEISHMANIASIS BY MOLECULAR DETECTION IN RAN OVER WILD FAUNA.**

**AVALIAÇÃO DE UMA METODOLOGIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA ATIVA E PRECOCE DA LEISHMANIOSE VISCERAL POR MEIO DE DETECÇÃO MOLECULAR EM FAUNA SILVESTRE ATROPELADA**

Eloiza Teles Caldart, Fernanda Pinto Ferreira, Andressa Maria Rorato Nascimento de Matos, Aline Ticiani Pereira Paschoal, Amanda Bertão Santos, Regina Mitsuka-Breaganó, Itamar Teodorico Navarro

**ABSTRACT**

Scientific studies have shown that wild animals can serve as important sentinels of the wild cycle of visceral leishmaniasis, especially in places where it has not yet effectively established in the urban cycle. The present study aimed to evaluate the methodology of active surveillance of visceral leishmaniasis by detecting *Leishmania (Leishmania) infantum* DNA in organs of wild animals run over from November 2016 to October 2018 in municipalities in the North of Paraná. Ran over wild animals were collected in four specific transects with 200km each; collections were also carried out by means of communication of the trampling to co-participating institutions. The collection point was georeferenced and a form with information regarding the place of the trampling and the animal was filled. The animals were autopsied and samples of bone marrow, lymph node, liver, spleen and ear tip skin were collected. Genomic DNA was extracted and submitted to PCR for amplification of *Leishmania* spp. 18S and ITS1 genes, DNA sequencing for species definition and molecular characterization of the parasite was performed. Of the 66 mammals collected, one lesser anteater (*Tamandua tetradactyla*) collected near a bottom of valley in the municipality of Cambé in the autumn of 2017 presented DNA of *Leishmania* subgenus *Viannia* in lymph node, confirmed by DNA sequencing. The proposed methodology proved to be effective in the active surveillance of visceral leishmaniasis, since it was able to detect the presence of *Leishmania* spp. in organs of run over wild animals. Although in the present study no DNA of *L. (L.) infantum* was detected in any of the organs of the animals evaluated, the active epidemiological surveillance should be constant, once the risk remains real in North Parana since it is proximity to endemic municipalities in the west of São Paulo.

**Key words:** One Health. Active surveillance. Sentinel. Lesser-anteater. Running over.

**RESUMO**

Estudos científicos demonstram que animais silvestres podem servir como importantes sentinelas do ciclo silvestre da leishmaniose visceral, principalmente em locais nos quais ela ainda não se estabeleceu de forma efetiva no ciclo urbano. O presente estudo objetivou avaliar

uma metodologia de vigilância ativa de leishmaniose visceral por meio de detecção de DNA de *Leishmania (Leishmania) infatum* em órgãos de animais silvestres atropelados de novembro de 2016 a outubro de 2018 em municípios do Norte do Paraná. Animais silvestres atropelados foram coletados em quatro transectos específicos com 200km cada; também foram realizadas coletas mediante comunicação do atropelamento a instituições co-participantes. O ponto da coleta foi georreferenciado e um formulário com informações relativas ao local do atropelamento e ao animal foi preenchida. Os animais foram autopsiados e amostras de medula óssea, linfonodo, fígado, baço e pele de ponta de orelha foram colhidas. DNA genômico foi extraído e submetido à PCR para amplificação dos genes 18S e ITS1 de *Leishmania* spp., sequenciamento de DNA para definição da espécie e caracterização molecular do parasito foi realizado. Dos 66 mamíferos avaliados, um tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) coletado próximo a um fundo de vale no município de Cambé no outono de 2017 apresentou DNA de *Leishmania* subgênero *Viannia* em linfonodo, confirmado por sequenciamento de DNA. A metodologia proposta se mostrou eficaz na vigilância ativa da leishmaniose visceral, visto que, foi capaz de detectar a presença de DNA de *Leishmania* spp. em órgãos de animais silvestres atropelados. Embora no presente estudo não tenha sido detectado DNA de *L. (L.) infantum* em nenhum dos órgãos dos animais avaliados, a vigilância epidemiológica ativa no Norte do Paraná deve ser constante, pois o risco permanece real visto a proximidade com municípios endêmicos do oeste paulista.

**Palavras-chave:** Saúde Única. Vigilância ativa. Sentinela. Tamanduá-mirim. Atropelamento.

## Introduction

Parasites of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) are protozoans that infect numerous species of mammals (GRAMICCIA, 2011). In nature, all *Leishmania* species are transmitted to the vertebrate host by the bite of hematophagous females of various sandfly species (Insecta, Diptera, Psychodidae). Infections by the above-mentioned parasite can lead to diseases with a broad spectrum of clinical signs; these are collectively known as leishmaniasis, which are neglected infectious diseases that affect 20 million people worldwide (DUJARDIN *et al.*, 2008). The circumstances of transmission of leishmaniasis are continually changing in relation to environmental, demographic and human behavior factors, which lead to changes in the reach and density of vectors and reservoirs, increasing human and animal exposure to infected sandflies (ROQUE; JANSEN, 2014).

A real geographical expansion of visceral leishmaniasis has occurred in the southern region of Brazil in recent years. In the state of Paraná, the vector (*Lutzomyia longipalpis*) was first identified in 2012 in Foz do Iguaçu (SANTOS; FERREIRA; BISETTO JUNIOR; 2012), West region of the state. The autochthonous canines cases in 2013 demonstrated the rapid expansion of the agent (BISETTO JUNIOR; THOMAZ-SOCCOL; NAVARRO; 2014) and the first reported human cases occurred after 2015 (SINAN, 2019).

Despite the efforts of the municipal and state health agencies, it was not possible to contain vector propagation and agent dispersion between dogs and humans, causing four deaths from 2015 to 2017 (SINAN, 2019). The advance of the vector was confirmed by about 60 km beyond Foz do Iguaçu, and was found in the municipality of Medianeira (verbal communication of Dr. Vanete Thomaz-Soccol). Taking into account the entire southern region of Brazil, the vector was first identified in 2009 in Rio Grande do Sul (BRAZIL, 2010), a state that presented 27 notified human cases by 2017; Santa Catarina had the first canine cases reported in 2011 (STEINDEL *et al.*, 2013) and the first human case reported in August 2017 (SINAN, 2019).

The northern region of the state of Paraná is considered indene for visceral leishmaniasis; however, findings in synanthropic rodents and dogs have indicated that the agent is circulating in the region (CALDART *et al.*, 2017; CALDART *et al.*, 2018). The most intriguing is the absence of the vector in this region of the state, both in scientific studies of fauna surveys of sandflies (OLIVEIRA *et al.*, 2000; MEMBRIVE *et al.*, 2004; DIAS-SVERSUTTI *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008; CERINO; TEODORO; SILVEIRA, 2010; REIS *et al.*, 2011; SANTOS; FERREIRA; BISETTO JUNIOR, 2012; MELO *et al.*, 2013), as well as in studies carried out by the Entomological Surveillance of the Health Department of the State of Paraná (verbal communication). Canine visceral leishmaniasis spread quickly in cities of the western state of São Paulo, being the most feasible route to be covered by the disease (parasite and vector) towards the northern border of the state of Paraná (D'ANDREA *et al.*, 2015), the two states are separated by the Paranapanema River, which may justify the delay in the entry of the disease in the municipalities of Paraná, which border São Paulo.

In Brazil, opossums and wild canids are potential reservoirs of *L. (L.) infantum* and some scientific studies have demonstrated that they can serve as important sentinels of the wild cycle of this infection, especially in places where it has not yet been effectively established in the urban cycle (ROQUE; JANSEN, 2014), that is, they are even more precocious sentinels than domestic dogs in the active surveillance of visceral leishmaniasis for humans.

The present study aimed to evaluate a methodology of active and early surveillance of visceral leishmaniasis by detecting *L. (L.) infantum* DNA in organs of wild animals run over from November 2016 to October 2018 in municipalities in the North of Paraná.

## Material and Methods

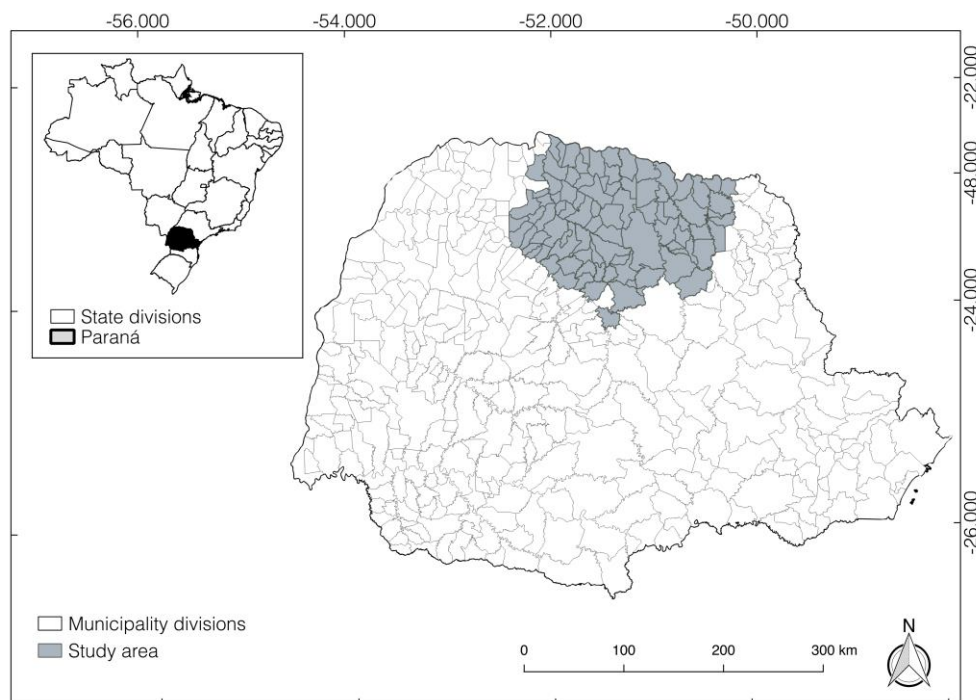
### *Ethical Aspects*

The project was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the State University of Londrina on October 2017 under number 30/2017 (Annex C) and was approved by the System of Authorization and Information on Biodiversity (SISBIO) on October 2016 under number 55384-1 (Annex D).

### *Study Area*

The state of Paraná is divided into 22 health regions (HR), the municipalities participating in the study are those attended by the 15th, 16th, 17th and 18th HR (Figure 1), whose main municipalities are Maringá, Apucarana, Londrina and Cornélio Procópio, respectively. The HR are co-participating institutions, as well as the 2nd Environmental Police Company and the Londrina City Hall.

Figure 1: Map of the state of Paraná, with emphasis on the municipalities participating in the research project.



Source: Caldart e colaboradores.

### *Collecting Run Over Animals*

Run over wild animals found in the municipalities covered by the 18th, 17th, 16th and 15th HR of the state of Paraná during the period from November 2016 to October 2018 were collected. The project team traveled four specific transects (Figure 2), one each week, that cover 89 municipalities of the North of Paraná. Transect 1, also called South transect, involves the 16th and 17th HR and has as boundaries the municipalities of Londrina, California and Mauá da Serra. Transect 2, or East, covers the 17th and 18th HR, is bounded by the municipalities of Londrina, Cornélio Procópio and Sertaneja. Transect 3, or North, covers the 17th HR, the cities of Rolândia, Prado Ferreira, Alvorada do Sul, Bela Vista do Paraíso and Londrina are its limits. Transect 4, or West, involves the 15th, 16th and 17th HR and has as boundaries the municipalities Mandaguari, Maringá, Astorga, Jaguapitã. The point of departure and arrival of the transects was always Londrina (-23.2927°, -51.1732 23°), the average speed used was 40 to 60km/h. Collects were also made through communication of the tramping to the 2nd Company of Environmental Police, 2nd Road Police Company.

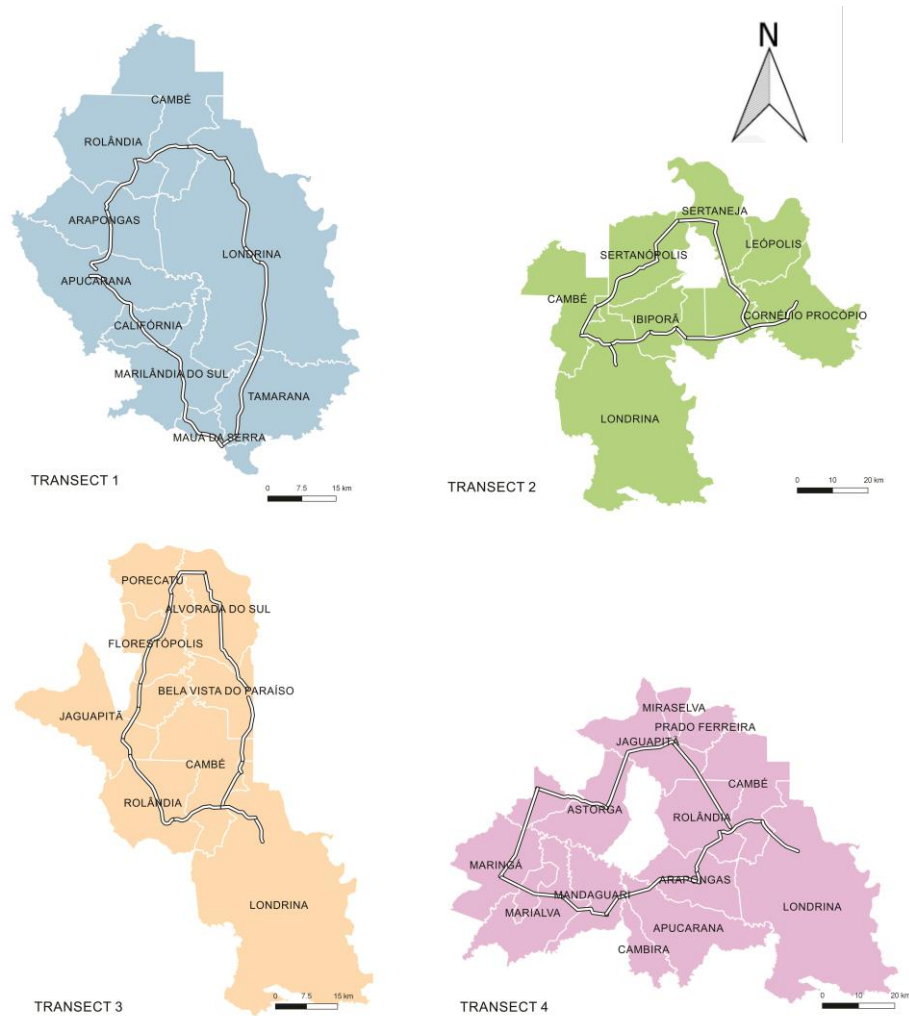
The animals were collected dead, without evisceration, without crushing in the abdomen and skull, absent from fly larvae, preferably *rigor mortis*. They were then placed in specific bags for biological material and transported to the State University of Londrina (UEL) where they were kept in a cold room until the autopsy was performed.

### *Georeferencing and Epidemiological Research*

The coordinate reference system used was EPSG:31981 and all the trampling points of the study were mapped using the global positioning system (GPS). The spatial analysis of the occurrence was performed in the QGIS program, version 2.14.1, using the Kernel intensity estimator.

For the epidemiological investigation a form was filled out for each animal collected for the purpose of obtaining data of the trampling site, trampled animal conditions and autopsy information (Appendix A).

Figure 2: Transects traveled weekly in the active search of wild animals run over in municipalities of the North of Paraná from November 2016 to October 2018.



Source: Caldart and collaborators.

### *DNA Extraction and PCR*

DNA extraction from bone marrow, lymph node, spleen, liver and ear tip skin was performed with the commercial PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's recommendations. A negative control (ultrapure water) was added to each extraction set. The extracted material was aliquoted into 1.5 ml sterile polypropylene tubes, identified and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ , for use in the PCR. In order to control the quality of the DNA extraction, quantification was performed using L-QUANT (Loccus Biotecnologia), the samples whose extracts had no minimum concentration of  $30\text{ng}/\mu\text{L}$  were submitted to extraction again, those that did not present the minimum quantity in the second extraction were excluded from the study.

For the DNA amplification of the parasites of *Leishmania* genus, two different PCR protocols were used with the aim of increasing the sensitivity. The first protocol was a nested-PCR (nPCR) whose target is a fragment of the smaller ribosomal subunit (18S), a highly conserved region among *Leishmania* species. In this nPCR the first reaction was performed with primers R221 and R332 (VAN EYS *et al.*, 1992) amplifying parasites of the order Kinetoplastida, the conditions of the reaction were denaturation 94°C for 5min, followed by 35 cycles of 30 sec to 94°C, 55°C, and 72°C, and a final extension at 72°C for 5min. The resulting amplification of the first reaction was 603bp and was used as a sample for the second reaction. The conditions of the second reaction of nPCR were similar to those of the first, except that the annealing temperature was 60 ° C, of which the primers used were R222 and R333 and the generated fragment was 353bp (VAN EYS *et al.*, 1992). To avoid inhibition in the second reaction of nPCR due to the large amount of DNA, the second reaction was performed twice, once without diluting the result of the first reaction and once diluting the result of the first reaction in a 1: 4 ratio. The second protocol used was a simple PCR that amplifies the gene ITS1 of the genus *Leishmania*, region more polymorphic than the 18S, which allows better discrimination of the different species through DNA sequencing. LIT.SR and L5.8S primers were used (SCHÖNIAN *et al.*, 2003) and the reaction conditions were denaturation 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 30 sec at 94°C, 55°C, and 72°C, and a final extension at 72°C for 5 min. The size of the fragment generated varies from 300 to 350bp according to the *Leishmania* species amplified.

For the amplifications, Platinum®Taq DNA Polymerase (Life Technologies) was used. The two PCR protocols employed had an analytical sensitivity of 25fg, that is, they detected one parasite. All the reaction sets included a negative control (ultrapure water) and a positive control whose *Leishmania* species did not occur in Brazil (*L. (L.) tropica* IOCL0571 or *L. (L.) major* IOCL0581) to avoid any suspicion of contamination. The amplified products generated in the PCR reactions were visualized after 1.5% agarose gel electrophoresis (Invitrogen®) stained with syBr safe DNA stain (Invitrogen®) in a horizontal vat with TEB 1X solution pH 8.4 (89mM Tris, 89mM boric acid, 6mM EDTA) as running conducting fluid. The gel was visualized under UV light using Loccus biotechnology software to obtain the images.

In order to avoid errors due to non-specific amplification, only samples with DNA sequencing confirmation were considered positive in the present study.

### *DNA Sequencing by Sanger*

PCR products were purified with PureLink Gel Extraction Kit (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and quantitated using L-QUANT. Direct sequencing was performed using BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) on the 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions.

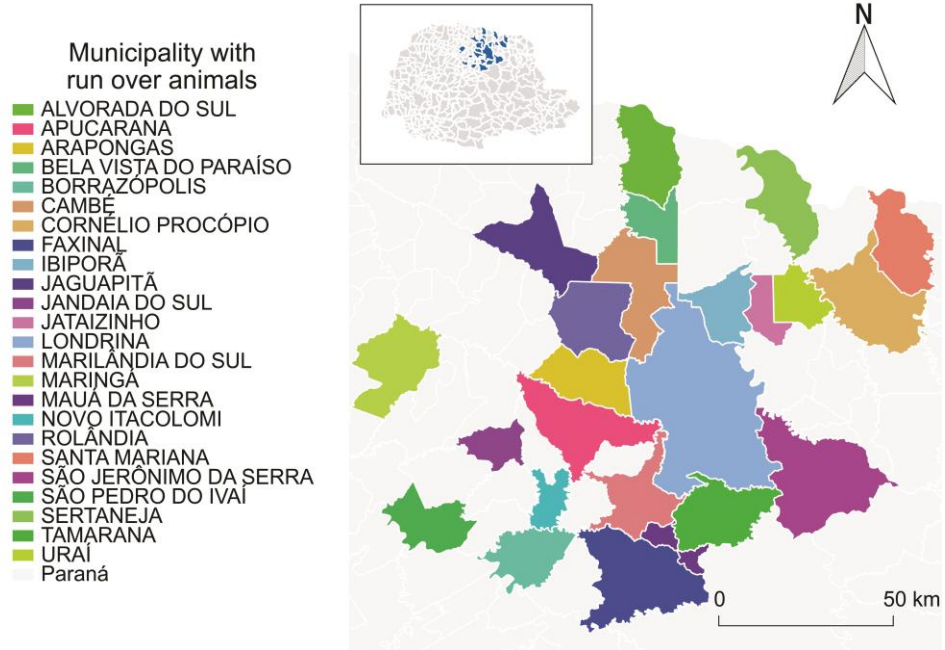
The sequences obtained were examined for quality by the PHRED software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>). Consensus sequences were determined by CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/cgi-bin/phph/cap3.pl>) and sequence identity was obtained by comparison with all sequences deposited on GenBank using the BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Other analyzes were carried out with BioEdit and Chromas software.

## **Results**

In the 24-month period (November 2016 to October 2018), 66 mammals were collected in 24 different municipalities (Figure 3 and 5); it is estimated that one in five specimens observed were in collecting conditions. The most collected animal species was *Didelphis albiventris*, representing 37.9% of the total (25/66). We highlight the large number of carnivores (24.2%, 16/66) represented by eight species; among them *Leopardus wiedii*, which is considered almost threatened by the International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) and *Leopardus guttulus*, already among the endangered and classified species as vulnerable by IUCN (Figure 4).

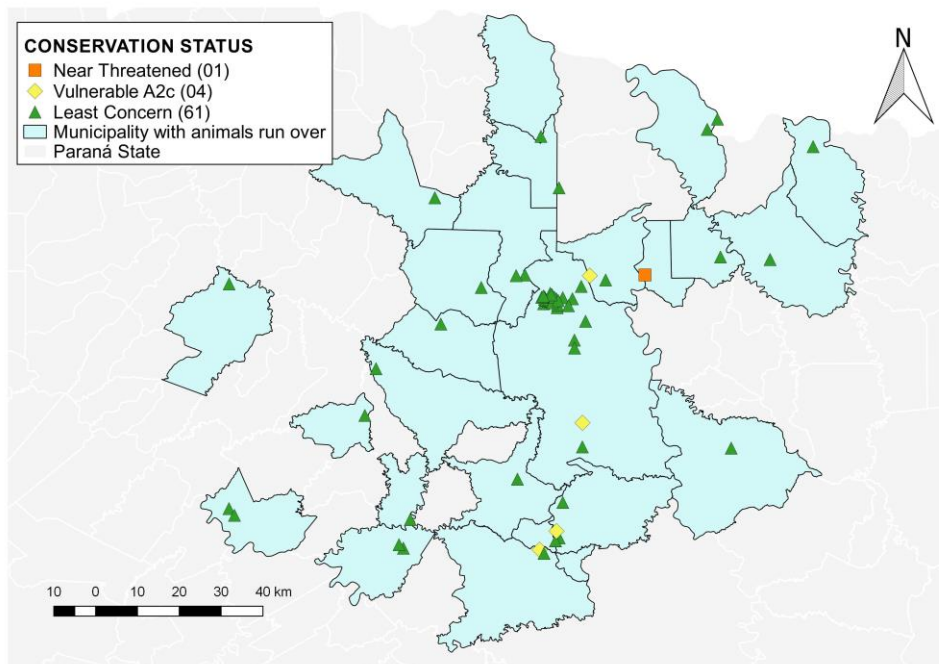
Most of the animals were collected in autumn (34.9%), followed by spring (28.6%) and winter (26.9%); 59.1% were males; 61.3% were adults, 35.5% were young and 3.3% were puppies. The death of the collected animals, in 72.6% of the cases, occurred by single contusion predominantly in the head. Among the trampling sites, 3.5% had traffic signs indicating the presence of wild animals on the highway, 48.2% had speed limit signs and 83.6% were near water courses (considering a radius of 2km). All the animals were less than 5km away from some kind of green area. Regarding the transects, 15 animals were collected in T1, 9 in T2, 3 in T3 and none in T4, 59.1% (39/66) were collected outside transects.

Figure 3. Geographic distribution of trampled wild animals collected in streets and highways of 24 municipalities belonging to the 15 th, 16 th, 17 th and 18 th regional health centers of the state of Paraná from November 2016 to October 2018.



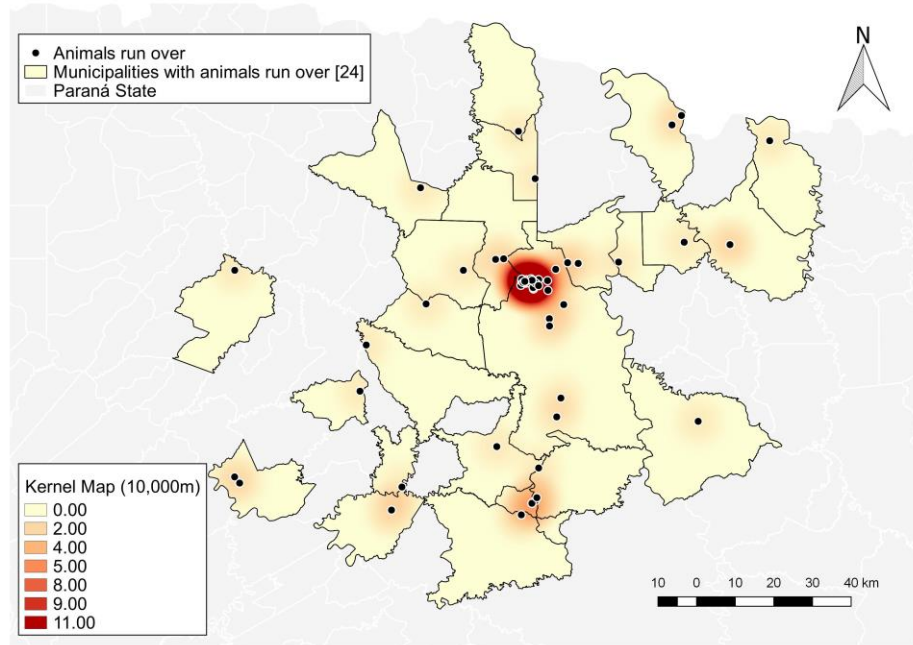
Source: Caldart and collaborators.

Figure 4. Conservation status of trampled wild animals collected from streets and highways of 24 municipalities belonging to the 15 th, 16 th, 17 th and 18 th regional health centers of the state of Paraná from November 2016 to October 2018.



Source: Caldart and collaborators.

Figure 5. Kernel map demonstrating the concentration of trampled wild animals collected on streets and highways of 24 municipalities belonging to the 15 th, 16 th, 17 th and 18 th regional health centers of the state of Paraná from November 2016 to October 2018.



Source: Caldart and collaborators.

Table 1 shows the success rate of DNA extraction and amplification results per organ evaluated, Table 2 shows the results of amplifications and DNA sequencing per positive animal. Figure 6 shows the phylogenetic relationship between the sequences obtained in the present study and those available in GeneBank.

Table 1. Results of DNA extraction and polymerase chain reactions for DNA amplification of *Leishmania* spp. of bone marrow, lymph node, spleen, liver and skin of wild animals run over in municipalities of the North of Paraná from November 2016 to October 2018.

Tissue	DNA extraction	PCR		
		ITS1	18S	18S (1:4)
Liver	65/66 (98.5%)	0	0	0
Ear skin	54/63 (85.7%)	6	0	2
Bone marrow	47/60 (78.3%)	5	1	1
Lymph node	43/56 (76.8%)	0	0	1
Spleen	46/65 (70.8%)	3	0	0

\*Differences in the number of samples submitted to DNA extraction are due to the collection conditions of each animal

Source: Caldart and collaborators.

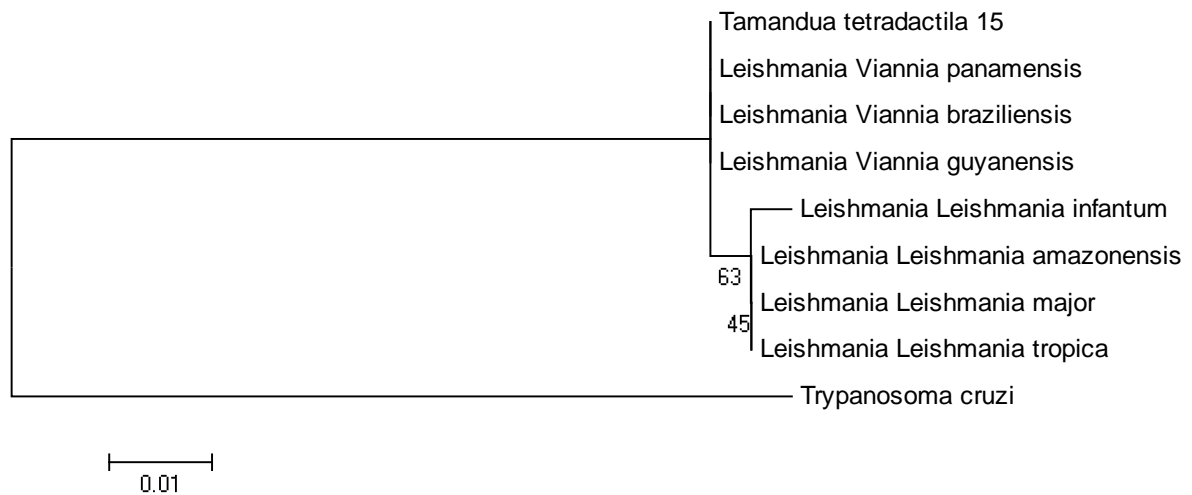
Table 2. PCR for *Leishmania* spp. and DNA sequencing results for wild animals run over in municipalities of Northern Paraná from November 2016 to October 2018.

ID	Species	Tissue	PCR	DNA sequencing
6	<i>Puma concolor</i>	BM	ITS1	Inespecific amplification
7	<i>Dasypus novemcinctus</i>	BM	ITS1	Inespecific amplification
10	<i>Leopardus weidii</i>	ES	ITS1	Waiting results
15	<i>Tamandua tetradactyla</i>	BM, LN, S	ITS1, 18S (1:4), ITS1	Viannia subgenus <sup>LN, 18S</sup>
24	<i>Procyon cancrivorus</i>	ES	18S (1:4)	Waiting results
42	<i>Leopardus pardalis</i>	ES	ITS1	Inespecific amplification
46	<i>Didelphis albiventris</i>	ES	18S (1:4)	Waiting results
51	<i>Tamandua tetradactyla</i>	ES	ITS1	Waiting results
52	<i>Dasypus novemcinctus</i>	ES	ITS1	Waiting results
59	<i>Tamandua tetradactyla</i>	S, ES	ITS1, ITS1	Waiting results
77	<i>Galictis cuja</i>	BM	ITS1	Inespecific amplification
80	<i>Leopardus guttulus</i>	BM, S, ES	ITS1, ITS1, ITS1	Waiting results
85	<i>Nasua nasua</i>	BM	18S and 18S (1:4)	Waiting results

BM- bone marrow, ES- ear skin, LN- lympho node, S- spleen.

Source: Caldart and collaborators.

Figure 6. Phylogenetic reconstruction by the Maximum Likelihood method with 1000 bootstraps, Tamura-Nei evolution model.



Partial sequences of the minor subunit (18S) of ribosomal RNA from the *Viannia* subgenus (OKGQ332355, OKGQ332358 and OKJN003595) and from the *Leishmania* subgenus (OKEU825208, OKFJ263545, OKFJ263546 and OKGQ332354) were used in the alignment and a *Trypanosoma cruzi* sequence were used as an outgroup.

Source: Caldart and collaborators.

## Discussion

According to the Brazilian Center for Road Ecology Studies (CBEE), 15 animals are killed on highways every second in Brazil, which represents more than 1 million per day. Of these, 90% are small vertebrates such as frogs and snakes, 9% correspond to medium-sized mammals such as owls, opossums and monkeys, finally 1% are large vertebrates such as jaguars, for example. The Brazilian regions with the highest rate of trampling are the Southeast and South, and among the states, Paraná occupies the second position and São Paulo the first (CBEE, 2019), which is probably due to the high flow of vehicles on the highways of these states. According to Richini-Pereira *et al.* (2014), carcasses of wild animals run over are a rich source of information and should be used for epidemiological studies aimed at zoonoses, the authors concluded that this type of study generates useful information related to parasite-host interaction and, in the specific case of leishmaniasis, help in the identification of reservoirs in different environments.

The quality of the material used for DNA extraction is essential to be able to rely on the results of molecular methods (SCHRADER *et al.*, 2012). The nature of the samples from the present study may be a problem in this aspect due to postmortem autolysis; in an attempt to control this bias, a rigorous quality measurement of the extracted material was performed (Table 1). In the specific case of the bone marrow, it is known that the autolysis occurs faster when compared to the other organs evaluated due to the low cellularity (DABOIN *et al.*, 2008), on the other hand, the climatic conditions and the place affected with the collision may influence the time of organ autolysis. For *in vivo* parasitological diagnosis of visceral leishmaniasis, the bone marrow together with the lymph node, spleen, liver and skin are organs of choice (BRASIL, 2014; CRMV-PR, 2016), so they were chosen for diagnosis in the present study.

The results obtained in PCR showed that the use of the LIT.SR and L5.8S primers (SCHÖNIAN *et al.*, 2003), which amplify the ITS1 gene, must be especially careful when DNA sequencing is not performed for confirmation of the result, considering the occurrence of non-specific amplification in four samples (Table 2).

The primers designed by (VAN EYS *et al.*, 1992), whose target is the 18S gene, amplify a well conserved region and, in the present study, have been shown to be the best option for a screening when the interest is to detect DNA from parasites of the genus *Leishmania*. One animal was confirmed infected with *Leishmania*, it is important to observe that the positivity occurred after a second DNA extraction, since the first attempt was

unsuccessful, and when the result of the first PCR reaction amplifying the 18S gene was diluted in the proportion 1: 4 to be used in the second reaction, proving the need for the care taken.

Brazilian studies that aimed to investigate the presence of *Leishmania* DNA in the organs of wild animals run over were found in the literature. Soares et al. (2013), worked with 49 animals from the state of Mato Grosso and 132 animals from Pará, Brasil; the authors used primers that amplify DNA from Trypanosomatidae family parasites and did not identify any positive animals in spleen or lung, even if the states which they worked are known to be endemic for leishmaniasis. Alves-Palmeira (2018), evaluated 297 animals collected on highways in the state of Santa Catarina, whose capital had the first autochthonous case of human visceral leishmaniasis reported in 2017, and did not find any positive animals for *L. (L.) infantum* using spleen, liver, heart, lung and skin. Richini-Pereira et al. (2014), in a study using 70 animals from the state of São Paulo detected DNA from parasites of the genus *Leishmania* in *Cavia aperea*, *Cerdocyon thous*, *Dasyurus septemcinctus*, *Didelphis albiventris*, *Hydrochoerus hydrochoeris*, *Myrmecophaga tridactyla*, *Procyon cancrivorus*, *Sphiggurus spinosus* and *Tamandua tetradactyla*. The DNA of *L. (L.) infantum* was confirmed in mesenteric lymph node of a *Cerdocyon thous*. The evaluated organs were lung, spleen, liver, kidney, lymph node, heart and adrenal gland, all positives were confirmed by DNA sequencing and the kinetoplastid DNA (kDNA) was the target of the amplification.

In the *Tamandua tetradactyla* species, DNA from *Leishmania (Viannia) guyanensis* (LAINSON et al., 1981) and *Leishmania (Leishmania) infantum* (ARAUJO et al., 2013) were detected in the state of Pará, Brazil; and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Ecuador (MIMORI et al., 1989). The role of the anteater in the epidemiology of leishmaniasis is not well known, for the time being they are considered only hosts (ROQUE; JANSEN, 2014). This animal species has behavioral and biological specificities that make it especially susceptible to leishmaniasis: anteaters are relatively large and slow, they spend a lot of time climbing trees in close intimate contact with phlebotomines that inhabit tree trunks, such as *Lutzomyia umbratilis* and *Lutzomyia whitmani* (LAINSON et al., 1981); in addition, they present a deficient cellular immune response. These characteristics, according to (RICHINI-PEREIRA et al., 2014), make them suitable models to study pathogen-host interaction. The parasite identified in the present study is of the subgenus *Viannia*, which occurs in the New World and contemplates the following species that cause LTA in Brazil: *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* and *L. (V.) braziliensis*, that is the only species of this subgenus reported in the state of Paraná to date (BRASIL, 2017).

The state of Paraná accounts for 3% of the Brazilian cases of American tegumentary leishmaniasis (LTA) in humans and 98% of the human cases in the southern region of Brazil (PONTELLO; GON; OGAMA, 2013) and autochthonous canine cases are recorded in three regions: Vale do Ribeira, Central and North (CASTRO *et al.*, 2007). The primary reservoirs of the LTA are small wild mammals, the rodent species *Necromys lasiurus* and *Thrichomys laurentius* are potential reservoirs of *L. (V.) braziliensis*, whereas the genus *Proechimys* is a potential reservoir of *L. (L.) amazonensis* in Brazil (DANTAS-TORRES *et al.*, 2010). Several other species of wild animals have been reported as hosts of LTA parasites in Brazil, such as: marsupials, armadillos, anteaters, wild cats and felines, primates and bats (ROQUE; JANSEN, 2014).

## Conclusion

The proposed methodology proved to be effective in the active surveillance of visceral leishmaniasis, since it was able to detect the presence of *Leishmania* spp. in organs of run over wild animals. No DNA of *L. (L.) infantum* was detected in any of the organs of the evaluated animals, the active epidemiological surveillance in the North of Paraná must be constant, since the risk remains real since it is close to endemic municipalities of the west of São Paulo.

## References

- ALVES-PALMEIRA, A. R. de O. **Análise espacial e detecção molecular de *Leishmania* spp . e *Trypanosoma* spp . em animais silvestres mortos.** [Master degree in Tropical Diseases]: Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2018.
- ARAÚJO, A. *et al.* Paleoparasitology: the origin of human parasites. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, 2013. v. 71, n. 9B, p. 722–726.
- BAGAGLI E, BOSCO SMG: Armadillos and dimorphic pathogenic fungi: ecological and evolutionary aspects. In **The Biology of the Xenarthra**. Firstth edition. Edited by Viscaino SF, Loughry WJ. Gainesville: University Press of Florida; 2008:103–110.
- BISETTO-JUNIOR, A.; THOMAZ-SOCCCOL, V.; NAVARRO, I.T. Leishmaniose Visceral no Estado do Paraná. **Revista do Conselho Regional de Medicina Veterinária do Paraná**, v. 41, p. 6-7, 2014.

- BRANDÃO-FILHO, S. P. *et al.* Wild and synanthropic hosts of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2003. v. 97, n. 3, p. 291–296.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral**. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Nota técnica conjunta da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul. **Situação da Leishmaniose Visceral na fronteira do Estado do Rio Grande do Sul com a Argentina**. Brasília, 2010.
- CALDART, E. T. *et al.* *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): New evidence for the urbanization of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2017. v. 26, n. 1.
- CALDART, E. T. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in londrina, paraná - Investigation and case report. **Sêmima: Ciências Agrárias**, 2018. v. 39, n. 3, p. 1371–1375.
- CASTRO, E. A. *et al.* *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*: Epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). **Experimental Parasitology**, 2007. v. 117, n. 1, p. 13–21.
- CBEE. Centro Brasileiro de Estudos em Ecologia de Estradas. Accessed in february 4th, 2019. Available in < <http://cbee.ufla.br/portal/atropelometro/>>
- CERINO, D. A.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T. G. V. Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in the urban area of the municipality of Cianorte, Paraná State, Brazil. **Neotropical Entomology**, 2010. v. 38, n. 6, p. 853–858.
- CRMV-PR. Conselho Regional de Medicina Veterinária do Paraná. **Manual Técnico: Leishmanioses caninas**. Curitiba- Paraná, 2016.
- D'ANDREA, L. A. Z. *et al.* The shadows of a ghost: A survey of canine leishmaniasis in

- Presidente Prudente and its spatial dispersion in the western region of São Paulo state, an emerging focus of visceral leishmaniasis in Brazil. **BMC Veterinary Research**, 2015. v. 11, n. 1, p. 1–7.
- DABOIN, K. M. P. *et al.* Biopsia de médula ósea: utilidade y limitaciones. **Patología**, 2008. v. 46, n. 3, p. 237–247.
- DANTAS-TORRES, F. *et al.* Cutaneous and visceral leishmaniasis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, 2010. v. 170, n. 3, p. 313–317. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401710001007>>.
- DIAS-SVERSUTTI, A. De C. *et al.* Estudo preliminar da preferência alimentar de *Nyssomyia neivai* (Pinto) e *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) em área rural do Paraná. **Neotropical Entomology**, 2008. v. 36, n. 6, p. 953–959.
- DUJARDIN, J. C. *et al.* Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, 2008. v. 14, n. 7, p. 1013–1018.
- EYS, G. J. J. M. VAN *et al.* Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 1992. v. 51, p. 133–142.
- GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniasis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, 2011. v. 181, n. 1, p. 23–30.
- IUCN. International Union for Conservation of Nature. Accessed in feb 13th, 2019. Available in <<https://www.iucnredlist.org/>>.
- LAINSON, R. *et al.* Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of, *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of “pian-bois”. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1981. v. 75, n. 4, p. 530–536.
- MELO, S. C. C. S. De *et al.* Phlebotomine Sandflies in Rural Locations in the State of Parana, Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2013. v. 55, n. 6, p. 407–410.

- MEMBRIVE, N. A. *et al.* Flebotomíneos de municípios do Norte do estado do Paraná, Sul do Brasil. **Entomología y vectores**, 2004. v. 11, n. 4, p. 673–680.
- MIMORI, T. *et al.* Identification, using isoenzyme electrophoresis and monoclonal antibodies, of *Leishmania* isolated from humans and wild animals of Ecuador. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 1989. v. 40, n. 2, p. 154–158.
- OLIVEIRA, F. J. A.; COSTA, I. C.; NUNES, V.; OLIVEIRA, O.; OLIVEIRA NETO, B. P.; OLIVEIRA, J. E. Leishmaniose tegumentar americana: Flebotomíneos de área de transmissão do Parque Arthur Thomas na região de Londrina – PR. **Biosaúde**, 2000. v. 2, p. 81-87.
- PONTELLO, R.; GON, A. D.; OGAMA, A. American cutaneous leishmaniasis: epidemiological profile of patients treated in Londrina from 1998 to 2009. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2013. v. 88, n. 5, p. 748–753.
- REIS, H. R. *et al.* Soroprevalência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) canina e fauna de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Bela Vista do Paraíso, Paraná **Sêmima: Ciências Agrárias**, 2011. v. 32, n. 3, p. 1083–1094.
- RICHINI-PEREIRA, V. B. *et al.* Molecular detection of *Leishmania* spp. in road-killed wild mammals in the Central Western area of the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 2014. v. 20, p. 27.
- ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, 2014. v. 3, n. 3, p. 251–262. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004>>.
- SANTOS, D. R. Dos; FERREIRA, A. C.; BISETTO JUNIOR, A. The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2012. v. 45, n. 5, p. 643–645.
- SCHÖNIAN, G. *et al.* PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2003. v. 47, n. 1, p. 349–358.
- SCHRADER, C. *et al.* PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. **Journal of**

**Applied Microbiology**, 2012. v. 113, n. 5, p. 1014–1026.

SILVA, A. M. Da *et al.* Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. **Neotropical Entomology**, 2008. v. 37, n. 2, p. 209–225.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Accessed in march 10th, 2019. Available in: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29892192&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishv>.

SOARES, H. S. Pesquisa de carrapatos, agentes transmitidos por carrapatos e tripanossomatídeos em animais silvestres dos Estados do Mato Grosso e Pará. **Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal**, 2013. v. Doctor of, p. 119.

STEINDEL, M. *et al.* Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2013. v. 33, n. 4, p. 490–496.

THOMAZ-SOCCOL, V. *et al.* Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2009. v. 18, n. 3, p. 46–51.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista a alta morbidade e capacidade desfigurante da leishmaniose tegumentar no Brasil e no mundo, bem como sua endemicidade no estado do Paraná, principalmente na região Norte; torna-se de vital importância a produção de estudos que busquem reconhecer padrões epidemiológico-espaciais de ocorrência desse agravo. Mais importante do que a produção e publicação desses estudos é que essa informação seja direcionada e entregue para os gestores de saúde capazes de usar essa informação em benefício da população. Verificando perfis e padrões pudemos observar a necessidade de maior atenção por parte da 15ª regional de saúde no que diz respeito às recidivas e abandono de tratamento da leishmaniose tegumentar americana, o que pode estar levando a um aumento no número de casos da forma clínica mucosa. A 16ª regional de saúde é a regional que mais apresentou casos em área rural e a que apresentou menor número de casos, demonstrando uma estabilidade do agravo naqueles municípios. Para a 17ª regional de saúde chamamos mais atenção para a notificação de casos com critério clínico-epidemiológico sem solicitação de exames laboratoriais. Na 18ª regional de saúde pudemos observar a ocorrência de uma mudança na epidemiologia da doença que passou a atingir mais pessoas acima de 50 anos e do sexo feminino. De forma geral é necessário um alerta relacionado à contenção do desmatamento, que historicamente está relacionado ao aumento no número de casos da leishmaniose tegumentar americana.

Considerando-se a alta morbidade e letalidade da leishmaniose visceral no Brasil e no mundo, bem como sua alarmante recente entrada no Sul do Brasil, cremos ser de vital importância a vigilância epidemiológica ativa de casos autóctones da doença em animais no Norte do Paraná, permitindo a tomada precoce de decisões no sentido de prevenir a ocorrência de casos humanos. Identificamos um caso canino cuja autoctonia não pudemos confirmar, dado que gerou um alerta para que a busca por novos casos caninos fosse desencadeada. Além disso, avaliamos uma nova metodologia de vigilância epidemiológica ativa da leishmaniose visceral, esta, por detecção molecular de DNA de *Leishmania* em fauna silvestre atropelada, o que não impacta a fauna e nos traz informação precoce, quando comparada à busca ativa em cães.

As informações geradas pela presente tese de doutorado são de grande utilidade para os gestores de saúde de municípios do Norte do Paraná e as metodologias utilizadas podem ser extrapoladas para outras regiões do Brasil e do mundo.

## 8 CONCLUSÃO

Os dados apresentados no presente trabalho demonstram que medidas preventivas e de educação em saúde devem ser principalmente direcionadas a áreas de maior degradação da mata nativa; bem como, o desmatamento deve ser contido para que se possa evitar a expansão da leishmaniose tegumentar americana no Norte do Paraná.

Além disso, demonstram a necessidade de ações imediatas por parte dos gestores nos municípios da 15ª regional de saúde do estado do Paraná principalmente no sentido de conscientizar os pacientes com relação às consequências do abandono do tratamento da leishmaniose tegumentar americana.

Apesar de não termos podido confirmar a autoctonia do caso de leishmaniose visceral canina diagnosticado no presente trabalho, a divulgação desse caso se faz necessária para servir de alerta a médicos veterinários e outros profissionais de saúde pública no Norte do Paraná.

A metodologia de vigilância ativa e precoce de leishmaniose visceral por meio de detecção molecular de DNA de *Leishmania* em fauna silvestre atropelada proposta nesse estudo provou ser efetiva, pois foi capaz de detectar a presença de DNA de *Leishmania* spp.

DNA de *L. (L.) infantum* não foi detectado nos órgãos dos animais avaliados no presente trabalho; no entanto, a vigilância epidemiológica ativa no Norte do Paraná deve ser constante, visto que o risco permanece iminente diante da proximidade com municípios endêmicos do oeste paulista.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

### FICHA IDENTIFICAÇÃO PROJETO SILVESTRES ATROPELADOS



#### IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL

Número do projeto: \_\_\_\_\_ RG anatomia patológica: \_\_\_\_\_ Nome vulgar: \_\_\_\_\_  
 Nome científico: \_\_\_\_\_

#### CARACTERÍSTICAS DO LOCAL DO ATROPELAMENTO

Data provável do atropelamento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Data do recolhimento do animal: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Estação do Ano: \_\_\_\_\_ Cidade do atropelamento: \_\_\_\_\_  
 Endereço do atropelamento: \_\_\_\_\_  
 Presença de Sinalização (limites): Sim ( ) Não ( ) Velocidade máxima da via: \_\_\_\_\_  
 Sinalização de Animais Silvestres: Sim ( ) Não ( )  
 Ocorreu queimada em local próximo ao atropelamento: Sim ( ) Não ( )  
 Época de grande circulação de veículos (feriado/final de semana)? Sim ( ) Não ( )  
 Radar próximo (raio de 500m): Sim ( ) Não ( ) Quantidade de faixas na via (2 sentidos): \_\_\_\_\_  
 Pista dupla: Sim ( ) Não ( ) Pista simples: Sim ( ) Não ( )  
 Trecho em torno do local do atropelamento de/com (raio de 50m):  
 Reta: Sim ( ) Não ( ) Curva: Sim ( ) Não ( ) Plano: Sim ( ) Não ( )  
 Inclinação: Sim ( ) Não ( ) Acostamento Sim ( ) Não ( )  
 Guard rail Central? Sim ( ) Não ( ) Guard rail lateral? Sim ( ) Não ( )

#### GEORREFERENCIAMENTO

Latitude: \_\_\_\_\_ Longitude: \_\_\_\_\_

Rodovia está próxima a (raio de 5km):

- |  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Centro-urbano | <input type="checkbox"/> Área verde  |
| <input type="checkbox"/> Periurbano    | <input type="checkbox"/> Mata Ciliar |
| <input type="checkbox"/> Pecuária      |                                      |
| <input type="checkbox"/> Agricultura   |                                      |

Rodovia está próxima a área verde de acordo com SNUC (raio de 10km):

- |   |  |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Zonas de amortecimento (1)   | <input type="checkbox"/> Área de proteção ambiental (8)                |
| <input type="checkbox"/> Corredores ecológicos (2)    | <input type="checkbox"/> Área de relevante interesse ecológico (9)     |
| <input type="checkbox"/> Estação ecológica (3)        | <input type="checkbox"/> Floresta nacional (10)                        |
| <input type="checkbox"/> Reserva biológica (4)        | <input type="checkbox"/> Reserva extrativista (11)                     |
| <input type="checkbox"/> Parque nacional (5)          | <input type="checkbox"/> Reserva de fauna (12)                         |
| <input type="checkbox"/> Monumento natural (6)        | <input type="checkbox"/> Reserva de desenvolvimento sustentável (13)   |
| <input type="checkbox"/> Refúgio de vida selvagem (7) | <input type="checkbox"/> Reserva particular do patrimônio natural (14) |

Animal coletado próximo a curso d'água (raio de 2km)

- |                                  |  |                               |
|----------------------------------|--|-------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Rio     | <input type="checkbox"/> Lago artificial | <input type="checkbox"/> Lago |
| <input type="checkbox"/> Represa | <input type="checkbox"/> Córrego         |                               |

Trafego intenso (**verificar classificação do Detran**)? Sim ( ) Não ( )

**NECROPSIA**

Data da necropsia: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Nro projeto \_\_\_\_\_ RG anato-pato \_\_\_\_\_  
 Estado de conservação 1 2 3 4 5 Nome vulgar \_\_\_\_\_  
 Gênero: \_\_\_\_\_ Prenhez: Sim ( ) Não ( ) NSA ( ) Classe Vertebrata: \_\_\_\_\_

**Categoria da Espécie**

Arborícola

Terrícola

Aquática

Diurno

Noturno

Hábito solitário

Hábito gregário

**Faixa Etária**

Filhote

Jovem

Adulto

Indeterminado

**Status de conservação (IUCN)**

Menor preocupação

Quase ameaçado

Vulnerável

Em perigo

Criticamente em perigo

**Escore do estado de destruição:**

1- Fratura ou contusão única que provavelmente levou ao óbito

2- Fratura e contusão que provavelmente levaram ao óbito

3- Duas fraturas ou contusões que provavelmente levaram ao óbito

4- Múltiplas fraturas e órgãos encontrados fora do seu local anatômico original

Presença de Ectoparasitos: Sim ( ) Não ( ) Espécie \_\_\_\_\_

Endoparasitos: Sim ( ) Não ( ) Espécie \_\_\_\_\_

**Conteúdo gástrico**

- Ausente  Presente anormal
- Presente normal

**Conteúdo intestino delgado**

- Ausente  Presente anormal
- Presente normal

**Conteúdo intestino grosso**

- Ausente  Presente anormal
- Presente normal

**Material coletado**

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Baço   | local: _____                                    |
| <input type="checkbox"/> Bexiga   | <input type="checkbox"/> Linfonodo 2            |
| <input type="checkbox"/> Cérebro  | local: _____                                    |
| <input type="checkbox"/> Coração  | <input type="checkbox"/> Língua                 |
| <input type="checkbox"/> Coágulo  | <input type="checkbox"/> Masséter               |
| <input type="checkbox"/> Coxim  | <input type="checkbox"/> Medula óssea           |
| <input type="checkbox"/> Diafragma  | <input type="checkbox"/> Olho                   |
| <input type="checkbox"/> Esôfago  | <input type="checkbox"/> Órgão reprodutor       |
| <input type="checkbox"/> Estômago   | <input type="checkbox"/> Pele focinho           |
| <input type="checkbox"/> Fezes: <input type="radio"/> Copro <input type="radio"/> PCR | <input type="checkbox"/> Pele orelha            |
| <input type="checkbox"/> Fígado   | <input type="checkbox"/> Pulmão                 |
| <input type="checkbox"/> Fígado para toxicologia                                      | <input type="checkbox"/> Rim                    |
| <input type="checkbox"/> Intestino delgado  | <input type="checkbox"/> Urina                  |
| <input type="checkbox"/> Intestino grosso   | <input type="checkbox"/> Lâmina de Medula óssea |
| <input type="checkbox"/> Linfonodo 1  | <input type="checkbox"/> Imprinting linfonodo   |

**Outros órgãos quando for Ave:**

- Bursa de fabrícius
- Proventrículo
- Ventrículo
- Musculatura peitoral
- Dedo

**Observações:**

---



---



---



---



---

**ANEXOS**

## ANEXO A

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Evolvendo Seres Humanos da  
Universidade Estadual de Londrina

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** INVESTIGAÇÃO ESPACIAL E MOLECULAR DA REDE EPIDEMIOLÓGICA DAS LEISHMANIOSES EM HUMANOS, ANIMAIS E VETORES.

**Pesquisador:** Eloiza Teles Caldart

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 61955316.9.0000.5231

**Instituição Proponente:** CCA - Programa de Pós Graduação em Ciência Animal

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.595.849

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um projeto de doutorado do Programa de pós-graduação em Ciência Animal. É um estudo caso-controle, os casos do estudo serão os casos autóctones de leishmaniose em humanos ou caninos notificados pela Vigilância Epidemiológica e/ou Sanitária

das Secretarias de Saúde dos municípios da Mesorregião Norte Central Paranaense.

Ao redor de cada caso índice, serão selecionados dois humanos ou caninos para participar do estudo como controles, esses controles deverão residir a, no máximo, 500 m de distância do seu respectivo caso índice.

Os controles serão selecionados de forma pareada, ou seja, deverão apresentar características em comum com o caso índice. O tamanho da amostra vai variar de acordo com o número de notificações, com previsão de no mínimo 80 e, no máximo 120 casos índice, totalizando 240 a 360 casos e controles. Os casos mais recentes serão priorizados, abrangendo pelo menos 3 casos índice, quando houver, de cada uma das microrregiões (Apucarana, Astorga, Faxinal, Fiorai, Ivaiporã, Londrina, Maringá e Porecatu). Nas residências dos humanos ou caninos selecionados como casos ou controles serão colhidas amostras de outras

espécies animais no intra e extra domicílio (humanos, caninos, felinos, equinos, roedores sinantrópicos e silvestres e vetores) com a intenção de traçar o caminho da transmissão das leishmanioses nos respectivos focos.

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Telefone: (43)3271-5455

Município: LONDRINA

CEP: 85.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Centro de Excelência em  
Parasitologia e Saúde Humana

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 1.000.000

#### Objetivo da Pesquisa:

##### Objetivo Geral:

Investigação das leishmanioses em humanos, animais e vetores para traçar o caminho da sua transmissão por meio de técnicas de tipagem molecular e utilização de ferramentas de georreferenciamento para caracterização do macro e micro ecossistema de ocorrência dos focos.

##### Objetivos Específicos:

- Isolar cepas de *Leishmania* de humanos, equinos, cães, gatos, roedores e vetores.
- Identificar haplótipos de *Leishmania* por meio de técnicas de tipagem molecular.
- Identificar fatores que aumentem as chances de ocorrência das leishmanioses por meio de estudo de caso-controle.
- Identificar as espécies de flebotomíneos presentes nos focos de infecção de leishmanioses e as espécies de *Leishmania* que estão albergando.
- Monitorar a entrada do vetor *Lutzomyia longipalpis* na mesorregião Norte Central paranaense, bem como de casos autóctones de leishmaniose visceral.
- Realizar caracterização molecular da família de genes A2 nos isolados em questão.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quanto aos riscos a pesquisadora descreve que serão decorrentes da coleta de sangue venoso (a qual será realizada por profissionais treinados e com material novo e

descartável) e da coleta de raspado de lesão cutânea (a qual será realizada por profissionais treinados, com o uso de material novo e descartável apenas

nos casos de lesão cutânea compatível com leishmaniose). Esses riscos envolvem desconforto e dor leves no momento da picada de agulha e da raspagem da lesão.

Quanto aos benefícios esperados relata que serão: identificar os fatores de risco de infecção por leishmaniose no local de residência, tanto para os humanos quanto para

os animais. Aprender sobre como prevenir essa zoonose. Gerar informações epidemiológicas reais para estabelecer programas profiláticos e de controle mais eficazes.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante considerando que a leishmaniose está, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), entre as seis doenças infecciosas de maior importância no mundo. O estado do Paraná é endêmico para a leishmaniose tegumentar sendo responsável por 98% dos casos humanos da região Sul do Brasil.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 96.057-970

Município: LONDRINA

E-mail: ocs200@uel.br



Centro de Ética em  
Saúde Pública  
UEL Londrina

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 1.806.046

Apresentou folha de rosto adequada e assinada. Apresentou declaração da instituição co-participante 17ª Regional de Saúde. Não apresentou declaração das outras instituições co-participantes. Apresentou termo de sigilo e confidencialidade assinado. Apresentou TCLE na forma de convite e em acordo com a resolução. Apresentou instrumentos para coleta de dados. Apresentou declaração de banco de material biológico. O cronograma tem data de coleta prevista para 01/03/2017. O orçamento previsto é de R\$ 19.300,00 e será custeado pela pesquisadora.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Fica aprovado o início da pesquisa apenas em Londrina e nos municípios pertencentes a 17ª Regional de Saúde, a qual consta autorização. A pesquisa nos outros municípios não está aprovada e só poderá ser iniciada após apresentação das autorizações das respectivas instituições através de notificação via Plataforma Brasil.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

Fica aprovado o início da pesquisa apenas em Londrina e nos municípios pertencentes a 17ª Regional de Saúde, a qual consta autorização. A pesquisa nos outros municípios não está aprovada e só poderá ser iniciada após apresentação das autorizações das respectivas instituições através de notificação via Plataforma Brasil.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PI_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_725002.pdf	13/12/2016 09:34:58		Aceito
Outros	TERMO_DE_SIGILO.pdf	13/12/2016 09:34:04	Eloiza Teles Caldart	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoATUALIZADA_ASSINADA.pdf	13/12/2016 09:32:45	Eloiza Teles Caldart	Aceito
Outros	Resposta_Parecer.docx	12/12/2016 23:26:52	Eloiza Teles Caldart	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativo de Ausência	TCLE.docx	12/12/2016 23:25:11	Eloiza Teles Caldart	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	PROJETO_CEP_UEL.doc	12/12/2016 23:23:38	Eloiza Teles Caldart	Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep260@uel.br



Continuação do Parecer: 1.000.048

Investigador	PROJETO_CEP_UEL.doc	12/12/2016 23:23:38	Eloiza Teles Caldart	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DeciRespBancoMatBiologicoHumanoAS SINADO.pdf	14/11/2016 11:15:03	Eloiza Teles Caldart	Aceito
Outros	SESA_Teresinha.pdf	20/10/2016 12:20:40	Eloiza Teles Caldart	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 24 de Janeiro de 2017

Assinado por:  
Rosana Lopes  
(Coordenador)

Prof.ª Dr.ª Alessandra Aparecida Maciel Cardelli  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
Em Ciências da Saúde  
Universidade Estadual de Londrina

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-070

UF: PR Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br

## ANEXO B

## Ficha de notificação de leishmaniose tegumentar americana

República Federativa do Brasil Ministério da Saúde		SINAN SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO		Nº				
FICHA DE INVESTIGAÇÃO		LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA						
<b>CASO CONFIRMADO:</b> Leishmaniose cutânea: todo indivíduo com presença de úlcera cutânea, com fundo granuloso e bordas infiltradas em moldura, com confirmação por diagnóstico laboratorial ou clínico epidemiológico. Leishmaniose mucosa: todo indivíduo com presença de úlcera na mucosa nasal, com ou sem perfuração ou perda do septo nasal, podendo atingir lábios e boca (palato e nasofaringe), com confirmação por diagnóstico laboratorial ou clínico epidemiológico.								
Dados Gerais	1	Tipo de Notificação		2 - Individual				
	2	Agravadoença		3	Data de Notificação			
	4	UF	5	Município de Notificação	6	Código (IBGE)		
Notificação Individual	7	Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)		8	Data do Diagnóstico			
	9	Nome do Paciente		10	Data de Nascimento			
	11	11	Sexo	12	12	13	Raça/Cor	
Dados de Residência	14	14				15	Nome da mãe	
	17	17	18	Município de Residência	19	Distrito		
	20	20		21	21		Logradouro (rua, avenida,...)	
	22	22	23	Complemento (apto., casa, ...)	24	24		Geo campo 1
	25	25		26	26		Ponto de Referência	
	27	27		28	28		CEP	
	29	29		30	30		Pala (se residente fora do Brasil)	
<b>Dados Complementares do Caso</b>								
Anexo Epidemiol.	31	31		32		Ocupação		
	33	33		34		35	Co-infecção HIV	
Dados Clínicos	36	36		37		38	Histopatologia	
	39	39		40		40		Forma Clínica
Dados Labo.	41	41		42		42		Druga Inicial Administrada
	43	43		44		44		Dose Prescrita em mg/kg/dia 5 <sup>o</sup> 15
Dados Caso	45	45		46		46		Outra Droga Utilizada, na Falência do Tratamento Inicial
	47	47		48		48		Outra Droga Utilizada, na Falência do Tratamento Inicial
Tratamento	49	49		50		50		Outra Droga Utilizada, na Falência do Tratamento Inicial
	51	51		52		52		Outra Droga Utilizada, na Falência do Tratamento Inicial

Leishmaniose Tegumentar Americana      Sinan NET      SVS      27/03/2005



## ANEXO C

Ofício de aprovação de projeto de pesquisa emitido pela comissão de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA-UEL)



## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 30/2017

Londrina, 10 de Março de 2017.

Prezada Pesquisadora,

Certificamos que o projeto intitulado "Caracterização epidemiológica e ecológica de animais silvestres atropelados na mesorregião norte central paranaense"; protocolo CEUA nº 2764.2017.41, sob a responsabilidade de **Alice Fernandes Alfieri**, 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 8 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 de Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **07/03/2017**.

O objetivo do projeto é obter dados sobre as principais espécies atropeladas na mesorregião norte central do Estado do Paraná. A partir destes dados ecológicos, serão analisados pontos importantes sobre as principais espécies atropeladas, qual a localização de maior ocorrência dos atropelamentos e se estes ocorrem próximos às cidades, às áreas antropizadas ou de preservação ambiental. Para isso os animais coletados serão aqueles atropelados e mortos, não sendo necessário o manuseio e possível estresse por contenções física ou química. Os animais serão coletados por profissionais capacitados usando EPI – equipamento de proteção individual – (luvas e máscara) no local de atropelamento e transportados em caixa isolérmica envoltos em sacos plásticos brancos (destinados a resíduo hospitalar) até a câmara fria do Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UEL. Os ecto e endoparasitos encontrados e coletados durante a necropsia serão fixados em álcool etílico a 70%. Parte dos tecidos dos animais serão fixados em formalina tamponada a 10% para preparação de lâminas histológicas e outra parte será congelada para análise molecular nos Laboratórios de Zoonoses e Saúde Pública e/ou Virologia Animal, do Hospital Veterinário, UEL, GI 1.

Vigência do Projeto	05/03/2017 a 31/12/2018
Espécie/inhagem	Espécie silvestre brasileira / Diversos Primata não-humano / Diversos Réptil / Diversos
Nº de animais	85 (50 Espécie silvestre brasileira, 5 Primata não-humano, 30 Réptil)
Peso/idade	Variados
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	SISBIO 55384-1
Amostras a serem coletadas	Urina, fezes, cérebro, masseter, língua, linfonodo, olho, pele, unha, fígado, bazo, rim, medula óssea, bexiga, diafragma

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter a nova petição à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Prof. Dra.  Glauri Spantamburlo Alves Fernandes  
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilma. Sra.  
**Prof. Dra. Alice Fernandes Alfieri**  
Coordenadora do Projeto  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Centro de Ciências Agrárias  
Com cópia para Chefe do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Diretor(a) do Centro de Ciências Agrárias

ANEXO D  
Ofício de aprovação de projeto de pesquisa emitido pelo Sistema de Autorização e  
Informação em Biodiversidade - SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 55384-2	Data da Emissão: 21/08/2017 10:21	Data para Revalidação*: 20/09/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: ANDRESSA MARIA RORATO NASCIMENTO DE MATOS	CPF: 398.508.348-42
Título do Projeto: Caracterização epidemiológica e ecológica de animais silvestres atropelados na mesoregião noroccidental paranaense	
Nome da Instituição: Universidade Estadual de Londrina	CNPJ: 78.840.489/0001-53

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta dos animais	01/2017	12/2018
2	Análise dos dados	05/2017	09/2019

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoas naturais ou jurídicas estrangeiras, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exclui o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para as fins previstas na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (serviços on-line - Licença para Importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando de violação de legislação vigente, ou quando de inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou renegada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/biogen">www.mma.gov.br/biogen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS CONDIÇÕES para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Fernanda Louze Pereira	Veterinária Pesquisadora	410.710.805-12	407292501 esp-SP	Brasileira
2	PERNANZA PINO PEREIRA	Pesquisadora	547.115.028-90	30160577 SSP-PR	Brasileira
3	WILLIAN LUIZ DA CUNHA	Biólogo responsável pela coleta de material	003.811.009-03	73681743 SSP-PR	Brasileira
4	Eliza Teles Cidart	Pesquisadora e responsável pelas coletas	003.115.050-07	1066967508 SJS-RS	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	LONDRIANA	PR	Mesoregião noroccidental de Londrina	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 68493678



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 55384-2	Data da Emissão: 21/08/2017 10:21	Data para Revalidação*: 20/09/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: ANDRESSA MARIA RORATO NASCIMENTO DE MATOS	CPF: 386.508.348-42
Título do Projeto: Caracterização epidemiológica e ecológica de animais silvestres atropelados na mesoregião nortocentral paranaense	
Nome da Instituição: Universidade Estadual de Londrina	CNPJ: 79.640.489/0001-53

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Procyonidae, Myrmecophagidae, Agoutidae, Dasypodidae, Boidae, Leporidae, Muridae, Aves, Caeryproctidae, Didelphidae, Cebidae, Tayridae, Hydrochaeridae, Artibeidae, Canidae, Aekidae, Bradypodidae, Callithricidae, Chelonidae, Testidae, Felidae

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele)
2	Amostras biológicas (Carnívoros)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele)
3	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele)
4	Amostras biológicas (Primates)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele)
5	Amostras biológicas (Répteis)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele)
6	Amostras biológicas (Tamarídeos)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele)
7	Amostras biológicas (Têtu)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele)
8	Método de captura/coleta (Aves)	Outros métodos de captura/coleta(Animal morto)
9	Método de captura/coleta (Carnívoros)	Outros métodos de captura/coleta(Animal morto)
10	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Outros métodos de captura/coleta(Animal morto)
11	Método de captura/coleta (Primates)	Outros métodos de captura/coleta(Animal morto)
12	Método de captura/coleta (Répteis)	Outros métodos de captura/coleta(Animal morto)
13	Método de captura/coleta (Tamarídeos)	Outros métodos de captura/coleta(Animal morto)
14	Método de captura/coleta (Têtu)	Outros métodos de captura/coleta(Animal morto)

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Estadual de Londrina	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 68493678



Página 3/3

