



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ELOIZA TELES CALDART

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Leishmania spp.* EM  
ROEDORES SINANTRÓPICOS**

---

Londrina  
2016

ELOIZA TELES CALDART

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Leishmania spp.* EM  
ROEDORES SINANTRÓPICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciência Animal (área de concentração Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Italmir Teodorico Navarro.

Londrina  
2016

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

Caldart, Eloiza.

Epidemiologia Molecular de Leishmania spp. em roedores sinantrópicos / Eloiza Caldart. - Londrina, 2016.  
91 f. : il.

Orientador: Italmar Navarro.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Leishmanioses - Teses. 2. Londrina - Teses. 3. PCR - Teses. 4. Zoonoses - Teses. I. Navarro, Italmar . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

ELOIZA TELES CALDART

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Leishmania spp.* EM  
ROEDORES SINANTRÓPICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciência Animal (área de concentração Sanidade Animal).

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Vanete Thomaz-Soccol  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

---

Profa. Dra. Thaís Gomes Verzignassi da Silveira  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 26 de fevereiro de 2016.

O presente trabalho foi realizado nos Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública e Protozoologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em ciência Animal pelo Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, área de concentração Sanidade Animal, sob orientação do Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgão de fomento abaixo relacionados:

**1. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**

**2. Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná.**

**3. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao que tenho de mais importante na vida: meus pais, Jaqueline e Wilmar; minha irmã, Ana Carolina; meu marido, Marlon; meu filho, Yan; e a Deus.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e pela oportunidade de fazer ciência e trazer à tona um milionésimo de grão de areia de Sua criação.

Agradeço à minha família - Marlon e Yan - pelo amor, apoio e compreensão incondicionais, por serem minha motivação para acordar todos os dias e por compartilharem dos meus sonhos sem necessidade de garantias. Agradeço aos meus pais - Jaqueline e Wilmar - pela educação, pelos sins e pelos não, pelos inúmeros votos de confiança, pelo imenso apoio desde o início desse sonho e por me dar força mesmo a 1000 km de distância. Agradeço a minha irmã – Ana Carolina - por me mostrar sempre o lado mais simples da vida e o quanto eu ainda posso e devo ser melhor. Agradeço aos meus tios, tias, primos, primas pelo apoio físico, psicológico, material, motivacional, amoroso, etc. Vocês não imaginam o quanto contribuíram.

Agradeço ao meu orientador – Itamar Teodorico Navarro - por acreditar em mim até mesmo em momentos que eu não merecia; pelas longas conversas nas quais eu sempre tirava algo de valioso para a vida. Agradeço a profa. Roberta Lemos Freire pelo presente que foi esse projeto (o melhor plano B de todos os tempos), pelo carinho e atenção de sempre. Agradeço à professora Regina Mitsuka Breganós pelas dicas e desabafos. Agradeço ao professor João Luís Garcia pela ajuda com análises moleculares. Agradeço a todos os já citados e também aos demais professores e funcionários do DMVP que em diversos momentos foram compreensivos, amigos e me deram palavras de motivação em momentos difíceis.

Agradeço também às amigas Aline K., Andressa, Daiana e Fernanda S. pelas palavras, risadas, tapinhas nas costas e convites à realidade. Agradeço às “irmãs de orientador” Fernanda F. e Marcelle por dividir comigo os mesmos anseios, pela empatia,

pelos brigadeiros, pelas fofocas, pelas vontades de gritar acalentadas. Agradeço aos inúmeros colegas de laboratório pela paciência, ao Felipe por melhorar o ambiente de trabalho com seu bom-humor e à Beatriz por estar disposta a nos auxiliar e até ser motorista quando precisamos.

Agradeço à banca de qualificação prof. Dr. Ulisses Pádua Pereira e profa. Regina Mitsuka-Breganó pelas correções; à banca de defesa profa. Thaís Gomes Verzignassi da Silveira e Vanete Thomaz-Soccol pela presença e sugestões.

É sempre bom lembrar que é muito bom ter com quem contar! Ninguém constrói nada sozinho!

Obrigada!!!

“A visão de cada um, por mais ética que seja,  
tem um viés relacionado com a sua subjetividade.  
Como não levar em conta essa subjetividade?”

Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa - UFPI

CALDART, Eloiza Teles. **Epidemiologia molecular de *Leishmania* spp. em roedores sinantrópicos.** 2016. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

Ratos pretos (*Rattus rattus*), espécie exótica introduzida nas Américas durante o período de colonização, tem sido suspeitos de servir como reservatório do complexo *Leishmania (Viannia) braziliensis* no Brasil e como potencial fonte de infecção a flebotomíneos peridomésticos. Esse estudo objetivou detectar parasitos do gênero *Leishmania*, determinar a prevalência de anticorpos IgG anti-*Leishmania* spp., identificar as espécies circulantes desse parasito e determinar variáveis epidemiológicas associadas à infecção em ratos capturados na área urbana na cidade de Londrina, estado do Paraná, Brasil. A captura de animais foi realizada de Maio a Dezembro de 2006, as armadilhas foram distribuídas em 35 pontos de armazenagem e/ou reciclagem de resíduos sólidos e ferros-velhos das cinco regiões do município. Os roedores foram anestesiados para a coleta de sangue e soro. Métodos sorológicos (Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) e moleculares (*Polimerase Chain Reaction* - PCR) foram realizados para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e/ou DNA de *Leishmania* spp. O número de amostras analisadas, por cada método, variou de acordo com a disponibilidade de material coletado. DNA foi extraído do sangue total e uma nested-PCR cujo alvo é uma parte central do gene SSU rRNA específica do gênero *Leishmania* foi realizada em triplicata. As amostras positivas na PCR foram sequenciadas pelo método de Sanger para determinar a espécie de *Leishmania*. Um questionário com variáveis relativas ao ambiente, condições sanitárias e características dos roedores foi aplicado e analisado com o *software* estatístico EpiInfo (3.5.4). Cento e oitenta e um roedores foram capturados, todos eles foram identificados como da espécie *R. rattus* (Rr) e nenhum deles apresentava alteração clínica. Quarenta e um de 176 (23,3%) animais foram positivos no ELISA e 6/181 (3,3%) foram positivos na RIFI. Das 127 amostras submetidas à PCR, nove (7,1%) foram positivas para o gênero *Leishmania*; pelo sequenciamento sete foram identificados como *L. (L.) amazonensis*, uma como *L. (L.) infantum* e uma não pode ser sequenciada. Quatro ratos foram positivos em mais de um teste, Rr76 foi positivo nos três métodos, Rr68 foi positivo no ELISA e na PCR; e Rr91 a Rr194 foram positivos no ELISA e na RIFI. Essa população de roedores apresentou mais animais 1 adultos positivos do que jovens no ELISA ( $p=0.02709$ ); e a presença de animais não-ratos nos pontos de coleta foi fator de proteção contra leishmanioses em ratos nesse estudo ( $p=0.03235$ ) quando levados em consideração apenas os resultados da RIFI. Dos nove animais positivos na PCR, cinco pertenciam a mesma região da cidade (Norte), dentre eles três foram capturados no mesmo endereço, um deles foi positivo para *L. (L.) infantum*. Essa foi a região da cidade com a maior expansão geográfica e crescimento populacional à época da coleta, a população estava adentrando um ambiente não-urbano e esse fator pode explicar o porquê aqueles animais estavam apresentando infecção recente caracterizada pela PCR positiva. Essa é a primeira descrição de roedores sinantrópicos naturalmente infectados por *L. (L.) amazonensis* no mundo e por *L. (L.) infantum* no Sul do Brasil. Com relação a *L. (L.) amazonensis*, esse resultado é uma nova evidência da urbanização desse agente etiológico enfatizando a expansão das leishmanioses no Brasil e sua condição de doença ainda negligenciada.

**Palavras-chave:** Leishmanioses. Londrina. PCR. Rato. Zoonoses.

CALDART, Eloiza Teles. **Molecular epidemiology of *Leishmania* spp. in synanthropic rodents.** 2016. 91 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

Black rats (*Rattus rattus*), an exotic species introduced in the Americas during the colonization period, have been suspected to serve as a reservoir of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* complex in Brazil and are potential sources of infection to peri-domestic sandflies. This study aimed to detect *Leishmania* genus parasites, determine the prevalence of anti-*Leishmania* spp. antibodies, to identify circulating species of the parasite and to determine epidemiological variables associated to infection in rats caught in the urban area of Londrina, Paraná, Brazil. The animals capture was carried out from May to December 2006, traps were distributed in 35 points of storage and/or recycling of solid waste and junkyards of the five regions of the municipality. Rats were anesthetized for blood and serum collection. Serological (Immunofluorescence Antibody Test - IFAT and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA) and molecular methods were done to detect anti-*Leishmania* spp. antibodies and/or *Leishmania* spp. DNA, respectively. The number of samples tested, by each method, varied according to the availability of the collected material. DNA was extracted from total blood and a nested-PCR targeted to a conserved central part of the SSU rRNA *Leishmania* genus gene was performed in triplicate. The positive samples were sequenced by Sanger method to determine *Leishmania* species. A questionnaire with variables about environment, sanitation and rats characteristics was applied and analyzed with EpiInfo (3.5.4) statistics software. One hundred eight-one rodents were captured, all of them were identified as *Rattus rattus* (Rr) species and none presented any clinic alteration. Forty one of the 176 (23.3%) animals were positive in ELISA and 6/181 (3.3%) were positive in IFAT. Nine of 127 rats (7.1%) were positive by PCR for *Leishmania* genus; by sequencing seven were identified as *L. (L.) amazonensis*, one as *L. (L.) infantum* and one couldn't be sequenced. Four rats were positive in more than one test; Rr76 were positive in all methods, Rr68 were positive in ELISA and PCR and Rr91 and Rr194 were positive in ELISA and IFAT. This rodent population had more adult animals positive than young animals in ELISA ( $p=0.02709$ ); and the presence of animal species different from rats in collection points was a protection factor 1 to leishmaniosis for rats in this study ( $p=0.03235$ ) when analyzing just IFAT results. From the nine positive animals, five belonged to the same region of the city (North), among them three were captured on the same address, one of them was *L. (L.) infantum* positive. This was the region with the higher geographic expansion and population growth, people were giving way in a new environment and this factor may explain why those animals were with recent infections. This is the first description of synanthropic rodents naturally infected by *L. (L.) amazonensis* in the world and by *L. (L.) infantum* in South Brasil. Regarding *L. (L.) amazonensis*, this finding must be a new evidence of the urbanization of this etiological agent emphasizing the spread of leishmaniosis in Brazil and its neglected disease condition.

**Keywords:** Leishmaniosis. Londrina. PCR. Rat. Zoonosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Classificação do gênero <i>Leishmania</i> em subgêneros, complexos e espécies.....	21
<b>Figura 2:</b> Árvore filogenética das espécies de <i>Leishmania</i> .....	24
<b>Figura 3:</b> <i>Leishmania</i> na forma amastigota dentro do macrófago (células coradas por <i>May Grunwald Giemsa</i> ) .....	26
<b>Figura 4:</b> <i>Leishmania</i> na forma promastigota .....	26
<b>Figura 5:</b> Ciclo de vida <i>Leishmania</i> spp.....	27
<b>Figura 6:</b> Caracterização de dois pontos de coleta.....	52
<b>Figura 7:</b> A – Geografic localization of Londrina city in Paraná State and in Brasil. B - Geografic distribution of the collection sites and of the positive rats by IFAT. C – Geografic distribution of the collection sites and of the positive rats by ELISA. D – Geografic distribution of the collection sites and of the positive rats by PCR. E - Geografic distribution of the collection sites and of the positive rats by IFAT, ELISA and PCR. The size of the balls, triangles and rectangles represent the different amount of positive rat in each collection point.....	54
<b>Figura 8:</b> Part of the nucleotide alignment of the 338/339 bp of SSu RNAr fragment of <i>Leishmania</i> spp. DNA from positive samples of <i>R. rattus</i> (Rr26, Rr50, Rr58, Rr63, Rr68, Rr76, Rr103 and Rr155) compared with <i>L. (L.)</i> <i>amazonensis</i> (M80293), <i>L. (L.) infantum</i> (M81430) and <i>L. (V.) braziliensis</i> (M80292) reference strains. Polymorphisms in positions 10, 35 and 56 diffrenciate <i>L. (L.) infantum</i> from <i>L. (L.) amazonensis</i> and <i>L. (V.)</i> <i>braziliensis</i> . Polymorphism in position 59 diffrenciate <i>L. (L.) amazonensis</i> from <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Prevalence of <i>Leishmania</i> spp. in serum (ELISA and IFAT) and blood (PCR) from <i>Rattus rattus</i> caught in recycling points of solid waste in Londrina city, Paraná State.....	55
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBO	Classificação Brasileira de Ocupações
CDC	Center of Disease Control
CMTU	Copanhia Municipal de Trânsito e Urbanização
CODEL	Companhia de Desenvolvimento de Londrina
COOPERSIL	Cooperativa de Catadores de Materiais Recicláveis e de Resíduos Sólidos da Região Metropolitana de Londrina
COOPRELON	Cooperativa de Catadores de Londrina
DHFR	Dihidrofolato Redutase Timidilato-sintetase
ELISA	Enzime-Linked Immunosorbent Assay
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GP	Glicoproteína
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL	Interleucina
INSS	Instituto Nacional de Seguridade Social
kDNA	Kinetoplastidae DNA
LB	Linfócito B
LFT	Linfócito T
LPG	Lipofosfoglicanos
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumetar Americana
LTD	Leishmaniose Tegumentar Difusa
LV	Leishmaniose Visceral
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
MTE	Ministério do Trabalho e Emprego
ONG	Organização Não-Governamental
ONU	Organização das Nações Unidas
NO	Óxido Nítrico
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PNSB	Pesquisa Nacional de Saneamento Básico
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta

Rr	<i>Rattus rattus</i>
SFM	Sistema Monocítico Fagocitário
SL	<i>Spliced Leader</i>
Th1	<i>T-helper 1</i>
Th2	<i>T- helper 2</i>
VP	Vacúolos Parasitóforo
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
2.1	O GÊNERO <i>Leishmania</i> Ross, 1903 .....	18
2.1.1	Histórico das <i>Leishmanias</i> nas Américas .....	18
2.1.2	Taxonomia .....	19
2.1.3	Génética .....	21
2.1.4	Ciclo Biológico .....	24
2.1.5	Patogenia .....	27
2.1.6	Resposta Imunológica .....	28
2.2	LEISHMANIOSES .....	30
2.2.1	Leishmaniose Visceral .....	31
2.2.1.1	Epidemiologia .....	31
2.2.1.2	Vetores, hospedeiros e reservatórios .....	31
2.2.1.3	Panorama brasileiro .....	32
2.2.1.4	Panorama paranaense .....	32
2.2.2	Leishmaniose Tegumentar .....	33
2.2.2.1	Epidemiologia .....	33
2.2.2.2	Vetores, hospedeiros e reservatórios .....	33
2.2.2.3	Panorama brasileiro .....	34
2.2.2.4	Panorama paranaense .....	35
2.2.3	Epidemiologia molecular .....	35
2.2.4	Particularidades de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> .....	36
2.3	ESPÉCIES ANIMAIS SINANTRÓPICAS E AS LEISHMANIAS .....	36
2.3.1	Roedores .....	37
2.3.1.1	Roedores sinantrópicos comensais .....	37
2.3.1.2	Roedores sinantrópicos não comensais ou silvestres .....	38
2.4	COLETA SELETIVA DE RESÍDUOS SÓLIDOS .....	39
2.5	PERSPECTIVAS .....	40
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES</b> .....	41

<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
4.1	OBJETIVO GERAL .....	42
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
<b>5</b>	<b>LEISHMANIOSIS IN SYNANTHROPIC RODENTS (<i>Rattus rattus</i>): A NEW EVIDENCE OF THE URBANIZATION OF <i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) <i>amazonensis</i></b> .....	43
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	72
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73
	<b>ANEXOS</b> .....	88
	ANEXO A – Questionário Epidemiológico - Roedores Londrina 2006 .....	89

## 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 doenças de caráter zoonótico. O gênero *Leishmania* pertence à Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae, o mesmo é composto por espécies que infectam 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 (Insecta, Díptera, Psychodidae), conhecidos popularmente como mosquito-palha, birigui, asa-dura, cangalhinha, entre outros, dependendo da região. Estes insetos, que se assemelham a mosquitos, medem de 1 a 3 mm de comprimento, habitam primariamente florestas, não se distanciando muito do seu local de procriação (máximo 300m). Possuem atividade crepuscular e noturna, permanecendo, durante o dia em repouso em lugares sombreados e úmidos. 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, as quais são doenças infecciosas 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 representado pelas leishmanioses, combinado com a complexidade da sua epidemiologia, faz necessário esclarecer todos os elos na rede de transmissão da mesma, inclusive o papel de pequenos mamíferos não-humanos, para que se possa desenvolver estratégias efetivas de controle (ROQUE et al., 2014). Por outro lado, a complexidade ambiental representada pelos pontos de reciclagem de resíduos sólidos, investigados nessa dissertação, oferece todas as condições necessárias para (i) a reprodução dos vetores: matéria orgânica abundante; (ii) permanência de hospedeiros e reservatórios: presença de alimento e abrigo; (iii) manutenção da doença no ambiente: populações negligenciadas. Os aspectos supracitados, juntos, justificam e reforçam a necessidade de realização de trabalhos científicos tais quais o que segue.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O GÊNERO *Leishmania* Ross, 1903

#### 2.1.1 Histórico das *Leishmanias* nas Américas

O gênero teria cerca de 120 milhões de anos e seu surgimento teria ocorrido ainda quando os continentes eram formados pela Pangea (MOMEN; CUPOLILLO, 2000). Várias são as hipóteses do local de origem, podendo ser, entre as regiões neotropical, paleoártica ou africana (NOYES, 1998; KERR, 2000; MOMEN; CUPOLILLO, 2000).

Lesões cutâneas semelhantes às causadas pela leishmaniose foram registradas em antigas peças de cerâmica do Peru e Equador (LAINSON, 2010); lesões desfigurantes em lábios e narizes também foram descritas (PIZARRO, 1571) na Cordilheira dos Andes em 1571. Essas mesmas lesões eram bem conhecidas no Velho Mundo e eram denominadas botão do Oriente, cujo agente etiológico foi descoberto em 1903 (WRIGHT, 1903) e denominado *Leishmania tropica* em 1906 (LÜHE, 1906). No Novo Mundo lesões cutâneas só foram associadas a um parasita do gênero *Leishmania* em 1909, quando Lindenberg (1909) e Carini; Paranhos (1909; 1909) demonstraram corpúsculos de Leishman-Donovan em indivíduos acometidos de úlcera de Bauru no Estado de São Paulo, Brasil. Em 1911, Splendore (1911) demonstrou a presença do parasita em lesões mucocutâneas, o qual foi denominado *Leishmania braziliensis* em 1916 (MATTA, 1916). Em 1946, Convit; Lapenta descreveram uma nova forma de apresentação da leishmaniose, a tegumentar difusa (LTD), o seu agente causador na Venezuela foi chamado de *Leishmania pifanoi*; e o brasileiro foi denominado *L. mexicana amazonensis* (LAINSON; SHAW, 1972). Em 1957 foi demonstrada a presença de uma espécie de *Leishmania* no roedor silvestre *Proechimys semispinosus* no Panamá e em roedores silvestres no Estado de São Paulo, Brasil, em 1960 (FORATTINI, 1960). Naquele momento estava ficando claro que diferentes parasitas dermatópicos do gênero *Leishmania* eram responsáveis pela ocorrência de leishmaniose tegumentar em diferentes partes da região neotropical (LAINSON, 2010). Em 1962, Garnham denominou o parasita causador da úlcera dos chicleros da América Central de *Leishmania mexicana*, subsequentemente Lainson; Strangways-Dixon (1962) afirmaram que roedores selvagens eram os seus reservatórios. Um voluntário foi infectado com sucesso por esse parasito e esta foi a primeira associação conclusiva de *Leishmania* que reconhecidamente infectava humanos e tinha um reservatório silvestre. Algumas semanas depois foram observados amastigotas de

*L. braziliensis* de uma lesão na cauda de um espécime de *Oryzomys capito* capturado nas florestas de Belém do Pará, Brasil (LAINSON, 2010).

A leishmaniose visceral americana (LVA) pode ser tão antiga quanto a leishmaniose tegumentar americana (LTA) na América Latina, porém oferece menor quantidade de evidências visuais de sua existência. O primeiro relato de foi provavelmente o de Migone (1913), amastigotas foram visualizados no sangue de paciente com sintomas indicativos de LVA; este homem havia trabalhado na construção da ferrovia São Paulo-Corumbá, onde, acredita-se, teria sido infectado. Em 1934, mais 41 casos foram diagnosticados (LAINSON, 2010). Sabia-se que tanto a *L. donovani* quanto a *L. infantum*, agentes conhecidos do Velho Mundo, facilmente infectavam animais de laboratório. Em 1937 Cunha; Chagas denominaram *Leishmania chagasi* um parasita que não conseguiu causar infecção em espécimes dessa categoria animal. Em 1968 a raposa *Cerdocyon thous* foi incriminada pela primeira vez como um importante reservatório do parasita responsável pelas leishmanioses viscerais canina e humana na Amazônia (LAINSON et al., 1969; LAINSON et al., 1987) sendo esses animais considerados portadores assintomáticos.

### 2.1.2 Taxonomia

A classificação atual das espécies neotropicais de *Leishmania*, adaptada de Laison & Shaw (2005) é a seguinte:

Reino: **Protozoa** Goldfuss, 1818; esse reino inclui organismos com tamanho entre 1 e 50mm, que possuem organelas com função de alimentação, locomoção, osmorregulação e reprodução.

Filo: **Euglenozoa** Cavalier-Smith, 1998; os organismos pertencentes a esse filo são eucariontes dotados de um ou mais flagelos.

Classe: **Kinetoplastea** Honigberg, 1963; essa classe inclui organismos heterotróficos que possuem cinetoplastos, uma organela citoplasmática estrutural e funcionalmente semelhante à mitocôndria, com abundante DNA mitocondrial, o Kinetoplastidae DNA (kDNA).

Ordem: **Trypanosomatida** Kent, 1880; a essa ordem pertencem organismos com um ou dois flagelos, livres ou não, associados ou não à membrana ondulante.

Família: **Trypanosomatidae** Doflein, 1901; a essa família pertencem organismos com um único flagelo e, em sua maioria são parasitas.

Gênero: **Leishmania** Ross, 1903; 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* Ross, 1903; parasitas pertencentes a esse subgênero apresentam o ciclo de vida no inseto hospedeiro limitado aos intestinos médio e anterior.

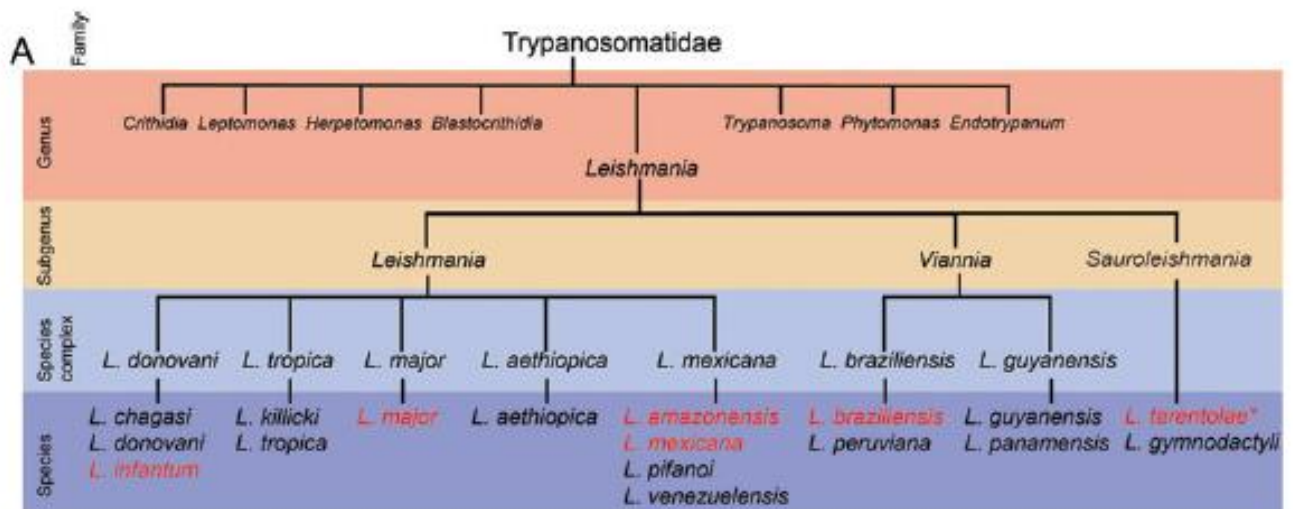
Subgênero: *Viannia* Lainson & Shaw (1987); parasitas pertencentes a esse subgênero apresentam o ciclo de vida no intestino posterior do inseto hospedeiro; porém, ocorre uma migração dos parasitas para os intestinos médio e anterior.

Subgênero: *Sauroleishmania* Ranque, 1973; esse subgênero abriga espécies de *Leishmania* consideradas mais primitivas e que infectam lagartos no Velho Mundo.

Os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* são divididos em 5 e 2 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., 2010). Atualmente há autores que defendem o abandono dessa terminologia (FRAGA, et al, 2010)

A classificação atual das espécies de *Leishmania* é baseada no método de isoenzima também chamado *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE). Dentro do subgênero *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 subgênero *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., 2010). Outras espécies de *Leishmania* já foram reportadas na literatura, mas não necessariamente são consideradas espécies verdadeiras quando analisadas pelo método de MLEE.

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



**Fonte:** Real et al. (2013).

### 2.1.3 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 sintonia (PEACOCK et al., 2007; DOWNING et al., 2011; ROGERS et al., 2011; RAYMOND et al., 2012) o que significa dizer que a ordem dos genes dentro dos cromossomos é conservada nas diferentes espécies. O grau de sintonia 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; IVENS et al., 2005; 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 a patologia (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).

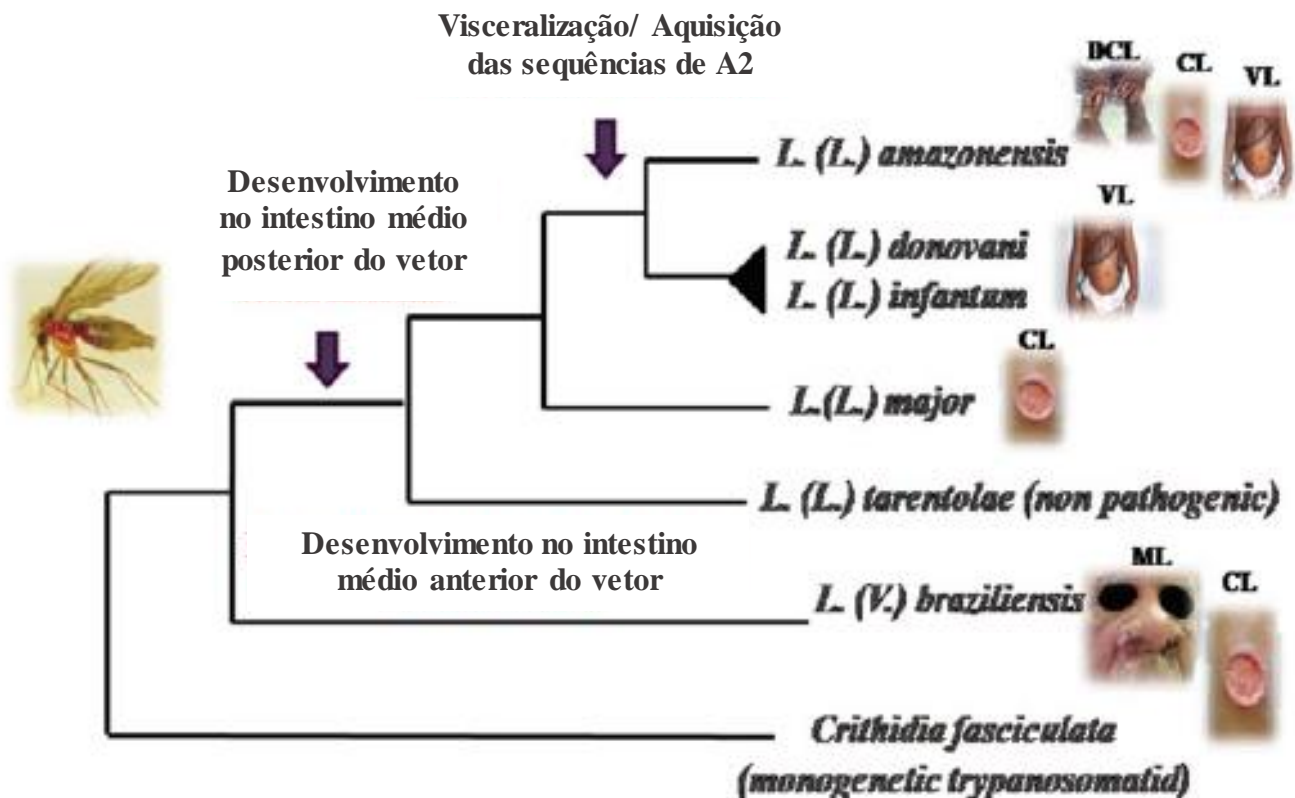
Os genes de *Leishmania* são organizados em unidades transcricionais policistrônicas, ou seja, a transcrição de vários genes é feita em uma única fita de RNAm, essa é uma característica importante no que diz respeito a regulação da expressão gênica que nessas espécies não ocorre em nível de gene, mas de unidade transcricional (ROGERS et al., 2011). Assim como outros tripanosomatídeos, a *Leishmania* tem um mecanismo não usual de controle transcricional (CLAYTON & SHAPIRA 2007), a mesma não é regulada pelos promotores, e sim, pela estabilidade do RNAm, ou seja a regulação da expressão gênica é pós-transcricional (REAL et al., 2013). Os genes codificadores de proteínas são cotranscritos pela RNA polimerase II, a fita precursora de RNAm pode ser muito longa, sofre *trans-splicing* e depois é poliadenilada (LIANG et al., 2003). O *trans-splicing* ocorre quando uma sequência líder idêntica e curta (SL-Spliced Leader), é emendada na porção final 5' de múltiplos RNAm. Nos tripanosomatídeos, todo *splicing* é *trans-splicing*, ou seja, todos os RNAm começam com uma sequência chamada SL e os genes não contém íntrons, esse mecanismo é responsável por separar os longos transcritos em unidades monocistrônicas (RIDDLE et al. 1997).

Outra característica importante da estrutura genômica do gênero *Leishmania* é a existência de matrizes em tandem de genes duplicados (IVENS et al., 2005; 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 2 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 4 espécies; a variação no número de cópias encontrada é considerável, alguns exemplos desses genes são: PSA2, Glicorpoteína 46 (GP46), amastina e Glicorpoteína 63 (GP63).

Os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* são altamente conservados, com pouquíssimos genes parálogos espécie-específicos. No subgênero *Sauroleishmania* genes importantes para o estágio intracelular não são encontrados (RAYMOND et al., 2012). A espécie *L. (V.) braziliensis* possui características genéticas exclusivas ao Novo Mundo (PEACOCK et al., 2007; SMITH et al., 2007).

**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 capazes de visceralizar.



**Fonte:** Fernandes et al. (2014).

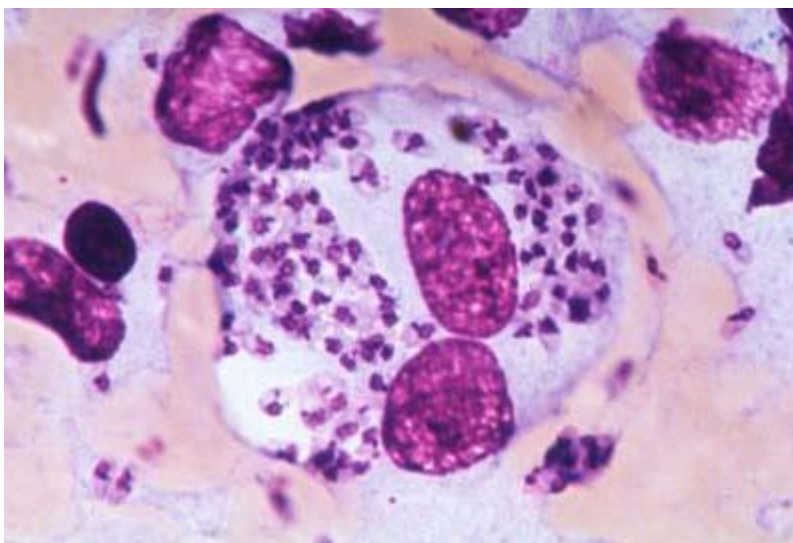
#### 2.1.4 Ciclo Biológico

Na natureza, todas as espécies de *Leishmania* são transmitidas ao hospedeiro vertebrado pela picada de fêmeas hematófagas 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 (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), vivendo 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, D. H.; KILLICK-KENDRICK, R., 1987) A forma amastigota (**Figura 3**), que é suscetível à ação dos neutrófilos - células com grande potencial de produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico - multiplica-se no interior de células de defesa conhecidas como 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 (20-30 $\mu$ m) flageladas (**Figura 4**) por um processo denominado metaciclogênese (GOSSAGE et al., 2003), no qual estas formas deixam de se reproduzir e tornam-se infectantes. A metaciclogênese 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 de evolução 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 5**.

**Figura 3:** *Leishmania* na forma amastigota dentro do macrófago (células coradas por May Grunwald Giemsa).



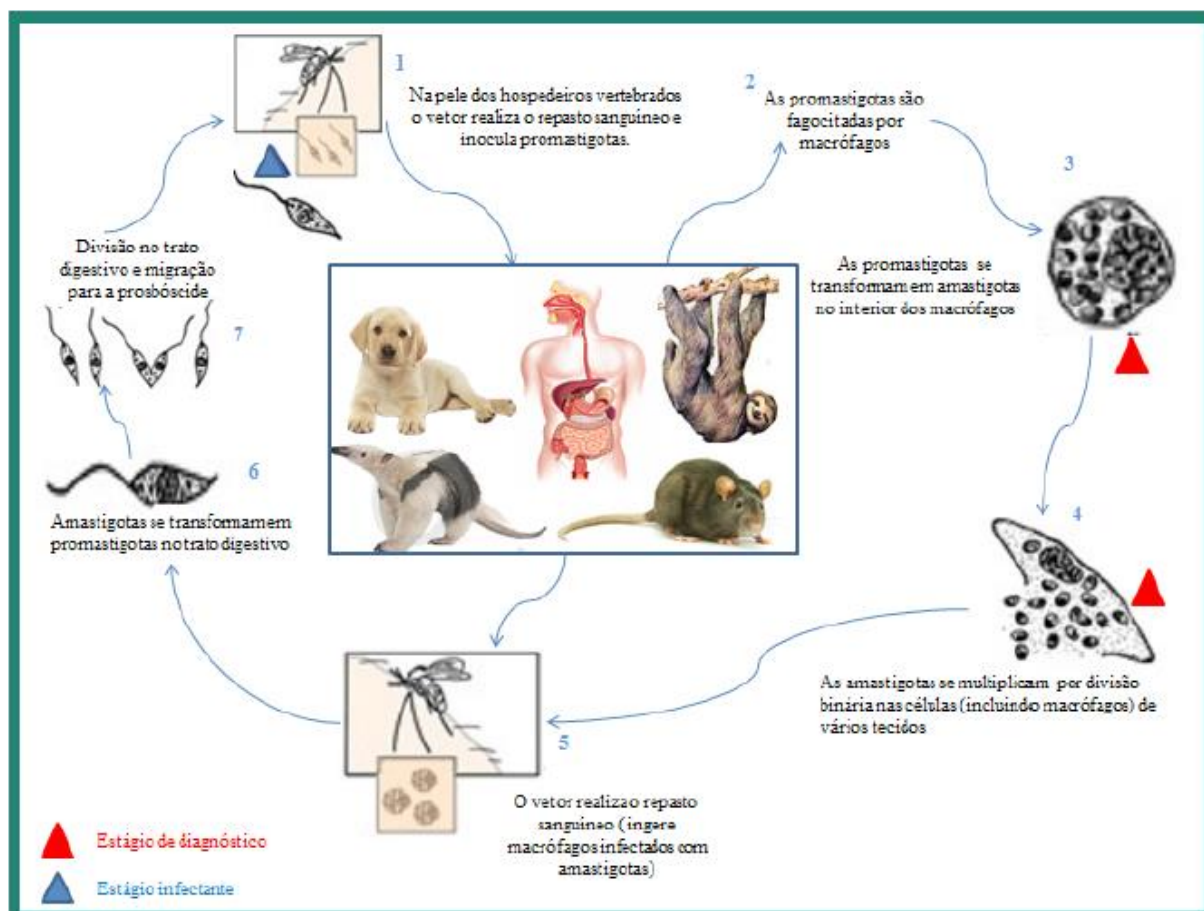
**Fonte:** Pereira (2005).

**Figura 4:** *Leishmania* na forma promastigota.



**Fonte:** Pereira (2005).

**Figura 5:** Ciclo de vida *Leishmania* spp.



**Fonte:** Manual Técnico: Leishmanioses caninas. CRMV-PR, 2015.

### 2.1.5 Patogenia

Durante a inoculação das formas promastigotas na epiderme do hospedeiro, componentes da saliva dos flebotomíneos (neuropeptídios) facilitam a introdução do aparelho bucal, estimulam afluxo sanguíneo, facilitando a hematofagia e inibindo a resposta imunológica do hospedeiro (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987). As mudanças bioquímicas ocorridas durante a metaciclôgenese conferem às promastigotas uma resistência aumentada à lise pelo complemento. Quando são introduzidas na pele encontram algumas células do sistema imune, se aderem à superfície dos macrófagos e células de *Langerhans* passando para o meio intracelular por meio de um processo de fagocitose mediada por receptores Lipofosfolícanos e Glicoproteína 63 (LPG e GP63). Após penetrar nas células, o parasita precisa sobreviver aos mecanismos inatos de defesa do hospedeiro se transformando na forma amastigota, característica do parasitismo nos mamíferos (CUNNINGHAM, 2002). Aqueles que se localizam dentro das células de *Langerhans* são levados aos linfonodos de

drenagem, que ao se infectarem sofrem modificações que possibilitam sua migração. No interior dos linfonodos, as partículas antigênicas do parasito são apresentadas às células do sistema imune. Estas, uma vez estimuladas, se dirigem ao sítio da infecção, auxiliando na formação do processo inflamatório. Nos macrófagos, os parasitos internalizados ficam dentro de um vacúolo parasitóforo (fagolisossoma), que os separa do citoplasma celular (da CRUZ; PIRMEZ, 2005). Embora os macrófagos sejam células fagocitárias especializadas no combate a agentes infecciosos, as *Leishmanias* desenvolveram mecanismos de defesa capazes de subverter sua capacidade microbicida, conseguindo sobreviver neste ambiente potencialmente tóxico e multiplicar-se intensamente até o rompimento da célula, ocorrendo a liberação destas formas para serem novamente fagocitadas num processo contínuo (CAMARGO; BARCINSKI, 2003; BRASIL, 2007).

Infecções por espécies de *Leishmania* pertencentes ao complexo *L (L.) mexicana* envolvem infiltração dérmica por macrófagos que hospedam parasitos em grandes Vacúolos Parasitóforo (VP) enquanto as demais espécies apresentam pequenos VP que abrigam apenas um único parasito (REAL; MORTARA., 2012). Esses VPs grandes podem atrapalhar ainda mais as defesas celulares por haver uma diluição relativa das enzimas hidrolíticas (REAL et al., 2010)

A lesão inicial se manifesta por infiltrado inflamatório composto basicamente por macrófagos e linfócitos da derme. Esta lesão pode regredir espontaneamente após a reação imunológica ou evoluir para um nódulo dérmico no local da inoculação do parasito pelo flebotomíneo denominado histiocitoma no caso de LT (GENARO et al., 1995). No caso de LV, a evolução da infecção – eliminação do parasita ou desenvolvimento de estado assintomático ou sintomático – é resultado da interação entre vetor, parasito e hospedeiro (CONSTANTINO et al., 2013, KOUTINAS & KOUTINAS, 2014).

#### 2.1.6 Resposta Imunológica

As espécies de *Leishmania* causadoras de quadros cutâneos e viscerais requerem resposta imune do Tipo T-helper 1 (Th1), ou seja, perfil de citocinas que estimula a produção de Linfócitos T citotóxicos e macrófagos; para que a infecção em ratos tenha a cura como desfecho clínico (WILSON et al., 2005). A natureza crônica e persistente das leishmanioses favorecem o desenvolvimento de respostas imunes polarizadas. De fato a leishmaniose por *L. (L.) major* em roedores fornece uma demonstração requintada de que as diferentes respostas, Th1 e T-helper 2 (Th2), podem influenciar o curso da doença em polos opostos dependendo

da predisposição genética do hospedeiro murino. Infecção progressiva por *L. (L.) major* em camundongos susceptíveis da linhagem BALB/c é promovida pela expansão da produção de IL (Interleucina) -4, IL-10 e IL-13 por células Th2. Em contraste, a expansão Th1 em camundongos resistentes, iniciada por IL-12 e IFN- $\gamma$ , leva a resolução das lesões por *L. (L.) major* (SCOTT et al., 1988; HEINZEL et al. 1991; SCOTT, 1993).

Roedores tem sido extensivamente usados como modelos biológicos no estudo de *L. (L.) donovani* e em menor grau em *L. (L.) infantum*. Camundongos também são geneticamente susceptíveis ou resistentes à infecção, mas mesmo animais susceptíveis evoluem para cura de suas infecções (BARBOSA JR et al., 1987). Portanto, são melhores modelos de auto-cura e infecção subclínica do que de doença visceral disseminada. A linhagem BALB/c é susceptível a *L. (L.) major*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* (ALMEIDA et al., 1996, WILSON et al., 2005). Almeida et al. (1996) infectaram camundongos da linhagem BALB/c com 5 isolados de *L. (L.) amazonensis* de pacientes humanos da Bahia com diferentes quadros clínicos de leishmaniose: cutâneo, mucoso ou visceral. Foi observado que os camundongos inoculados com isolados de quadros clínicos viscerais apresentaram uma infecção controlada; esses achados demonstram uma inesperada resistência dos camundongos aos isolados em questão. Essa resistência parece ser devida a adaptação desses roedores às cepas de *L. (L.) amazonensis* com fenótipo visceral em humanos, (ALMEIDA et al., 1996) o que pode ter ocorrido ao longo da evolução, visto que, os roedores são considerados os principais reservatórios dessa espécie de *Leishmania*.

Em contraste, hamsters infectados com espécies visceralizantes de *Leishmania* spp. desenvolvem uma doença progressiva na qual os parasitos replicam no fígado, baço e medula óssea eventualmente causando a morte do hospedeiro (GOSH & GOSH, 1987). Essa doença progressiva nos hamsters se assemelha a doença visceral em humanos, no entanto, a maior parte dos hamsters desenvolve uma ascite severa. Estudos histológicos revelaram glomerulonefrite mediada por imunocomplexos e amiloidose disseminada, o que produz uma síndrome nefrótica (SARTORI, et al. 1991). Humanos e cães com LV também apresentam glomerulonefrite mediada por imunocomplexos, mas falência renal e síndrome nefrótica são raras (PEARSON & SOUSA, 1996). O hamster também não é um modelo perfeito para a doença em humanos.

Cães infectados por *L. (L.) infantum* são classificados em susceptíveis ou resistentes. Nos susceptíveis a irrestrita multiplicação dos parasitas leva à lesão e disfunção dos órgãos afetados; nos resistentes, eventualmente, eliminam o parasito e permanecem clinicamente normais. No entanto, alguns cães sintomáticos se curam clinicamente e até

parasitologicamente, esses são cães, supostamente, resistentes que eventualmente ficaram doentes por comprometimento de sua resposta imune celular momentaneamente (SARIDOMICHELAKIS, 2009). O papel mais importante contra o parasito é desempenhado pela resposta imune específica. A influência imposta pelo equilíbrio entre a resposta celular Th1 e Th2 é crucial para a evolução e desfecho da leishmaniose canina, onde uma resposta mista parece prevalecer em ambos, cães assintomáticos e doentes (BANETH et al., 2008; PANARO et al., 2009). A imunidade protetora em cães é mediada pela ação dos TNF- $\alpha$ , IL-2 e IFN- $\gamma$  secretados por Linfócitos T (LFT) ativados para regular a atividade anti-leishmania de macrófagos por meio da produção de Óxido Nítrico (NO) que é responsável pela morte do parasito por apoptose (PINELLI et al., 1994). Os macrófagos infectados são lisados por LFT citotóxicos CD8+, os quais podem estar suprimido em cães sintomáticos com alto grau de parasitismo (de LUNA et al., 1999). O oposto pode ser visto na doença assintomática, com baixo grau de parasitismo, na qual LFT CD8+ prevalecem (REIS et al., 2006). O período de incubação geralmente prolongado, que pode estender-se de 3 meses a 7 anos após a picada de flebotômíneo infectado, pode explicar a transição inconsistente e variável de um estado resistente a um estado suscetível (BANETH & SOLANO-GALLEGO, 2012). Entre outros fatores, susceptibilidade a LV em cães pode ser influenciada pela genética (KOUTINAS & KOUTINAS, 2014).

Em cães doentes por leishmaniose, a depleção dos LFT nos órgãos linfóides é falsamente compensada por uma exuberante proliferação e atividade de Linfócito B (LB) que pode explicar a linfadenomegalia generalizada, a esplenomagalia e a hiperglobulinemia policlonal (BANETH et al., 2008; BANETH & SOLANO-GALLEGO, 2012). Esses anticorpos formam imunocomplexos que são depositados em diversos tecidos e órgãos, resultando em glomerulonefrite, vasculite, uveíte, miosite e poliartrite (KOUTINAS et al., 1999; SARIDOMICHELAKIS, 2009). A supracitada mudança na resposta imune humoral e celular pode explicar por que a doença sintomática pode variar de leve papulodermatite a nefropatia severa, levando a falência renal e caquexia (COSTA et al., 2003).

## 2.2 LEISHMANIOSES

As leishmanioses não são caracterizadas apenas pelo seu considerável pleomorfismo clínico, mas também por marcadas variações epidemiológicas devido à diversidade de espécies de *Leishmania* seus vetores e reservatórios (SCHÖNIAN et al., 2011).

## 2.2.1 Leishmaniose Visceral

### 2.2.1.1 Epidemiologia

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% deless ocorrem em apenas 6 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, 2004). Os dados de mortalidade são escassos e geralmente representam apenas mortes ocorridas em hospitais. A taxa de mortalidade 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).

### 2.2.1.2 Vetores, hospedeiros e reservatórios

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.) infantm* 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).

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).

### 2.2.1.3 Panorama Brasileiro

Na década de 90, aproximadamente noventa por cento (90%) dos casos notificados de LV ocorreram na Região Nordeste. A 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). Dentre os estados do Sul do Brasil, Santa Catarina, até o momento, tem apenas casos caninos notificados (CRMV-PR, 2015); Rio Grande Sul e Paraná já notificaram casos autóctones em cães e humanos.

A doença é mais frequente em crianças menores de 10 anos (54,4%), provavelmente devido a imaturidade da resposta imunológica celular. O sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (60%).

### 2.2.1.4 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. Até o momento, o flebotomíneo vetor foi encontrado apenas em Foz do Iguaçu e Santa Teresinha de Itaipu (comunicação verbal de Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanete Thomaz-Soccol), os quais são municípios vizinhos; no entanto, casos caninos alóctones são diagnosticados, frequentemente, em municípios como Curitiba e Londrina (THOMAZ-SOCCOL et al., 2009) demonstrando o intenso risco ao qual o estado está submetido, bastando a expansão geográfica do vetor.

## 2.2.2 Leishmaniose Tegumentar

### 2.2.2.1 Epidemiologia

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, 2007). 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 3 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). São potencialmente ameaças de vida ou de desfiguração clínica (AZULAY & AZULAY JUNIOR, 1995).

### 2.2.2.2 Vetores, hospedeiros e reservatórios

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

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 et al., 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 et al., 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 et al., 2014).

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. A forma cutânea é a mais relatada em felinos, que podem apresentar também, uveíte, linfadenopatia, local ou generalizadas, emése, diarreia, desidratação, estomatite e anorexia. Apesar da existência de alguns estudos sobre a soroprevalência da infecção em felinos residentes em áreas endêmicas, não está claro se as baixas prevalências da infecção e da doença em gatos são devidas às falhas na detecção de anticorpos ou ao fato dos gatos apresentarem resistência natural à leishmaniose.

### 2.2.2.3 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 sexo masculino, 74% dos casos (BRASIL, 2014).

#### 2.2.2.4 Panorama paranaense

No estado do Paraná ocorrem 98% dos casos humanos de LTA da região Sul do Brasil (PONTELLO JR et al.,2013) e nele são registrados casos caninos autóctones em três regiões: Vale do Ribeira, Central e Norte (CASTRO et al., 2007). Os vetores *Ny. whitmani*, *Ny. neivai*, *My. migonei*, *Pi. pessoai*, comumente relacionados a *L. (V.) braziliensis*, foram reportados no Norte do Paraná por Membrive et al. (2004), Oliveira et al. (2000) e da Silva et al. (2008).

#### 2.2.3 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 8 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 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).

Com o avanço do uso de técnicas moleculares observamos cada vez mais a sobreposição de quadros clínicos, ou seja, espécies de *Leishmania* comumente envolvidas em LT estão causando LV e vice-versa (BARRAL et al. 1991; SACKS et al., 2005; HOFFMANN et al., 2012) o que nos leva a estudar mais profundamente o que realmente define os diferentes quadros clínicos (GARIN et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007; ZHANG et al., 2014) .

#### 2.2.4 Particularidades de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Em estudos recentes no Brasil, a espécie *L. (L.) amazonensis* tem sido encontrada como agente etiológico em 8% dos casos de LTA (CAMARA-COELHO et al., 2011). O espectro de manifestações clínicas causadas por essa espécie de *Leishmania* em humanos e cães é muito grande, variando de cutânea difusa, cutânea, mucocutânea a casos com comprometimento visceral (OLIVEIRA et al., 2007). Barral et al. (1991) relataram 11 humanos com LV causada por *L. (L.) amazonensis* na Bahia; em cães, casos como esse também foram reportados por Tolezano et al. (2007) na cidade de Araçatuba/SP, por Hoffmann et al. (2012) na cidade de Londrina/PR e por Dias et al. (2011) na cidade de Paracatu/MG. Essa particularidade da *L. (L.) amazonensis* levou Oliveira et al. (2007) a investigarem a variabilidade genética de isolados da região nordeste do Brasil de pacientes humanos com diferentes manifestações clínicas, mas não foram encontradas diferenças significativas. Diversos trabalhos tem investigado a fauna de flebotomíneos no estado do Paraná (GOMES et al., 1977; CONSOLIM et al., 1990; TEODORO et al. 1993 e 1999; OLIVEIRA et al., 2000; DIAS-SVERSUTTI et al., 2007; da SILVA et al., 2008; CERINO et al., 2009; dos REIS et al., 2011; CRUZ et al., 2012; dos SANTOS et al., 2012; MEMBRIVE et al., 2012; CRUZ et al., 2013; de MELO et al., 2013) no entanto, os vetores comprovados de *L. (L.) amazonensis*, *Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutelata*, *Lu. (N.) olmeca olmeca* e *Lu. (N.) reducta*, (BRASIL, 2007) ainda não foram relatados no estado do Paraná. São considerados pouco antropofílicos e, talvez, essa seja a explicação para um menor número de casos de leishmaniose pela espécie *L. (L.) amazonensis* quando comparado ao número de casos por *L. (V.) braziliensis*. Marlow et al. (2013) relataram casos de LTA no estado de Santa Catarina por *L. (L.) amazonensis* sem que haja relato dos vetores nesse estado, isso pode significar que há outros flebotomíneos atuando como vetores dessa espécie de *Leishmania* ou que os levantamentos de flebotomíneos nessas regiões estejam desatualizados ou incompletos.

#### 2.3 ESPÉCIES ANIMAIS SINANTRÓPICAS E AS LEISHMANIAS

Algumas espécies animais são consideradas sinantrópicas por associarem-se ao homem em virtude de terem seus ambientes prejudicados pela ação do próprio homem (FUNASA, 2002). Na categoria de animais sinantrópicos se enquadram: baratas, carrapatos, morcegos, moscas, mosquitos, pombos, pulgas, roedores e outros (FUNASA, 2007). Dentre essas, temos algumas envolvidas no ciclo epidemiológico das leishmanioses; os roedores podem atuar tanto como hospedeiros/reservatórios; com relação aos morcegos, são

considerados hospedeiros e potenciais reservatórios (ROQUE et al., 2014).

### 2.3.1 Roedores

Os roedores pertencem à ordem *Rodentia*, cuja principal característica é a presença de dentes incisivos proeminentes que crescem continuamente. Existem cerca de 2.000 espécies de roedores no mundo, representando ao redor de 40% de todas as espécies de mamíferos existentes. Os roedores vivem em qualquer ambiente terrestre que lhes dê condições de sobrevivência (FUNASA, 2002) e são o taxon mais estudado em termos de leishmanioses (ROQUE et al., 2014). Apresentam extraordinária variedade de adaptações ecológicas, suportando os climas mais frios e os mais tórridos, nas regiões de maior revestimento florístico e nas mais estéreis; suportam grandes altitudes e em cada região mostram um grande número de adaptações fisiológicas (WILSON & REEDER 2005).

No Manual de Controle de Roedores do Ministério da Saúde (FUNASA, 2002) as diversas espécies de roedores estão didaticamente separadas em roedores sinantrópicos comensais, isto é, aqueles que dependem unicamente do ambiente do homem e sinantrópicos não comensais ou silvestres, ainda não inteiramente dependentes do ambiente antrópico. No meio urbano e rural predominam as espécies sinantrópicas comensais e algumas espécies silvestres que podem, ocasionalmente, invadir as habitações humanas.

#### 2.3.1.1 Roedores sinantrópicos comensais

As principais espécies sinantrópicas comensais pertencem à subordem Sciurognathi, família Muridae, subfamília Murinae. São elas: a ratazana (*Rattus norvegicus*), o rato de telhado (*Rattus rattus*) e o camundongo (*Mus musculus*). Têm distribuição cosmopolita e são responsáveis pela maior parte dos prejuízos econômicos e sanitários causados ao homem.

Em recente revisão bibliográfica cujo tema foram os hospedeiros e reservatórios de *Leishmania* sp nas Américas, Roque et al. (2014) apresentaram a espécie *Rattus rattus* como hospedeiro de *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana* e *L. (L.) infantum*, e como potencial reservatório de *L. (Viannia) braziliensis*. Já a espécie *Mus musculus* foi apresentada apenas como hospedeiro de *L. (V.) braziliensis*. Lara-Silva et al. (2014) publicaram o primeiro relato de *Rattus norvegicus* infectado por *L. (L.) infantum* nas Américas e Marcelino et al. (2011) relataram a infecção do mesmo por *L. (V.) braziliensis*; no entanto, nada se sabe do potencial

dessa espécie de roedor como reservatório.

Um estudo aprofundado para a definição do *status* dessas espécies animais com relação às leishmanioses - seja como reservatórios ou simples hospedeiros - é imprescindível, haja vista sua intensa proximidade com o homem.

#### 2.3.1.2 Roedores sinantrópicos não comensais ou silvestres

Caracterizam-se por formarem colônias no ambiente silvestre longe do contato com o homem, contudo em função das modificações ambientais decorrentes dos processos de urbanização e de transformação de ecossistemas naturais em áreas de plantio; algumas espécies, hoje, apresentam populações com elevado grau de sinantropia. Nestas situações é grande o risco de transferência de agentes infecciosos dessas espécies para os roedores estritamente comensais. Estas espécies mantêm e fazem circular os agentes infecciosos, por longos períodos de tempo (BRASIL, 2002).

Diversos gêneros de roedores sinantrópicos não comensais estão envolvidos no ciclo epidemiológico das *Leishmanias*. Segundo revisão realizada por Roque et al. (2014), diversas espécies do gênero *Proechimys* tem sido identificadas como potenciais reservatórios de *L. (L.) amazonensis* no Brasil e na Guiana Francesa. O gênero *Thrichomys* possui pelo menos 5 espécies importantes, são elas: *T. apereoides*, que foi encontrada infectada com *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*; *T. laurentius* com *L. (L.) infantum*, *L. naiffi*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) shawi*; *T. inermis* com *L. (V.) shawi*; e *T. pachyurus* com *L. naiffi*. A *L. (L.) infantum* foi encontrada em *Clyomys laticeps*, *Dasyprocta azarae*, *Nectomys squamipes*, *Holochilus sciureus* and *Rhipidomys mastacalis* do Brasil. Com relação a *L. (V.) braziliensis*, foram encontradas naturalmente infectadas as seguintes espécies: *Akodon arviculoides*, *Nectomys squamipes*, *Necromys (=Bolomys) lasiurus*, *Oryzomys nigripes* e *Sigmodon hispidus*.

Roedores são considerados os principais reservatórios das *Leishmanias* do complexo mexicana (*L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis*). A persistência da infecção por *L. (L.) mexicana* em roedores silvestres foi comprovada duas vezes, uma nos Estados Unidos da América e outra no México (VAN WYNSBERGHE et al., 2000; RAYMOND et al., 2003). *L. (L.) amazonensis* foi descrita nos seguintes gêneros de roedores: *Akodon*, *Dasyprocta*, *Oligoryzomys*, *Oryzomys*, *Proechimys*, *Thrichomys* e *Sciurus*.

## 2.4 COLETA SELETIVA DE RESÍDUOS SÓLIDOS

O aumento populacional das últimas décadas aliado à migração dos centros rurais para os urbanos e o acelerado processo de automação industrial reduziu o número de empregos disponíveis, acarretando uma maior população de desempregados (MONTEIRO, 1995). O lixo/resíduo é responsável por um dos mais graves problemas ambientais de nosso tempo. Seu volume vem aumentando, intensa e progressivamente, principalmente nos grandes centros urbanos, sendo seu impacto ambiental sentido sob o aspecto da poluição do solo, da água e do ar (BAZO et al., 2011). O Programa Organização das nações Unidas (ONU) para o meio ambiente divulgou um relatório que chama atenção para o fato de o Planeta Terra já ter excedido em 40% a capacidade de restauração da biosfera e esse déficit aumenta 2,5% ao ano. Além disso, esse relatório enfatiza que se o mundo consumisse na mesma proporção dos norte-americanos, dos alemães e dos franceses, o homem precisaria de três planetas para poder sobreviver (NOVAES, 2002). O que significa que preservar o meio ambiente e adotar políticas de desenvolvimento sustentável passam a ser uma necessidade universal na preservação da espécie humana na Terra (BAZO et al., 2011). De acordo com a Constituição Federal Brasileira, o gerenciamento do manejo de resíduos sólidos é de competência do poder público local/municipal. Segundo o Atlas de Saneamento Básico (IBGE, 2011) que divulga os resultados da Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB) 2008: 5448 municípios brasileiros fazem coleta de seus resíduos sólidos e 114 não fazem; um volume total de 183.488 toneladas ao dia é coletado, o que significa que houve um acréscimo de 58.207 toneladas desde o ano 2000 em todo o País.

Se de um lado a questão da coleta de resíduos sólidos está relativamente bem equacionada, por outro, a destinação final dos mesmos se apresenta como um grande desafio às gestões municipais. De acordo com a PNSB 2008, 50,8% dos municípios brasileiros ainda recorre a vazadouros a céu aberto, conhecidos como lixões, como destino principal de seus resíduos (IBGE, 2011). O Atlas ressalta ainda que, associada à questão do manejo dos resíduos sólidos está a reciclagem de resíduos. Ela é uma das alternativas para fazer frente ao crescente volume de lixo produzido pela sociedade e contribui para a preservação do meio ambiente. No Brasil, embora presente em grande número de municípios, a reciclagem é, em sua maior parte, resultado da atividade de catadores (autônomos ou organizados em cooperativas), e não consequência de um comprometimento mais profundo e generalizado da população e das autoridades com o processo de separação e coleta seletiva do lixo. Alguns dados da PNSB 2008 (IBGE, 2011) revelaram o aumento no número de programas de coleta seletiva de 451 em 2000 para 994 em 2008. Em 2008, existiam cerca de 30 mil catadores

associados a 1175 cooperativas e associações em todo o país, totalizando 674 municípios.

Em Londrina a coleta seletiva teve início em novembro de 1996 e atendia apenas 5% da população. Em abril de 2001 foi iniciado o “Projeto Londrina 1000 ONGs” com a proposta de reunir os catadores em associações. O número de pessoas envolvidas nas associações aumentou expressivamente de 55 membros para 321 em janeiro de 2005. Também houve um grande aumento na quantidade de material reciclável, passando de quatro toneladas por dia em 2001 para cerca de 60 toneladas por dia em 2003. Em 2004, esse número já chegava a 80 toneladas por dia, segundo a Coordenação da Coleta Seletiva, representando, na época, mais de 50% de todo o material reciclável produzido no município (SOUZA, 2005).

Atualmente o município de Londrina conta com O Programa Londrina Recicla que foi instituído pelo Decreto Municipal nº 829/2009. O serviço de coleta de resíduos recicláveis é realizado por cooperativas de catadores, que coletam os resíduos recicláveis separados pela população no sistema porta a porta, que são encaminhados aos barracões de triagem, onde são triados e comercializados, retornando à cadeia produtiva. As cooperativas são contratadas pela Prefeitura e passaram a coletar em mais 95.224 domicílios a partir de dezembro de 2011 com a Cooperativa de Catadores de Londrina (COOPRELON), ampliando a abrangência para 77% dos domicílios (CMTU, 2015).

A problemática das doenças e acidentes ocupacionais envolvendo pessoas que trabalham com coleta de resíduos sólidos é real e é relatada em diversos trabalhos publicados (VELLOSO et al., 1997; FERREIRA; ANJOS, 2001; MEDEIROS & MACÊDO, 2006; SANTOS & da SILVA, 2009; BAZO et al., 2011; FERRAZ et al., 2012, FERREIRA et al., 2013). Ressaltamos, contudo, que além dos riscos mais discutidos inerentes à profissão de catador (cortes, perfurações e questões ergonômicas); as condições a que são expostos predispõe à proliferação de vetores e reservatórios de inúmeras doenças infecciosas.

## 2.5 PERSPECTIVAS

Os grandes desafios que enfrentamos na atualidade com relação às leishmanioses são: frear a expansão territorial e a urbanização das mesmas. Para tanto, a identificação de fatores ambientais locais que tem favorecido e/ou poderão favorecer essa disseminação é indispensável. A ampliação e melhora das condições logísticas da reciclagem no Brasil é uma necessidade real e imediata para evitar o aumento do número de criatórios de roedores, os quais são reservatórios de inúmeros agentes, inclusive os causadores das leishmanioses.

### 3 HIPÓTESES

Locais de reciclagem de resíduos sólidos e ferros-velhos são locais de fácil proliferação e sobrevivência de roedores sinantrópicos.

Roedores sinantrópicos podem atuar como reservatórios de parasitos do gênero *Leishmania* na cidade de Londrina, Paraná, Brasil.

Diferentes espécies de *Leishmania* sp. acometem roedores sinantrópicos na cidade de Londrina, Paraná, Brasil.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de parasitos do gênero *Leishmania* em roedores sinantrópicos comensais capturados em área urbana, identificar as espécies do parasito detectado e avaliar aspectos epidemiológicos da infecção pelos mesmos.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a prevalência de anticorpos IgG anti-*Leishmania* spp. no soro de roedores sinantrópicos capturados em área urbana.

Detectar parasitos do gênero *Leishmania* por PCR no sangue total de roedores sinantrópicos capturados em área urbana.

Determinar as espécies de *Leishmania* circulantes em roedores sinantrópicos capturados em área urbana.

Identificar as variáveis associadas ao risco de leishmanioses em roedores sinantrópicos capturados em área urbana.

## 5 ARTIGO

---

Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico **Parasites & Vectors**.

***Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): a new evidence of the urbanization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Eloiza Teles Caldart<sup>1</sup>

Email: eloiza.vet@gmail.com

Fernanda Pinto Ferreira<sup>1</sup>

Email: nandaferreiravet@gmail.com

Marcelle Mareze<sup>1</sup>

Email: marcelle\_mareze@hotmail.com

Bruno Bergamo Ruffolo<sup>1</sup>

Email: brunorufflo@ig.com.br

Mônica Raquel Sbehgen<sup>2</sup>

Email: biomedica\_monica@yahoo.com.br

Regina Mitsuka-Breganó<sup>1</sup>

Email: rbregano@uel.br

João Luis Garcia<sup>1</sup>

Email: jlgarcia@uel.br

Roberta Lemos Freire<sup>1\*</sup>

Email: rlfreire@uel.br

Italmar Teodorico Navarro<sup>1</sup>

Email: italmar@uel.br

<sup>1</sup> Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil. Address: Rodovia Celso Garcia Cid/PR 445 km 380. CEP 86057-970. Londrina, Paraná, Brasil. \* Corresponding author

<sup>2</sup> Laboratório de Imunologia Animal, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil. Address: Rodovia Celso Garcia Cid/PR 445 km 380. CEP 86057-970. Londrina, Paraná, Brasil.

## **Abstract**

### **Background**

Black rats (*Rattus rattus*), an exotic species introduced in the Americas during the colonization period, have been suspected to serve as a reservoir of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in Brazil and are potential sources of infection to peri-domestic sandflies. This study aimed to detect *Leishmania* genus parasites, determine the prevalence of anti-*Leishmania* spp antibodies, to identify circulating species of the parasite and to determine epidemiological variables associated to infection in rats caught in urban area of Londrina, Paraná, Brazil.

### **Methods**

The animal capture was carried out from May to December 2006, traps were distributed in 35 points of storage and/or recycling of solid waste and junkyards of the five regions of the municipality. Serological and molecular methods were performed, immunofluorescence antibody test (IFAT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR), for the detection of antibodies anti-*Leishmania* spp. and the DNA of *Leishmania* spp. The number of samples tested, by each method, varied according to the availability of the collected material. DNA was extracted from total blood and a nested-PCR targeted to a conserved central part of the SSU rRNA of *Leishmania* genus was performed in triplicate. The positive samples were sequenced by Sanger method to determine *Leishmania* species. A questionnaire with variables about environment, sanitation and rats characteristics was applied and analyzed with EpiInfo (3.5.4) software.

## Results

One hundred eight-one rodents were captured, all of them were identified as *Rattus rattus* (Rr) species and none presented clinic alteration. Forty one of the 176 (23.3%) animals were positive in ELISA and 6/181 (3.3%) were positive in IFAT. Nine of 127 tested animals (7.1%) were positive by PCR for *Leishmania* genus; by sequencing seven were identified as *L. (L.) amazonensis*, one as *L. (L.) infantum* and one couldn't be sequenced. Four rats were positive in more than one test; Rr76 were positive in all methods, Rr68 were positive in ELISA and PCR and Rr91 and Rr194 were positive in ELISA and IFAT. This rodent population had more adult animals positive than young animals in ELISA ( $p=0.027$ ); and the presence of animal species different from rats in collection points was a protection factor to leishmaniosis in rats in this study ( $p=0.032$ ) when considering just IFAT results. From the nine positive animals, five belonged to the same region of the city (North), among them three were captured on the same address, one of them was the *L. (L.) infantum* positive rat. This was the region with the higher geographic expansion and population growth in the year of collection, people were giving way in a new environment and this factor may explain why those animals were with recent infections.

## Conclusions

This is the first description of synanthropic rodents naturally infected by *L. (L.) amazonensis* in the world and by *L. (L.) infantum* in South Brasil. Regarding *L. (L.) amazonensis*, this finding must be a new evidence of the urbanization of this etiological agent emphasizing the spread of leishmaniosis in Brazil and its neglected disease condition.

**Keywords:** Leishmaniosis. Londrina. PCR. Zoonosis. *Leishmania infantum*.

## BACKGROUND

The *Leishmania* parasite is a member of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), wich is composed by species that infects multiple mammalian species [1,2]. There are about 30 *Leishmania* species reported; from these, 21 cause infection in man, which is an accidental host [3,4,5]. In the nature all species of this genus are transmitted to the vertebrate host by the bite of hematophagous females of several species of phlebotomine sand flies (Insecta, Diptera) [6]. These trypanosomatids are characterized by high genetic

heterogeneity and biological eclecticism, as evidenced in varied orders of mammals that they are able to infect. As a result, these protozoan species have complex transmission cycles with region-specific epidemiological characteristics [7,8]. Infections by the aforementioned parasites can lead to diseases with a wide spectrum of clinical forms; these are collectively known as leishmaniosis, which are zoonosis and neglected infectious diseases [9,10].

About 58,000 cases of visceral leishmaniosis (VL) are reported worldwide each year. Six countries together account for more than 90% of global estimated VL incidence: India, Bangladesh, Sudan, South Sudan, Ethiopia and Brazil [9]. Between 2005 and 2011, the mean incidence rate of VL in Brazil was approximately 2.0 cases per 100,000 inhabitants, and the mortality rate was 6.7% [11]. VL is caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* (synonym of *L. (L.) chagasi*) in Brasil, and its vectors are *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi*, the second in a limited focus [12]. In the 90's, approximately ninety percent (90%) of Brazilian VL reported cases occurred in the Northeast region. But this situation is changing, as the disease reaches urban and periurban areas of all regions of the country [12]. Paraná State was considered harmless to VL until July 15, 2015 when the first autochthonous human case was reported [13]. VL vector is found in Foz do Iguacu city since 2012 [14]. The isolation of the agent in symptomatic dogs in the same city occurs since 2014 [15].

Regarding cutaneous leishmaniosis (CL), 220,000 cases are reported worldwide each year. Ten countries together account for 70 to 75% of global estimated CL incidence and Brazil is also included in this list [9]. The American cutaneous leishmaniosis (ACL) in Brazil represents a serious public health problem; it has been diagnosed in all States since 2003 [3]. In Southern region, 3% of ACL human cases in Brazil occurs [11] and in Paraná State, 98% of ACL human cases from Southern region of Brazil occurs [16]. Autochthonous cases in dogs have been reported in the Vale do Ribeira, Central, and Northern regions of the State [17]. The primary reservoirs of ACL disease are small mammals, particularly wild rodents [2, 18, 19]. ACL still maintains a rural disease profile, but its occurrence can also be observed in urban areas; especially when it has remaining forest or vegetation corridors associated to the local hydrography, with primary and secondary riparian forests [20-22]. However, a relatively recent study discusses that inequities may determine risk in Costa Rica; where socially excluded populations are most affected by the disease [23].

*Rattus rattus* also known as roof rat is the predominant rodent in mostly rural area of Brazil, but is common also in urban centers. They have habit of living in high surfaces, down to the ground in search of food and water. They live in groups, whose size depends on existing resources in the environment [24, 25]. The black rat is an exotic species introduced in the Americas during the colonization period and have been suspected to serve as a reservoir of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in Brazil [2] and are potential sources of infection to peri domestic sandflies [19]. Leishmaniosis are dynamic diseases: environmental impact and anthropogenic actions to the environment, with social and economic changes, have allowed the vector to adapt to the peridomestic environment and spread the disease. The production of huge quantities of waste; the reduction of areas available for disposal of these materials; the man entry into the wild due to the urbanization process are examples of human actions that occur in many cities in Brazil and other countries; creating environments conducive to the spread of leishmaniosis because of the increased range and density of vectors and reservoirs.

The magnitude of the health problem represented by leishmaniosis combined with the complexity of its epidemiology make necessary to clarify all of the links in its transmission net to develop effective control strategies [2]. On the other hand, the environmental complexity represented by points of recycling of solid waste, investigated in this work, offers all the necessary conditions for (i) the reproduction of the vectors: abundant organic matter; (ii) stay hosts and reservoirs: the presence of food and shelter; (iii) maintenance of the disease in the environment: neglected populations. The above elements together, justify and reinforce the need to carry out scientific work such this. This study aimed to investigate the infection by *Leishmania* spp., identify circulating species of the parasite and to determine epidemiological variables associated to infection in rats caught in the urban area of Londrina, Paraná, Brazil.

## **Methods**

### **Place of study**

The city of Londrina (23°18'36"S/51°09'46"W) is located in the North-Central mesoregion of Paraná State, in Southern region of Brazil. It lies 610m above sea level and has a subtropical climate, with year-round rainfall concentrated mostly during the summer months. It has an average annual temperature above 21°C and an estimated human population of 543,003 [26].

## Sampling

The points for collection of data and animals were the recycling centers of solid waste and junkyards from the five regions of the city, taking as its starting point the surroundings of Basic Health Units (BHU). The sample size calculation was done using the EpiInfo 3.5.3 [27], for an infinite population, a prevalence of 50% was estimated, precision of 7.5% and significance level of 5%, resulting in 171 samples.

## Animal trapping and sample collection

The rats were captured between the months May and December, 2006, using cage mouse traps where the trigger is activated by bait placed in its interior. Traps were assembled in the end of the afternoon in areas where there were traces of rodents, such as: feces, fat stains, trails, or areas of great offer of food; and checked in the following morning. Rats were captured, identified by Prof. DSc Roberta Lemos Freire, submitted to anesthesia for the collection of blood and serum from the brachial plexus and after submitted to euthanasia. Half of the material had been kept at room temperature until the clot retraction to obtain the serum and the other half, whole blood, had been frozen at -20° until use.

## ELISA

Serum samples were analyzed, in duplicate, by ELISA to determine the prevalence of anti-*Leishmania* spp. IgG antibodies as recommended by Ministério da Saúde (MS) for screening in canine population. Antigen preparation and the ELISA technique were done according to Szargiki [28] with minor modifications. In each well of ELISA plates (Microlon 600, Greiner), 100µL of *L. (L.) amazonensis* (MCAN/BR/2011/cãoLV01) total promastigote lysate (2.5µg/mL), previously diluted in sodium carbonate–bicarbonate buffer (0.05 M, pH 9.6), were added. After overnight incubation at 4 °C, plates were washed 3 times with saline 0.9% containing 0.05% Tween-20 and were blocked for one hour at 37 °C using 200µL of 2% casein in phosphate buffered saline containing 0.05% Tween-20 (PBS-Tween20). After another wash, 100µL of sera diluted (1:50) in PBS-Tween20 was added to each well and incubated for 1 hour at 37 °C. After a new wash, 100µL of anti-Rat IgG labeled with peroxidase (Sigma Aldrich - A9037) was added to each well and incubated for 1 hour at 37

°C. The enzyme reaction was carried out with 100µL of o-Phenylenediamine dihydrochloride (Sigma Aldrich - P8287) solution according to manufacturer's instructions. Reaction was interrupted adding 50µL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M and the optical density (OD) read at 450nm using an ELISA reader (iMark, Bio-Rad). Six negative and four positive controls were included in each plate in duplicate, values were expressed by serum OD mean. The mean and standard deviation (SD) were calculated. The mean OD value from negative controls plus 3 SD was considered as the cut-off point. The negative control was obtained from a young laboratory black rat and the positive controls were assigned by Prof. DSc. Mario Augusto Ono research group.

## **IFAT**

Serum samples were analyzed by IFAT (Immunofluorescence Antibody Test) [29] to determine the prevalence of anti-*Leishmania* spp. IgG antibodies as recommended by Ministério da Saúde (MS) for confirmation in canine population. IFAT slides were prepared using *Leishmania Leishmania amazonensis* (MCAN/BR/2011/cãoLV01) promastigotes [29]. The concentration of the conjugates anti-Rat IgG FITC (Sigma Aldrich - F6258) were standardized for the slides. Positive and negative controls were included in all slides tested; the negative control was obtained from a young laboratory black rat and the positive control was assigned by Prof. DSc. Mario Augusto Ono research group. In positive serum samples, parasites displayed a bright-green peripheral stain and the considered cutoff point was the titer 20 [30,31]. Positive samples were serially diluted two-fold to obtain the bigger reagent titer.

## **DNA extraction**

The DNA extraction was performed from whole blood of synanthropic rodents using the commercial kit QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen™), according to the manufacturer's recommendations. Negative controls for the DNA extraction process were used in all assays every ten samples and were tested with the samples to verify possible contamination of samples during the DNA extraction procedure. The extracted DNA was eluted in 50µL of elution buffer in a sterile 1.5mL tube, identified for use in the PCR reactions and stored at -20°C. The DNA extraction yield was determined by reading the absorbance at 260 nm in a Picodrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) spectrophotometer and the

A260/A280 absorbance ratio was assessed to verify the purity of the obtained DNA.

### **Molecular detection**

*Leishmania* spp. nested-PCR targeted to the small subunit of ribosomal ribonucleic acid (SSU rRNA) gene

To detect *Leishmania* parasites, we utilized a nested-PCR (nPCR) assay targeting a small subunit of ribosomal RNA (SSU RNAr) gene fragment, which is within a region that is highly conserved among *Leishmania* species. The first amplification step was performed with 2 $\mu$ L of DNA solution added to 23 $\mu$ L of PCR mix containing 0.2mM deoxynucleoside triphosphates (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM KCl, 75mM Tris-HCl pH 9.0, 1 U Platinum®Taq DNA Polymerase (Life Technologies) and 20 pmol of the specific primers (R221 and R332) [32] for the order Kinetoplastida but not exclusively for *Leishmania* genus. The amplifications conditions were denaturation at 94°C for 5min, followed by 30 cycles of 30 seg at 94°C, 60°C, and 72°C, and a final extension at 72°C for 5min. The resulting amplification product of 603bp was used (2 $\mu$ L) as template in a second reaction in the presence of *Leishmania* genus specific primers (R223 and R333) [32]. The reaction conditions were the same as before except for an increased annealing temperature of 65°C. The final reaction will result in a 353bp fragment that was visualized after electrophoresis on 1.5% agarose gel (Invitrogen) and stained with SyBr safe DNA stain (Invitrogen). Every set of reactions included a PCR-negative (ultrapure water), a nPCR-negative (ultrapure water) and a positive (*L. (L.) infantum* MHOM/BR/75/M2903DNA or *L. (L.) amazonensis* MCAN/BR/2011/cãoLV01) controls. All samples were tested in triplicate to improve sensibility, since we were using total blood as sample.

### **Parasite species characterization**

The SSU rRNA PCR products were purified using QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN), and quantified using Picodrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). The direct Sanger sequencing was performed by using the BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) with the forward and reverse corresponding primers, in the 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, USA), according to the manufacturer's instructions. The obtained sequences were examined with the

PHRED software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>) for quality analysis of chromatogram readings. The sequences were accepted if base quality was equal to or higher than 20. Consensus sequences were determined by CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/cgi-bin/phph/cap3.pl>) and the sequence identity was verified with all sequences deposited in the GenBank using the BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

To distinguish *L. (L.) amazonensis* from *L. (L.) Mexicana*, polymorphism-specific primers (a1 TGCGAGGATAAAGGGAAAGAA and a2 GTGCCCTGACTTGCATGTCTA) targeted to p53 gene were used according to Mimori *et al.* [35]. These primers detect *L. (L.) amazonensis* and do not detect *L. (L.) mexicana* because of a difference between these two species in 3' extremity of the primer a1, which block polymerization by Taq DNA polymerase. In case of *L. (L.) amazonensis* the PCR will result in a 62bp fragment.

## Research tools

In order to obtain epidemiological data, an epidemiological questionnaire was used, containing data concerning characteristics from the environment, sanity, species, age and gender; the association of these factors was later made with the obtained results.

## Statistical analysis

Data tabulation was performed using EpiInfo 3.5.3 (CDC, Atlanta). Differences between proportions and statistical significance were evaluated by chi-square ( $\chi^2$ ) or Fisher's exact tests with a 5.0% significance level.

## Ethical considerations

This study was approved by the Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) of the Universidade Estadual de Londrina (nº 28/2006).

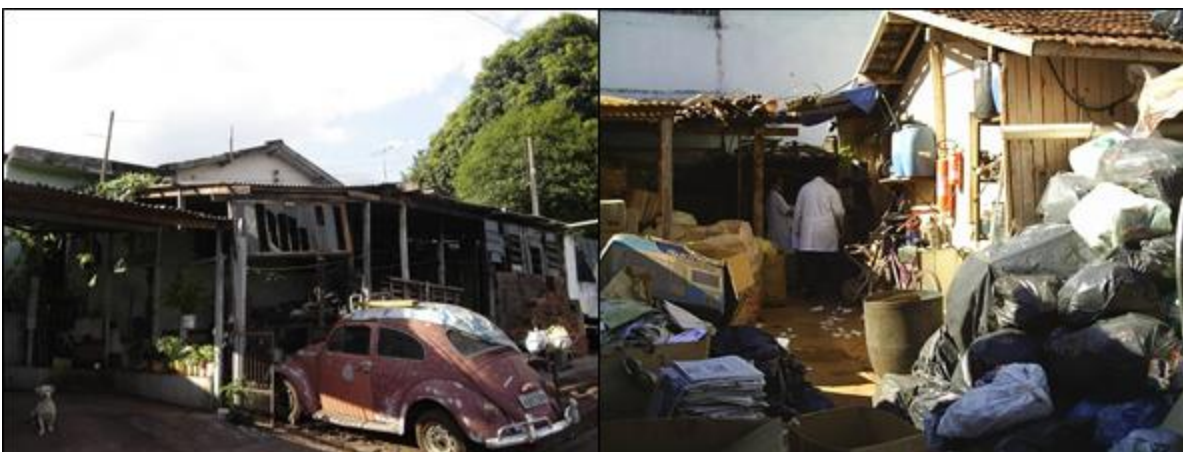
## Results

One hundred eight-one rodents were captured, all of them were identified as *Rattus rattus*

species; 104/181 (57.5%) were female and 77/181 (42.5%) were male; 150/181 (82.9%) were adults and 31/181 (17.1%) were young. The animals were apparently healthy and showed no visible ectoparasites on visual inspection. The traps were placed 550 times and got up 181 catches (32.9%). The best bait was raw corn with 95.0% of efficiency. Other food were used like raw bacon, orange, cheese and peanut butter, but didn't show good results.

These animals were captured in 35/35 collection sites (100%), distributed in regions North (7), South (6), East (6), West (7) and Central (9) of Londrina city. The region with the highest number of captured rats was Central with 62/181 catches (34.3%), followed by South with 42/181 catches (23.2%). Of the 35 collection points, 26 stored waste of paper, cardboard, plastic and aluminum, 18 were primarily engaged in the scrap metal trade and 15 had residences (Figure 1). Owners or workers of all sites visited reported the presence of rats at night, followed by presence of dried faeces (32 places), fresh faeces (22 places) and rats reports during the day (10 places). Among the collection points, 16/35 (45.7%) performed rat extermination, 11/35 (31.4%) had food available to rodents, 7/35 (20.0%) had trash badly or unpacked, 32/35 (91.4 %) allow free access for other animal species like dogs, cats and chicken. On any establishment we found the use of personal protective equipment (PPE) by workers. Dogs lived at 29/35 capture sites (82.8%), cats at 2/35 (5.7%) and chickens at 2/35 (5.7%).

**Figure 1:** Characterization of two collection sites



**Source:** Authors

Regarding serological diagnose, 41/176 (23.3%) animals were positive in ELISA, but only 2 samples showed expressive OD (Rr52 and Rr105), the others were very close to the cutoff

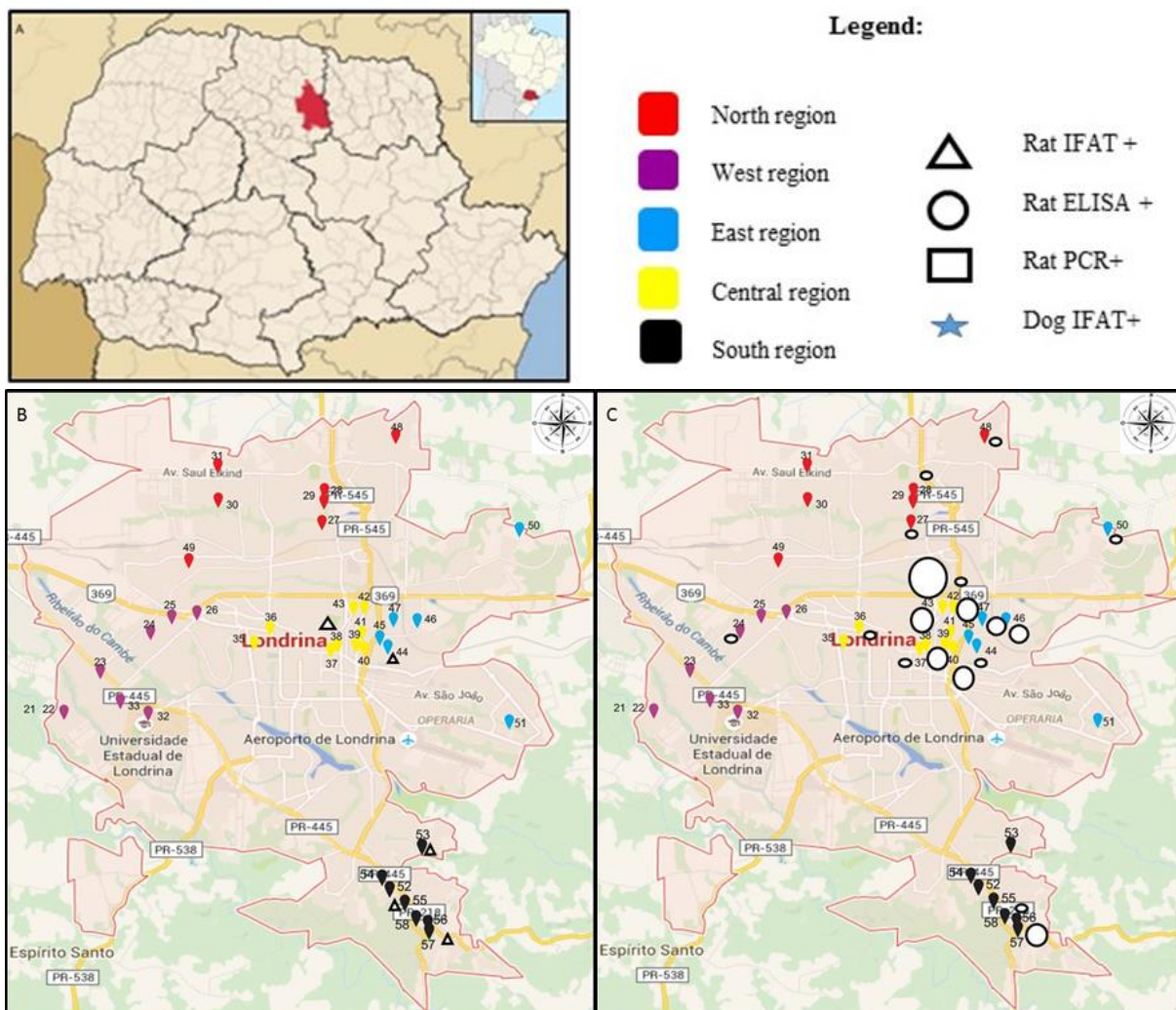
point, while positive. The geographic distribution (Figure 2) of the positive animals in ELISA was 21 at Central region, 9 at East region, 7 at South region, 3 at North region and 1 at West region; 8/21 (38.1%) from Central region were captured on the same address. Of the 41 positives, 28 (68.3%) were female, 39 (95.1%) were adults. Data analysis revealed association between positivity in rats by ELISA and their age ( $p=0.027$ ), so this population had more adult animals positive than young animals in ELISA (Table 1).

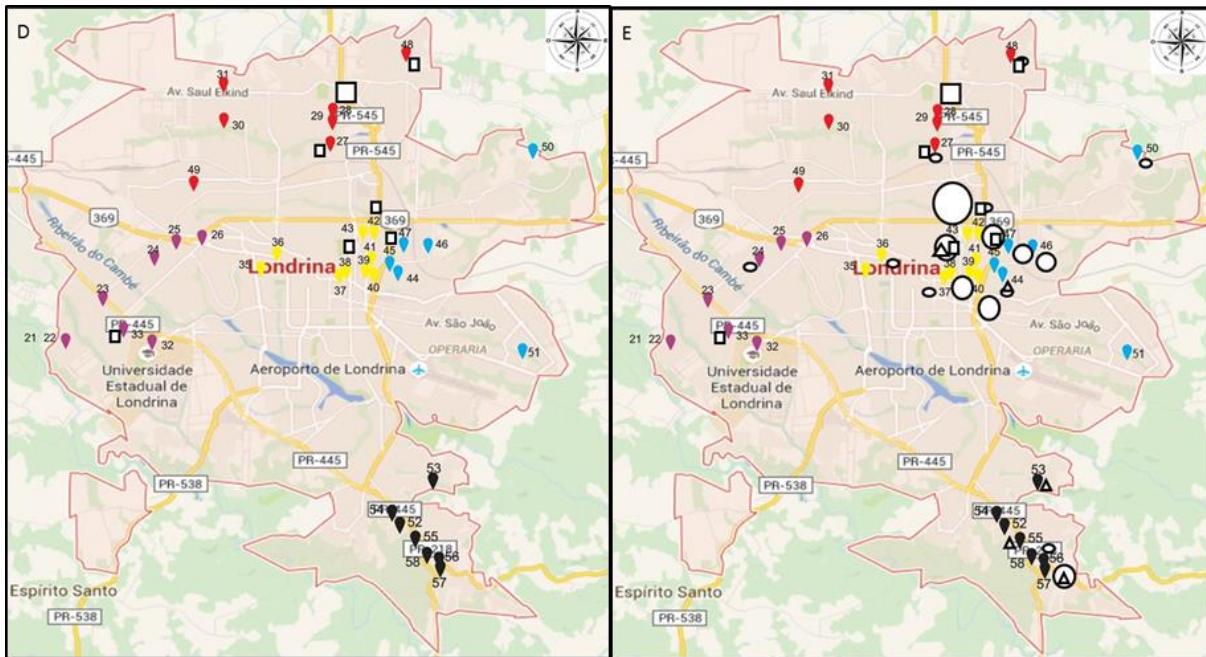
In IFAT 6/181 (3.3%) rats were positive; 2 had titer equal to 20 (Rr91 and Rr141), 3 had titer equal to 40 (Rr76, Rr165 and Rr182) and one had titer equal to 80 (Rr194). The geographic distribution (Figure 2) of the positive animals in IFAT was 2 at Central region, 1 at East region, 3 at South region. Two from Central region were captured on the same address. All of them were female and adult. Data analysis revealed association between IFAT positivity in rats and the free access of other animal species in the places of rodents collection ( $p=0.032$ ), which means that there were more positive rats in places where not rat animals were not allowed to enter.

From 127 rats analyzed by molecular methods, nine (7.1%) were positive in PCR targeted to SSU rRNA gene which is specific to *Leishmania* genus (Rr26, Rr50, Rr57, Rr58, Rr63, Rr68, Rr76, Rr103 and Rr155). The geographic distribution (Figure 2) of PCR positive animals was 2 at Central region, 1 at East region, 5 at North region and 1 at West region. Three from five of the North region were captured on the same address. Of the nine positive, six (66.7%) were female and 6 (66.7%) were adults. PCR data analysis revealed no association of leishmaniosis in rats and variables researched (Table 1).

Considering all diagnose methods used in this work we had 51 positive animals distributed as: 42.3% (11/26) at East, 35.4% (22/62) at Central, 30.4% (7/23) at North, 21.4% (9/42) at South and 7.1% (2/28) at West regions of the city. Four rats were positive in more than one test; Rr76 were positive in all methods, Rr68 were positive in ELISA and PCR and Rr91 and Rr194 were positive in ELISA and IFAT. In this population female were more positive than male when considering three diagnose methods ( $p=0.038$ ) (Table 1).

**Figure 2** A – Geografic localization of Londrina city in Paraná State and in Brasil. B - Geografic distribution of the collection sites and of the positive rats by IFAT. C - Geografic distribution of the collection sites and of the positive rats by ELISA. D - Geografic distribution of the collection sites and of the positive rats by PCR. E - Geografic distribution of the collection sites and of the positive rats by IFAT, ELISA and PCR. The size of the balls, triangles and rectangles represent the different amount of positive rat in each collection point.





**Table 1** Prevalence of *Leishmania* spp. in serum (ELISA and IFAT) and blood (PCR) from *Rattus rattus* caught in recycling points of solid waste in Londrina city, Paraná State, 2006

Sex	ELISA +/n (%)		IFAT +/n (%)		PCR +/n (%)		Total +/n (%)
	Adult	Young	Adult	Young	Adult	Young	
Male	12/59 (20.3%)	1/16 (6.2%)	0/61 (0%)	0/16 (0%)	3/40 (7.5%)	0/13 (0%)	15*/77 (19.4%)
Female	27/86 (31.4%)	1/15 (6.6%)	6/89 (6.7%)	0/15 (0%)	3/62 (4.8%)	3/12 (25%)	36*/104 (34.6%)
<b>Total +/n (%)</b>	<b>39<sup>a</sup>/145 (26.9%)</b>	<b>2/31 (6.4%)</b>	<b>6/150 (4%)</b>	<b>0/31 (0%)</b>	<b>6/102 (5.8%)</b>	<b>3/25 (12%)</b>	<b>51*/181 (28.1%)</b>

<sup>a</sup> This population had more adult animals positive than young animals in ELISA. <sup>b</sup> In this population, female were more positive than male when considering all diagnose methods used. \* The number in Total column is not the sum of other columns because we had positive animals in more than one method.

A 353bp fragment from SSU rRNA PCR, from the nine positive animals were purified and sequenced by Sanger twice; seven samples were identified as *L. (L.) amazonensis* or *L. (L.) mexicana* (Rr26, Rr50, Rr63, Rr68, Rr76, Rr103 and Rr155), one as *L. (L.) infantum* (Rr58) (Figure 3) and one could not be sequenced (Rr57). *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) mexicana* are identical when analyzing just this fragment of SSU rRNA gene. We have confirmed *L. (L.) amazonensis* species in all seven samples performing a1/a2 polymorphism-specific PCR (PS-PCR) (Figure 4).

**Figure 3** Part of the nucleotide alignment of the 338/339 bp of SSu RNAr fragment of *Leishmania* spp. DNA from positive samples of *R. rattus* (Rr26, Rr50, Rr58, Rr63, Rr68, Rr76, Rr103 and Rr155) compared with *L. (L.) amazonensis* (M80293), *L. (L.) infantum* (M81430) and *L. (V.) braziliensis* (M80292) reference strains. Polymorphisms in positions 10, 35 and 56 differentiate *L. (L.) infantum* from *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis*. Polymorphism in position 59 differentiates *L. (L.) amazonensis* from *L. (V.) braziliensis*.

		10	20	30	40	50	60	
<i>L. braziliensis</i>	1	CATCGCAACT	TCGGTTCGGT	GTGTGGCGCC	TTTGGAGGGG	TTTAGTGCGT	CCGGTGCAG	60
<i>L. amazonensis</i>	1	CATCGCAACT	TCGGTTCGGT	GTGTGGCGCC	TTTGGAGGGG	TTTAGTGCGT	CCGGTGCAG	60
Rr 26	1	CATCGCAACT	TCGGTTCGGT	GTGTGGCGCC	TTTGGAGGGG	TTTAGTGCGT	CCGGTGCAG	60
Rr 50	1	CATCGCAACT	TCGGTTCGGT	GTGTGGCGCC	TTTGGAGGGG	TTTAGTGCGT	CCGGTGCAG	60
Rr 63	1	CATCGCAACT	TCGGTTCGGT	GTGTGGCGCC	TTTGGAGGGG	TTTAGTGCGT	CCGGTGCAG	60
Rr 68	1	CATCGCAACT	TCGGTTCGGT	GTGTGGCGCC	TTTGGAGGGG	TTTAGTGCGT	CCGGTGCAG	60
Rr 76	1	CATCGCAACT	TCGGTTCGGT	GTGTGGCGCC	TTTGGAGGGG	TTTAGTGCGT	CCGGTGCAG	60
Rr 103	1	CATCGCAACT	TCGGTTCGGT	GTGTGGCGCC	TTTGGAGGGG	TTTAGTGCGT	CCGGTGCAG	60
Rr 155	1	CATCGCAACT	TCGGTTCGGT	GTGTGGCGCC	TTTGGAGGGG	TTTAGTGCGT	CCGGTGCAG	60
<i>L. infantum</i>	1	CATCGCAAC	TCGGTTCGGT	GTGTGGCGCC	TTTGGAGGGG	TTTAGTGCGT	CCGGTGCAG	59
Rr 58	1	CATCGCAAC	TCGGTTCGGT	GTGTGGCGCC	TTTGGAGGGG	TTTAGTGCGT	CCGGTGCAG	59

## Discussion

The success of rodents capture in solid waste recycling sites indicates the existence of shelter, food and water, essential components for installation and proliferation of rodents. The catch rates were higher than in other studies conducted in South America and Brazil [36-39]. The successful capture is due to local high infestation and to the attractiveness of the bait used, the raw corn. Rats are highly selective, so in places where there is plenty of food the bait to catch them should be attractive, especially when talking about *R. rattus*. It is known that *R. rattus* prefers cereals and fruits and is very selective about the bait rodenticides found in the market, it is difficult to realize integrated management for combating this species [25]. Remember that the dispersion of the species *R. rattus* is 50m [25], indeed worrisome since in 15 of the 35 sites selected for this study we found residences; some of them with children and elderly, who are more susceptible to infectious and parasitic diseases than adult people.

Any animal caught in this study presented alteration in clinical exam, what was also reported in previous studies [40-43]. The lack of correlation between clinical symptoms and infection or infectivity to sand flies was reported previously for visceral or cutaneous leishmaniosis in experimentally infected rodents [44-46]. What reinforces the fact that *R. rattus* species must be a good *Leishmania* spp. reservoir: besides living in colonies, they are asymptomatic for leishmaniosis and have a sufficient longevity to maintain the infectious agent for the required period on the environment [7].

Regarding serological methods we had 41/176 (23.3%) animals positive in ELISA and 6/181 (3.3%) in IFAT. The literature is scarce in serological diagnosis of leishmaniosis in rats; we just found two studies using ELISA [65, 66], two using IFAT [30, 31] and two using an immunochromatografic method [42, 67]. Our prevalence in ELISA was higher (0% in Brazil and 4.1% in Sudan) and in IFAT was lower than works cited (27.2% in Tunísia and 51.3% in Brasil), respectively.

Cássia-Pirez *et al.* [31] affirm that infection rate demonstrated by the IFAT (51.3%) in their work points out that the natural *Leishmania* infection is much higher than that observed in the molecular diagnosis (4.6%). On the other hand, Lima *et al.* [42] serological testing revealed an overall positivity of 5.0% while PCR 28.6% and all seropositive animals were PCR negative. The lack of concordance between diagnosis methods is scarcely discussed and investigated; what is clear is that serological survey showed results of animals previous exposed to *Leishmania* parasites, and, therefore, are expected to be infected; but parasites have non-uniform distribution in tissues and blood of vertebrate hosts, and may be present in other fragments of the spleen as well as in different tissues as skin and/or liver. Furthermore, animals positive for the molecular diagnosis, but negative for serology may have been caught in an initial phase of infection when there was not yet production of detectable IgG in serological tests. Another factor, although less known in wild hosts, may be an inability (permanent or temporary) of some individuals to produce detectable antibodies for serological assays [31]. In another way, it is crucial to take into account that the presence of other trypanosomatids has previously been proved to lead to cross-reactions [68] reason why these methods are less used.

Regarding PCR prevalence, we had nine positive of 127 animals (7.1%) wich is a low prevalence comparing with other studies realized in Brasil [19, 36, 41- 43, 47, 49, 50], South America [51, 52], Iran [40, 53, 54], Saudi Arabia [55], Italy [56], Spain [57] and Portugal [58]. This low prevalence may be explained by total blood used as sample, the most part of the studies used both, blood and some tissue (liver, spleen, skin, bone marrow). In some cases the positivity rate of blood samples were higher than tissues [41, 43] except when compared with bone marrow. Neitzke-Abreu *et al.* [59] tested the accuracy of some PCR techniques for CL diagnosis in humans and concluded that use of blood (buffy coat) may be indicated in patients with no lesion. We have used total blood because it was the only available material.

Our prevalence was higher than other Brazilian [31, 60] and foreign works [51, 61-64]. We just found one study that analyzed rodents from waste sites [63], it was from Croatia, the authors detected 1/173 (0.5%) rodent positive for *L. (L.) infantum* and the animal was *R. rattus*. They identified five species of phlebotomine sand fly at those waste sites, none positive for *Leishmania*; these data show that places of storage or discard of waste are environments where *Leishmania* reservoirs and vectors can live together and may complete the transmission cycle.

In the present work, five from nine positive animals in PCR were from the North region of Londrina city, three of them from the same address (collection point 28) and four from the same neighborhood. In collection point 48 (North region) we also had a positive dog (data not published) for leishmaniosis in IFAT and a positive rat in PCR. This was the region with the higher geographic expansion with a large number of illegal occupation areas [69] in 2006, the year of the collection of the samples, this factor may explain why those animals were with recent infections. People were giving way in a new environment, modifying it and entering in contact with new ethiological agents. The overall positivity, including serological methods, was concentrated in regions East (42.3%) and Central (35.4%); although these collection points were in different regions, they were very close. In collection point 38 (Central region) we had two rats positives just in ELISA, one positive in IFAT and ELISA, one positive in ELISA, IFAT and PCR, and had another dog positive in IFAT (data not published); this is also a gist that the disease had points of concentration in Londrina city.

The rodent population studied by this work presented statistically more adult animals positive than young in ELISA (Table 1), these findings are likely explained by increased exposure to infected vectors throughout their lives. In this population, female were more positive than male when considering three diagnose methods. Data analysis revealed statistical association between IFAT positivity in rats and places where other animal species were not allowed to enter, for example: dogs, cats and chickens. In other words, the presence of animal species different from rats was a protection factor to leishmaniosis for rats in this study (OR= 0.01273 to 0.8341), which may mean that rats are less exposed when female phlebotomine sand flies have other sources of food. A study with *Nyssomyia neivai*, species broadly found in Paraná State [71-76], realized in Ribeira Valley São Paulo State, examined 988 engorged females and no rat blood was detected in the phlebotomines [77]. According to Dias-Sversutti et al. [73]

*Ny. neivai* and *Ny. whitmani* are opportunist and, probably, the females adjust their feeding habits to the availability of hosts.

An interesting information is that *R. rattus* are found in the domicile [19,49], in the peridomicile [19,47], in waste areas [63], in rural areas [19,47,49,52] and in wild [56] areas. In other words, this rat species may be the link between sylvatic and peri-domestic transmission cycles of leishmaniosis [19,44], being the source of infection for peri-domestic sand flies; specially in cases of less anthropophilic vectors as *Lutzomyia flaviscutellata*.

Despite the difficulties, species-specific diagnosis is crucial to a better understanding of the complex network of transmission of *Leishmania* species. *R. rattus* species was already found naturally infected with *L. (L.) infantum*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) mexicana* and *L. (V.) braziliensis* in several places around the world: Brasil [19,41, 42,45,49,48], Venezuela [51,80], Iran [53], Iraq [81], Saudi Arabia [55], Italy [56,82- 84], Spain [57], Croatia [63] and India [67]. As in this work, other authors found in the same place rats with more than one *Leishmania* species [47,51], what is very interesting from the epidemiological point of view, because those rats may be reservoir from both species of *Leishmania*. This also may have important implications in the context of the control of leishmaniosis in urban areas, especially when considering that these rodents live in close relationship with human dwellings, especially those in more precarious conditions [47].

We found one *R. rattus* naturally infected with *L. (L.) infantum*; however North Paraná doesn't have any autochthonous case of visceral leishmaniosis in dogs or humans by this agent or any report of the vector. We have three hypothesis to that, from the most likely to the least likely: (i) railway lines pass by Londrina North region carrying grains, which may have brought infected rats from São Paulo State; (ii) Londrina already has the vector and need new phlebotomine studies to prove; (iii) Londrina has a new vector transmitting *L. (L.) infantum*. In Paraná State, *Lu. longipalpis* was just found by dos Santos *et al.* [14] in Foz do Iguaçu, (500km far from Londrina). According to D'Andrea *et al.* [115], canine leishmaniosis is spreading fast from the western counties of São Paulo State (Presidente Prudente, 167km far from Londrina) toward the border of Paraná State, and this is the most likely path to be followed by etiological agent and by the vector of visceral leishmaniosis to get in Londrina city.

This work is the first description of synanthropic rodents naturally infected by *L. (L.) amazonensis* in the world. This result corroborates to an autochthonous case report of canine visceral leishmaniosis in Londrina published by our research group in 2012 [85] and to an autochthonous case report of human cutaneous leishmaniosis in Maringá (80km far from Londrina) published in 1990 [114]. Until the present work, this *Leishmania* species was just found in wild rodents [86-91]. Clear expansion of leishmaniosis by *L. (L.) amazonensis* around the country has been observed in the last decades; according to Câmara-Coelho *et al.* [92] 8% of American cutaneous leishmaniosis cases in Brasil are caused by the above species. Several recent scientific studies show this expansion; in terms of hosts de Souza *et al.* [93] and Cardoso *et al.*[36] reported *Felis catus domesticus* (gato doméstico) and *Necromys lasiurus* (wild rodent) infection; in terms of geographic distribution Marlow *et al.* [94] and Carvalho *et al.* [95] reported its detection in Santa Catarina and Rio de Janeiro States, Brasil; regarding clinical manifestations Barral *et al.* [96] and Oliveira *et al.* [97] reported *L. (L.) amazonensis* causing visceral leishmaniosis in humans in Bahia and Maranhão, and Tolezano *et al.* [98], Dias *et al.* [99] and Hoffmann *et al.* [85] reported *L. (L.) amazonensis* causing visceral leishmaniosis in dogs in São Paulo, Minas Gerais and Paraná States.

Finally regarding vectors Barrios *et al.* [100], Rêgo *et al.* [101] and Martinez *et al.* [102] detected *Lutzomyia ovalesi* in Venezuela, *Martinsmyia minasensis* in Minas Gerais State, Brasil and *Lutzomyia anglesi* in Bolívia with *L. (L.) amazonensis* by molecular methods suggesting that this parasite may have new vectors species. The known sand flies vectors species of *L. (L.) amazonensis* are *Lu. flaviscutellata*, *Lu. reducta* and *Lu. olmeca nociva* [3,89,103]. These vectors are less anthropophilic, which justifies a lower frequency of human infection with this *Leishmania*. A recent study [104] using ecological niche modelling predicts southward expansion of *Lu. flaviscutellata* in South America under climate change, the authors concluded that this vector might well find improving climate conditions for its expansion in the approaching decades. Several studies investigated phlebotomine fauna in Paraná State [14,21,72-76,105-110] and the species with higher prevalence in all of them were *Nyssomyia neivai*, *Pintomyia pessoai*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia whitmani*, *Pintomyia fischeri* and *Lutzomyia intermedia*. Santa Catarina and Paraná States don't have any report of *L. (L.) amazonensis* sand flies vectors, so: there is a new vector transmitting *L. (L.) amazonensis* in these States or the studies about phlebotomine fauna are out of date. *Lu. flaviscutellata* is strongly attracted to rodents, but not so much to humans [89,111,112] and

the use of Disney traps [113], using rodents as baits, are often more successful in capturing this species [104].

## Conclusion

This is the first description of synanthropic rodents naturally infected by *L. (L.) amazonensis* in the world and by *L. (L.) infantum* in South Brasil. Regarding *L. (L.) amazonensis*, this finding must be a new evidence of the urbanization of this etiological agent emphasizing the spread of leishmaniosis in Brazil and its neglected disease situation.

## Abbreviations

ACL, American cutaneous leishmaniosis; BHU, Basic Health Unit; bp, base pair; C+, positive control; C-, negative control; CL, Cutaneous leishmaniosis; DNA, Deoxyribonucleic acid; ELISA, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay; HSP70, Heat shock protein 70; IFAT, Immunofluorescence antibody test; ITS1, Internal transcribed spacer; L, ladder; MS, Ministério da Saúde; PCR, Polymerase chain reaction; Rr, *Rattus rattus*; SSU rRNA, Small subunit of ribosomal ribonucleic acid; VL, visceral leishmaniosis.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## References

1. Gramiccia M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*. 2011;181(1): 23-30.
2. Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: parasites and wildlife*. 2014;3(3): 251–262.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Tegumentar Americana - MS. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2007.
4. Laison R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2010;1(2): 13-32.

5. Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology*. 2011;138(4): 405–425.
6. Forattini OP. *Entomologia médica*. v. 4. 1ª ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1973.
7. Ashford RW. Leishmaniosis reservoir and their significance in control. *Clinics in Dermatology*. 1996;14(5): 523–532.
8. Rotureau B. Ecology of the leishmania species in the Guianan ecoregion complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006;74(1): 81–96.
9. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniosis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5), e35671.
10. Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniosis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 2008;14(7): 1013-1018.
11. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. [<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def> ].
12. BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2014.
13. Agência Nacional de Notícias do Paraná - ANP. [<http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=84980>].
14. dos Santos DR, Ferreira AC, Bisetto-Jr A. O primeiro registro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae), no Estado do Paraná, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012;45(5).
15. Bisetto-Jr A, Thomaz-Soccol V, Navarro IT. Leishmaniose Visceral no Estado do Paraná. *Revista do Conselho Regional de Medicina Veterinária do Paraná*. 2014;41: 6-7.
16. Pontello-Jr R, Gon AS, Ogama A. American cutaneous leishmaniosis: epidemiological profile of patients treated in Londrina from 1998 to 2009. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2013;88(5): 748-53.
17. Castro EA, Thomaz-Soccol V, Augur C, Luz E. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Epidemiology of canine cutaneous leishmaniosis in the State of Paraná (Brazil). *Experimental Parasitology*. 2007;117(1): 13- 21.
18. Dantas-Torres, F, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Melo MF, da Silva FJ, da Silva AL, et al. Cutaneous and visceral leishmaniosis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2010;170(3-4): 313- 317.
19. Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniosis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003;97(3): p. 291-296.

20. Constantino C, Pasquali AKS, Caldart ET, Ferreira FP, Marana ERM, Freire RL et al. Seroepidemiology of *Leishmania* spp. in dogs residing in Telêmaco Borba, Paraná, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*. 2014;35(6): 3181-3190.
21. Membrive NA, Rodrigues G, Gualda KP, Bernal MVZ, Oliveira DM, Lonardoni MVC, et al. Environmental and animal characteristics as factors associated with American cutaneous leishmaniasis in rural locations with presence of dogs, Brazil. *PLoS ONE*. 2012;7(11), e47050.
22. Negrão GN, Ferreira MEMC. Considerações sobre a dispersão da leishmaniose tegumentar americana nas Américas. *Revista Percurso*. 2009;1(1): 85-103.
23. Chaves, LF, Cohen JM, Pascual M, Wilson ML. Exclusion Modifies Climate and Deforestation Impacts on a Vector-Borne Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2008;2(2), e176.
24. D'Elia, G. Guia dos roedores de Brasil: Com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. *Mastozoologia neotropical*. 2008;15(2): 374-376.
25. FUNASA. Manual de controle de roedores. Brasília: Fundação nacional de saúde, 2002.
26. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. [<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=411370>].
27. Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, et al. Epi Info, Version 6: a word processing database, and statistic program for epidemiology on microcomputers. Atlanta: Center for Diseases Control and Prevention, 1994.
28. Szargiki R. Comparação de Métodos diagnósticos em leishmaniose tegumentar Americana. 85p. (Master dissertation). Universidade Federal do Paraná. 2005.
29. Oliveira TMFdeS, Furuta PI, Carvalho D, Machado RZ. 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 Veterinária*. 2008;17(1): 7- 11.
30. Ben Ismail R, Khaled S, Makni S, Ben Rachid MS. Anti-leishmanial antibodies during natural infection of *Psammomys obesus* and *Meriones shawi* (Rodentia, Gerbillinae) by *Leishmania major*. *Annales de la Société belge de médecine tropicale*. 1989;69(1): 35-40.
31. Cássia-Pires R, Boité MC, D'Andrea PS, Herrera HM, Cupolillo E, Jansen AM, Roque ALR. Distinct *Leishmania* species infecting wild caviomorph rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(12), e3389.
32. van Eys Guillaume JJM, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1992;51(1): 133-142.

33. Van der Auwera G, Maes I, De Doncker S, Ravel C, Cnops L, Van Esbroeck M, et al. Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in European tropical infectious disease clinics. *Euro Surveillance*. 2013;18(30), 20543.
34. Van der Auwera G, Dujardin JC. Species Typing in Dermal Leishmaniosis. *Clinical microbiology reviews*. 2015;28(2): 265-294.
35. Mimori T, Sasaki JI, Nakata M, Gomez EA, Uezato H, Nonaka S, et al. Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. *Gene*. 1998;210(2): 179-186.
36. Cardoso RM, de Araújo NNSL, Romero GAS, Souza TTCM, Dietrich AG, Mendes JD, et al. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. *Parasites & vectors*. 2015;8(1): 171.
37. Castillo AE, Priottoa J, Ambrosio AM, Provencal MC, Pini N, Morales, MA, et al. Commensal and wild rodents in an urban area of Argentina. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2003;52(3): 135-141.
38. Lobos G, Ferres M, Palma RE. Presencia de los géneros invasores *Mus* y *Rattus* en áreas naturales del Chile: un riesgo ambiental y epidemiológico. *Revista Chilena de Historia Natural*. 2005;78(1): 113-124.
39. Gazeta GS, Carvalho RW, Avelar RF, Amorim M, Abouddutra AE. Ocorrência de *Babesia* sp em pequenos roedores no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2004;56(6): 741-744.
40. Akhavan AA, Mirhendi H, Khamesipour A, Alimohammadian MH, Rassi Y, Bates P, et al. *Leishmania* species: detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. *Experimental Parasitology*. 2010;126(4): 552-556.
41. Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniosis in Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2005;129(3): 219-227.
42. Lima BS, Dantas-Torres F, de Carvalho MR, Marinho-Junior JF, de Almeida EL, Brito ME, et al. Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniosis in north-eastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2013;107(9): 592–597.
43. Marcelino AP, Ferreira EC, Avendanha JS, Costa CF, Chiarelli D, Almeida G, et al. Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniosis in Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2011;183(1): 54-58.
44. Andrade MS, Courtenay O, Brito ME, Carvalho FG, Carvalho AWS, Soares F, et al. Infectiousness of sylvatic and synanthropic small rodents implicates a multi-host reservoir of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *PLoS Neglected and Tropical Diseases*. 2015;9(10), e0004137.

45. Svobodová M, Votýpka J, Nicolas L, Volf P. *Leishmania tropica* in the black rat (*Rattus rattus*): persistence and transmission from asymptomatic host to sand fly vector *Phlebotomus sergenti*. *Microbes and infection*. 2003;5(5): 361-364.
46. Molina R, Amela C, Nieto J, Sanandres M, Gonzalez F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994;88: 491-493.
47. Ferreira EC, Cruz I, Cañavate C, de Melo LA, Pereira AA, Madeira FA, et al. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. *BMC Veterinary Research*. 2015;11(1): 71.
48. Alencar EJ, Pessoa EP, Fontenele ZF. Infecção natural de *Rattus rattus alexandrinus* por *Leishmania* (provavelmente *L. braziliensis*) em zona endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado do Ceará. Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1960;2: 347-348.
49. Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, da Silva SR, Moura AJ, Neto RGT, et al. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniosis in Minas Gerais State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011;105(10): 579-585.
50. Richini-Pereira VB, Marson PM, Hayasaka EY, Victoria C, da Silva RC, Langoni H. Molecular detection of *Leishmania* spp. in road-killed wild mammals in the Central Western area of the State of São Paulo, Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2014;20(27), 01-07.
51. de Lima H, de Guglielmo Z, Rodríguez A, Convit J, Rodríguez N. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara State, Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002;97(2): 169-174.
52. Alexander B, Lozano C, Barker DC, McCann SHE, Adler GH. Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. *Acta tropica*. 1998;69(1): 41-50.
53. Davami MH, Motazedian MH, Kalantari M, Asgari Q, Mohammadpour I, Sotoodeh-Jahromi A, et al. Molecular Survey on Detection of Leishmanial Infection in Rodent Reservoirs in Jahrom District, Southern Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*. 2013;8(2): 139-146.
54. Mirzaei A, Schweynoch C, Rouhani S, Parvizi P, Schönian G. Diversity of *Leishmania* species and of strains of *Leishmania major* isolated from desert rodents in different foci of cutaneous leishmaniosis in Iran. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014;108(8): 502-512.
55. Ibrahim EA, Al-Zahrani MA, Al-Tuwaigri AS, Al-Shammary FJ, Evans DA. *Leishmania* infecting man and wild animals in Saudi Arabia. 9. The black rat (*Rattus rattus*) a probable reservoir of visceral Leishmaniosis in Gizan province, south-west Saudi Arabia, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1992;86(5): 513-514.

56. Zanet S, Sposimo P, Trisciuglio A, Giannini F, Strumia F, Ferroglio E. Epidemiology of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in *Rattus rattus* in absence of domestic reservoir and definitive hosts. *Veterinary Parasitology*. 2014;199(3): 247-249.
57. Navea-Pérez HM, Díaz-Sáez V, Corpas-López V, Merino-Espinosa G, Morillas-Márquez F, Martín-Sánchez J. *Leishmania infantum* in wild rodents: reservoirs or just irrelevant incidental hosts?. *Parasitology Research*. 2015;114(6): 2363-2370.
58. Helhazar M, Leitão J, Duarte A, Tavares L, da Fonseca IP. Natural infection of synanthropic rodent species *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra–Portugal. *Parasites & Vectors*. 2013;6(1): 88.
59. Neitzke-Abreu HC, Venazzi MS, Bernal MVZ, Reinhold-Castro KR, Vagetti F, Mota CA, et al. Detection of DNA from *Leishmania* (*Viannia*): Accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous Leishmaniosis. *PLoS ONE*;8(7): e62473.
60. Lara-Silva, FO, Barata RA, Michalsky EM, Ferreira EC, Lopes MO, Pinheiro AC, et al. *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.
61. Shender LA, De Los Santos M, Montgomery JM, Conrad PA, Ghersi BM, Razuri H, et al. Native Rodent Species Are Unlikely Sources of Infection for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* along the Transoceanic Highway in Madre de Dios, Peru. *PLoS ONE*;9(7): e103358.
62. Papadogiannakis E, Spanakos G, Kontos V, Menounos PG, Tegos N, Vakalis N. Molecular detection of *Leishmania infantum* in wild rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. *Zoonoses and public health*. 2010;57(7-8), e23-e25.
63. Vladimir I, Katja K, Sara Z, Elena B. Illegal Waste Sites As A Potential Micro Foci Of Mediterranean Leishmaniosis: First Records Of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) From Slovenia. *Acta Veterinaria*. 2015;65(3): 348-357.
64. de Mendonça PG, Harsch A, Mogl C, Walther B, Boje J, Dimke, C. Molecular Screening of Wild Rodents for *Leishmania infantum* in Germany. *Acta Zoologica Bulgarica*. 2011;63(3): 307-311.
65. Barbosa PBBM. Estudo sobre a participação de roedores na cadeia de transmissão de *Leishmania infantum* (Protozoa: Trypanosomatidae) no Rio Grande do Norte. 85p. (Master dissertation). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2005.
66. Mukhtar MM, Sharief AH, El Saffi SH, Harith AE, Higazzi TB, Adam AM, Abdalla HS. Detection of antibodies to *Leishmania donovani* in animals in a kala-azar endemic region in eastern Sudan: a preliminary report. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000;94(1): 33-36.
67. Singh N, Mishra J, Singh R, Singh S. Animal reservoirs of visceral leishmaniosis in India. *The Journal of parasitology*. 2013;99(1): 64-67.

68. Díaz-Sáez V, Merino-Espinosa G, Morales-Yuste M, Corpas-López V, Pratlong F, Morillas-Márquez F, Martín-Sánchez J. High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniosis area: Epidemiological consequences. *Veterinary Parasitology*. 2014;202(3): 119-127.
69. Plano Diretor da Cidade de Londrina.  
[www.londrina.pr.gov.br/dados/images/.../apresentacao\_produto\_05.pps].
70. Tanure A, Peixoto JC, Afonso MMDS, Duarte R, Pinheiro ADC, Coelho SVB, Barata RA. Identification of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) blood meals in an endemic leishmaniosis area in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2015;57(4): 321-324.
71. Membrive NA, Rodrigues G, Lonardoni MVC, Silveira TGV, Teodoro U. Flebotomíneos de municípios do norte do estado do Paraná, sul do Brasil. *Entomología y Vectores*. 2004;11(4): 673-680.
72. da Silva AM, Camargo NJ, Santos DR, Massaera R, Ferreira AC, Postai C, et al. Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. *Neotropical Entomology*. 2008;37(2): 209-225.
73. 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*. 2007;36(6): 953-959.
74. Cerino DA, Teodoro U, Silveira TGV. Sand flies (Diptera: Psychodidae) in the urban area of the municipality of Cianorte, Paraná state, Brazil. *Neotropical entomology*. 2009;38(6): 853-858.
75. Cruz CFR, Cruz MFR, Galati EAB. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in rural and urban environments in an endemic area of cutaneous leishmaniosis in southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013;108(3): 303-311.
76. de Melo SCCSD, Cella W, Massafra R, Silva NMMG, Marqui R, Carvalho M. D. D. B., & Teodoro, U. (2013). Phlebotomine sandflies in rural locations in the State of Parana, southern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2013;55(6): 407-410.
77. Marassa AM, Galati EAB, Bergamaschi DP, Consales CA. Blood feeding patterns of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera, Psychodidae) in a cutaneous leishmaniosis endemic area of the Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2013;46(5): 547-554.
78. Afonso MMS, Gomes AC, Meneses CRV, Rangel EF. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (N.) intermedia* (Diptera, Psychodidae), vector of cutaneous leishmaniosis in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2005;21(6): 1816-1820.

79. Nieves E, Pimenta PF. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*. 2000;37(1): 134-140.
80. Zulueta AM, Villarroel E, Rodriguez N, Feliciangeli MD, Mazzarri MILENA, Reyes O. et al. Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniosis in na endemic focus in eastern Venezuela. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999;61(6): 945–950.
81. El Adhami B. Isolation of *Leishmania* from a black rat in the Baghdad area, Iraq, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1976;25(5): 759–761.
82. Pozio E, Gradoni L, Bettini S, Gramiccia M. Leishmaniosis in Tuscany (Italy) V. Further isolation of *Leishmania* from *Rattus rattus* in the province of Grosseto. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1981;75(4): 393–395.
83. Gramiccia M, Maazoun R, Lanotte G, Rioux JA, Le Blancq S. Typage enzymatique de onze souches de *Leishmania* isolees, en Italie continentale, a partir de formes viscerales murines, canines et vulpines. Mise en evidence d'un variant enzymatique chez le Renard (*Vulpes vulpes*) et le chien. *Annales de Parasitologie humaine et comparée*. 1982;57:527-531.
84. Di Bella C, Vitale F, Russo G, Greco A, Milazzo C, Aloise G, Cagnin M. Are rodents a potential reservoir for *Leishmania infantum* in Italy? *Journal of Mountain Ecology*. 2003;7: 125–129.
85. Hoffmann AR, Navarro IT, Camargo-Jr VE, Caldart ET, Mitsuka-Breganó R, Pereira PM. *Leishmania amazonensis* em cão com quadro clínico de leishmaniose visceral no Estado do Paraná, Brasil – relato de caso. *Semina: Ciências Agrárias*. 2012;33(2): 3265-3270.
86. Catarino CLM. Leishmaniose tegumentar americana: uso de técnicas de biologia molecular no diagnóstico de infecção de roedores de coleção do Museu Nacional – RURJ. 70p. (Master dissertation). Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. 1998.
87. Nery-Guimarães, Azevedo M, Damasceno RG. Leishmaniose tegumentar (LT). Zoonose de roedores silvestres (*Orozomys goeldi* Thomas) na Amazônia. *O hospital*. 1966;70: 387-395.
88. Telleria J, Bosseno MF, Tarifa T, Buitrago R, Martinez E, Torrez M., et al. Putative reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a Sub-Andean focus of Bolivia identified by kDNA-polymerase chain reaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999;94:5–6.
89. 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*. 1968;62: 385-395.
90. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniosis in Brazil: V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniosis in Mato Grosso State, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1970;64: 654-667.

91. Lainson R, Shaw JJ. Leishmanias and leishmaniosis of the New World, with particular reference to Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization*. 1973;7:1-19.
92. Camara-Coelho LI, Paes M, Guerra JA, das Graças Barbosa M, Coelho C, Lima B, et al. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniosis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitology Research*. 2011;108(3): 671–677.
93. de Souza AL, Barros EMS, Ishikawa E, Ilha IMN, Marin GRB, Nunes VLB. Feline leishmaniosis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2005;128(1-2): 41-45.
94. Marlow MA, Mattos MS, Makowiecky ME, Eger I, Rosseto AI, Grisard EC, Steindel M. Divergent Profile of Emerging Cutaneous Leishmaniosis in Subtropical Brazil: New Endemic Areas in the Southern Frontier. *PLoS ONE*. 2014;8(2), e56177.
95. Carvalho BM, Maximo M, Costa WA, de Santana ALF, da Costa SM, da Costa Rego TAN, et al. Leishmaniosis transmission in an ecotourism area: potential vectors in Ilha Grande, Rio de Janeiro State, Brazil. *Parasites & vectors*. 2013;6(1): 325.
96. Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi-Jr G, Momen H, McMahon-Pratt D, de Jesus AR, et al. Leishmaniosis in Bahia: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1991;44(5): 536-546.
97. Oliveira JPC, Fernandes F, Cruz AK, Trombela V, Monteiro E, Camargo AMA, et al. Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. *Kinetoplastid Biology and Disease*. 2007;6(1): 5.
98. Tolezano JE, Uliana SR, Taniguchi HH, Araújo MF, Barbosa JÁ, Barbosa JE. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniosis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2007;149(3): 280-284.
99. Dias ES, Regina-Silva S, França-Silva JC, Paza GF, Michalskya EM, Araújo SC, et al. Eco-epidemiology of visceral leishmaniosis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2011;176(2–3): 101–111.
100. Barrios MA, Rodriguez N, Feliciangeli DM, Ulrich M, Telles S, Pinardi ME, Convit J. Coexistence of two species of *Leishmania* in the digestive tract of the vector *Lutzomyia ovallesi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994;51(5): 669-675.
101. Rêgo FD, Rugani JMN, Shimabukuro PHF, Tonelli GB, Quaresma PF, Gontijo CMF. Molecular Detection of *Leishmania* in Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from a Cutaneous Leishmaniosis Focus at Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. *PLoS ONE*;10(4): e0122038.
102. Martinez E, Le Pont F, Torrez M, Telleria J, Vargas F, Dujardin JC, Dujardin JP. *Lutzomyia nuneztovari anglesi* (Le pont & Desjeux, 1984) as a vector of *Leishmania*

*amazonensis* in a sub-Andean leishmaniosis focus of Bolivia. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1999;61(5): 846-849.

103. 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. 1998;84(3): 363-369.

104. Carvalho BM, Rangel EF, Ready PD, Vale MM. 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. 2014;10(11), e0143282.

105. Gomes AC, Galati EAB, Gomes ADC, Galati E. Flebotomíneos de Londrina, Paraná (Brasil) e observações ecológicas sobre algumas espécies. Revista de Saúde Pública. 1977;11(2): 284-287.

106. Teodoro U, La Salvia Filho V, de Lima EM, Spinosa RP, Barbosa OC, Ferreira MEMC, Silveira TGV. Flebotomíneos em área de transmissão de leishmaniose tegumentar na região norte do Estado do Paraná-Brasil: Variação sazonal e atividade noturna. Revista de Saúde Pública. 1993;27(3): 190-194.

107. Teodoro U, Balduino J, Thomaz-Soccol V, Barbosa OC, Ferreira ME, Lozovei AL, et al. 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. 1999;42(3): 307-314.

108. Oliveira FJA, Costa IC, Thomaz MEB, Nunes V, Oliveira O, de Oliveira-Neto BP, de Oliveira, JE. Leishmaniose Tegumentar Americana: flebotomíneos de área de transmissão do Parque Arthur Thomas na região de Londrina – PR. Biosaúde. 2000;2(2): 81-87.

109. dos Reis HR, Lopes-Mori FMR, dos Reis CR, Freire RL, Marana ERM, Chryssafidis, AL, et al. Soroprevalência da leishmaniose tegumentar americana (LTA) canina e fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Bela Vista do Paraíso, Paraná. Semina: Ciências Agrárias. 2011;32(3): 1083-1094.

110. Cruz MFR, Galati EAB, Cruz CFR. 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. 2012;45(4): 430-436.

111. Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniosis in Brazil: VI. Observations on the seasonal variations of *Lutzomyia flaviscutellata* in different types of forest and its relationship to enzootic rodent leishmaniosis (*Leishmania mexicana amazonensis*). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1972; 66(5): 709–717.

112. Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniosis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009;104(7): 937–954.

113. Dorval MEC, Alves TP, Oliveira AG, Brazil RP, Galati EAB, Cunha RV. Modification of Disney trap for capture of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102(7): 877–878.

114. Silveira TGV, Teodoro U, Arraes SMAA, Lonardon MVC, Dias MLGG, Shaw JJ, Ishikawa EAY, Lainson R. An Autochthonous case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 from the North of Paraná State, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1990; 85(4): 475–476.

115. D'Andrea LAZ, Fonseca ES, Prestes-Carneiro LE, Guimarães RB, Yamashita RC, Soares CN, Hiramoto RM, Tolezano JE. 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; 11(273).

### **Authors' contributions**

ETC, BBR, RLF, ITN participated in the design of the study. BBR, MRS, RMB, RLF contributed in obtaining biological samples. ETC, FPF, MM, MRS carried out the molecular and serological studies and experiments. ETC, RLF performed the statistical analysis. ETC, JLG performed the molecular analysis and sequences alignment. ETC, FPF, MM, MRS, JLG, RMB, RLF, ITN contributed to the manuscript preparation and approved the final version of the manuscript.

### **Acknowledgements**

We are grateful to CAPES, CNPq and Fundação Araucária for financial support; to Thaís Gomes Verzignassi da Silveira for giving the DNA of the positive controls; to Mario Augusto Ono and Rafaela Macagnan for giving the serum of the positive controls.

## 6 CONCLUSÃO

A espécie de roedor urbano predominante na cidade de Londrina foi a *R. Rattus*. A presença de roedores sinantrópicos infectados por parasitos do gênero *Leishmania* em ambientes de coleta seletiva e ferros-velhos expõe ao risco os trabalhadores, os residentes e também os moradores do entorno dos locais de coleta. Essa é a primeira descrição de roedores sinantrópicos comensais naturalmente infectados por *L. (L.) amazonensis* no mundo e por *L. (L.) infantum* no Sul do Brasil. Com relação à *L. (L.) amazonensis*, esse resultado é uma nova evidência da urbanização desse agente etiológico, enfatizando a expansão das leishmanioses no Brasil e sua situação de doença negligenciada.

## 7 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.
- ALMEIDA, R. P.; BARRAL-NETTO, M.; de JESUS, A. M. R.; de FREITAS, L. A. R.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore, v. 54, n. 2, p. 178-184, 1996.
- 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.
- ANP. AGÊNCIA NACIONAL DE NOTÍCIAS DO PARANÁ. Disponível em: <http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=84980>. Acessado em 23 de dezembro de 2015.
- AZULAY, R. D.; AZULAY JR, D. R. Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis. *International Journal of Dermatology*, Malden, v. 34, p. 303-307, 1995.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis. Part one. *Trends in Parasitology*, Oxford, v.24, n. 7, p. 324–330, 2008.
- BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniasis. In: Greene, C. E. 4ª ed. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Saint Louis, MO: Elsevier/Saunders, 2012. p. 734–749.
- BARBOSA JR, A. A.; ANDRADE, Z. A.; REED, S. G. The pathology of experimental visceral leishmaniasis in resistant and susceptible lines of inbred mice. *Brazilian Journal of Medical Research*, Ribeirão Preto, v. 20, n. 1, p. 63–70, 1987.
- BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JR, G.; MOMEN, H.; McMAHON-PRATT, D.; de JESUS, A. R.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M.; JOHNSON JR, W. D. Leishmaniasis in Bahia: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore, v. 44, n. 5, p. 536-546, 1991.
- BARRETT, T.V.; SENRA, M. Leishmaniasis in Manaus. *Parasitology Today*, Oxford, v.5, p. 255, 1989.
- BASTIEN, P.; BLAINEAU, C.; PAGES, M. *Leishmania*: sex, lies and karyotype. *Parasitology Today*, Oxford, v. 8, p. 174–7, 1992.
- BAZO, M. L.; STURION, L.; PROBST, V. S. Caracterização do reciclador da ONG RRV em Londrina-Paraná. *Fisioterapia em Movimento*, Curitiba, v. 24, n. 4, p. 613-620, 2011.

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

BRASIL. Decreto nº 7.405, de 23 de dezembro de 2010. Institui o Programa Pró-Catador, denomina Comitê Interministerial para Inclusão Social e Econômica dos Catadores de Materiais Reutilizáveis e Recicláveis, o Comitê Interministerial da Inclusão Social de Catadores de Lixo, criado pelo Decreto de 11 de setembro de 2003, dispõe sobre sua organização e funcionamento, e dá outras providências. Brasília: DOU, 24/12/2010.

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, 2007.

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.

CAMARA-COELHO, L. I.; PAES, M.; GUERRA, J. A.; BARBOSA, M. D.; COELHO, C.; LIMA, B.; BRITO, M. E.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil, *Parasitology Research*, Berlin, v. 108, n. 3, p. 671–7, 2011.

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.

CARINI, A.; PARANHOS, U. Identification de l'ulcera de Baurú avec le bouton d'Orient. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, Paris, v. 2, p. 225-226, 1909.

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.

CDC. Center of Disease Control. Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>>. Acesso em: 03 jan. 2016.

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.

CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in *trypanosomes* and *leishmanias*. *Molecular Biochemistry Parasitology*, Amsterdam, v. 156, n. 2, p. 93–101, 2007.

CONSOLIM, J.; LUZ, E.; TORRES, P. B. Flebótomos da Área do Reservatório da Hidroelétrica de Itaipu, Estado do Paraná, Brasil (Diptera, Psychodidae). *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 6, n. 1, p. 74-85, 1990.

CONSTANTINO, C.; PASQUALI, A. K. S.; CALDART, E. T.; FERREIRA, F. P.; MARANA, E. R. M.; FREIRE, R. L.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; HILST, C. L. S.; VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T. Seroepidemiology of *Leishmania* spp. in dogs residing in Telêmaco Borba, Paraná, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 35, n. 6, p. 3181-3190, 2014.

CONVIT, J.; LAPENTA, P. Sobre un caso de leishmaniose tegumentaria de forma diseminada. *Revista Policlinica de Caracas*, Caracas, v. 18, n. 100, p.153-158, 1946.

COSTA, F. A.; GOTO, H.; SALDANHA, L. C.; SILVA, S. M.; SINHORINI, I. L.; SILVA, T. C.; GUERRA, J. L. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Pathology*, New York, v. 40, n. 6, p. 677-684, 2003.

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

CMTU. Companhia Municipal de Trânsito e Urbanização. Disponível em: <http://www.cmtuld.com.br/index.php/diretoria-de-operacoes/coleta-seletiva>. Acessado em 23 de dezembro de 2015.

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.

CUNHA, A. M; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* n.sp. Nota Prévia. *O Hospital*, Rio de Janeiro, v. 11, p. 3-9, 1937.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*, New York, v. 72, n. 2, p. 132-141, 2002.

da COSTA, L. *Ocorrência de anticorpos IgG anti-Leishmania spp em cães de locais de reciclagem e nas adjacências de uma mata urbana de Londrina – PR*. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

da CRUZ, A. M.; PIRMEZ, C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: COURA, J. R. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. 1ª ed. v. 01. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A, 2005.

da SILVA, A. M.; CAMARGO, N. J.; SANTOS, D. R.; MASSAFERA, R.; FERREIRA, A. C.; POSTAI, C.; CRISTÓVÃO, E. C.; KONOLSAISENII, J. F.; BISELTO-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, 2008.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasites & Vectors*, London, v. 2, s. 1, doi:10.1186/1756-3305-2-S1-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 leishmaniosis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 170, n. 3-4, p. 313-317, 2010.

de 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.

de LUNA, R.; VUOTTO, M. L.; IELPO, M. T.; AMBROSIO, R.; PIANTEDOSI, D.; MOSCATIELLO, V.; CIARAMELLA, P.; SCALONE, A.; GRADONI, L.; MANCINO, D. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v. 70, n. (1-2), p. 95-103, 1999.

de MEDEIROS, L. F. R.; MACÊDO, K. B. Catador de material reciclável: uma profissão para além da sobrevivência? *Psicologia & Sociedade*, Porto Alegre, v. 18, n. 2, p. 62-71, 2006.

de OLIVEIRA, D. A. M. *Percepção de Riscos Ocupacionais em catadores de Materiais Recicláveis: Estudo de uma cooperativa em Salvador-Bahia*. 2011. Dissertação (Mestrado em Saúde, Ambiente e Trabalho) -, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

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, E. S.; REGINA-SILVA, S.; FRANÇA-SILVAB, J. C.; PAZA, G. F.; MICHALSKYA, E. M.; ARAÚJO, S. C.; VALADÃO, J. L.; LARA-SILVA, F. O.; OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; FORTES-DIAS, C. L. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, State of Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 176, n. 2-3, p. 101-111, 2011.

dos 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, 2012.

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.

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*, Irã, 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. 77-1012014.

FERRAZ, L.; GOMES, M. H. A.; BUSATO, M. A. O catador de materiais recicláveis: um agente ambiental. *Cadernos EBAPE.BR*, Rio de Janeiro, v. 10, n. 3, p.763–768, 2012.

FERREIRA, J. A. *Lixo hospitalar e domiciliar: semelhanças e diferenças - Estudo de caso no município do Rio de Janeiro*. 1997. Tese (Doutorado) -, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FERREIRA, J. A.; ANJOS, L. A. Aspectos de saúde coletiva e ocupacional associados à gestão dos resíduos sólidos municipais. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 17, n. 3, p. 689-696, 2001.

FERREIRA, V. S.; LIMA, A. G. D.; PESSOA, C. S.; PAZI, F. S. S.; de JESUS, J. Estudo comparativo das enteroparasitoses ocorrentes em duas áreas de Barreiras, Bahia. *Natureza on line*, Santa Teresa, v. 11, n. 2, p. 90-95, 2013.

FORATTINI, O. P. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 2, p. 195-203, 1960.

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.

- FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. *Projetos Físicos de Unidades de Controle de Zoonoses e Fatores Biológicos de Risco*. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2007.
- FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. *Manual de Controle de Roedores*. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2014.
- GARIN, Y. J. F.; MENECEUR, P.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.; DEROUIN, F.; LORENZO, F. A2 gene of Old World cutaneous *Leishmania* is a single highly conserved functional gene. *BMC Infectious Diseases*, v. 18, n. 5, p. 1- 17, 2005.
- 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.
- GONÇALVES, H. H; ABEGÃO, L. H. Da ausência do trabalho à viração: a importância da catação na manutenção da vida. In: Encontro da ANNPAS, II, Indaiatuba. São Paulo 2004.
- 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.
- GHOSH, A. K.; GHOSH, D. K. Infection pattern of leishmaniasis in hamsters produced by recent isolates from kala-azar patients in India. *The Indian Journal of Medical Research*, Nova Delhi, v. 86, p. 14–19, 1987.
- 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.
- HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; MUTHA, S. S.; LOCKSLEY, R. M. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4C lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 88, n. 16, p. 7011–7015, 1991.
- 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. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.33, s. 2, p. 3265-3270, 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. *Atlas de Saneamento Básico 2011*. Rio de Janeiro, 2011.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A.; AGGARWAL, G.; BERRIMAN, M.; SISK, E.; RAJANDREAM, M. A.; ADLEM, E.; AERT, R.; ANUPAMA, A.; APOSTOLOU, Z.; ATTIPOE, P.; BASON, N.; BAUSER, C.; BECK, A.; BEVERLEY, S. M.; BIANCHETTIN, G.; BORZYM, K.; BOTHE, G.; BRUSCHI, C. V.; COLLINS, M.; CADAG, E.; CIARLONI, L.; CLAYTON, C.; COULSON, R. M.; CRONIN, A.; CRUZ, A. K.; DAVIES, R. M.; de GAUDENZI, J.; DOBSON, D. E.; DUESTERHOEFT, A.; FAZELINA, G.; FOSKER, N.; FRASCH, A. C.; FRASER, A.; FUCHS, M.; GABEL, C.; GOBLE, A.; GOFFEAU, A.; HARRIS, D.; HERTZ-FOWLER, C.; HILBERT, H.; HORN, D.; HUANG, Y.; KLAGES, S.; KNIGHTS, A.; KUBE, M.; LARKE, N.; LITVIN, L.; LORD, A.; LOUIE, T.; MARRA, M.; MASUY, D.; MATTHEWS, K.; MICHAELI, S.; MOTTRAM, J. C.; MÜLLER-AUER, S.; MUNDEN, H.; NELSON, S.; NORBERTCZAK, H.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; PENTONY, M.; POHL, T. M.; PRICE, C.; PURNELLE, B.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; REINHARDT, R.; RIEGER, M.; RINTA, J.; ROBBEN, J.; ROBERTSON, L.; RUIZ, J. C.; RUTTER, S.; SAUNDERS, D.; SCHÄFER, M.; SCHEIN, J.; SCHWARTZ, D. C.; SEEGER, K.; SEYLER, A.; SHARP, S.; SHIN, H.; SIVAM, D.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TOSATO, V.; VOGT, C.; VOLCKAERT, G.; WAMBUTT, R.; WARREN, T.; WEDLER, H.; WOODWARD, J.; ZHOU, S.; ZIMMERMANN, W.; SMITH, D. F.; BLACKWELL, J. M.; STUART, K. D.; BARRELL, B.; MYLER, P. J. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, Nova York, v. 09, n. 5377, p. 436–42, 2005.

KERR, S. F. Palearctic origin of *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 95, n. 1, p. 75- 80, 2000.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Veterinary Pathology*, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 527-538, 2014.

KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K. G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989–1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*, South Bend, v. 35, n. 5, p. 376–383, 1999.

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

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. 1 ed. London: Academic Press, 1987. pp. 1–120,

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*. 10ª ed. London: Hodder Arnold ASM Press; 2005. p. 313-49.

- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; LINS, Z. C. Leishmaniasis in Brazil: IV. The fox, *Cerdocyon thous* as a reservoir of *Leishmania donovani* in Pará State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 63, n. 6, p. 741-745, 1969.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 81, n. 3, p. 517, 1987.
- LAINSON, R.; STRANGWAYS-DIXON, J. Dermal leishmaniasis in British Honduras: some host-reservoirs of *Leishmania braziliensis mexicana*. A preliminary note. *British Medical Journal*, London, v. 1, p.1596-8, 1962.
- LAINSON, R.; STRANGWAYS-DIXON, J. The epidemiology of dermal leishmaniasis in British Honduras. Part II. Reservoir-hosts of *Leishmania mexicana* among the forest rodents. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 58, n. 2, p. 136-53, 1962.
- LAMPO, M.; FELICIANGELI, M. D.; MARQUEZ, L. M.; BASTIDAS, C.; LAU, P. A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore, v. 62, n. 6, p. 718–719, 2000.
- 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.
- LIANG, X.; HARITAN, A.; ULIEL, S.; MICHAELI, S. trans and cis splicing in Trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryotic Cell*, Washington, v. 2, n. 5, p. 830–840, 2003.
- LIMA, L.; SILVA, F. M.; NEVES, L.; ATTIAS, M.; TAKATA, C. S.; CAMPANER, M.; de SOUZA, W.; HAMILTON, P. B.; TEIXEIRA, M. M. G. Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in African bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. *Protist*, Jena, v. 136, n. 6, p. 856–872, 2012.
- LINDENBERG, A. L'ulcère de Bauru ou le bouton d'orient au Brésil. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, Paris, v. 2, p. 252-254, 1909.
- LÜHE, M. Die im Blute schmarotzenden Protozoen und ihre nächsten Verwandten. In: MENSE, C.; BARTH, I. A. *Hanbuch der Tropenkrankheiten*. 1906.p. 203.
- 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.

- MARCELINO, A. P.; FERREIRA, E. C.; AVENDANHA, J. S.; COSTA, C. F.; CHIARELLI, D.; ALMEIDA, G.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C.; dos REIS, J. K. P.; GONTIJO, C. M. F. Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in na area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 183, n. 1-2, p. 54– 58, 2011.
- 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.
- MATTA, A. A. Sur les leishmanioses tégumentaires. Classification générale des leishmanioses. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, Paris*, v. 9, p. 494-503, 1916.
- 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. *Entomologia y Vectores*, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 673–680, 2004.
- MIGONE, L. E. Un caso de kala-azar a Asunción (Paraguay). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, Paris*, v. 6, p. 118-20, 1913.
- 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.
- MOMEN, H.; CUPOLILLO, E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 95, n. 4, p. 583-588, 2000.
- MONTEIRO, C. A. *Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças*. 1ª ed. São Paulo: Editora Hucitec; 1995. 359p.
- 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.
- MTE. Ministério do Trabalho e Emprego. Classificação Brasileira de Ocupações. 2002. Disponível em: <<http://www.mtecbo.gov.br/busca/descricao.asp?codigo=5192-05>>. Acesso em: 01 abr. 2009.
- NEVES, D. P. *Parasitologia Dinâmica*. 3º ed. São Paulo: Atheneu, 2009.
- NOVAES W. A. *A década do impasse: da Rio-92 à Rio +10*. 1ª ed. São Paulo: Estação Liberdade e Instituto Socioambiental, 2002. 384p.
- NOYES, H. A. Implications of a neotropical origin of the genus *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 93, n. 5, p. 657-661, 1998.
- 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.

OLIVEIRA, J. P. C.; FERNANDES, F.; CRUZ, A. K.; TROMBELA, V.; MONTEIRO, E.; CAMARGO, A. M. A.; BARRAL, A.; OLIVEIRA, C. I. Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. *Kinetoplastid Biology and Disease*, v. 6, n. 5, 2007. doi: 10.1186/1475-9292-6-5

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 an ecto-30-nucleotidase activity and its possible role in virulence, *Experimental Parasitology*, Nova York, v. 129, n. 3, p. 277–283, 2011.

PANARO, M. A.; BRANDONISIO O.; CIANCIULLI, A.; CAVALLO, P.; LACASELLA, V.; PARADIES, P.; TESTINI, G.; de CAPRARIIS, D.; MITOLO, V.; OTRANTO, D. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Parasitology*, London, v. 136, n. 8, p. 823–831, 2009.

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.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. D. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v. 22, n. 1, p. 1–13, 1996.

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 (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia,) -, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity*, v. 62, N. 1, p. 229–235, 1994.

PIZARRO, P. Relación de la conquista del Perú. In: *Colección de libros y documentos referentes a la historia del Perú*. Vol VI. 1ªed.. Lima: Collection Urteaga-Romero, 1571.

POLI, A.; ABRAMO, F.; BARSOTTI, P.; LEVA, S.; GRAMICCIA, M.; LUDOVISI, A.; MANCIANTI, F. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 181-191, 2002.

PONTELLO JR, 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.

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.

RAYMOND, R. W.; MCHUGH, C. P.; WITT, L. R.; KERR, S. F. Temporal and spatial distribution of *Leishmania mexicana* infections in a population of *Neotoma micropus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 98, n. 2, p. 171-180, 2003.

REAL, F.; MORTARA, R. A.; RABINOVITCH, M. Fusion between *Leishmania mazonensis* and *Leishmania major* parasitophorous vacuoles: live imaging of coinfecting macrophages. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, San Francisco, v. 4, n.12, e905, 2010.

REAL, F.; MORTARA, R. A. The diverse and dynamic nature of *Leishmania* parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, San Francisco, v. 6, n. 2, e1518, 2012.

REAL, F.; VIDAL, R. O.; CARAZZOLLE, M. F.; MONDEGO, J. M. C.; COSTA, G. G. L.; HERAI, R. H.; WU'RTELE, 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.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; GUERRA, L. L.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clinical and Experimental Immunology*, Oxford v. 146, n. 2, p. 303-311, 2006.

RIDDLE, D. L.; BLUMENTHAL, T.; MEYER, B. J.; PRIESS, J. R.; HUTCHINSON, F. C. *elegans II*. 2 ed. Local: Cold Spring Harbor Monograph Series 33, 1997.

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.; HERTZ-FOWLER, 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 (Mestrado 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.

SACKS, D. L.; KENNEY, R. T.; NEVA, F. A.; KREUTZER, R. D.; JAFFE, C. L.; GUPTA, A. K.; SHARMA, M. C.; SINHA, S. P.; NEVA, F. A.; SARAN, R. Indian kala-azar caused by *Leishmania tropica*. *The Lancet*, London, v. 345, n. 8955, p. 959-961, 1995.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*, Oxford, v. 20, n. 5-6, p. 471–489, 2009.

SARTORI, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; COE, J.; CAMPOS-NETO, A. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar II: detection and characterization of parasite antigens and antibodies eluted from kidneys of *Leishmania donovani* infected hamsters. *Clinical & Experimental Immunology*, London, v. 87, n. 3, p. 386–392, 1981.

SANTOS, G. O.; da SILVA, L. F. F. Estreitando os Nós entre o Lixo e a Saúde: estudo de caso de garis e catadores de lixo na cidade de Fortaleza. Ceará. *REDE – Revista Eletrônica do PRODEMA*, Fortaleza, v. 3, n. 1, p. 83-102, 2009.

SAVANI, E. S.; de ALMEIDA, M. F.; de OLIVEIRA-CAMARGO, M. C.; D'AURIA, S. R.; SILVA, M. M.; de OLIVEIRA, M. L. Detection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Brazilian bats. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 168, n. 1-2, p. 5–10, 2010.

SAVANI, E. S. M. M.; de OLIVEIRA-CAMARGO, M. C.; de CARVALHO, M. R.; ZAMPIERI, R. A.; dos SANTOS, M. G.; D'AURIA, S. R.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. The first Record in the Américas an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis 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.

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R. L.; PEARCE, E.; SHER, A.; Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *Journal of Experimental Medicine*, Nova York, v. 168, p. 1675–1684, 1988.

SCOTT, P. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science*, Nova York, v. 260, n. 5107, p. 496–497, 1993.

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.

SHAPIRO, J. T.; da COSTA LIMA JUNIOR, M. S.; DORVAL, M. E.; de OLIVEIRA, F. A.; CEPA-MATOS, M. F.; BORDIGNON, M. O. First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. *Acta Tropica*, Basel, v. 128, n. 1, p. 171–174, 2013.

SILVA, M. A. de SOUZA CÂNDICO, C. D.; de 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.

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.

SOUZA, P. R. B. *A parceria na coleta seletiva de Londrina sob a ótica da economia dos custos de transação: Um estudo de caso*. 2005. Tese (Doutorado em Administração) -, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná.

SOUZA, A. L.; BARROS, E. M.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I. M.; MARIN, G. R.; NUNES, V. L. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 128, n. 1-2, p. 41-45, 2005.

SPLENDORE, A. Buba-blastomicosi-leishmanosi. Nota sopra alcune affezioni framboesiche osservate in Brasile. *Arch für Schiffs-und Tropenhyg*, v. 15, p. 105-115, 1911.

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.

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.

TOLEZANO, J. E.; ULIANA S. R.; TANIGUCHI, H. H.; ARAÚJO, M. F.; BARBOSA, J. A.; BARBOSA, J. E.; FLOETER-WINTER, L. M.; SHAW, J. J. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 149, n. 3-4, p. 280-284, 2007.

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

VAN WYNSBERGHE, N. R.; CANTO-LARA, S. B.; MIAN-CENTENO, A. G.; ITZA-ORTIZ, M. F.; ANDRADE-NARVAEZ, F. J. Retention of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in naturally infected rodents from the State of Campeche, Mexico. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 95, n. 5, p. 595–600, 2000.

VELLOSO, M. P.; SANTOS, E. M.; ANJOS, L. A. Processo de trabalho e acidentes de trabalho em coletores de lixo domiciliar na cidade de Rio de Janeiro. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 13, n. 4, p. 603-700, 1997.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2008) The Global Burden of Disease: 2004 update. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 84 p.

WHO (2010) 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.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. 1<sup>a</sup> ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005.

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

WRIGHT, J. H. Protozoa in a case of tropical ulcer ("Delhisore"). *The Journal of Medical Research*, Boston, v. 10, n. 3, p. 472-82, 1903.

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.

**ANEXOS**

## ANEXO A

## Questionário Epidemiológico - Roedores Londrina 2006

Nº Roedor #####

**01 Região #**

- 1 NORTE
- 2 SUL
- 3 OESTE
- 4 LESTE
- 5 CENTRAL

**02 Nome do responsável** \_\_\_\_\_

**03 Endereço/Bairro** \_\_\_\_\_

**04 Número do georeferenciamento ##**

**1 Local de Captura ##**

- 1 FERRO VELHO
- 2 RECICLAVEL
- 3 RESIDENCIA
- 4 UBS
- 5 COOPERATIVA SELETIVA
- 6 MERCADOS
- 7 ESGOTO
- 8 TERRENOS BALDIOS
- 9 FERRO VELHO + RESIDENCIA
- 10 RECICLAVEL + RESIDENCIA
- 11 FAZENDA ESCOLA
- 12 FERRO VELHO + RESIDENCIA + RECICLAVEIS
- 13 RESIDENCIA + TERRENOS BALDIOS + RECICLAVEIS
- 14 FERRO VELHO + RECICLAVEIS

**2 Realiza Desratização #**

- 1 SIM
- 2 NÃO

**2.1 Tipo de Raticida #**

- 1 AGUDO
- 2 CRÔNICO
- 3 CASEIRO

**2.2 Quando #**

- 1 0 - 15 DIAS
- 2 15 - 1 MÊS
- 3 1 MÊS - 6 MESES
- 4 > 6 MESES

**5 QUANDO AUMENTOU O N° DE RATOS****3 Fonte de Alimento Para Roedores #**

- 1 PRESENTE
- 2 AUSENTE

**4 Presença de Materiais Recicláveis#**

- 1 SIM
- 2 NÃO

**4.1 Quais #**

- 1 PLASTICO
- 2 FERRO
- 3 PAPEL + PAPELÃO
- 4 PLASTICO + FERRO + PAPELÃO
- 5 PLASTICO + FERRO
- 6 PLASTICO + PAPELÃO
- 7 PAPELÃO + FERRO
- 8 FERRO + PLASTICO + PAPEL + PAPELÃO
- 9 FERRO + PAPEL + PAPELÃO

**5 Presença de lixo #**

- 1 SIM
- 2 NÃO

**6 Indício Rato no Local #**

- 1 SIM
- 2 NÃO

**6.1 Quais ##**

- 1 FEZES FRESCAS
- 2 FEZES SECAS
- 3 RATO DIA
- 4 RATO NOITE
- 5 TRILHAS
- 6 MANCHAS
- 7 ROEDURAS
- 8 FEZES FRESCAS + RATOS NOITE
- 9 FEZES SECAS + RATOS NOITE
- 10 FEZES FRESCAS + FEZES SECAS + RATOS NOITE
- 11 FEZES FRESCAS + FEZES SECAS + RATOS DIA + RATOS NOITE

**7 Acesso livre a animais #**

- 1 Sim
- 2 Não

**7.1 Animais Companhia #**

- 1 Sim
- 2 Não

**7.1.1 Quais #**

- 1 Cão
- 2 Gato + Cão + Gato

**7.2 Animais Produção #**

- 1 Sim
- 2 Não

**7.2.1 Quais #**

- 1 Galinha
- 2 Galinha e outros (suino + Eq....)

**7.3 Gambá #**

- 1 Sim
- 2 Não

**Ficha Individual Roedor Londrina 2007****10 Espécie #**

- 1 Rattus rattus
- 2 Rattus norvegicus
- 3 Mus musculus

**11 Sexo #**

- 1 Macho
- 2 Femea

**12 Peso #**

- 1 0 - 50g
- 2 50 - 100g
- 3 100 - 250 g
- 4 > 250g

**13 Idade #**

- 1 Adulto
- 2 Jovem
- 3 Velho

**14 Isca #**

- 1 Milho
- 2 Bacon
- 3 Laranja
- 4 Queijo