



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RENATA CRISTINA FERREIRA DIAS

**EMERGÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO
ESTADO DO PARANÁ, BRASIL**

Londrina
2016

RENATA CRISTINA FERREIRA DIAS

**EMERGÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO
ESTADO DO PARANÁ, BRASIL**

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

Orientador: Prof^o. Dr^o. Itamar Teodorico Navarro

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Vanete Thomaz Soccol

Londrina
2016

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

Dias, Renata Cristina Ferreira .

Emergência da leishmaniose visceral canina no estado do Paraná, Brasil. / Renata Cristina Ferreira Dias. - Londrina, 2016.

76 f. : il.

Orientador: Itamar Teodorico Navarro.

Coorientador: Vanete Thomaz Soccol.

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

Inclui bibliografia.

1. Leishmania infantum - Tese. 2. zoonose - Tese. 3. saúde pública - Tese. I. Navarro, Itamar Teodorico . II. Soccol, Vanete Thomaz. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina e no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Área de Concentração Sanidade Animal, sob orientação do Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro e coorientação da Prof^a. Dr^a. Vanete Thomaz Soccol.

OS RECURSOS FINANCEIROS PARA O DESENVOLVIMENTO DO PROJETO FORAM
OBTIDOS JUNTO AS AGÊNCIAS E ORGÃOS DE FOMENTO A PESQUISA:

- 1. PROPPG: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina**
- 2. UFPR: Universidade Federal do Paraná**
- 3. SESA: Secretaria de Estado da Saúde**
- 4. 9^aRS: 9^a Regional de Saúde do Estado do Paraná**
- 5. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**

RENATA CRISTINA FERREIRA DIAS

**EMERGÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO
ESTADO DO PARANÁ, BRASIL**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Roberta Lemos Freire
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Fabiana Maria Ruiz Lopes Mori
Centro Universitário Filadélfia - UniFil

Prof^a. Dr^a. Ellen de Souza Marquez
Universidade Estadual Norte do Paraná - UENP

Prof. Dr^a. Thaís Gomes Verzignassi Silveira
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 10 de novembro de 2016.

Aos meus pais Rubens e Romilda (*in memoriam*) com todo meu amor e gratidão, por não medirem esforços para proporcionar os conhecimentos da integridade e perseverança no meu desenvolvimento como ser humano.

Ao meu avô Rubens, minha tia Roseli, meus irmãos Rafael e Ronaldo e à minha cunhada Clarcia pelo incentivo e amizade.

A Deus, pois sem Ele nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.º Dr.º Itamar Teodorico Navarro pela sua orientação, amizade e confiança.

A Prof.ª. Dr.ª. Vanete Thomaz Soccol pela sua coorientação, amizade, ensinamentos e confiança.

Aos coordenadores do curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Prof.ª Dr.ª. Ana Paula F. R. L. Bracarense, Prof.º Dr.º. Amauri Alcindo Alfieri, Prof.º Dr.º. Odilon Vidotto pelo auxílio para a conclusão deste trabalho e pela contribuição que tem dado ao curso.

A Helenice Kieski secretária do curso de pós-graduação em Ciência Animal pela amizade e auxílio na realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pela amizade e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

A Secretaria de Saúde, 9ª Regional de Saúde e Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu pelo apoio para o desenvolvimento deste trabalho, principalmente durante as coletas de amostras em Foz do Iguaçu.

Aos amigos que auxiliaram nas coletas em Foz do Iguaçu e nos exames laboratoriais.

Aos colegas de pós-graduação, estagiários e técnicos do laboratório de Protozoologia e Zoonoses e Saúde Pública pelo auxílio, incentivo e apoio.

Aos estagiários e pós-graduandos do laboratório de biotecnologia da UFPR pelo auxílio, incentivo e apoio.

Aos amigos de Curitiba pelo carinho, apoio, momentos de descontração e por abrir as portas de suas casas e vidas.

A todos os meus amigos e familiares que sempre me apoiaram e incentivaram quando eu mais precisei.

A todos os cães que participaram deste trabalho, sem os quais seria impossível a realização do mesmo.

A todos que de certa maneira ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

*“You know more than you think you know,
just as you know less than you want to know.”*

Oscar Wilde

DIAS, Renata Cristina Ferreira. **Emergência da leishmaniose visceral canina no estado do Paraná, Brasil**. 2016. 76f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a emergência da leishmaniose visceral canina no estado do Paraná, Brasil. Foi realizada a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania infantum* em cães de localidades do município de Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, que fazem fronteira com Argentina e Paraguai. Foram coletadas amostras de sangue de cães para realização de testes sorológicos: teste rápido imunocromatográfico DPP[®] (DPP[®]), teste imunoenzimático indireto (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI). No ano de 2012, foram analisados 285 cães na fronteira com a Argentina e, em 2013 foram coletadas amostras de soro de 396 cães na fronteira com o Paraguai. Utilizando o método de ensaio imunoenzimático (ELISA) como triagem e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) como confirmatório a prevalência foi de 1,8% (5/285) na fronteira com a Argentina e de 3,0 (12/396) na fronteira com o Paraguai. Com o teste imunocromatográfico (DPP[®]) como triagem e ELISA como confirmatório observou-se uma prevalência de 2,5% (7/285) na fronteira com Argentina e 5,1% (20/396) na fronteira com Paraguai, de animais sororreagentes. Uma diferença estatisticamente significativa foi observada, em que a não coleta pública do lixo residencial pelo sistema público apresentou-se como uma variável de risco à leishmaniose visceral canina. Com o objetivo de confirmar a espécie circulante da leishmaniose visceral canina em Foz do Iguaçu foi realizada a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) em amostras de sangue e de aspirado de linfonodo de cães domiciliados no município. Foram utilizados os iniciadores específicos para *Leishmania infantum*, RV1/RV2 e K26F/R, sendo o último utilizado para o sequenciamento e confirmação da espécie dos isolados. Em uma primeira etapa, foram coletadas três amostras de aspirado de linfonodo e, 46 amostras de camada leucocitária. Foram amplificados para os iniciadores RV1/RV2 e K26F/R, 100% (3/3) dos isolados das amostras de aspirado de linfonodo e 0,06% (1/15) de camada leucocitária. Das amostras de camada leucocitária, foram amplificados 66,7% (10/15), para RV1/RV2. Na segunda etapa, foram coletadas amostras de camada leucocitária de 376 cães de 20 localidades, próximas ao Paraguai, rio Paraná, centro e periferia da cidade. Dois isolados (2/376) foram obtidos e amplificados para o iniciador RV1/RV2 e K26F/R. As amostras de camada leucocitária foram amplificadas com RV1/RV2 e, 20,5% (77/376) foram positivas. As análises da sequências de 6 isolados comprovou a espécie como *L. infantum*. A autoctonia dos isolados foi confirmada em inquérito epidemiológico realizada em pesquisa prévia, em que 100% dos cães nunca haviam saído do município. O estudo confirma a emergência da leishmaniose visceral canina no estado do Paraná ao verificar a ocorrência de cães soro reagentes para leishmaniose visceral na fronteira com a Argentina e Paraguai, em área com características ambientais e geográficas que favorecem a dispersão do parasito e, a identificação da *L. infantum* em amostras de cães no município de Foz do Iguaçu. Os dados da pesquisa fornecem subsídios para novas pesquisas com uma abordagem em Saúde Única e, medidas de controle devem ser delineadas e implementadas como o objetivo de controlar a dispersão da zoonose e casos humanos de leishmaniose visceral.

Palavras-chaves: *Leishmania infantum*. Zoonose. Saúde pública. Emergência.

DIAS, Renata Cristina Ferreira. Emergency of canine visceral leishmaniasis in Paraná state, Brasil. 2016. 76p. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the emergence of canine visceral leishmaniasis in Paraná State, Brazil. A research was performed to search for anti-*Leishmania infantum* antibodies in dogs from localities of the city Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, bordering Argentina and Paraguay. Blood samples of dogs were collected for serological tests: immunochromatographic DPP[®] rapid test (DPP[®]), indirect immunoenzymatic assay (ELISA) and indirect immunofluorescence assay (IFA). In the year 2012, 285 dogs were analyzed on the border of Argentina and in 2013, were collected serum samples of 396 dogs on the border of Paraguay. Using indirect immunoenzymatic assay (ELISA) as screening and indirect immunofluorescence assay (IFA) as confirmatory test the prevalence was 1.8% (5/285) in the border of Argentina and 3.0 (12/396) in the border of Paraguay, and with immunochromatographic DPP[®] rapid test (DPP[®]) rapid test as screening and indirect immunoenzymatic assay (ELISA) as confirmatory, 2.5% (7/285) in the border of Argentina and 5,1% (20/396) in the border of Paraguay, of serum reagent animals. A statistically significant difference was observed, in which no public collection of residential waste was presented as a risk variable for canine visceral leishmaniasis. With the aim to confirm the current specie of canine visceral leishmaniasis in Foz do Iguaçu, the technique polymerase chain reaction (PCR) was performed in blood and lymph node aspirate samples of dogs domiciled in the city. Specific primers for *Leishmania infantum* were used, RV1/RV2 and K26F/R, the last one for sequencing and to confirm the specie of the isolates obtained in culture. In a first stage, were collected three lymph node aspirate samples and, 46 buffy coat samples. Were amplified for RV1/RV2 and K26F/R primers of, 100% (3/3) of isolates from lymph node aspirate samples and 0.06% (1/15) from buffy coat. Of the buffy coat samples, 66.7% (10/15) were amplified for RV1 / RV2. In a second step, the buffy coat samples from 376 dogs of 20 locations were collected near the Paraguai, Paraná river, downtown and outskirts of the city. From this, two isolates (2/376) were obtained and amplified for RV1/RV2 and K26F/R. The buffy coat samples were amplified with RV1/RV2, and 20.5% (77/376) were positive. The sequences analysis of 6 isolates proved the specie as *L. infantum*. The isolates autochthony were confirmed by epidemiological survey carried out in previous research, in which 100% of the dogs had never left city. The study confirms the emergence of canine visceral leishmaniasis in Paraná due to the occurrence of dogs serum reagent for visceral leishmaniasis on the border of Argentina and Paraguay, in a area with environmental and geographical characteristics that favor the spread of the parasite and, the identification of *L. infantum* in dogs samples from Foz do Iguaçu city. The research data provides aids for further researches with a One Health approach and, control measures should be designed and implemented with the aim of controlling the spread of the zoonosis and human cases of visceral leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania infantum*. Zoonoses. Public health. Emergence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1** - Cladograma com a relação dos 15 complexos filogenéticos do gênero *Leishmania*, construído com base em 80 zimodemas e 13 diferentes isoenzimas, mostrando a origem monofilética do gênero..... 15
- Figura 2** - Locais de captura de flebotomíneos na área urbana de Foz do Iguaçu, Estado do Paraná, Brasil, 2012 17
- Figura 3** - Densidade de casos de leishmaniose visceral humana por segundo nível administrativo, Américas, 2001 -2014..... 18

ARTIGO 1. PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania infantum* E ANÁLISE DE VARIÁVEIS ASSOCIADAS À LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA REGIÃO DE TRÍPLICE FRONTEIRA DE FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ, BRASIL.

- Figura 1** – Mapa apresentando a localização da tríplice fronteira: Foz do Iguaçu (Brasil); *Ciudad del Este* (Paraguai); *Puerto Iguaçu* (Argentina)..... 36
- Figura 2** – Dispersão das amostras de cães reagentes em mais de um teste sorológico (teste imunocromatográfico, teste imunoenzimático indireto e reação de imunofluorescência indireta) no município de Foz do Iguaçu, Paraná, 2012 – 2013..... 39

ARTIGO 2. PRIMEIRO REGISTRO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA AUTÓCTONE NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Leishmania infantum*.

- Figura 1 -** Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando o perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de PCR de 5 isolados de *Leishmania* usando como iniciadores RV1 e RV2. 61
- Figura 2 -** Localização geográfica dos isolados de *Leishmania infantum* sequenciados no município de Foz do Iguaçu, 2012-2013 62
- Figura 3 -** Árvore filogenética relacionando as sequências da amostra de referência *Leishmania infantum* MHOM/FR/71/LEM75 com seis isolados, gerada pelo programa MEGA versão 5 utilizando o modelo Tamura-Nei para medir a distância evolutiva. Os números acima dos ramos indicam a porcentagem de *bootstrap* 63

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1. PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania infantum* E ANÁLISE DE VARIÁVEIS ASSOCIADAS À LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA REGIÃO DE TRÍPLICE FRONTEIRA DE FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ, BRASIL.

- Tabela 1 -** Prevalência de anticorpos anti-*Leishmania infantum* nas técnicas de diagnóstico teste imunocromatográfico (DPP[®]), teste imunoenzimático indireto (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em cães de localidades próximas às fronteiras do município de Foz do Iguaçu, Paraná, com a Argentina e Paraguai - 2012 e 2013..... 38
- Tabela 2 -** Dados epidemiológicos e características dos cães estudados no município de Foz do Iguaçu, Paraná, na fronteira com Argentina, 2012 40
- Tabela 3 -** Dados epidemiológicos e características dos cães estudados no município de Foz do Iguaçu, Paraná, na fronteira com Paraguai, 2013 41
- Tabela 4 -** Frequência das características do ambiente e dos cães analisados em Foz do Iguaçu, PR, na fronteira com a Argentina e Paraguai, 2012 e 201342

ARTIGO 2. PRIMEIRO REGISTRO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA AUTÓCTONE NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Leishmania infantum*

- Tabela 1 -** Comparação da similaridade genética de sequências dos isolados de *Leishmania* obtidos neste trabalho com *L. infantum*, *L. chagasi* e *L. donovani*, score total, identidade genética e número de acesso ao GenBank (NCBI) 63

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

μL	microlitro
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
<i>D.O.</i>	Densidade óptica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i>
DPP [®]	Teste imunocromatográfico/Dual path platform
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Teste imunoenzimático indireto
G	Gravidade
HASPB	<i>Hydrophilic acylated surface protein B</i>
IgG	Imunoglobulina G
kDNA	Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto
LV	Leishamaniose visceral
LVC	Leishamaniose visceral canina
LVH	Leishamaniose visceral humana
PCR	Reação em cadeia pela Polimerase
NCBI	GenBank-National Center or Biotechnology Information
Ng	Nanograma
Nm	<i>Nanômetro</i>
NNN	Meio de cultura Novy, McNeal e Nicolle
Pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RNase	Ribonuclease
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
UI	Unidades internacionais

SUMÁRIO

1	REFERENCIAL TEÓRICO	14
1.1	ETIOLOGIA.....	14
1.2	VETOR	16
1.3	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.	17
1.4	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	19
1.5	DIAGNÓSTICO	20
1.6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
1.7	REFERÊNCIAS	23
2	OBJETIVOS	31
2.1	OBJETIVO GERAL.....	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3	HIPÓTESES	32
4	ARTIGO I – Prevalência de anticorpos anti-<i>Leishmania infatum</i> e análise de variáveis associadas à leishmaniose visceral canina na região de tríplice fronteira de Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil	33
	RESUMO	33
	ABSTRACT	33
4.1	INTRODUÇÃO	34
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.2.1	Área de Estudo	35
4.2.2	Amostragem e local de coleta	36
4.2.3	Sorodiagnóstico	37
4.2.4	Análise Estatística	37
4.3	RESULTADOS	38
4.4	DISCUSSÃO	43
4.5	REFERÊNCIAS	47

5	ARTIGO II – Primeiro registro de leishmaniose visceral canina autóctone no estado do Paraná, Brasil: isolamento e identificação molecular de <i>Leishmania infantum</i>	54
	RESUMO	54
	ABSTRACT	55
5.1	INTRODUÇÃO	55
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	57
5.2.1	Área de estudo	57
5.2.2	Amostragem	57
5.2.3	Isolamento do parasito <i>Leishmania infantum</i>	57
5.2.4	Extração de DNA de camada leucocitária	58
5.2.5	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	59
5.2.6	Sequenciamento	59
5.2.7	Análise das sequências	60
5.3	RESULTADOS	60
5.4	DISCUSSÃO	64
5.5	REFERÊNCIAS	66
6	CONCLUSÃO	72
	ANEXOS	73
	ANEXO I – TERMO DE CIÊNCIA E AUTORIZAÇÃO	73
	ANEXO II – INVESTIGAÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL	74

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 ETIOLOGIA

A leishmaniose visceral (LV) é causada por espécies de protozoário intracelular obrigatório, *Leishmania* (NICOLLE, 1908), pertencentes ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* (LAISON; SHAW, 1987).

No Velho Mundo ocorrem, principalmente, a *L. donovani* (LAVERAN; MESNIL, 1903) e a *L. infantum* (NICOLLE, 1908), e há a possibilidade de uma terceira espécie, a *L. archibald*, encontrada no Sudão (LAISON; SHAW, 1987; RIOUX et al., 1990; PRATLONG et al., 2001). A *L. donovani*, presente na Etiópia, Sudão e Índia, é considerada uma antroponose (HARALAMBOUS et al., 2008), entretanto há uma suspeita de transmissão zoonótica em manguços (*Herpestes ichneumon*) encontrados infectados no Sudão (ELNAIEM et al., 2001) e, detecção de anticorpos circulantes em animais domésticos no Sudão (DEREURE et al., 2003) e no subcontinente indiano (ALAM et al., 2011).

A *L. infantum* possui característica zoonótica e os cães desempenham papel fundamental na epidemiologia, sendo considerados os principais reservatórios para a doença humana, principalmente devido à riqueza de formas amastigotas na pele do animal. É encontrada no sudoeste da Europa, no norte e leste da África, na China, no Oriente Médio e, no Mediterrâneo (PRATLONG et al., 2001; ALVAR et al., 2004; HARALAMBOUS et al., 2008; SCHIMMING, 2012; GRANO et al., 2014).

Nas Américas há registro da doença e do parasito tanto na América do Sul como na América Central (LAINSON; SHAW, 1987; DEDET, 2009). Cunha e Chagas em 1937 atribuíram a doença na América do Sul à *Leishmania chagasi*. Entretanto a nomenclatura e, a origem do agente etiológico da LV nestas áreas são objetos de debate e especulação (DANTAS-TORRES, 2006).

Com base no perfil isoenzimático de cepas do parasito isoladas no Novo e Velho Mundo, foi possível demonstrar que *L. infantum* e *L. chagasi* são semelhantes (MORENO et al., 1986). Riox et al. (1990) propuseram uma nova classificação para o gênero *Leishmania* onde passaria a ser sinônimo de *L. infantum* por respeito às regras de nomenclatura. No final da década de 90, estudos utilizando métodos como amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD), análise da sequência de DNA da protease de superfície gp63 e hibridização com a sonda de DNA Lmet9, em isolados de diferente origem geográfica

e hospedeiro, não foi capaz de distinguir a *L. chagasi* da *L. infantum* (MAURÍCIO et al., 1999).

Autores como: Thomaz-Soccol et al. (1993a), Mauricio et al., (2000) e Dantas-Torres, (2006), propuseram manter *L. chagasi* como sinônimo à *L. infantum*, entretanto, algumas publicações demonstram haver diferenças genéticas entre esses dois organismos (DANTAS-TORRES, 2006; LAISON, 2010). Dantas-Torres (2006) sugeriu que a reclassificação do gênero é necessária, com a inclusão de outras subespécies, baseadas no mesmo critério usado para a separação das cepas de *L. infantum*.

Laison (2010) classificou o protozoário na seguinte posição sistemática:

Reino: Protozoa Goldfuss, 1818

Filo: Euglenozoa Cavalier-Smith, 1998

Classe: Kinetoplastea: Honigberg, 1963

Ordem: Trypanosomatida Kent, 1880

Família: Trypanosomatidae Doflein, 1901

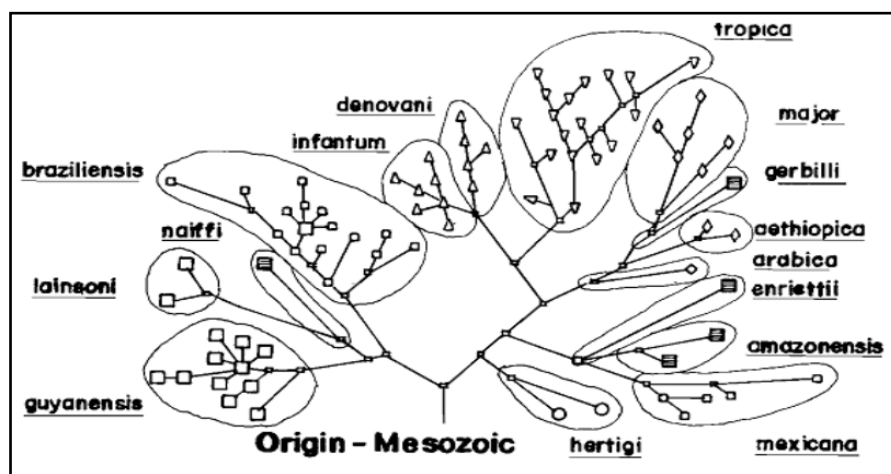
Gênero: *Leishmania* Ross, 1903

Subgênero: *Leishmania* Ross, 1903

Subgênero: *Viannia* Lainson & Shaw, 1987

Thomaz - Soccol et al. (1993a; 1993b) propuseram a divisão dos subgêneros em complexos filogenéticos, conforme a figura 1.

Figura 1 - Cladograma com a relação dos 15 complexos filogenéticos do gênero *Leishmania*, construído com base em 80 zimodemas e 13 diferentes isoenzimas, mostrando a origem monofilética do gênero.



Fonte: Thomaz-Soccol et al. (1993a; 1993b)

1.2 VETOR

A leishmaniose visceral (LV) é transmitida pela picada de fêmeas de flebotomíneos (ordem Diptera, família Psychodidae; subfamília Phlebotominae), insetos hematófagos de hábitos noturno ou crepuscular, que se reproduzem em matéria orgânica em decomposição (DEANE, 1955; COSTA et al., 2011; READY, 2013)

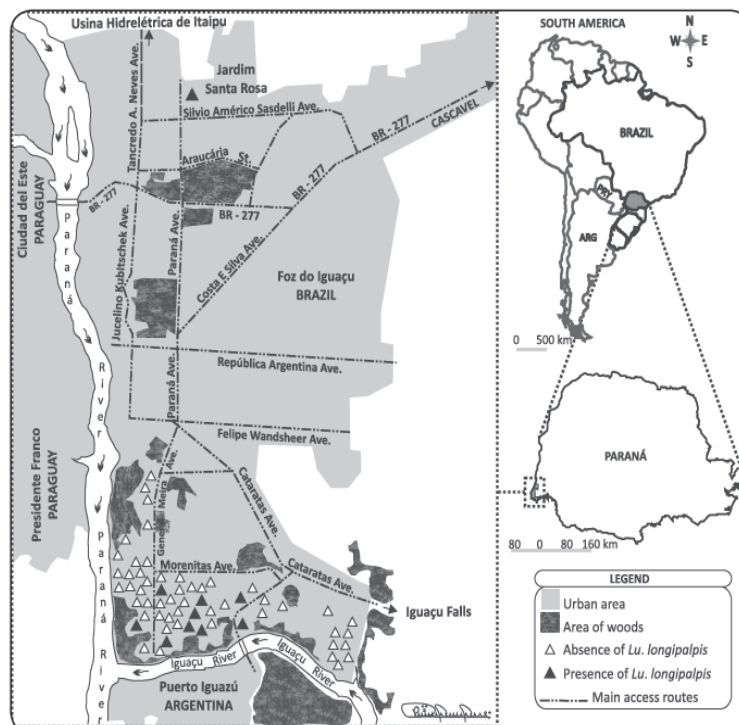
No Novo Mundo o vetor é o *Lutzomyia longipalpis*, já no Velho Mundo várias espécies estão envolvidas como vetor da LV, principalmente as que pertencem ao subgênero *Phlebotomus* (*Larroussious*), como *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus ariasi* e *Phlebotomus neglectus* (DEANE, 1955; GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

No Brasil, o principal vetor é a espécie *Lu. longipalpis* (LUTZ; NEIVA, 1912), conhecido popularmente, por mosquito-palha, birigui ou tatuquiras. Outras espécies de flebotomíneos são consideradas potenciais transmissores da doença, como o *Lu. cruzi* considerado o vetor da LV no estado do Mato Grosso do Sul (SANTOS et al., 1998; COUTINHO et al., 2008; SCHIMMING, 2012).

A ocorrência de uma doença, numa determinada área, depende fundamentalmente da presença do vetor infectado e de um hospedeiro reservatório igualmente susceptível (COUTINHO et al., 1982). No Brasil, verifica-se a dispersão do *Lu. longipalpis* para a região Sul do país, quando em 2008 foi identificada a presença do vetor em municípios do Rio Grande do Sul que fazem fronteira com a Argentina (BRASIL, 2010; TARTAROTTI et al., 2011; MASSIA et al., 2016). No estado de Santa Catarina, a capital Florianópolis, apresentou casos de leishmaniose visceral canina (LVC) sem a identificação do vetor (STEINDEL et al., 2013).

No Estado do Paraná a presença do *Lu. longipalpis* foi registrada durante pesquisa em 2012, em 61 residências de seis bairros na área urbana do município de Foz do Iguaçu (Figura 2). A identificação no Paraná contribui para o conhecimento da distribuição geográfica do vetor no Brasil e sugere que esta espécie esteja dispersa em toda a área urbana de Foz do Iguaçu (SANTOS; FERREIRA; BISSETO-JUNIOR, 2012).

Figura 2 - Locais de captura de flebotômíneos na área urbana de Foz do Iguçu, Estado do Paraná, Brasil, 2012.



Fonte: Santos; Ferreira; Bisseto-Junior, 2012

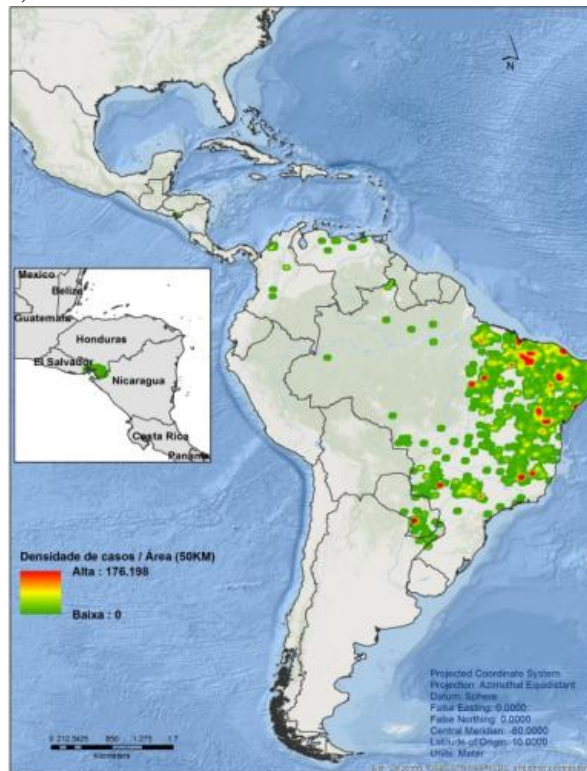
1.3 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A leishmaniose visceral humana (LVH) é uma doença com ampla distribuição geográfica e estima-se 300.000 novos casos por ano (DAGNE, 2014) e uma taxa de letalidade de 10% (ALVAR et al., 2012). Dos casos de LVH, 90% ocorrem em áreas rurais e de periferia de cinco países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (GRAMICIA; GRADONI, 2005).

Nas Américas, a LVH é endêmica em 12 países, e apresenta três cenários epidemiológicos: países com transmissão esporádica (Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Bolívia, Guiana e México), países com transmissão estável ou controlada (Colômbia e Venezuela) e países com transmissão em expansão (Argentina, Brasil e Paraguai). No período de 2001 a 2014 foram registrados um total de 48.720 casos de LVH e média anual de 3.480 casos, sendo que 96,42% (46.976) estão concentrados no Brasil. Observa-se uma tendência estável de casos entre os anos de 2004 a 2012, no entanto, a partir do ano de 2009 ocorreu incremento de casos nos países do Cone Sul e redução nos países Andinos representados por Venezuela e Colômbia. A partir de 2012 foram registrados 654

mortes causadas por LVH, com letalidade média de 6,6% (OPAS, 2016). Analisando a densidade de casos, desagregados ao segundo nível administrativo subnacional e prevendo um raio de 50 km, observa-se uma concentração de casos na grande região de Assunção, no Paraguai e em municípios das regiões Nordeste, Sudeste e Centro Oeste do Brasil (Figura 3) (OPAS, 2016).

Figura 3 - Densidade de casos de leishmaniose visceral humana por segundo nível administrativo, Américas, 2001 -2014.



Fonte: OPAS, 2016.

No Brasil a LV é uma zoonose endêmica presente em 21 dos 27 estados do país, com uma maior concentração na região nordeste (BRASIL, 2010; BRASIL, 2014). A LV foi considerada primeiramente uma doença rural no Brasil, entretanto, depois de 1980, a doença vem ocorrendo em grandes cidades de todo o país (WERNECK, 2014).

Na região Sul, os primeiros casos autóctones de LVC foram registrados a partir de 2008 no estado do Rio Grande do Sul (TARTAROTTI et al., 2011). No estado de Santa Catarina os primeiros casos autóctones de LVC foram relatados a partir de 2011 no município de Florianópolis (FIGUEIREDO et al., 2012; STEINDEL et al., 2013) e, posteriormente, nos municípios de São Miguel do Oeste e Descanso, fronteira com Argentina e o estado do Paraná (MAZIERO et al., 2014).

1.4 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A *Leishmania* possui um ciclo de vida dimórfico. No vetor está presente a forma promastigota (flagelada) da *Leishmania*, que são inoculadas na derme do hospedeiro através da picada do flebotomíneo fêmea infectado. Macrófagos fagocitam as promastigotas, onde no compartimento fagolisossomal perdem o flagelo e tornam-se na forma amastigota (aflagelada). Amastigotas se replicam nos macrófagos, provocando a destruição celular e infectando progressivamente mais fagócitos (PALTRINIERI et. al, 2010; LANGONI et al., 2015; ROCHA, 2015).

O cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o reservatório principal do agente etiológico da LV devido a alta susceptibilidade à infecção e maior proximidade dos humanos, além do parasitismo alto na pele, que contribui na manutenção e expansão do ciclo de transmissão no ambiente doméstico e peridoméstico (SILVA; MADEIRA; FIGUEIREDO, 2015).

A LVC, causada pela *Leishmania infantum*, é uma doença sistêmica essencialmente crônica, que pode ter uma apresentação clínica que varia de assintomática a sistêmica que, em animais susceptíveis, causa geralmente anemia, linfadenomegalia generalizada, hepatoesplenomegalia, perda progressiva de peso, epistaxe, lesões cutâneas, renais, oftálmicas, digestivas, locomotoras e neurológicas (MARCONDES; ROSSI, 2013; GRANO et al., 2014; CRMV, 2015). Os cães apresentam um período de incubação que varia de 3 meses a vários anos (BRASIL, 2011).

A infecção canina no Brasil coexiste com a doença humana na maioria dos focos conhecidos (AGUIAR et al., 2007). Nos humanos a LV apresenta-se como uma doença crônica, sistêmica, caracterizada por febre, de longa duração, perda de peso, astenia e anemia, dentre outras manifestações, principalmente a esplenomegalia. Quando não tratada pode evoluir para óbito em mais de 90 % dos casos (ROCHA, 2015). O Período de incubação no homem varia de 10 dias a 24 meses, com média de 2 a 6 meses (BRASIL, 2011).

1.5 DIAGNÓSTICO

Normalmente os casos de LVC precedem os casos humanos, já que os cães são os principais reservatórios domésticos e fundamentais na manutenção do ciclo da doença (KRAUSPENHAR et al., 2007).

O diagnóstico canino é complexo, visto que os sinais clínicos são semelhantes a outras doenças, assim, também deve ser baseado na epidemiologia da doença e em testes parasitológicos, sorológicos, moleculares e imunocitoquímicos (GONTIJO; MELO, 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Como a distribuição geográfica da LV é variável, torna-se essencial descobrir onde o cão vive ou se viajou para área endêmica e, conseqüentemente exposto ao vetor. Também é importante verificar se o cão recebeu tratamento preventivo que seja efetivo contra flebotomíneos ou algum tratamento administrado que possa interferir no sistema imune (PALTRINIERE et al., 2010).

Durante a anamnese deve ser incluída a coleta de informações dos sinais detectados pelo proprietário que sejam compatíveis com LV, sendo que os sinais clínicos mais comumente observados nos cães são: linfadenomegalia, onicogribose, emaciação, queda de pelos, lesões ulcerativas, prurido, pelos opacos, diarreia, ceratoconjutivite, esplenomegalia, hemorragia intestinal, edema de patas, hiperqueratose, dentre outros. Em estágios mais avançados, observa-se também paresia das patas posteriores, caquexia, inanição, evoluindo para a morte (THOMAZ-SOCCOL et al., 2009; PALTRINIERE et al., 2010; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Para uma melhor acuidade diagnóstica da LV faz-se necessário o uso de uma combinação de técnicas, uma vez que não está disponível um método que isoladamente reúna todas as características consideráveis desejáveis para o diagnóstico, tais como: fácil execução, custo acessível, rapidez e especialmente sensibilidade e especificidade altas (LANGONI et al., 2015).

O “padrão ouro” para o diagnóstico da leishmaniose é o diagnóstico parasitológico de baço, medula, ou lesão de pele. Os parasitas podem ser encontrados em linfonodos, biópsia de fígado, amostras de aspirados ou na camada leucocitária do sangue periférico. As formas amastigotas aparecem arredondadas ou ovaladas, medindo de 2 a 3 μm de comprimento, intracelular, em monócitos e macrófagos (SUDAR; RAI, 2002).

Para melhorar a sensibilidade na detecção dos parasitas pode ser realizada a cultura de *Leishmania*, que se mantém no meio artificial na forma de promastigota. O método de cultura de parasitas é caro e demanda muito tempo, além de ser necessário habilidade na execução, equipamentos de alto custo e uso restrito na rotina de clínica (SUNDAR; RAI, 2002).

Técnicas sorológicas são frequentemente utilizadas para diagnosticar leishmaniose e são instrumentos indispensáveis para os estudos epidemiológicos (OLIVEIRA et al., 2015). O diagnóstico sorológico da LVC recomendado pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose até o ano de 2012 era composta pelo teste imunoenzimático (ELISA) como método de triagem e o teste de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) como confirmatório (BRASIL, 2003; BRASIL, 2011b). A fim de melhorar a técnica de diagnóstico da LVC o Ministério da Saúde estabeleceu a substituição deste protocolo, com a implantação do teste rápido imunocromatográfico *Dual Path Platform* (DPP®/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) como triagem e ELISA como confirmatório (BRASIL, 2011b), levando em consideração as vantagens e facilidades no DPP® e ao fornecimento de resultados semi-automatizados sem subjetividade (LANGONI et al., 2015).

A RIFI demonstra sensibilidade que varia de 90 a 100% e especificidade aproximada de 80% para amostras de soro, apresentando ponto de corte na titulação ≥ 40 . A especificidade desse teste é prejudicada devido à presença de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos e os da leishmaniose tegumentar americana (CAMARGO; REBONATO, 1969; ALVES; BEVILACQUA, 2004; LUCIANO et al., 2009; BRASIL, 2011). Também apresenta como desvantagem a necessidade de pessoas bem treinadas e consumo de tempo considerável para a execução do teste (MARCONDES et al., 2011).

A técnica de ELISA tem sido utilizada como uma ferramenta de diagnóstico sorológico para quase todas as doenças infecciosas, incluindo leishmaniose. É um teste com uma sensibilidade que varia de 80% a 99,5% e especificidade de 81% a 100%, que aumenta quando antígenos recombinantes são utilizados (SUNDAR; RAI, 2002; SOLANO GALLEGOS et al., 2009; MARCONDES et al., 2011).

Os antígenos utilizados nos testes diagnósticos de RIFI e ELISA são geralmente derivados de cultura de promastigotas, parasitas intactos ou moléculas solúveis. Estes antígenos apresentam reações cruzadas com outras espécies da família

Trypanosomatidae, mesmo com microrganismos filogeneticamente distantes (LUCIANO et al., 2009).

O teste de ELISA foi substituído pelo teste imunocromatográfico DPP[®] na triagem da LVC (BRASIL, 2011b) devido a rapidez do teste, sua sensibilidade e especificidade e a utilização tanto em condições a campo quanto em pesquisas, além da importância nas práticas veterinárias de rotina. Outra vantagem é a necessidade de mínimo de equipamentos e treinamento de pessoal, além de serem ferramentas importantes para diagnóstico sorológico de leishmaniose canina clínica e subclínica (OTRANTO et al., 2005).

O DPP[®] utiliza a tecnologia de plataforma de duplo percurso garantindo uma alta sensibilidade para o teste e oferecendo o resultado em 15 minutos (SANTIS et al., 2013). É um teste qualitativo para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* que utiliza como antígeno a proteína recombinante K39 (rK39), localizada no cinetoplasto de *Leishmania*, que apresenta sequência idêntica em sete espécies de *Leishmania*. A conservação de uma sequência de 39 aminoácidos repetitivos confere a esta proteína epítomos de alta densidade e identidade específica com as espécies *L. donovani* e *L. infantum*. A reatividade com outros tripanossomatídeos mostrou-se negativa e a presença de anticorpos anti-rK39 indicaria a infecção ativa (BISUGO et al., 2007; SANTIS et al., 2013). Os testes imunocromatográficos, que utilizam o antígeno recombinante rK39 em cães possuem uma sensibilidade que varia de 72-97% e especificidade de 61-100% (REITHINGER et al., 2002; DA COSTA et al., 2003; METTLER et al., 2005; BISUGO et al., 2007; LEMOS et al., 2008; LIMA et al., 2010).

A PCR e suas variações (ex.: *nested*, *multiplex*, *real-time*) contribuem para a detecção dos agentes etiológicos de doenças em humanos e animais, incluindo *Leishmania* spp., com alta sensibilidade e especificidade (ALBUQUERQUE, 2014). A detecção de DNA é possível em uma variedade de tecidos, incluindo medula óssea, biópsias cutâneas, aspirados de linfonodos, sangue, cortes histológicos de tecidos parafinados, e também no vetor (BRAGA et al., 2014; LANGONI et al., 2015). Além da pequena quantidade necessária de material biológico, outro ponto importante da PCR é a diferenciação dos agentes infecciosos, que pode ser feita pela análise de polimorfismo dos alvos (BHATTARAI et al., 2009). Iniciadores elaborados para amplificar sequências conservadas encontradas em minicírculos de DNA cinetoplasto de diferentes espécies de *Leishmania* foram testadas em vários tecidos de relevância (SUNDAR; RAI, 2002), e são considerados bons alvos no genoma da *Leishmania* por apresentar mais de 10.000 cópias por célula, o que aumenta a sensibilidade de detecção nos procedimentos (BIGELI; OLIVEIRA-JUNIOR; TELES, 2012).

1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O risco de estabelecimento da doença em novas áreas indica a necessidade de atenção por parte de médicos veterinários na identificação de novos casos, e de uma constante vigilância por parte de agentes de saúde pública (MARCONDES; ROSSI, 2013).

O controle da transmissão urbana da LV é laborioso e de resultados nem sempre satisfatórios a partir de uma única aplicação residual de inseticida. Portanto, outras medidas mais permanentes são indicadas a fim de alterar as condições do meio, que propiciem o estabelecimento de criadouros de formas imaturas do vetor, como o manejo ambiental, através da limpeza de quintais, terrenos e praças públicas, eliminação dos resíduos sólidos orgânicos e destino adequado dos mesmos, certamente contribuirão para evitar ou reduzir a proliferação do vetor (BRASIL, 2003).

Medidas preventivas devem ser realizadas com estudos que possam prever a situação epidêmica em áreas próximas a aglomerações urbanas, para que ações de controle sejam efetuadas antes da manifestação das epidemias sobre a população. A compreensão dos fatores socioambientais que influenciam os agravos que acometem a saúde das populações, só pode ser realizada de maneira eficaz através da visualização dos fatos por vários ângulos da ciência (FREITAS; FEITOSA, 2014).

1.7 REFERÊNCIAS

AGUIAR, P. H. P.; SANTOS, S. O.; PINHEIRO, A. A.; BITTENCOURT, D. V. V.; COSTA, R. L. G.; JULIÃO, F. S.; SANTOS, W. L. C.; BARROUIN-MELO, S. M. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 4, p. 283-94, 2007.

ALAM, M. S.; GHOSH, D.; KHAN, M. G.; ISLAM, M. F.; MONDAL, D.; ITOH, M.; ISLAM, N.; HAQUE, R. Survey of domestic cattle for anti-*Leishmania* antibodies and *Leishmania* DNA in a visceral leishmaniasis endemic area of Bangladesh. **BMC Veterinary Research**, v. 7, n. 27, 2011.

ALBUQUERQUE, S. C. G. Otimização de ferramentas moleculares baseadas em *multiplex* PCR para inclusão de controles de qualidade amostral no diagnóstico das leishmanioses. **Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Saúde)** - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco. 2014.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-88. 2004.

ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN-BOER, M.; WHO. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, 2012.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, p. 259-65, 2004.

BHATTARAI, N. R.; VAN-DER-AUWERA, G.; KHANAL, B.; DE-DONCKER, S.; RIJAL, S.; DAS, M. L.; URANW, S.; OSTYN, B.; PRAET, N.; SPEYBROECK, N.; PICADO, A.; DAVIES, C.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J. C. PCR and direct agglutination as *Leishmania* infection markers among healthy Nepalese subjects living in areas endemic for Kala-Azar. **Tropical Medicine and International Health**, v. 14, n. 4, p. 404-11, 2009.

BIGELI, J. G.; OLIVEIRA-JUNIOR, W. P.; TELES, N. M. M. Diagnosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 18-23, 2012.

BISUGO, M. C.; ARAÚJO, M. F. L.; TANIGUCHI, H. H.; ACUNHA, E.; SANTOS, A. A.; SPESSOTO, J. M.; KANETO, C. N.; CAMARGO, C. V. O.; POLIZEL, M. A.; VIGILATO, M. A. N.; NEGREIROS, C. M. S.; OKAGIMA, M.; GONÇALVES, N. M.; LUNDSTEDT, L. P.; ANDRADE, A. M.; LIMA, V. M. F.; TOLEZANO, J. E. Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização do teste rápido com antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas do Estado de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 185-93, 2007.

BRAGA, A. R. C.; LANGONI, H.; LUCHEIS, S. B. Evaluation of canine and feline leishmaniasis by the association of blood culture, immunofluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n.5, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde: Departamento de Vigilância Epidemiológica: **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, p. 9-18, 2003.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade**. Brasília, 2011a.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica conjunta nº01/2011- CGDT-CGLAB-DEVIT/SVS/MS. **Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC)**. Brasília, 2011b.

BRASIL. Portal saúde. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2013.** 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>> Acessado em: 25/12/2015.

CAMARGO, M. E.; REBONATO, C. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, p. 500–5, 1969.

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 232-42, 2011.

COUTINHO-ABREU, I. V.; SONODA, I. V.; FONSECA, J. A.; MELO, M. A.; BALBINO, V. Q.; RAMALHO-ORTIGAO, M. *Lutzomyia longipalpis* s.l. in Brazil and the impact of the São Francisco River in the speciation of this sand fly vector. **Parasites & Vectors**, v. 1, n. 16, 2008.

CRMV – Conselho Regional de Medicina Veterinária. **Manual Técnico de Leishmanioses Caninas: Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral.** Curitiba; 2015.

DA COSTA, R. T.; FRANÇA, J. C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E.; GENARO, O.; CAMPOS-NETO, A. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens k39 and k26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, p. 678-82, 2003.

DAGNE, M. E. D. Strategic framework for leishmaniasis control in the WHO European Region 2014–2020. **World Health Organization**, 2014.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 117-8, 2006.

DEANE, L. M. Leishmaniose visceral no Brasil – estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará. Rio de Janeiro: **Serviço nacional de educação sanitária**, 161 p., 1955.

DEDET, J. P.; DEREURE, J.; VANWAMBEKE, S. O.; MALÉ, P.; MARTINEZ, S.; PRATLONG, F.; BALARD, Y. The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in southern France. **Vector Borne and Zoonotic Diseases** v. 9, n. 6, p. 687-94, 2009.

DEREURE, J.; EL-SAFI, S. H.; BUCHETON, B.; BONI, M.; KHEIR, M. M.; DAVOUST, B.; PRATLONG, F.; FEUGIER, E.; LAMBERT, M.; DESSEIN, A.; DEDET, J. P. Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host–parasite relationships. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1103–8, 2003.

ELNAIEM, D. A.; HASSAN, M.M.; MAINGON, R.; NURELDIN, G. H.; MEKAWI, A. M.; MILES, M.; WARD, R. D. The Egyptian mongoose, *Herpestes ichneumon*, is a possible

reservoir host of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. **Parasitology**, v. 122, p. 531–6, 2001.

FIGUEIREDO, F. B.; LIMA-JÚNIOR, F. E. F.; TOMIO, J. E.; INDÁ, F. M. C.; CORRÊA, G. L. B.; MADEIRA, M. F. Leishmaniose Visceral Canina: Dois casos autóctones no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 1, p. 1026, 2012.

FREITAS, L. C. S; FEITOSA, A. C. Espaço e saúde: condições socioambientais favoráveis à leishmaniose visceral (LV) na bacia do rio Anajá em Paço do Lumiar – MA. **Hygeia**, v. 10, n. 18, p. 33-45, 2014.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-49, 2004.

GRANO, F. G.; MELO, G. D.; BELINCHÓN-LORENZO, S.; MACHADO, G. F.; GOMEZ-NIETO, L. C.. First detection of *Leishmania infantum* DNA within the brain of naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 204, p. 376-80, 2014.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1169–80, 2005.

HARALAMBOUS, C.; ANTONIOU, M.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.; SOTERIADOU, K. Development of a molecular assay specific for the *Leishmania donovani* complex that discriminates *L. donovani/Leishmania infantum* zymodemes: a useful tool for typing MON-1. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 60, p. 33–42, 2008.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A. A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.907-10, 2007.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: **The leishmaniasis in biology and medicine** (ed. Peters, W. & Killick-Kendrick,R.), Academic Press, London. p. 1–120, 1987.

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

LANGONI, H.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; SCREMIN, C.; TRONCARELLI, M. Z.; CAMARGO, J. B.; MACHADO, J. G.; ULMANN, L. S.; GUIMARÃES, F. F.; SILVA, D. B.; SÁNCHEZ, G. B.; LUCHEIS, S. B. Detecção molecular de *Leishmania* spp. em material de hemocultura, e diagnóstico sorológico para leishmaniose em cães procedentes do bairro da Conquista, São Manuel-São Paulo, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**. v. 22, n. 4, p. 580-90, 2015.

LAVERAN, A.; MESNIL, F. Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lav. et Mesn.), parasite d'une fièvre de l'Inde. **Comptes rendus de l'Académie des sciences**, v. 137, p. 957-61, 1903.

- LEMOS, E. M.; LAURENTI, M. D.; MOREIRA, M. A. B.; REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; RAYCHAUDHURID, S.; DIETZEA, R. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect™) in dogs with and without signs of the disease. **Acta Tropica**, v. 107, p. 205–7, 2008.
- LIMA, V. M. F.; FATTORI, K. R.; MICHELIN, A. F.; NETO, L. S.; VASCONCELOS, R. O. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 330–3, 2010.
- LUCIANO, R. M.; LUCHEIS, S. B.; TRONCARELLI, M. Z.; LUCIANO, D. M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 181–7, 2009.
- LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 4, p. 84–95, 1912.
- MASSIA, L. I.; LAMADRIL, R. D. Q.; WELICKS, J. R.; BITTENCOURT, R. A.; BITTENCOURT, D. G.; MARQUES, G. D.; CELIS, E. L. H.; PELLEGRINI, D. C. P. Canine visceral leishmaniasis in three districts of Uruguaiana – RS. **Vigilância sanitária em debate**, v. 4, n. 1, p. 113–9, 2016.
- MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, 188–9, 2000.
- MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genetic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, p. 237–46, 1999.
- MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; GOMES, A. A.; SILVA, A. R.; VIEIRA, R. F.; CAMACHO, A. A.; QUINN, J.; CHANDRASHEKAR, R. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1–2, p. 15–9, 2011.
- MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341–52, 2013.
- METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5515–9, 2005.
- MAZIERO, N.; THOMAZ-SOCCOL, V.; STEINDEL, M.; LINK, J. S.; ROSSINI, D.; ALBAN, S. M.; NASCIMENTO, A. J. Rural–urban focus of canine visceral leishmaniosis in the farwestern region of Santa Catarina state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 92–5, 2014.

MORENO G., RIOUX J.A., LANOTTE PRATLONG F., SERRES E. Le complexe *Leishmania donovani* s.l. Analyse enzymatique et traitement numerique. Individualization du Complex *L. infantum*. A propos de 146 souches originaires de l ,, Ancien et Nouveau Monde. p. 119-128, In J. A. Rioux (ed.), *Leishmania*. Taxonomie et phylogenèse. Applications éco-épidémiologiques. **IMEEE, Montpellier, France**, 1986.

NICOLLE, C. J. Sur trois cas d'infection splénique infantile à corps de Leishman observes en Tunisie. **Les archives de l'Institut Pasteur Tunis**, v. 3, p. 1-26, 1908.

OLIVEIRA, G. C.; PAIZ, L. M.; MENOZZI, B. D.; LIMA, M. S.; MORAES, C. C. G.; LANGONI, H. Antibodies to *Leishmania* spp. in domestic felines. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 24, n. 4, p. 464-70, 2015.

OTRANTO, D.; PARADIES, P.; SASANELLI, M. T.; LEONE, N.; CAPRARIIS, D.; CHIRICO, J.; SPINELLI, R.; CAPELLI, G.; BRANDONISIO, O. Leishmaniasis Recombinant K39 Dipstick Immunochromatographic Test: A new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 32-7, 2005.

OPAS - ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas. **Informe Leishmanioses**, n. 4, p. 4-6, 2016.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184-91, 2010.

PRATLONG, F.; DEREURE, J.; BUCHETON, B.; EL-SAF, S.; DESSEIN, A.; LANOTTE, G.; DEDET, J. P.; Sudan: the possible original focus of visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 122, p. 599–605, 2001.

READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 227–50, 2013.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R.J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C.R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using na immunochromatografic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2352-56, 2002.

RIOUX, J. A.; LANOTTE, G.; SERRES, E.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P.; PERIERES, J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Annales de Parasitologie Humaine et comparée**, v. 65, p. 111–25, 1990.

ROCHA, T. J. M.; SILVA, K. K. M.; OLIVEIRA, V. C.; SILVEIRA, L. J. D.; WANDERLEY, F. S.; CALHEIROS, C. M. L. Perfil epidemiológico relacionado aos casos de letalidade por leishmaniose visceral em Alagoas: uma análise entre os anos de 2007 a 2012. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 1, p. 17-20, 2015.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman-Donovan and further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**,; v. 2, p. 1261-1401, 1903.

SANTIS, B.; SANTOS, E. G. B.; SOUZA, C. S. F.; CHAVES, S. A. M. Performance of DPP™ immunochromatographic rapid test (IRT) for canine visceral leishmaniasis: comparison with other serological methods in suspected dogs from Cuiabá, Mato Grosso State, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 3, p. 198-205, 2013.

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; FIGUEIREDO, F. B. Geographical expansion of canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 5, p. 435-8, 2015.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1/2, p. 1-18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 86, 2011.

SANTOS, D. R.; FERREIRA, A. C.; 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**, v. 45, n. 5, p. 643-5, 2012.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. P.; FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, p. 315-7, 1998.

SCHIMMING, B. C. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 10, n. 19, p. 1-17, 2012.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 9, n. 5, p. 951-8, 2002.

STEINDEL, M.; MENIN, A.; EVANGELISTA, T.; STOCO, P. H.; MARLOW, M. A.; FLEITH, R. C.; PILATI, C.; GRISARD, E. C. Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 490–6, 2013.

TARTAROTTI, A.L.; DONINIL, M. A.; ANJOS, C.; RAMOS, R. R. Vigilância de reservatórios caninos. **Boletim Epidemiológico**. v. 13, n. 1, p. 3-6, 2011.

TELES, N. M. M.; AGOSTINI, M. A. P.; BIGELI, J. G.; NOLETO, R. V.; OLIVEIRA, J. D.; OLIVEIRA-JUNIOR, W. P. Molecular and parasitological detection of *Leishmania* spp. in dogs caught in Palmas, TO, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 21, n. 3, p. 278-82, 2012.

THOMAZ-SOCCOL, V.; LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PRATLONG, F.; MARTINIDUMAS, A.; SERRES, E. Phylogenetic taxonomy of new world *Leishmania*. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 68, n. 2, p. 104-6, 1993a.

THOMAZ-SOCCOL, V.; LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PRATLONG, F.; MARTINIDUMAS, A. SERRES, E. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* 75 Ross, 1903. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 68, n. 2, p. 107-8, 1993b.

THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E. A.; NAVARRO, I. T.; FARIAS, M. R.; 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**, v. 18, n. 3, p. 46-51, 2009.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, p. 851-5, 2014.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a emergência da leishmaniose visceral no Estado do Paraná por meio do emprego de técnicas sorológicas, moleculares e isolamento do agente em cães do município de Foz do Iguaçu.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ocorrência da leishmaniose visceral canina na fronteira do município de Foz do Iguaçu com a Argentina e Paraguai, por meio de diagnóstico sorológico e molecular;
- Avaliar os fatores associados à leishmaniose visceral no município;
- Identificar a espécie de *Leishmania* spp. por meio do isolamento e sequenciamento.

3 HIPÓTESES

- A ocorrência de leishmaniose visceral canina (LVC), na região do extremo oeste do Paraná é esperada, pois os cães do município vizinho, *Puerto Iguazú* – Argentina, cães apresentam LVC com transmissão autóctone;

- Na região de fronteira do Estado do Paraná com o Paraguai, a ocorrência de LVC é esperada por ser uma região de intenso fluxo de pessoas e animais;

- É esperada a identificação da *Leishmania infantum*, por meio do isolamento e sequenciamento do parasito em amostras de punção de linfonodo ou camada leucocitária, de cães de localidades próximas a fronteira com Argentina e Paraguai.

4 ARTIGO I

PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania infantum* E ANÁLISE DE VARIÁVEIS ASSOCIADAS À LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA REGIÃO DE TRÍPLICE FRONTEIRA DE FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ, BRASIL.

PREVALENCE OF ANTI-*Leishmania infantum* ANTIBODIES AND ANALYSIS OF VARIABLES ASSOCIATED WITH CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN THE TRIPLE BORDER REGION OF FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ, BRASIL.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania infantum* em cães de localidades do município de Foz do Iguaçu-Paraná-Brasil, que fazem fronteira com Argentina e Paraguai. Foram coletadas amostras de sangue de cães para realização de testes sorológicos: teste rápido imunocromatográfico DPP® (DPP®), teste imunoenzimático indireto (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI). No ano de 2012, foram analisados 285 cães na fronteira com a Argentina e, em 2013 foram coletadas amostras de soro de 396 cães na fronteira com o Paraguai. Utilizando-se o método de ensaio imunoenzimático (ELISA) como triagem e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) como confirmatório, a prevalência foi de 1,8% (5/285) na fronteira com a Argentina e de 3,0 (12/396) na fronteira com o Paraguai. Com o teste imunocromatográfico (DPP®) como triagem e ELISA como confirmatório observou-se uma prevalência 2,5% (7/285) na fronteira com Argentina e 5,1% (20/396) na fronteira com Paraguai, de animais sororreagentes. A não coleta pública do lixo residencial pelo sistema público ($p=0,0004$; $OR=0,07$; $IC\ 95\%=(0,02 - 0,30)$)/ $p=0,0007$; $OR=0,10$; $IC\ 95\%=(0,03-0,38)$) apresentou-se como uma variável de risco à leishmaniose visceral canina. O estudo confirma a emergência da leishmaniose visceral canina no estado do Paraná ao verificar a ocorrência de cães soro reagentes para LV na fronteira com a Argentina e Paraguai, com características ambientais e geográficas que favorecem a dispersão do parasito, e fornece subsídios para novas pesquisas com uma abordagem em Saúde Única.

Palavras-chave: Zoonose, saúde pública, epidemiologia, emergência

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the occurrence of anti-*Leishmania infantum* antibodies in dogs from localities in the city of Foz do Iguaçu-Paraná-Brazil, bordering Argentina and Paraguay. Blood samples of dogs were collected to perform serologic tests: immunochromatographic DPP® rapid test (DPP®) rapid test, indirect immunoenzymatic assay (ELISA) and indirect immunofluorescence assay (IFA). In the year 2012, 285 dogs were

analyzed on the border of Argentina and in 2013, were collected serum samples of 396 dogs on the border of Paraguay. Using indirect immunoenzymatic assay (ELISA) as screening and indirect immunofluorescence assay (IFA) as confirmatory test the prevalence was 1.8% (5/285) in the border of Argentina and 3.0 (12/396) in the border of Paraguai. With immunochromatographic DPP[®] rapid test (DPP[®]) rapid test as screening and indirect immunoenzymatic assay (ELISA) as confirmatory, 2.5% (7/285) in the border of Argentina and 5,1% (20/396) in the border of Paraguai, of serum reagent animals. A statistically significant difference was observed when there is no public collection of residential waste ($p=0,0004$; $OR=0,07$; $IC\ 95\%=(0,02-0,30)$ / $p=0,0007$; $OR=0,10$; $IC\ 95\%=(0,03-0,38)$) was presented as a risk variable for canine visceral leishmaniasis. The study confirms the emergence of canine visceral leishmaniasis (VL) in the state of Paraná due to confirmed occurrence of reagents dogs for VL on the border of Argentina and Paraguay, with environmental and geographical characteristics that favor the spread of the parasite, and provides subsidies for new researches with One Health approach.

Key words: Zoonoses, public health, epidemiology, emergence

4.1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de distribuição mundial e tem como agente etiológico, nas Américas, o protozoário *Leishmania infantum* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) (NICOLLE, 1908; LAINSON; SHAW, 1987; DEDET, 2009; READY, 2014). Em áreas endêmicas os cães são os reservatórios de maior importância epidemiológica na transmissão de *L. infantum* e são fonte de infecção para os vetores (ASHFORD, 1996; DANTAS-TORRES, 2007; COSTA, 2011). A incidência de LV em humanos está relacionada com o número de cães portadores de LV e com a eficiência dos flebotomíneos em transmitir o parasito de cães para humanos (WERNECK, 2014; ORTIZ; ANVERSA, 2015).

No Brasil, fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* são os principais vetores responsáveis pela transmissão de *L. infantum* (LAINSON; RANGEL, 2005). Este vetor foi identificado pela primeira vez na região Sul do Brasil em São Borja – RS, em 2009, e o primeiro caso canino foi notificado em 2008 (SOUZA; SANTOS; FILHO, 2009; BRASIL, 2010). Pesquisas entomológicas no estado do Paraná foram realizadas por anos e não foi observado vetor espécie-específico para LV (TEODORO et al., 2003; MEMBRIVE et al., 2004; THOMAZ-SOCCOL et al., 2009; TEODORO et al., 2010). Em 2012, Santos, Ferreira e Bisetto-Jr identificaram pela primeira vez o *Lu. longipalpis* no estado, no município de Foz do Iguaçu. Um dos fatores que pode ter favorecido a entrada do vetor no Paraná é a fronteira com os estados do Mato Grosso do Sul e São Paulo e com a Argentina e o Paraguai. Estas áreas, durante as últimas décadas, apresentaram surtos urbanos de LV (CANESE, 2010;

FURLAN, 2010; SAVANI et al., 2011; SALOMON et al., 2012; MATSUMOTO; GOULD et al., 2013; LIMA; CASAGRANGE, 2013; ORTIZ; ANVERSA, 2015).

Na tríplice fronteira do Brasil, Argentina e Paraguai, há registros de casos de LV. No Paraguai há relatos de aumento na incidência da LV humana (LVH) com registro da doença nas províncias do Alto Paraná, região que faz fronteira com Foz do Iguaçu (CANESE, 2010, PARAGUAY, 2011). Na Argentina, de maio de 2006 a julho de 2012, foram notificados 103 casos humanos de LV, e cães infectados por *L. infantum* foram relatados em quase todo o país (SALOMON et al., 2008; SALOMON et al., 2011; GOULD et al., 2013; BARROSO et al., 2015). Na divisa da Argentina com Foz do Iguaçu, no município de *Puerto Iguazú*, foi comprovada a presença do vetor *Lu. longipalpis* em pesquisa realizada no ano de 2010 (SALOMON et al., 2011) e em 2013, verificou-se a presença de DNA de *Leishmania infantum* em amostras de cães do município (ACOSTA et al., 2015).

Foz do Iguaçu é um município vulnerável a esta zoonose devido ao grande fluxo migratório, a fronteira com países que apresentam casos de LV e a identificação do vetor *Lu. longipalpis* (SANTOS, FERREIRA, BISELTO-JR, 2012). Assim, o presente trabalho foi desenvolvido para investigar a ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania infantum* em cães de localidades próximas à fronteira com a Argentina e Paraguai, e identificar as variáveis associadas à LV.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Área de estudo

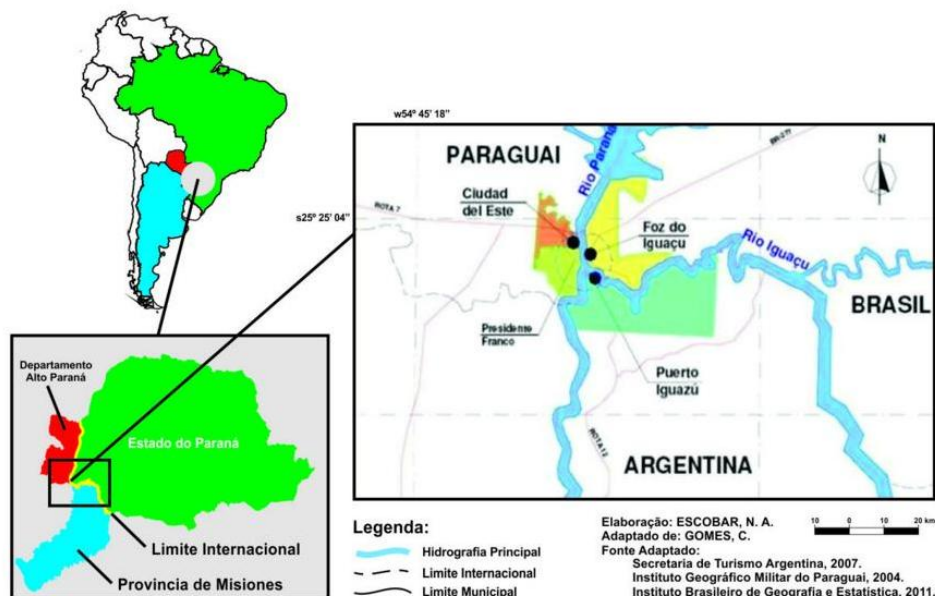
O município de Foz do Iguaçu tem população média estimada nos anos de 2012 e 2013 de 259,313 habitantes (IBGE, 2016a; IBGE, 2016b). Está localizado no extremo oeste do Estado do Paraná, na fronteira com o Paraguai e com a Argentina, na latitude 25°32'45" S e longitude 54°35'07" O. Foz do Iguaçu faz divisa ao norte com o município de Itaipulândia, ao sul com *Puerto Iguazú* (Argentina), a leste com Santa Terezinha de Itaipu e São Miguel do Iguaçu e a oeste com *Ciudad del Este* (Paraguai). Apresenta clima subtropical úmido, com verões quentes, geadas poucos frequentes e chuvas em todos os meses do ano. Possui nove microbacias hidrográficas, sendo sete delas circunscritas ao perímetro municipal, com os principais rios: Paraná, Iguaçu, Tamanduá, São João, Almada, M'Boicy e Monjolo, (IBGE, 2016c; FOZ DO IGUAÇU, 2016).

4.2.2 Amostragem e local da coleta

Devido ao caráter de emergência da LVC na região de tríplice fronteira com Foz do Iguaçu, o estudo foi realizado inicialmente com autorização da 9ª Regional de Saúde do Paraná e, posteriormente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Estadual de Londrina (CEUA nº 22530.2013). Para a seleção das residências, onde foram realizadas as coletas de sangue de cães, utilizou-se como referência os locais de instalação de armadilhas de levantamentos entomológicos realizados previamente às coletas (SANTOS, FERREIRA, BISELTO-JR, 2012; PARANÁ, 2013). Foi utilizado critério aleatório de escolha da residência com presença de cão, casa sim - casa não. Para a realização das coletas os proprietários preencheram o termo de ciência e autorização (anexo 1) e o questionário de levantamento de dados epidemiológicos (anexo 2).

Primeiramente, no período de 4 a 18 de maio de 2012, foram realizadas coletas em localidades próximas à fronteira com a Argentina e dos rios Iguaçu e Paraná. Numa segunda etapa, no período de 17 de junho a 04 de julho de 2013, procedeu-se a coleta de sangue de cães em localidades próximas à fronteira com o Paraguai e do Rio Paraná (Figura 1). As amostras foram processadas na 9ª Regional de Saúde do Paraná, no laboratório de biotecnologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), e no laboratório de protozoologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina

Figura 1 – Mapa apresentando a localização da tríplice fronteira: Foz do Iguaçu (Brasil); *Ciudad del Este* (Paraguai); *Puerto Iguazú* (Argentina).



4.2.3 Sorodiagnóstico

Para determinar a presença de anticorpos contra *L. infantum* e conhecer a taxa de animais sororreagentes para Leishmaniose Visceral Canina (LVC) foram utilizados três técnicas de sorodiagnóstico: teste imunocromatográfico (DPP®), teste imunoenzimático indireto (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

O teste DPP® foi realizado utilizando-se amostra de soro, conforme o protocolo do fabricante (Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, BR). O teste ELISA foi padronizado conforme Maziero (2014) e Maziero et al. (2014). A produção de antígeno foi realizada a partir do cultivo de formas promastigotas de cepa referência de *Leishmania infantum* (MHOM/FR/71/LRM75), conforme descrito por Castro, Thomaz-Soccol e Augur (2003) e Szargiki et al. (2009). A absorvância foi determinada em espectrofotômetro em 492 nm. O ponto de corte foi realizado com base na média da absorvância de quatro soros negativos (cães nascidos em Curitiba - Paraná) acrescidos de três desvios padrão, repetidos em cada placa.

A obtenção do antígeno de *L. infantum* para sensibilização das lâminas para a RIFI seguiu o protocolo conforme Maziero (2014). A RIFI foi padronizada conforme MARZOCHI et al. (1980) e as leituras foram realizadas em microscópio de epifluorescência em objetiva de 40x. Os soros foram diluídos a partir de 20 e reagentes com título igual ou superior a 40 (MARZOCHI et al., 1980).

4.2.4 Análise estatística

Utilizou-se o programa EpiInfo 3.5.3 (DEAN et al., 1994) para a tabulação e análise das variáveis que compuseram o questionário epidemiológico junto aos resultados sorológicos encontrados. Para a análise univariada, foram utilizados os testes do Qui-Quadrado de Independência de Pearson ou o Teste Exato de Fisher. Foi adotado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) para rejeição da hipótese de nulidade e, como medida de associação o cálculo de *Odds Ratio* (OR), com intervalo de confiança (IC) de 95%.

4.3 RESULTADOS

Utilizando-se o método de ensaio imunoenzimático (ELISA) como triagem e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) como confirmatório, a prevalência foi de 1,8% (5/285) na fronteira com a Argentina e de 3,0 (12/396) na fronteira com o Paraguai. Com o teste imunocromatográfico (DPP[®]) como triagem e ELISA como confirmatório observou-se uma prevalência de 2,5% (7/285) na fronteira com Argentina e 5,1% (20/396) na fronteira com Paraguai, de animais sororreagentes (Tabela 1).

Tabela 1 - Prevalência de anticorpos anti-*Leishmania infantum* nas técnicas de diagnóstico teste imunocromatográfico (DPP[®]), teste imunoenzimático indireto (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em cães de localidades próximas às fronteiras do município de Foz do Iguaçu, Paraná, com a Argentina e o Paraguai, 2012 e 2013.

Região	Número amostras de soro	DPP [®] %	ELISA %	RIFI %	ELISA ¹ RIFI	DPP ^{®2} ELISA	Prev. ¹	Prev. ²
Fronteira com Argentina	285	3,2	30,5	4,6	5	7	1,8%	2,5%
Fronteira com Paraguai	396	7,6	21,2	4,3	12	20	3,0%	5,1%

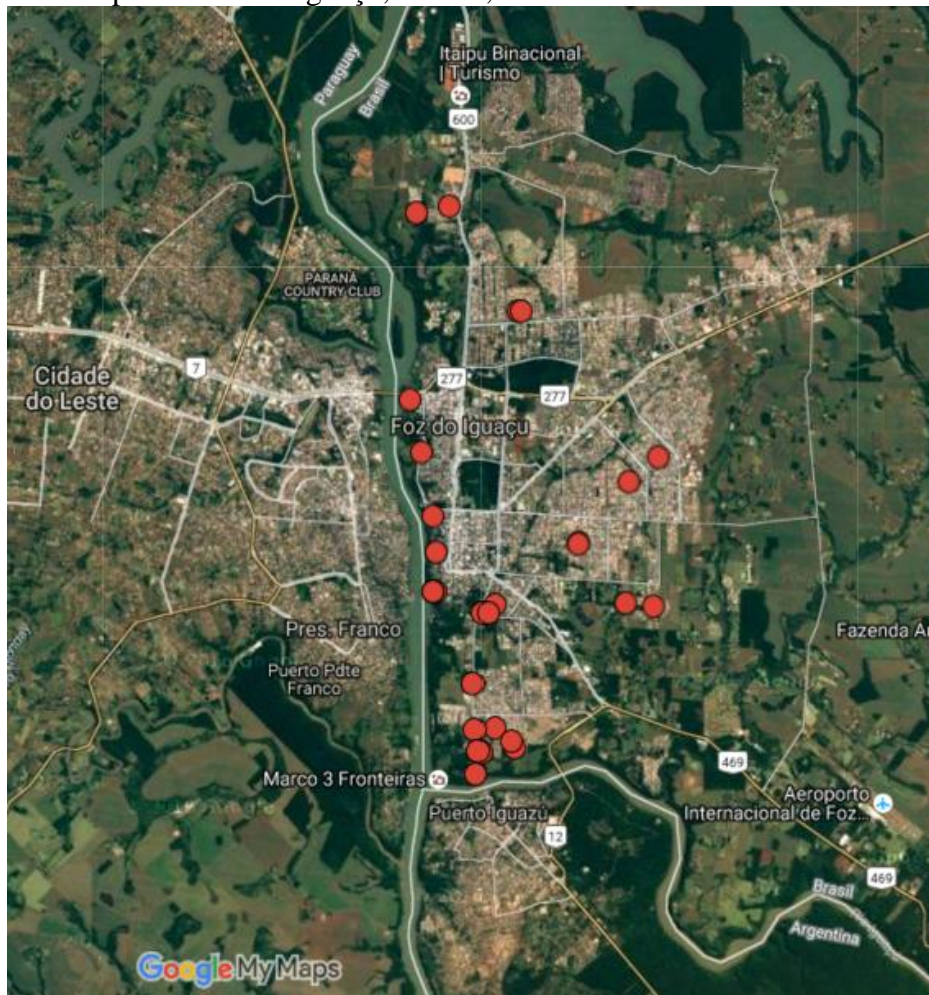
R = Reagente; N = Não Reagente; Prev = Prevalência

¹ = Protocolo do Ministério da Saúde até 2012; ² = Protocolo do Ministério da Saúde após 2012.

Na região de fronteira com a Argentina, dos 285 cães avaliados, 3,2% (9/285) foram reagentes no teste DPP[®], 30,5% (87/285) no ELISA e, 4,6% (13/285) na RIFI. De 87 animais reagentes no teste ELISA, cinco (5/87) foram reagentes na RIFI e sete (7/87) foram reagentes no DPP[®]. Apenas um cão foi reagente nos três testes sorológicos.

Na região de fronteira com o Paraguai, dos 396 cães avaliados, 7,6% (30/396) foram reagentes no teste DPP[®], 21,2% (84/396) no ELISA e, 4,3% (17/396) na RIFI. De 84 animais reagentes no teste ELISA, 12 (12/84) foram reagentes na RIFI e 20 (20/84) foram reagentes no DPP[®]. Nove cães foram sororreagentes nos três testes, onde, todos os cães eram autóctones, dois eram da mesma residência e um vizinho a esta, localizados na região central de Foz do Iguaçu (Figura 2).

Figura 2 – Dispersão das amostras de cães reagentes em mais de um teste sorológico (teste imunocromatográfico, teste imunoenzimático indireto e reação de imunofluorescência indireta) no município de Foz do Iguaçu, Paraná, 2012 - 2013.



Fonte: O autor.

Obs.: Há pontos sobrepostos devido à proximidade das residências dos cães.

Na tabela três foi possível observar que houve diferença significativa na não coleta pública do lixo residencial pelo sistema público ($p = 0,0004$; $OR = 0,07$; $IC\ 95\% = (0,02 - 0,30)$ / $p = 0,0007$; $OR = 0,10$; $IC\ 95\% = 0,03 - 0,38$), apresentando-se como uma variável de risco à LVC.

Tabela 2 – Dados epidemiológicos e características dos cães estudados no município de Foz do Iguaçu, Paraná, na fronteira com Argentina, 2012.

Variáveis	Prot. ¹			Prot. ²		
	Reagentes/ total (%)	Valor p	OR (IC95%)	Reagentes/ total (%)	Valor p	OR (IC95%)
Local da residência						
Zona urbana	5/226 (2,2)	0,6553 ⁽¹⁾	Ind.**	5/226 (2,2)	0,8406 ⁽¹⁾	0,61
Zona rural	0/56 (0,0)			2/56 (11,2)		(0,10 – 6,59)
Presença de mata próximo a residência						
Sim	4/241 (1,7)	>0,9999 ⁽¹⁾	Ind.**	5/241 (2,1)	>0,9999 ⁽¹⁾	0,62
Não	0/30 (0,0)			1/30 (3,3)		(0,07 – 5,44)
Distância da mata até a residência						
0 – 300 metros*	0/117 (0,0)			4/117 (3,4)		
300 – 500 metros	3/50 (6,0)	0,0514 ⁽¹⁾	0 (0,0 – 1,01)	0/50 (0,0)	0,4744 ⁽¹⁾	Ind.**
Mais de 500 metros	1/61 (1,6)	0,6854 ⁽¹⁾	0 (0,0 – 20,3)	1/61 (1,6)	0,8810 ⁽¹⁾	2,1(0,20-106,3)
Presença de outros animais						
Sim	4/201 (2,0)	>0,9999 ⁽¹⁾	1,62	7/201 (3,5)	0,1813 ⁽¹⁾	Ind.**
Não	1/81 (1,2)		(0,16 – 80,98)	0/81 (0,0)		
Presença de matéria orgânica no quintal						
Sim	5/217 (2,3)	0,5533 ⁽¹⁾	Ind.**	6/217 (2,8)	>0,9999 ⁽¹⁾	1,76
Não	0/63 (0,0)			1/63 (1,6)		(0,21 – 82,38)
Coleta pública do lixo residencial						
Sim	5/241 (2,08)	>0,9999 ⁽¹⁾	Ind.**	5/241 (2,08)	0,4020 ⁽¹⁾	0,33
Não	0/33 (0,0)			2/33 (6,1)		(0,05 – 3,61)
Possui raça?						
Sim	1/62 (1,6)	>0,9999 ⁽¹⁾	0,85	0/62 (0,0)	0,3220 ⁽¹⁾	0
Não	4/211 (1,9)		(0,02 – 8,79)	7/211 (3,3)		(0 – 2,35)
Sexo						
Macho	2/139 (1,4)	>0,9999 ⁽¹⁾	0,67	5/139 (3,6)	0,4355 ⁽¹⁾	2,59
Fêmea	3/141 (2,1)		(0,06 – 5,97)	2/141 (1,4)		(0,41 – 27,59)
Idade						
≤ 1 ano*	0/54 (0,0)			0/54 (0,0)		
2 – 8 anos	4/199 (2,0)	0,7606 ⁽¹⁾	0 (0,0-5,62)	6/199 (3,0)	0,4659 ⁽¹⁾	0 (0,0-2,38)
> 8 anos	1/23 (4,4)	0,5974 ⁽¹⁾	0 (0,0-16,61)	1/23 (4,4)	0,5974 ⁽¹⁾	0 (0,0-16,61)
Cão procedente de outra cidade						
Sim	0/18 (0,0)	>0,9999 ⁽¹⁾	0	0/18 (0,0)	>0,9999 ⁽¹⁾	0
Não	5/257 (2,0)		(0,0 – 16,35)	7/257 (2,7)		(0,0 – 10,43)

Prot.¹ = Protocolo do Ministério da Saúde até 2012.

Prot.² = Protocolo do Ministério da Saúde após 2012.

* = Categoria de referência; ** = Indefinido

⁽¹⁾ Através do teste exato de Fisher

Tabela 3 – Dados epidemiológicos e características dos cães estudados no município de Foz do Iguaçu, Paraná, na fronteira com Paraguai, 2013.

Variáveis	Prot. ¹			Prot. ²		
	Reagentes/ total (%)	Valor p	OR (IC95%)	Reagentes/ total (%)	Valor p	OR (IC95%)
Local da residência						
Zona urbana	10/364 (2,8)	0,5034 ⁽²⁾	0,43	16/364 (4,4)	0,1354 ⁽²⁾	0,32
Zona rural	2/32 (6,3)		(0,08 – 4,17)	4/32 (12,5)		(0,10 – 1,42)
Presença de mata próximo a residência						
Sim	11/345 (3,2)	>0,9999 ⁽²⁾	1,61	17/345 (4,9)	0,9526 ⁽²⁾	0,81
Não	1/50 (5,0)		(0,23 – 70,86)	3/50 (6,0)		(0,22 – 4,49)
Distância da mata até a residência						
0 – 300 metros*	7/158 (4,4)			11/158 (7,0)		
300 – 500 metros	2/97 (2,1)	0,5323 ⁽²⁾	2,2 (0,41-22,1)	6/97 (6,2)	>0,9999 ⁽²⁾	1,13(0,34-3,87)
Mais de 500 metros	1/80 (1,3)	0,3718 ⁽²⁾	3,7 (0,46-30,29)	0/80 (0,0)	0,0195 ⁽²⁾	Ind.**
Presença de outros animais						
Sim	6/253 (2,4)	0,4469 ⁽²⁾	0,54	10/253 (4,0)	0,2566 ⁽²⁾	0,54
Não	6/140 (4,3)		(0,14 – 2,08)	10/140 (7,1)		(0,19 – 1,48)
Presença de matéria orgânica no quintal						
Sim	10/328 (3,1)	>0,9999 ⁽²⁾	1,02	17/328 (5,2)	>0,9999 ⁽²⁾	1,17
Não	2/67 (3,0)		(0,21 – 9,81)	3/67 (4,5)		(0,32 – 6,4)
Coleta pública do lixo residencial						
Sim	7/371 (1,9)	0,0004 ⁽¹⁾	0,07	14/371 (3,8)	0,0007 ⁽¹⁾	0,11
Não	5/22 (22,7)		(0,02 – 0,30)	6/22 (27,3)		(0,03 – 0,38)
Possui raça?						
Sim	4/144 (2,8)	>0,9999 ⁽²⁾	0,86	5/144 (3,5)	0,3838 ⁽¹⁾	0,56
Não	8/249 (3,2)		(0,19 – 3,28)	15/249 (6,0)		(0,18 – 1,53)
Sexo						
Macho	6/181 (3,3)	0,9929 ⁽¹⁾	1,19	10/181 (5,5)	0,8687 ⁽¹⁾	1,20
Fêmea	6/215 (2,8)		(0,36 – 3,98)	10/215 (4,7)		(0,48 – 3,29)
Idade						
≤ 1 ano*	0/69 (0,0)			1/69 (1,5)		
2 – 8 anos	9/277 (3,3)	0,2631 ⁽²⁾	0 (0,0-2,02)	16/277 (5,8)	0,2263 ⁽²⁾	0,24 (0,01-1,6)
> 8 anos	3/49 (6,1)	0,1381 ⁽²⁾	0 (0,0-1,69)	3/49 (6,1)	0,3865 ⁽²⁾	0,23 (0,004 -2,9)
Cão procedente de outra cidade						
Sim	0/16 (0,0)	>0,9999 ⁽²⁾	0	0/16 (0,0)	0,8330 ⁽²⁾	0
Não	11/367 (3,0)		(0,0 – 9,79)	20/367 (5,5)		(0,0 – 4,90)

Prot.¹ = Protocolo do Ministério da Saúde até 2012.

Prot.² = Protocolo do Ministério da Saúde após 2012.

* = Categoria de referência; ** = Indefinido

⁽¹⁾ = Através do teste Qui-quadrado de Pearson; ⁽²⁾ Através do teste exato de Fisher

Analisando a totalidade dos cães do estudo (tabela 4), foi possível observar que a maioria dos animais era fêmea, sem raça definida, com idade entre dois a oitos anos, provenientes do município de Foz do Iguaçu. A maior parte vivia em área urbana com mata muito próxima a residência. Em ambas as regiões de coletas, constataram-se na área peridomiciliar a presença de outras espécies animais (figura 3), principalmente gatos (22,1% na fronteira com Argentina e 50% na fronteira com Paraguai), galinhas (23,9% e 16,7%, respectivamente) e ratos (37,5% e 20,2%) e, presença de matéria orgânica (figura 4) decorrente da presença de jardim (40,4% e 45,7%) e acúmulo de folhas (39,3% e 42,7%).

A maior parte do esgoto doméstico era destinada para a rede coletora de esgoto (52% na fronteira com a Argentina e 49,1% com o Paraguai) ou para a fossa séptica (38,1% na fronteira com a Argentina e 47,8% com o Paraguai). Em relação ao destino final do lixo doméstico, a maioria das residências utilizava o sistema de coleta pública (88% na fronteira com a Argentina e 94,4% com o Paraguai).

Tabela 4 – Frequência das características do ambiente e dos cães analisados em Foz do Iguaçu, PR, na fronteira com a Argentina e Paraguai, 2012 e 2013.

(Continua)

Variáveis	Número (%) de residências	
	Argentina	Paraguai
Local da residência		
Zona urbana	226 (80,1)	364 (91,9)
Zona rural	56 (19,9)	32 (8,1)
Presença de mata próximo a residência		
Sim	241 (88,9)	345 (87,3)
Não	30 (11,1)	50 (12,7)
Distância da mata até a residência		
0 – 300 metros	117 (51,3)	158 (47,2)
300 – 500 metros	50 (21,9)	97 (28,9)
Mais de 500 metros	61 (26,8)	80 (23,9)
Presença de outros animais		
Sim	201 (71,3)	253 (64,4)
Não	81 (28,7)	140 (35,6)
Quais animais		
Animais silvestres	32 (11,2)	4 (1,0)
Camundongos		
Equinos	8 (2,8)	8 (2,0)
Galinhas	68 (23,9)	66 (16,7)
Gambás	55 (19,3)	21 (5,3)
Gatos	63 (22,1)	198 (50,0)
Macacos	9 (3,2)	0 (0,0)
Muare	0 (0,0)	2 (0,5)
Ratos	107 (37,5)	80 (20,2)

Tabela 4 – Frequência das características do ambiente e dos cães analisados em Foz do Iguaçu, PR, na fronteira com a Argentina e Paraguai, 2012 e 2013.

(Conclusão)

Variáveis	Número (%) de residências	
	Argentina	Paraguai
Presença de matéria orgânica no quintal		
Sim	217 (77,5)	328 (83,0)
Não	63 (22,5)	67 (17,0)
Qual material orgânico		
Acúmulo de folhas	112 (39,3)	169 (42,7)
Horta	40 (14,0)	59 (14,9)
Jardim	115 (40,4)	181 (45,7)
Lixo	43 (15,1)	67 (16,9)
Pomar	81 (28,4)	64 (16,2)
Cão possui raça?		
Sim	62 (22,7)	144 (36,6)
Não	211 (77,3)	249 (63,4)
Sexo		
Macho	139 (49,6)	181 (45,7)
Fêmea	141 (50,4)	215 (54,3)
Idade		
Até 1 ano	54 (19,6)	69 (17,5)
2 a 8 anos	199 (72,1)	277 (70,1)
Mais de 8 anos	23 (8,3)	49 (12,4)
Cão procedente de outra cidade		
Sim	18 (6,5)	16 (4,2)
Não	257 (93,5)	367 (95,8)

Fonte: O autor, 2016.

4.4 DISCUSSÃO

Em Foz do Iguaçu (PR) utilizando o critério de diagnóstico adotado pelo Ministério da Saúde até o ano de 2012 (ELISA como triagem e RIFI como confirmatório) foi encontrada uma prevalência de 1,8% (5/285) na fronteira com a Argentina e de 3,0% (12/396) na fronteira com o Paraguai. Estudo realizado em São Borja, Rio Grande do Sul (RS), de fevereiro de 2009 a dezembro de 2010, encontrou uma prevalência de 22,5% em 5.400 amostras sorológicas de cães. No mesmo período, em cães de Uruguaiana (RS) observou-se prevalência de 14% e em Porto Alegre (RS) de 4,1% (TARTAROTTI et al., 2011). Hirschmann et al. (2015) avaliaram 165 cães provenientes de canis e ONGs de 12 municípios do RS, indenes para LVC, e encontraram uma prevalência de 3,0% (5/165). No estado de Santa Catarina, que faz fronteira ao sul com o estado do Paraná, Figueiredo et al. (2012) descreveram os primeiros casos autóctones de LVC no município de Florianópolis. Posteriormente foi realizado um levantamento epidemiológico em 2.124 cães de 7 distritos do

município de Florianópolis e a prevalência encontrada foi de 1,4% (29/2.124) (STEINDEL et al., 2013).

Quando se utilizou o critério adotado atualmente pelo Ministério da Saúde (DPP[®] como triagem e o ELISA como confirmatório), encontrou-se uma prevalência de 2,5% (7/285) na fronteira com a Argentina e 5,1% (20/396) na fronteira com o Paraguai. Estudo realizado por Hirschmann et al. (2015) em área indene no estado do RS apresentou uma prevalência de 1,8%. Em áreas endêmicas foram encontradas prevalências de 3,1% em Campinas, estado de São Paulo (ZUBEN et al., 2014), 6,8% em Lavras, Minas Gerais (ALVARENGA et al., 2015) e 9,2% no Distrito Federal (HERENIO; FORTES; RINCON, 2014).

Na região da fronteira com a Argentina, dos cães reagentes pelas técnicas de ELISA como triagem e RIFI como confirmatório, dois (2/5) apresentavam sinais clínicos: um cão com anorexia, perda de peso e prostração e o outro com lesão de pele de aspecto nodular em membro. Nas técnicas de DPP[®] como triagem e ELISA como confirmatório, dois (2/7) cães apresentaram sinais clínicos: um animal com anorexia, lesão de pele com alopecia, perda de peso e prostração e outro com lesão de pele com bordas elevadas em membro e onicogribose.

Na fronteira com o Paraguai, um cão apresentou sinal clínico de lesão de pele e, foi reagente nas técnicas ELISA como triagem e RIFI como confirmatório (1/12) e DPP[®] como triagem e ELISA como confirmatório (1/20).

O DPP[®] foi desenvolvido para detectar anticorpos contra rK26/rK39 e, apresenta alta especificidade (96%) e baixa sensibilidade (47%) para identificar cães sem sinais clínicos de LV. Entretanto, na presença de sinais, a sensibilidade do teste aumenta (98%) (GRIMALDI-JR et al., 2012). Segundo Alves et al. (2012), as taxas de sensibilidade e especificidade permanecem altas, independentemente de animais estarem infectados por *Trypanosoma caninum*. O teste DPP[®] como teste de triagem, apresenta vantagem frente ao ELISA, por sua fácil manipulação e por apresentar o resultado em 15 minutos, portanto é mais adaptado ao uso tanto à campo quanto em laboratório (SANTIS et al., 2013).

Foz do Iguaçu não apresentava estudos prévios para LVC, entretanto trabalhos desenvolvidos em outros municípios do estado do Paraná demonstraram que as regiões analisadas eram indenes para LVC fato que permite afirmar que a área em que o trabalho foi realizado em Foz do Iguaçu não era endêmica (TEODORO et al., 2003; MEMBRIVE et al., 2004; THOMAZ-SOCCOL, 2009; TEODORO et al., 2010). A baixa

prevalência apresentada no teste DPP[®] pode ser explicada devido a Foz do Iguaçu ser uma área de baixa incidência de casos de LVC e por apresentar a maioria dos casos caninos assintomáticos, demonstrando que provavelmente o teste DPP[®] não é eficiente para área não endêmica.

Embora alguns kits comerciais estejam disponíveis, a maioria das informações sobre o desempenho de diagnóstico do ELISA vem de testes *in-house* (PALTRINIERI et al., 2010), que podem ser realizados com antígenos brutos, sintéticos ou recombinantes (MAIA; CAMPINO, 2008), sendo este último o que apresenta os melhores resultados (MIRÓ et al., 2008; MARCONDES et al., 2011). Antígenos brutos fornecem especificidade de 87%, enquanto os antígenos recombinantes rK26 e A2 fornecem especificidades de 90 e 96%, respectivamente (PORROZZI et al., 2007). A vantagem na utilização do ELISA frente ao RIFI está em sua semi automação, eliminando a subjetividade da RIFI e, por ser uma técnica que pode ser aplicada para um grande número de amostras em curto espaço de tempo (MAIA; CAMPINO, 2008; LUCIANO et al., 2009).

A RIFI apresenta sensibilidade entre 83 a 100% e especificidade de aproximadamente 80%, é uma técnica que exige equipamento especializado e de alto custo e, pessoal treinado, devido à interpretação subjetiva na avaliação da intensidade de fluorescência por microscopia (EDRISSIAN; DARABIAN, 1979; BARBOSA-DE-DEUS et al., 2002; PALTRINIERI et al., 2010; FARIA; ANDRADE, 2012).

Uma das principais limitações das técnicas de ELISA e RIFI é a ocorrência de reações cruzadas com outras espécies de parasitos da família Trypanosomatidae, em especial com *Trypanosoma* sp., devido à proximidade filogenética entre as espécies (CAMARGO; REBONATO, 1969; CABALLERO et al., 2007; LUCIANO et al., 2009; PALTRINIERI et al., 2010). Para reduzir riscos de reação cruzada poderia ser realizada a adsorção dos soros com antígenos de *Trypanosoma* sp. para eliminar a reatividade cruzada, porém não é aplicável na rotina.

A não coleta pública de lixo nas residências pelo sistema público apresentou-se como fator de risco para a LVC. A presença de matéria orgânica no peridomicílio representa os possíveis abrigos e criadouros do vetor e, refletem a importância do meio ambiente para a manutenção do ciclo do parasito (GONÇALVES, 2014). Quando existe coleta regular de lixo há uma menor taxa de LV, isto ocorre, pois, a reorganização e limpeza do peridomicílio ocasionam uma redução na população de flebotomíneos nestes

ambientes e, assim, diminuindo o risco de transmissão da *Leishmania* para humanos e animais domésticos (TEODORO et al., 2004; LAISON; RANGEL, 2005).

A maioria dos casos de LV em cães foi autóctone com a residência situada em área urbana e próximo à mata. A LV foi primeiramente considerada uma doença rural e, após a década de 1980, passou a ser registrada em áreas urbanas (WERNECK, 2014) sendo o cão, considerado o principal reservatório do parasito (MARCONDES; ROSSI, 2013). Degradação ambiental, fluxos migratórios e ocupação urbana não planejada favorecem a adaptação do vetor no ambiente (SILVA; MADEIRA; FIGUEIREDO, 2015). Acosta et al. (2015) relatam que a LV em *Puerto Iguazú*, Argentina foi estabelecida devido as mudanças na urbanização do vetor, da existência de reservatórios (cães) e do vetor (*Lu. longipalpis*) e que, a posição geográfica do município (região de tríplice fronteira) com fluxo de turistas durante todo o ano nas proximidades do Parque Nacional do Iguazu (Cataratas do Iguazu) contribuem para a dispersão da doença.

Foi observado a presença de outros animais, principalmente gatos, galinhas e ratos, nas residências analisadas. Em algumas áreas os cães não são a fonte preferencial de alimentação para o vetor *Lu. longipalpis* (MARCONDES; ROSSI, 2013) e, o agente etiológico pode se manter abrigado naturalmente em animais silvestres (SCHIMMING et al., 2012). Afonso et al. (2012) encontraram evidência de infecção natural, por *L. infantum*, em gambás e constataram que esses animais são fontes para o repasto do vetor. Os autores relatam a possibilidade deste mamífero sinantrópico participar no ciclo de transmissão da LV em algumas regiões, especialmente aquelas que foram submetidas a alterações ambientais, o que facilita o contato destes animais com a habitação humana. Controlar a invasão das áreas urbanas por animais silvestres em busca de alimentos são medidas de controle que podem ser adotadas pela comunidade, diminuindo o elo existente entre os ciclos urbanos e silvestres (SCHIMMING, 2012).

Oliveira et al. (2015) avaliando gatos de vários bairros de Belém, Pará, Brasil, pela RIFI encontraram uma prevalência de 4,06% de anticorpos contra *Leishmania* e, enfatizam a pesquisa na população felina devido a importância em saúde pública e por estarem em contato próximo com os seres humanos.

Um sistema de vigilância integrado envolve a saúde humana, animal e setores da vida selvagem trabalhando em conjunto para detectar eventos incomuns de doenças desencadeando uma resposta para conter e controlar as medidas de intervenção (HÄSLER et al., 2012). Neste contexto, enquadra-se a Saúde Única que tem como premissa que as pessoas,

os animais e o ambiente formam um ecossistema interdependente que precisa ser considerada de forma coordenada (FRANK, 2008; GIBBS, 2014). Para realização deste sistema é necessário uma liderança e coordenação clara, metas e objetivos comuns, ferramentas de coleta e análise de dados, planos de contingência integrados e uma boa comunicação de campo (HÄSLER et al., 2012).

Os dados obtidos no presente trabalho demonstram a presença da LVC em Foz do Iguaçu na região de tríplice fronteira com a Argentina e Paraguai, a qual apresenta características populacionais (região turística e comercial, de intenso fluxo de pessoas e animais), ambientais (residências com acúmulo de matéria orgânica e próximas a matas), e presença de cães autóctones, que colaboram para a manutenção da zoonose e fornecem subsídios para uma abordagem em Saúde Única.

A colaboração técnica da Organização Pan-Americana da Saúde a partir de 2013 auxiliou em tomadas de estratégias neste trabalho, e verificou-se que medidas conjuntas com abordagens eco-sócio-sistêmicas integradas e transdisciplinares devem ser adotadas entre os países para o controle da LV. Assim, medidas de prevenção e controle em níveis locais, regionais, nacionais e internacionais devem ser realizadas de maneira uniforme ao padronizar coletas, processamento e análise de amostras, e abordando variáveis ecológicas, epidemiológicas e sócio-culturais de interesse nesses níveis e definir estratégias de controle e programas nos três países.

4.5 REFERÊNCIAS

ACOSTA, L.; DÍAZ, R.; TORRES, P.; SILVA, G.; RAMOS, M.; FATTORE, G.; DESCHUTTER, E. J.; BORNAY-LLINARES, F. J. Identification of *Leishmania infantum* in Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 2, p. 175-6, 2015.

AFONSO, M. M. S.; DUARTE, R.; MIRANDA, J. C.; CARANHA, L.; RANGEL, E. F. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of american visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, n. 2012, p. 1-5, 2012.

ALVARENGA, I. M.; BLANCO, Y. A. C.; NARCISO, T. P.; BOTELHO, M. C. A.; FREITAS, H. F.; BARÇANTE, T. A.; BARÇANTE, J. M. P. Avaliação do DPP[®] e ELISA em cães de uma área endêmica para leishmaniose visceral canina. **Anais do XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia (XXIV CBP) e do XXIII Congresso Latinoamericano de Parasitologia**, Salvador, p. 145, 2015.

ALVES, A. S.; MOUTA-CONFORT, E.; FIGUEIREDO, F. B.; OLIVEIRA, R. V.; SCHUBACH, A. O.; MADEIRA, M. F. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. **Research in Veterinary Science**, v. 26, p. 1329-33, 2012.

ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, p. 523-32, 1996.

BARBOSA-DE-DEUS, R.; MARES-GUIA, M. L.; NUNES, A. Z.; COSTA, K. M.; JUNQUEIRA, R. G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; TAVARES, C. A. P. *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 1361-6, 2002.

BARROSO, P. A.; MARCO, J. D.; LOCATELLI, F. M.; CARDOZO, R. M.; HOYOS, C. L.; MORA, M. C.; BUSTOS, M. F. G.; LOPEZ-QUIROGA, I.; MIMORI, T.; GENTILE, A. G.; BARRIO, A. B.; KORENAGA, M.; HASHIGUCHI, Y.; BASOMBRI, M. A.. Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum* in Salta, Argentina: Possible Reservoirs and Vectors. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 2, p. 334-9, 2015.

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

CABALLERO, Z. C.; SOUSA, O. E.; MARQUES, W. P.; SAES-ALQUEZAR, A.; UMEZAWA, E. S. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 8, p. 1045-9, 2007.

CAMARGO, M. E.; REBONATO, C. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, p. 500-5, 1969.

CANESE, J. Gran incremento de Leishmaniasis visceral humana en Paraguay. **Pediatría (Asunción)**, v. 37; n. 3; p. 167-8, 2010.

CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; AUGUR, C. **Standardization of ELISA (Enzyme linked immunosorbent Assay) and Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) techniques for canine cutaneous leishmaniasis**. In: ROUSSOS, S. et al. (Eds.). *New Horizons in Biotechnology*. [S.l.]: Kluwer Academic Publishers, p. 421-8, 2003.

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 232-42, 2011.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139-46, 2007.

DEAN, A. G.; DEAN, J. A.; COULOMERIER, D.; BRENDEL, K. A.; SMITH, D. C.; BURTON, A. H.; DICKER, R. C.; SULIVAN, K. M.; FAGAN, R. F.; ARNER, T. G. Epi Info, Version 6: a word processing, data bases, and statistic program for epidemiology on microcomputers. **Center for Diseases Control and Prevention, Atlanta - Georgia, U.S.A.** 1994.

EDRISSIAN, G. H.; DARABIAN, P. A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test in the serodiagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Iran. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, p. 289-92, 1979.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: major technological advances and few practical applications. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 47-57, 2012.

FIGUEIREDO, F. B.; LIMA-JÚNIOR, F. E. F.; TOMIO, J. E.; INDÁ, F. M. C.; CORRÊA, G. L. B.; MADEIRA, M. F. Leishmaniose Visceral Canina: Dois casos autóctones no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 1, p. 1026, 2012.

FOZ DO IGUAÇU. Prefeitura Municipal de Foz do Iguaçu. Portal do Turismo. Disponível em: <<http://www.pmf.pr.gov.br/turismo/?idMenu=1693>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

FRANK, D. One world, one health, one medicine. **Canadian Veterinary Journal**, v. 49, n. 11, p. 1063-5, 2008

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

GIBBS, E. P. J. The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future. **Veterinary Record**, v. 174, n. 4 p. 85-91, 2014.

GONÇALVES, M. B. Prevalência, distribuição e identificação de prováveis fatores de risco para leishmaniose visceral canina em Camaçari-BA. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)** - Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia. 2014.

GOULD, I. T.; PERNER, M. S.; SANTINI, M. S.; SAAVEDRA, S. B.; BEZZ, G.; MAGLIANESE, M. I.; ANTMAN, J. G.; GUTIÉRREZ, J. A.; ALOMÓN, O. D. Leishmaniasis visceral en la Argentina: notificación y situación vectorial (2006-2012). **MEDICINA**, v. 73, n. 2, p.104-10, 2013.

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

HÄSLER, B.; GILBERT, W.; JONES, B. A.; PFEIFFER, D. U.; RUSHTON, J.; OTTE, M. J. The economic value of One Health in relation to the mitigation of zoonotic disease risks. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 365, p. 127–51, 2012.

HERENIO, E. M.; FORTES, R. C.; RINCON, G. Prevalência da Leishmaniose visceral em cães do Distrito Federal, segundo dados do centro de zoonoses de Brasília. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 32, n. 2, p. 126-9, 2014.

HIRSCHMANN, L. C.; BROD, C. S.; RADIN, J.; SIMON, C. F.; RECUERO, A. L. C. Leishmaniose visceral canina: comparação de métodos sorológicos em cães de área indene do Rio Grande do Sul no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 44, n. 1, p. 33-44, 2015.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estimativas da população residente nos municípios brasileiros com data de referência em 1º de julho de 2012. 2016a. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2012/estimativa_2012_municipios.pdf>. Acesso em: 06 jul 2016.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estimativas da população residente nos municípios brasileiros com data de referência em 1º de julho de 2013. 2016b Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2013/estimativa_2013_dou.pdf>. Acesso em: 06 jul 2016.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades. 2016c. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=410830&search=||infoqr%EF1ficos:-informa%E7%F5es-completas>. Acesso em: 10 jan. 2016.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: **The leishmaniasis in biology and medicine** (ed. Peters, W. & Killick-Kendrick, R.), Academic Press, London. p. 1–120, 1987.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of american visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-27, 2005.

LUCIANO, R. M.; LUCHEIS, S. B.; TRONCARELLI, M. Z.; LUCIANO, D. M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 181-7, 2009.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274-87, 2008.

MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; GOMES, A. A.; SILVA, A. R.; VIEIRA, R. F.; CAMACHO, A. A.; QUINN, J.; CHANDRASHEKAR, R. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 15-9, 2011.

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

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SABROZA, P. C.; SOUZA, W. J. S. Reação de imunofluorescência indireta e intradermoreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 22, p. 97-155, 1980.

MATSUMOTO, P. S. S.; LIMA, J.; CASAGRANGE, B. Leishmaniose visceral no estado de São Paulo: aplicações cartográficas e estatísticas. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 9, n. 17, p. 195-203, 2013.

MAZIERO, N. Ocorrência de *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908) em cães do extremo oeste do estado de Santa Catarina, Brasil. **Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos)** – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

MAZIERO, N.; THOMAZ-SOCCOL, V.; STEINDEL, M.; LINK, J. S.; ROSSINI, D.; ALBAN, S. M.; NASCIMENTO, A. J. Rural–urban focus of canine visceral leishmaniosis in the farwestern region of Santa Catarina state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 92–5, 2014.

MEMBRIVE, N. A.; RODRIGUES, G.; MEMBRIVE, U.; MONTEIRO, W. M.; NEITZKE, H. C.; 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**, v. 11, n. 4, p. 673-80, 2004.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniasis-new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 371-7, 2008.

NICOLLE, C. J. Sur trois cas d'infection splénique infantile à corps de Leishman observés en Tunisie. **Les archives de l'Institut Pasteur Tunis**, v. 3, p. 1-26, 1908.

OLIVEIRA, G. C.; PAIZ, L. M.; MENOZZI, B. D.; LIMA, M. S.; MORAES, C. C. G.; LANGONI, H. Antibodies to *Leishmania* spp. in domestic felines. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 24, n. 4, p. 464-70, 2015.

ORTIZ, R. C.; ANVERSA, L. Epidemiologia da leishmaniose visceral em Bauru, São Paulo, no período de 2004 a 2012: um estudo descritivo. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n.1, p. 97-104, 2015.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Vet Med Today: Reference Point**, v. 236, n. 11, p. 1184-91, 2010.

PARAGUAY. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. **Manual Diagnóstico y Tratamiento de las Leishmaniasis en el Paraguay**. Asunción, 2011.

PORROZZI, R.; COSTA, M. V.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A.; SANTOS, C. D.; FERNANDES, A. P.; GAZZINELLI, R. T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI-JUNIOR, G. Comparative evaluation of enzymelinked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 544-8, 2007.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 147-54, 2014.

SALOMON, O. D.; SINAGRA, A.; NEVOT, M. C.; BARBERIAN, G.; PAULIN, P.; ESTEVEZ, J. O.; RIARTE, A.; ESTEVEZ, J. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 109-11, 2008.

SALOMON, O. D.; FERNANDEZ, M. S.; SANTINI, M. S.; SAAVEDRA, S.; MONTIEL, N.; RAMOS M. A.; ROSA, J. R.; SZELAG, E. A.; MARTINEZ, M. F. Distribution of *Lutzomyia longipalpis* in the Argentine Mesopotamia, 2010. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 71, n. 1, p. 22-6, 2011.

SALOMON, O. D.; QUINTANA, M. G.; MASTRÁNGELO, A. V.; FERNÁNDEZ, M. S. Leishmaniasis and climate change. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, n. 601242, 2012.

SANTIS, B.; SANTOS, E. G. B.; SOUZA, C. S. F; CHAVES, S. A. M. Performance of DPPTM immunochromathographic rapid test (IRT) for canine visceral leishmaniasis: comparison with other serological methods in suspected dogs from Cuiabá, Mato Grosso State, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 3, p. 198-205, 2013.

SANTOS, D. R.; FERREIRA, A. C.; 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**, v. 45, n. 5, p. 643-5, 2012.

SAVANI, E. S. M. M.; PRESOTTO, D.; ROBERTO, T.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'AURIA, S. R. N.; SACRAMENTO, D. V. First occurrence of an autochthonous canine case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in the municipality of Campinas, State of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n.4, 2011.

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; FIGUEIREDO, F. B. Geographical expansion of canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 5, p. 435-8, 2015.

SOUZA, G. D.; SANTOS, E.; FILHO, J. D. A. The first report of the principal vector of visceral leishmaniasis in Americas, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1181-2, 2009.

STEINDEL, M.; MENIN, A.; EVANGELISTA, T.; STOCO, P. H.; MARLOW, M. A.; FLEITH, R. C.; PILATI, C.; GRISARD, E. C. Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 490-6, 2013.

SCHIMMING, B. C. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 19, 2012.

SZARGIKI, R.; CASTRO, E. A.; LUZ, E.; KOWALTHUK, W.; MACHADO, A. M.; THOMAZ-SOCCOL, V. Comparison of Serological and Parasitological Methods for Cutaneous Leishmaniasis Diagnosis in the State of Paraná, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p.47-52, 2009.

TARTAROTTI, A.L.; DONINIL, M. A.; ANJOS, C.; RAMOS, R. R. Vigilância de reservatórios caninos. **Boletim Epidemiológico**, v. 13, n. 1, p. 3-6, 2011.

TEODORO, U.; ALBERTON, D; KÜHL, J. B.; SANTOS, E. S.; SANTOS, D. R.; SANTOS, A. R.; OLIVEIRA, O.; SILVEIRA, T. G.; LONARDONI, M. V. C. Ecologia de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* em área urbana do município de Maringá, Paraná. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 5, 2003.

TEODORO, U.; THOMAZ-SOCCOL, V.; KÜHL, J. B.; SANTOS, D. R.; SANTOS, E. S.; SANTOS, A. R.; MILIA, A.; DIAS, A. C. Reorganization and cleanliness of peridomiciliar area to control sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in South Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 205-12, 2004.

TEODORO, U.; SANTOS, D. R.; SILVA, A. M.; MASSAFERA, R.; IMAZU, L. E.; MONTEIRO, W. M.; NEITZKE-ABREU, H. C. Fauna de flebotomíneos em municípios do norte pioneiro do estado do Paraná, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 4, p. 322-30, 2010.

THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E. A.; NAVARRO, I. T.; FARIAS, M. R.; 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**, v. 18, n. 3, p. 46-51, 2009.

ZUBEN, A. P. B.; ANGERAMI, R. N.; CASTAGNA, C.; BALDINI, M. B. D.; DONALISIO, M. R. The first canine visceral leishmaniasis outbreak in Campinas, State of São Paulo Southeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 385-8, 2014.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, p. 851-5, 2014.

5 ARTIGO II

PRIMEIRO REGISTRO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA AUTÓCTONE NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Leishmania infantum*

FIRST REPORT OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN PARANÁ STATE, BRAZIL: ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Leishmania infantum*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a emergência da leishmaniose visceral canina (LVC) no município de Foz do Iguaçu, Paraná, por meio de isolamento e identificação molecular. Foi utilizada a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando iniciadores específicos para *Leishmania infantum*, RV1/RV2 e K26F/R, sendo o último utilizado para o sequenciamento e confirmação da espécie dos isolados. Em uma primeira etapa, foram coletadas três amostras de aspirado de linfonodo e, 46 amostras de camada leucocitária de cães. Foram amplificados para os iniciadores RV1/RV2 e K26F/R, 100% (3/3) dos isolados das amostras de aspirado de linfonodo e 6,67% (1/15) de camada leucocitária. Das amostras de camada leucocitária, foram amplificados 66,7% (10/15), para RV1/RV2. Na segunda etapa, foram coletadas amostras de camada leucocitária de 376 cães de 20 localidades, próximas ao Paraguai, rio Paraná, centro e periferia da cidade. Dois isolados (2/376) foram obtidos e amplificados para o primer RV1/RV2 e K26F/R. As amostras de camada leucocitária foram amplificadas com RV1/RV2 e 20,5% (77/376) foram positivas. As análises das sequências de seis isolados comprovaram a espécie como *L. infantum*. A autoctonia dos isolados foi confirmada em inquérito epidemiológico realizada em pesquisa prévia, ONDE 100% dos cães nunca haviam saído do município. O estudo confirma a emergência da leishmaniose visceral no Paraná com a identificação da *Leishmania infantum* em cães no município de Foz do Iguaçu. Com isso, medidas de controle devem ser delineadas e implementadas como o objetivo de controlar a dispersão da zoonose e casos humanos de leishmaniose visceral.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, zoonose, caracterização molecular

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the emergence of canine visceral leishmaniasis (CVL) in the city of Foz do Iguaçu, Paraná. To achieve this goal the technique polymerase chain reaction (PCR) was chosen using specific primers for *Leishmania infantum*, RV1/RV2 and K26F/R, the last one was used for sequencing and to confirm the specie of the isolates obtained in culture. In a first stage, were collected three lymph node aspirate samples and, 46 buffy coat samples. Were amplified for RV1/RV2 and K26F/R primers of, 100% (3/3) of isolates from lymph node aspirate samples and 6,67% (1/15) from buffy coat. Of the buffy coat samples, 66.7% (10/15) were amplified for RV1 / RV2. In a second step, the buffy coat samples from 376 dogs of 20 locations were collected near the Paraguai, Paraná river, downtown and outskirts of the city. From this, two isolates (2/376) were obtained and amplified for RV1/RV2 and K26F/R. The buffy coat samples were amplified with RV1/RV2 and 20.5% (77/376) were positive. The sequences analysis of six isolates proved the specie as *L. infantum*. The isolates autochthony were confirmed by epidemiological survey carried out in previous research, in which 100% of the dogs had never left city. The study confirms the emergence of visceral leishmaniasis in Paraná with *L. infantum* identification in dogs from the city of Foz do Iguaçu. Thereby, control measures should be designed and implemented with the aim of controlling the zoonose spread and the VL human cases.

Key words: *Leishmania infantu*, zoonose, molecular characterization

5.1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose sistêmica grave de transmissão vetorial, causada por um protozoário intracelular do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). Na América Latina a *Leishmania infantum* é o agente etiológico da doença (BRAGA et al., 1986; ROMERO; BOELAERT, 2010; COSTA, 2011). Os flebotomíneos são os vetores responsáveis pela transmissão do parasito e, no Brasil, *Lutzomyia longipalpis* é a principal espécie envolvida (MARZOCHI et al., 2009; SCHIMMING, 2012). Os cães são considerados os reservatórios de maior importância no ciclo urbano de transmissão. Casos de LV em humanos normalmente são precedidos por casos da doença em cães e estes animais apresentam uma maior quantidade de parasitos na pele do que o homem (SCHIMMING, 2012).

Em 2008, foi registrado o primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral canina (LVC) na região Sul do Brasil. O caso ocorreu em São Borja, Rio Grande do Sul (RS), município que faz divisa com *Corrientes*, Argentina, que possuía transmissão intensa da infecção (BRASIL, 2010; TARTAROTTI et al., 2011). A capital do estado, Porto Alegre, registrou o primeiro caso de LVC autóctone em um cão domiciliado (BIANCHI et al., 2016). No RS, entre 2009 a 2012, foram confirmados 10 casos da LV humana (LVH) autóctones,

sendo sete do município de São Borja, dois de Itaquí e um de Uruguaiana (DEBONI et al. 2011; RIO GRANDE DO SUL, 2014; MASSIA et al., 2016). No estado de Santa Catarina os primeiros casos autóctones de LVC foram relatados a partir de 2011 no município de Florianópolis (FIGUEIREDO et al., 2012; STEINDEL et al., 2013) e, posteriormente, nos municípios de São Miguel do Oeste e Descanso, fronteira com Argentina e o estado do Paraná (MAZIERO et al., 2014).

O estado do Paraná era considerado indene à LVC e apresentava apenas casos alóctones (THOMAZ-SOCCOL et al., 2009). O município de Foz do Iguaçu, localizado no oeste do Paraná em região de tríplice fronteira, é um centro turístico e econômico, com grande fluxo de pessoas e animais, e vegetação abundante entre os Rios Paraná e Iguaçu (FOZ DO IGUAÇU, 2016). Este município era classificado como área silenciosa vulnerável para vigilância e controle da LV, por estar contígua a municípios de países vizinhos com casos de LV e possuírem intenso fluxo migratório e mesmo eixo viário (BRASIL, 2006).

Como *Puerto Iguazú*, Argentina, foi o primeiro município da tríplice fronteira a registrar o vetor *Lu. longipalpis* (SALOMÓN et al., 2011) e a ter identificado os primeiros casos de LVC autóctones a partir de 2011 (GÓMEZ et al., 2013; ACOSTA et al., 2015), foi iniciada a pesquisa do vetor e da LVC em Foz do Iguaçu. Em 2012, foi realizada a pesquisa entomológica e constatada a presença do vetor *Lu. longipalpis*, o município passou a ser classificado como área silenciosa vulnerável receptiva para LV (SANTOS; FERREIRA; BISETTO-JR, 2012). Em 2012 e 2103, foi realizada a investigação epidemiológica de cães que residiam em bairros próximos às fronteiras da Argentina e Paraguai, regiões em que foram detectadas o vetor. Neste levantamento foram verificadas a presença de cães reagentes para *L. infantum* e a presença de fatores de risco e características ambientais que favorecem a dispersão da LV (DIAS et al., 2013; THOMAZ SOCCOL et al., 2013). O primeiro caso de LVH no município de Foz do Iguaçu foi confirmado em 2015 (PARANÁ, 2015) e no ano de 2016 o registro de um óbito em decorrência da doença (ÁLVARO, 2016).

O objetivo deste trabalho foi verificar a emergência da LVC em cães de bairros do município de Foz do Iguaçu próximos à fronteira com a Argentina e Paraguai por meio do isolamento e identificação molecular de *Leishmania infantum*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Área de estudo

O estudo foi realizado no município de Foz do Iguaçu (latitude 25°32'45" S e longitude 54°35'07"), localizado no extremo oeste do Estado do Paraná, na fronteira do Brasil com Paraguai e Argentina (FOZ DO IGUAÇU, 2016), com população média estimada nos anos de 2012 e 2013 de 259.313 habitantes (IBGE, 2016a; IBGE, 2016b).

5.2.2 Amostragem

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Estadual de Londrina (CEUA nº 22530.2013.00) e, para a coleta de amostras dos cães os proprietários preencheram o termo de ciência e autorização (anexo 1).

A amostragem foi realizada em duas etapas:

Etapla 1: Foram selecionados 46 cães sororeagentes, sendo: 14 previamente sororeagentes em mais de uma técnica sorológica (teste imunocromatográfico - DPP[®], teste imunoenzimático indireto - ELISA e, reação de imunofluorescência indireta - RIFI) e 14 com absorbância alta no teste ELISA, provenientes de estudo realizado em 2012 (DIAS et al., 2013), e 18 animais contactantes sem diagnóstico sorológico prévio.

No período de 10 a 14 de dezembro de 2012 foram coletadas amostras de sangue por venopunção jugular com anticoagulante EDTA de todos os cães. Daqueles animais com sintomatologia clínica de LV foi realizado a punção do linfonodo poplíteo.

Etapla 2: Foram selecionados 376 cães residentes em 20 localidades, próximas a fronteira com o Paraguai, ao rio Paraná, centro e periferia. Os domicílios foram selecionados a partir de dados do levantamento entomológico da 9ª Regional de Saúde do Paraná (PARANÁ, 2013), utilizando o critério aleatório de escolha da casa com presença de cão, casa sim-casa não. No período de 17 de junho a 04 de julho de 2013 foram coletadas amostras de sangue com anticoagulante de todos os cães.

5.2.3 Isolamento do parasito *Leishmania infantum*

O sangue total foi centrifugado (1.500 g, 5 minutos) para separação da camada leucocitária. O material obtido (camada leucocitária e punção de linfonodo) foi adicionado a meio de cultura NNN (Novy, McNeal e Nicolle), contendo 0,5 mL de solução fisiológica 0,9% contendo penicilina (25.000 UI) + estreptomicina (100 µg.mL⁻¹). As

culturas foram repicadas a cada sete dias até o isolamento da *Leishmania infantum*, ou descartados quando negativos após a quinta semana.

Os isolados foram inoculados em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*), suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 5%. A biomassa dos parasitos foi obtida a partir do conteúdo de quatro tubos de 15 mL contendo meio NNN que foram passados para tubos Falcon (15 mL) contendo 5 mL de meio RPMI com 10% de soro fetal. Os tubos foram observados semanalmente e quando verificada uma quantidade elevada de *Leishmania* spp. foram passados para garrafa de cultivo celular contendo 10 mL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após sete dias o conteúdo da garrafa foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL com solução de NaCl₂ a 0,9% e centrifugado durante 10 minutos a 3.500 g a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi centrifugado com solução de NaCl₂ a 0,3%, por 10 minutos a 3.500 g a 4°C. Depois foi retirado o sobrenadante e o sedimento foi transferido para um tubo de 2 mL, centrifugado a 9.000g a 4°C por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e a biomassa foi armazenada no freezer -20°C até o momento da extração do DNA.

5.2.4 Extração de DNA de camada leucocitária

Foram utilizados dois métodos para a extração de DNA neste estudo. Na etapa 1 foi utilizado o método de fenol-clorofórmio e, na etapa 2 o *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega®, Madison, WI, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Foram utilizados controles negativos em todas as etapas de extração e o DNA das amostras foi quantificado no espectrofotômetro Gene Quant™ (Marlborough, MA, EUA).

Para a extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio, as células foram ressuspendidas com 500 µL de tampão de lise, pH 8,0, SDS a 10% e 5 µL de proteinase K 20 mg.mL⁻¹, procedeu-se a incubação por uma hora, a 55 °C. Posteriormente, desnaturou-se a proteinase K, por 10 minutos, a 95 °C. Em seguida adicionou-se 5 µL RNase (20 mg/mL⁻¹), e incubou-se por 30 minutos, a 37°C. Em seguida, adicionou-se igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), agitou-se por 5 minutos, seguiu-se de centrifugação a 14.000g por 5 minutos. Recuperou-se o sobrenadante e adicionou-se, igual volume de clorofórmio e agitou-se por 5 minutos e centrifugou-se a 14.000g por 5 minutos. O DNA do sobrenadante foi precipitado com acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2 volumes de etanol e centrifugou-se a 14.000g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado adicionou-se 300 µL de etanol 70% e centrifugou-se a 14.000 g por 15 minutos a

4 °C. O precipitado foi deixado para secar, por 10 minutos, em estufa a 37 °C e, posteriormente foi hidratado com 100 µL de água ultrapura e mantido a -80 °C até o seu uso.

5.2.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Nas duas etapas do trabalho foi realizada PCR convencional. Em ambas as etapas foram utilizados os iniciadores RV1 (5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3') e RV2 (5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3'), desenhados com base no DNA alvo altamente repetitivo do minicírculo do kDNA de *Leishmania donovani sensu lato*, gerando um fragmento de 145 pb (LACHAUD et al., 2002b). A reação foi realizada para 25 µL contendo 5 µL de DNA diluído 1:10, 1× *buffer*, 0,2 mM dNTPs (*deoxynucleotide triphosphate*), 3 mM MgCl₂, 0,2 pmol de cada iniciador (RV1/RV2), 1,5 U de *Taq polymerase* (Invitrogen®) e água ultra pura. A amplificação consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 4 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 59 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, seguido de uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Na etapa 1, também foram utilizados os iniciadores K26r (5'-ACGAAGGACTCCGCAAAG-3') e K26f (5'-TTCCCATCGTTTTGCTG-3') (HARALAMBUS et al., 2008), em reação de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão, 1,0 µL de cada iniciador (K26r/K26f), 2,0 µL de dNTP, 1,25 µL de MgCl₂, 0,25 µL de 0,1% Triton x 100, 0,1 µL de *Taq* polimerase (Invitrogen®, Brasil) e 5 µL de DNA. Os ciclos utilizados foram 94 °C por 5 minutos, 35 vezes de 95 °C por 1 minuto, 48°C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e 7 minutos a 72°C.

Como controle positivo da PCR utilizou-se amostra de DNA extraído de cepa de referência, *Leishmania infantum* (MHOM/FR/71/LEM75). Após a amplificação realizou-se a eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio por 20 minutos e visualizado em ultravioleta.

5.2.6 Sequenciamento

Foi realizado o sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados para os iniciadores K26r e K26f. As reações foram processadas em microtubos de 2,0 mL contendo 1,6 pmol/µL dos primers 1,0 µL do Big Dye Terminator, 1,0 µL do tampão próprio da reação, 50 ng de DNA, água ultra pura para completar o volume de 10 µL. Procedeu-se desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 96 °C a

10 segundos, anelamento a 50 °C por 5 segundos e extensão a 60 °C por 4 minutos. Em seguida o produto da reação de sequenciamento foi submetido a precipitação com isopropanol a 70%, incubado em temperatura ambiente por 20 minutos e centrifugadas a 4.000 g por 25 minutos. Ao término da centrifugação o isopropanol foi removido, adicionado 400 µL de etanol 80% e centrifugado a 4.000 g por 5 minutos. O etanol foi descartado e o precipitado deixado para secar em estufa a 37 °C. O DNA foi ressuscitado em 10 µL de formamida Hi-Di e submetido ao sequenciamento em ambas as fitas pelo método *dideoxy chain-termination* (SANGER et al., 1977) realizado com o *kit Taq dye-terminator*, usando o sequenciador ABI 3700 (Applied Biosystems, CA, EUA).

5.2.7 Análise das sequências

As sequências consensos foram geradas a partir do programa EMBOSS GUI (<http://bips.u-strasbg.fr/EMBOSS>) e submetidas ao programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmação dos resultados. Sequências de *L. infantum* depositadas no Genbank foram utilizadas para análise de distância genética entre as amostras obtidas. As sequências foram alinhadas no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (CARLSBAD, CA, EUA) e analisadas no programa MEGA5: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versão 5.05 (TAMURA et al., 2011), para a construção da árvore filogenética.

5.3 RESULTADOS

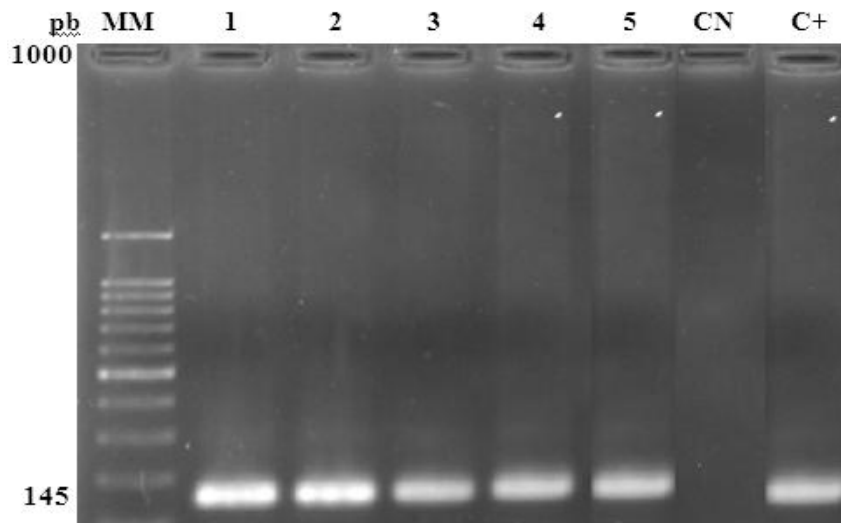
Na etapa 1, 15 (15/46) amostras de camada leucocitária foram submetidas à técnica de PCR para os iniciadores RV1 e RV2. Das amostras analisadas 66,7% (10/15) apresentaram fragmentos de DNA de *Leishmania infantum*.

Nesta etapa, foram obtidos três aspirados de linfonodos. Estes, e as 46 amostras de camada leucocitária foram submetidas à cultura. Cinco isolados foram obtidos dos quais, quatro foram sequenciados (*L. infantum* 1941; *L. infantum* 1951; *L. infantum* 22922; *L. infantum* 4949). Os isolados *L. infantum* 1941, *L. infantum* 1951 e *L. infantum* 4949 foram obtidos por aspiração de linfonodo e o isolado *L. infantum* 22922 de camada leucocitária.

Na etapa 2, 376 amostras de camada leucocitária foram submetidas à técnica de PCR para os iniciadores RV1 e RV2, 20,5% (77/376) apresentaram fragmentos de DNA de *L. infantum*.

Nesta etapa, foram obtidos e sequenciados dois isolados (*L. infantum* 2412; *L. infantum* 3643) provenientes de camada leucocitária. A figura 1 representa o perfil dos produtos de amplificação do DNA (145 pb) pela técnica de PCR de 5 isolados de *L. infantum* usando como iniciadores RV1 e RV2.

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando o perfil dos produtos de amplificação do DNA pela técnica de PCR de 5 isolados de *Leishmania* usando como iniciadores RV1 e RV2.

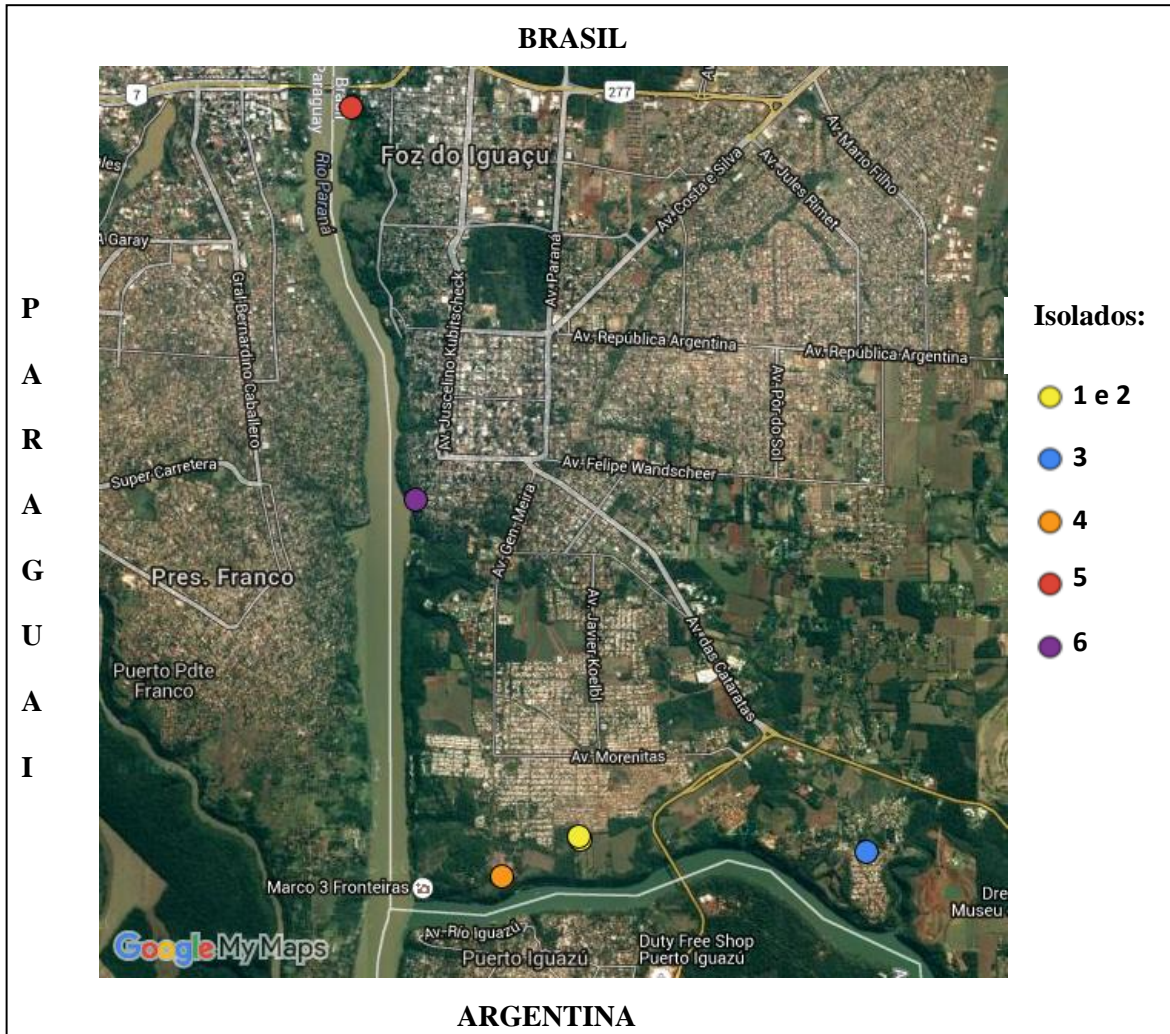


MM: Marcador Molecular 100pb; 1 – 5, Isolados; CN, Controle Negativo; C+, Controle Positivo, amostra referência *L. Infantum*.

A figura 2 demonstra a localização geográfica, dos isolados de *Leishmania infantum* que foram sequenciados, no município de Foz do Iguaçu. Os isolados *L. infantum* 1941 e *L. infantum* 1951 estão localizados no Jardim Flores, residências vizinhas, e o *L. infantum* 22922 no Jardim Novo Horizonte, ambos próximos à divisa com Argentina e ao Rio Iguaçu. O isolado *L. infantum* 2412 no Loteamento Paraguaçu e o *L. infantum* 3643 no Centro próximo a aduaneira Brasil-Paraguai e, ambas as localidades próximas ao Rio Paraná.

As amostras dos animais em que foi possível obter os isolamentos, apresentaram-se reagentes nos testes sorológicos: teste imunocromatográfico, teste imunoenzimático indireto e reação de imunofluorescência indireta (DIAS et al., 2013), e na PCR, demonstrando compatibilidade.

Figura 2 - Localização geográfica dos isolados de *Leishmania infantum* sequenciados no município de Foz do Iguaçu, 2012-2013.



Fonte: O autor, 2016.

Para confirmar a identificação do parasito, os seis isolados foram sequenciados e comparados com cepas de *L. infantum* amplificadas para o gene K26, para busca por similaridade no programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabela 1).

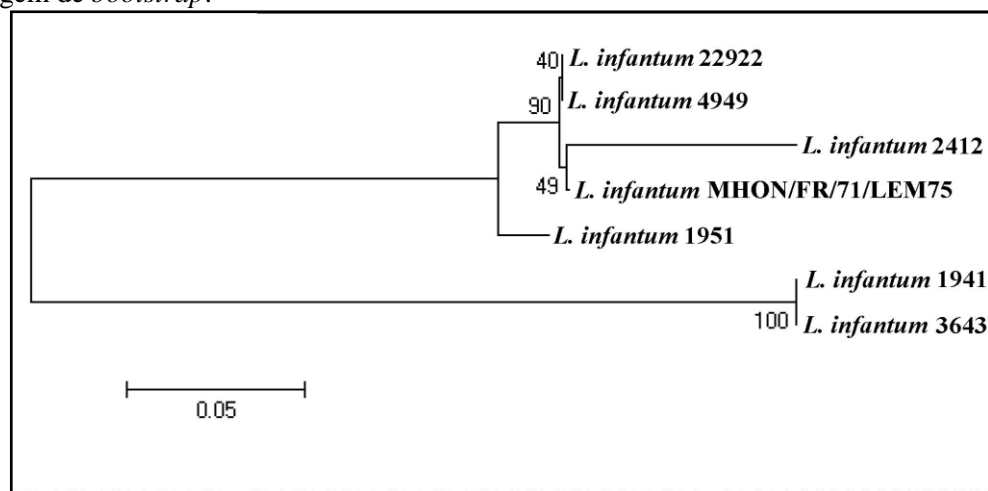
A árvore filogenética apresenta dois ramos distintos (Figura 3). A cepa referência de *L. infantum* MHOM/FR/71/LEM75 (LEM75) está em um ramo com os isolados *L. infantum* 22922, *L. infantum* 4949, *L. infantum* 2412, representado por um valor de *bootstrap* de 90%, e o isolado *L. infantum* 2412 possui a maior similaridade com LEM75.

Tabela 1 – Comparação da similaridade genética de sequências dos isolados de *Leishmania* obtidos neste trabalho com *L. infantum*, *L. chagasi* e *L. donovani*, score total, identidade genética e número de acesso ao *GenBank* (NCBI).

CI	Descrição	ET	PI	NA	Autor
1	<i>L. infantum</i> k26 antigen (K26) gene	5290	99%	DQ192034.1	Farajnia et al., 2008
	<i>L. chagasi</i> K26 (k26) gene	5297	99%	AF131228.1	Bhatia et al., 1999
	<i>L. donovani</i> strain MHOM/IN/2003/BHU32 K26 (k26), gene	2474	86%	JX294870.1	Zackay et al., 2013
2	<i>L. infantum</i> k26 antigen (K26) gene	4324	97%	DQ192034.1	Farajnia et al., 2008
	<i>L. chagasi</i> K26 (k26) gene	4338	97%	AF131228.1	Bhatia et al., 1999
	<i>L. donovani</i> strain MHOM/SD/98/LEM3582 HASPB1 gene	1979	96%	KC342852.1	Bhattacharyya et al., 2013
3	<i>L. infantum</i> strain MHOM/FR/1978/LEM75 K26 protein (K26) gene	6187	99%	EF504255.1	Haralambous et al., 2008
	<i>L. chagasi</i> K26 (k26) gene	6237	98%	AF131228.1	Bhatia et al., 1999
	<i>L. donovani</i> strain MHOM/SD/97/LEM3458 HASPB1 gene	3617	96%	KC342854.1	Bhattacharyya et al., 2013
4	<i>L. infantum</i> strain MHOM/FR/1978/LEM75 K26 protein (K26) gene	7669	99%	EF504255.1	Haralambous et al., 2008
	<i>L. chagasi</i> K26 (k26) gene	7749	100%	AF131228.1	Bhatia et al., 1999
	<i>L. donovani</i> strain MHOM/KE/LRC-L445 K26 (K26) gene	3736	86%	JX294869.1	Zackay et al., 2013
5	<i>L. infantum</i> strain MHOM/FR/1978/LEM75 K26 protein (K26) gene	6708	94%	EF504255.1	Haralambous et al., 2008
	<i>L. chagasi</i> K26 (k26) gene	7459	94%	AF131228.1	Bhatia et al., 1999
	<i>L. donovani</i> strain MHOM/SD/98/LEM3582 HASPB1 gene	4119	98%	KC342852.1	Bhattacharyya et al., 2013
6	<i>L. infantum</i> strain MHOM/GR/2001/GH10 K26 protein (K26) gene	4872	99%	EF504257.1	Haralambous et al., 2008
	<i>L. chagasi</i> K26 (k26) gene	5297	99%	AF131228.1	Bhatia et al., 1999
	<i>L. donovani</i> BPK282A1 complete genome, chromosome 23	1286	99%	FR799610.2	Downing et al., 2011

CI: Código dos isolados (1 - *L. infantum* 1941; 2 - *L. infantum* 1951; 3 - *L. infantum* 22922; 4 - *L. infantum* 4949; 5 - *L. infantum* 2412; 6 - *L. infantum* 3643); ET: Escore total; PI: Percentual de identidade; NA: Número de Acesso

Figura 3 - Árvore filogenética relacionando as sequências da amostra de referência *Leishmania infantum* MHOM/FR/71/LEM75 com seis isolados, gerada pelo programa MEGA versão 5 utilizando o modelo Tamura-Nei para medir a distância evolutiva. Os números acima dos ramos indicam a porcentagem de *bootstrap*.



Fonte: O autor, 2016.

5.4 DISCUSSÃO

Desde 2008, a ocorrência de LV na região Sul do Brasil (BRASIL, 2010; STEINDEL et al., 2013; MAZIERO et al., 2014) e, no município de *Puerto Iguazú*, Argentina (ACOSTA et al., 2015), demonstrou a necessidade de estudos no município de Foz do Iguazu, avaliando assim a possibilidade de entrada de LV no estado. Pesquisas no município constataram a presença do vetor *Lu. longipalpis* (SANTOS; FERREIRA; BISELTO-JR, 2012) e, a ocorrência de cães sororeagentes a *L. infantum* (DIAS et al., 2013).

Com o propósito de caracterização molecular do parasito circulante no município de Foz do Iguazu, amostras de camada leucocitária de cães foram processadas pela técnica de PCR com os iniciadores RV1 e RV2 e foi encontrada uma prevalência de 20,5% (77/376). Em Palmas, Tocantins, município endêmico da região norte do Brasil, estudos utilizando a PCR com os mesmos iniciadores encontraram frequências de 59,3 e 65,1% (BIGELI; OLIVEIRA-JR; TELES, 2012; TELES et al., 2012). Entretanto, frequência similar, de 21,8%, foi encontrada em região do oeste do estado de Santa Catarina, próximo a fronteira com a Argentina, em que o ciclo do parasito pode estar se estabelecendo recentemente (MAZIERO et al., 2014), mesma situação que ocorre em Foz do Iguazu. As diferenças em relação à frequência podem ocorrer devido à variação temporal e a diferença entre as dinâmicas de transmissão, como distintos perfis de susceptibilidade locais, a possibilidade de diferentes vertebrados servindo como reservatórios, diferença demográfica e das condições sócio-ambiental de cada localidade (WERNEK, 2008).

Os iniciadores RV1 e RV2 são desenhados a partir do minicírculo do kDNA, o alvo mais estudado e aplicado nas pesquisas moleculares para o diagnóstico de LV devido ao fato do grande número de cópias por célula (SILVA et al., 2010), o que permite a criação de ensaios baseados em PCR ultrasensíveis quando comparados com sistemas que utilizam como alvo sequências menos repetitivas (BASTIEN; PROCOP; REISCHL, 2008). Seu uso também é importante em regiões nas quais a infecção pode ser causada por mais de uma espécie do parasito (LAMBSON; SMYTH; BARKER, 2000), pois possibilita a identificação da espécie de *Leishmania* responsável pela infecção (RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990). Os iniciadores possuem ótimo desempenho diagnóstico, tanto no grupo de cães sintomáticos, como no grupo de assintomáticos (GOMES et al., 2007; LACHAUD et al., 2002a) e são apropriados para a confirmação dos exames sorológicos em estudos epidemiológicos a campo (GOMES et al., 2007; MAIA et al., 2009).

Entre as técnicas de diagnóstico para leishmaniose, a PCR tem a maior especificidade e sensibilidade (ASHFORD et al., 1995) e segundo Lachaud et al. (2002) os iniciadores RV1 e RV2 são extremamente sensíveis, detectando 10^{-3} parasitos por ml de sangue. A PCR também permite a análise de um grande número de amostras (FALLAH et al., 2011; TELES et al., 2012), identifica a espécie do parasito envolvido (ALAM et al., 2009; FALLAH et al., 2011) e permite a identificação de cães infectados, mesmo antes do aparecimento dos anticorpos anti-*L. infantum* (FALLAH et al., 2011).

A utilização de sangue como material de análise biológica na PCR justifica-se pela facilidade de coleta, sendo menos invasivo, especialmente quando um grande número de animais é analisado (FALLAH et al., 2011). Esta preferência no uso deve-se ao fato, de no hospedeiro vertebrado, a *Leishmania* ser um parasito intracelular leucocitário obrigatório e, portanto, está mais concentrado na camada leucocitária, produzindo assim, uma melhor sensibilidade (LACHAUD et al., 2002a).

No presente estudo, os isolados do parasito foram sequenciados para *Hydrophilic acylated surface protein B* (HASPB), também conhecida K26, por ser uma proteína que faz parte de uma família heterogênea de moléculas de superfície das espécies do gênero *Leishmania* (MCKEAN et al., 1997). Esta proteína é considerada polimórfica, constituída por uma série de domínios de aminoácidos repetitivos, presente nas formas promastigotas e amastigotas do parasito (SADLOVA et al., 2010). Haralambous et al. (2008) desenhou iniciadores específicos (K26R/K26F) para discriminar parasitas do complexo *L. donovani*, direcionando estudos de diversidade genética, com a associação dos polimorfismos gênicos a origem geográfica das cepas. Estudos desenvolvidos no leste Africano utilizaram a PCR como ferramenta molecular para localização do gene K26 em isolados do parasito, diferenciando as espécies *L. infantum* e *L. donovani* de acordo com o tamanho do *amplicon* (GADISA et al., 2010; ZACKAY et al., 2013).

Observou-se que dos 6 isolados sequenciados e comparados com cepas de *L. infantum* para o gene K26 no programa BLAST, verificou-se similaridade de 86 a 100%, demonstrando uma relação genética com o complexo *L. donovani*. Quando comparado o escore total entre as espécies dentro do complexo *L. donovani* observa-se que *L. chagasi*, apresentou maior score ou menor número de *gaps*, ou seja, menos nucleotídeos foram alterados pelo banco de dados NCBI BLAST quando da realização do alinhamento das bases. Como vários autores consideram a *L. infantum* sin. *L. chagasi* por não haver um grau de diversidade genética significativa (CUNHA, 1938; RIOUX et al., 1990; THOMAZ-SOCCOL

et al., 1993; MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2000; DANTAS-TORRES, 2006) pode-se considerar os isolados similares à espécie *L. infantum*.

A árvore filogenética apresenta dois ramos distintos. A cepa referência de *L. infantum* MHOM/FR/71/LEM75 (LEM75) está em um ramo com os isolados *L. infantum* 22922, *L. infantum* 4949, *L. infantum* 2412, representado por um valor de *bootstrap* de 90%, e o isolado *L. infantum* 2412 possui a maior similaridade com LEM75. Os isolados *L. infantum* 1941 e *L. infantum* 3643 apresentaram-se em um ramo separado da LEM, indicando que pode se tratar de uma cepa variante, assim, estudos voltados para a identificação de cepas circulantes no município de Foz do Iguaçu e da Argentina e Paraguai são necessários para compreender a dinâmica da LV na tríplice fronteira.

O sequenciamento dos isolados, a similaridade com outras cepas no BLAST e a apresentação dos isolados na árvore filogenética demonstram a circulação do parasito *L. infantum* no município de Foz do Iguaçu. A autoctonia dos isolados foi confirmada através do inquérito epidemiológico (DIAS et al., 2013), sendo que 100% dos cães nunca haviam saído do município.

No nosso conhecimento o presente trabalho é o primeiro registro de LVC autóctone no estado do Paraná, com a identificação da espécie *L. infantum*. Por ser um problema de saúde pública, fato esse reforçado pelos casos de LVH autóctone no município de Foz do Iguaçu a partir de 2015 (PARANÁ, 2015), torna-se necessário que os órgãos públicos e instituições de pesquisa do Brasil, Argentina e Paraguai atuem em parceria para ampliar o conhecimento da LV na região e, conseqüentemente elaborar alternativas de controle viáveis para conter o avanço aos municípios vizinhos, atuando na identificação das cepas circulantes e realizando o monitoramento constante do vetor e da prevalência da LVC.

5.5 REFERÊNCIAS

- ACOSTA, L.; DÍAZ, R.; TORRES, P.; SILVA, G.; RAMOS, M.; FATTORE, G.; DESCHUTTER, E. J.; BORNAY-LLINARES, F. J. Identification of *Leishmania infantum* in Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 2, p. 175-6, 2015.
- ALAM, M. Z.; SHAMSUZZAMAN, A. K. M.; KUHLIS, K.; SCHONIAN, G. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. **Tropical Medicine and International Health**, v. 14, n. 5, p.499–503, 2009.

ÁLVARO, V. Primeira morte por leishmaniose humana no Paraná é confirmada em Foz. Publicado em: 26/01/2016 Disponível em: < <http://www.gazetadopovo.com.br/saude/primeira-morte-por-leishmaniose-humana-no-parana-e-confirmada-em-foz-dsgv3zpdgee4t1o8e5oj5os1c>>. Acesso em: 13 de jul. de 2016.

ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREEIER, M.; MIRANDO, J. C.; SHERLOCK, I.; EULLALI, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER, R. H.; BADARO, R.; DAVID, J. R. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 251–5, 1995.

BASTIEN, P.; PROCOP, G. W.; REISCHL, U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1897-900, 2008.

BIANCHI, M. V.; G. FREDO, TAGLIARI, N. J.; LEITE-FILHO, R.V.; LORENZO, C.; GOTTLIEB LUPION, C.; DRIEMEIER, D.; SONNE, L. Leishmaniose Visceral Canina autóctone na região urbana de Porto Alegre, RS, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. 110, p. 1 – 4, 2016.

BIGELI, J. G.; OLIVEIRA-JR, W. P.; TELES, N. M. M. Diagnosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, **Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 18-23, 2012.

BHATIA, A.; DAIFALLA, N. S.; JEN, S.; BADARO, R.; REED, S. G.; SKEIKY, Y. A. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 102; n. 2, p. 249-61, 1999.

BHATTACHARYYA. T.; BOELAERT, M.; MILES, M. A. Comparison of Visceral Leishmaniasis Diagnostic Antigens in African and Asian *Leishmania donovani* Reveals Extensive Diversity and Region-specific Polymorphisms. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, e2057, 2013.

BRAGA, R. R.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; RYAN, L.; F. SILVEIRA, T. Leishmaniasis in Brazil. XXII: Characterization of *Leishmania* from man, dogs and the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) isolated during an outbreak of visceral leishmaniasis in Santarém, Pará State. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 143-5, 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde**. Brasília, p. 44-6, 2006.

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

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 232-42, 2011.

CUNHA, A. M. Experimental infections in American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 33, p. 581-616, 1938.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 117-8, 2006.

DEBONI, S. C.; BARBOSA, M.; RAMOS, R. R. Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Sul - Vigilância epidemiológica de casos humanos. **Boletim Epidemiológico**, v. 13, n. 1, p. 1-3, 2011.

DIAS, R. C. F.; THOMAZ-SOCCOL, V.; BISETO, A.; NAVARRO, I. T. Occurrence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in domiciled dogs from the city of Foz do Iguaçu, state of Paraná, Brazil. In: Fifth World Congress on Leishmaniosis, p. 826, 2013.

FIGUEIREDO, F. B.; LIMA-JÚNIOR, F. E. F.; TOMIO, J. E.; INDÁ, F. M. C.; CORRÊA, G. L. B.; MADEIRA, M. F. Leishmaniose Visceral Canina: Dois casos autóctones no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 1, p. 1026, 2012.

FOZ DO IGUAÇU. Prefeitura Municipal de Foz do Iguaçu. Portal do Turismo. Disponível em: <<http://www.pmfi.pr.gov.br/turismo/?idMenu=1693>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

FALLAH, E.; KHANMOHAMMADI, M.; RAHBARI, S.; FARSHCHIAN, M.; FARAJNIA, S.; HAMZAVI, F.; ASL, A. M. Serological survey and comparison of two polymerase chain reaction (PCR) assays with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 648-56, 2011.

GADISA, E.; KURU, T.; GENET, A.; ENGERS, H.; ASEFFA, A.; GEDAMU, L. *Leishmania donovani* complex (Kinetoplastida, Trypanosomatidae): comparison of deoxyribonucleic acid based techniques for typing of isolates from Ethiopia. **Experimental Parasitology**, v. 126, p. 203-8, 2010.

GÓMEZ, A.; DESCHUTTER, J.; GALARZA, F.; SILVA, G.; SALOMÓN, O. D.; SANTINI, M. S.; RAMOS, M.; FATTORE, G.; BAEZ, P.; ABRIL, M. Diagnosis of urban visceral leishmaniasis in Puerto Iguazú City, Misiones province, Argentina. **5° World Congress on Leishmaniasis**, Porto Galinhas, Brazil 13-17/5/2013.

HARALAMBOUS, C.; ANTONIOU, M.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.; SOTERIADOU, K. Development of a molecular assay specific for the *Leishmania donovani* complex that discriminates *L. donovani/Leishmania infantum* zymodemes: a useful tool for typing MON-1. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 60, p. 33-42, 2008.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estimativas da população residente nos municípios brasileiros com data de referência em 1º de julho de 2012. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2012/estimativa_2012_municipios.pdf>. Acesso em: 06 jul 2016a.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estimativas da população residente nos municípios brasileiros com data de referência em 1º de julho de 2013. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2013/estimativa_2013_dou.pdf>. Acesso em: 06 jul 2016b.

LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; REYNES, J.; LAMOTHE, J.; BASTIEN, P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Journal Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 613-7, 2002a.

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n.1, p. 210–5, 2002b.

LAMBSON, B.; SMYTH, A.; BARKER, D. C. *Leishmania donovani*: development and characterization of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. **Experimental Parasitology**, v. 94, n. 1, p. 15-22, 2000.

MCKEAN, P. G.; TRENHOLME, K. R.; RANGARAJAN, D.; KEEN, J. K.; SMITH, D. F. Diversity in repeat-containing surface proteins of *Leishmania major*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 86, p. 225–35, 1997.

MARZOCHI, M. C. A.; FAGUNDES, A.; ANDRADE, M. V.; SOUZA, M. B.; MADEIRA, M. F.; MOUTA-CONFORT, E; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 570–580, 2009.

MASSIA, L. I.; QUEVEDO, R. D.; WELICKSI, L. J. R.; BITTENCOURTI, R. A.; BITTENCOURTII, D. G.; MARQUES, G. D.; CELIS, E. L. H.; PELLEGRINI, D. C. P.. Leishmaniose visceral canina em três bairros de Uruguaiana – RS. **Revista VISA em debate**, v. 4, n. 1, p. 113-9, 2016.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD. J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16: 188-9, 2000.

MAZIERO, N.; THOMAZ-SOCCOL, V.; STEINDEL, M.; LINK, J. S.; ROSSINI, D.; ALBAN, S. M.; NASCIMENTO, A. J. Rural–urban focus of canine visceral leishmaniosis in the farwestern region of Santa Catarina State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 92–5, 2014.

PARANÁ. Secretaria da Saúde. 9ª Regional de Saúde. Núcleo de Entomologia de Foz do Iguaçu. Relatório. Foz do Iguaçu; 2013.

PARANÁ. Secretaria de Saúde. Paraná registra primeiro caso de leishmaniose visceral em humanos. Publicado em: 16/07/2015. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/modules/noticias/makepdf.php?storyid=4217>>. Acesso em: 13 de jul. de 2016.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde. Nota técnica conjunta da Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul e Laboratório Central do Estado nº 01/2014. **Leishmaniose visceral no Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2014.

RIOUX, J. A.; LANOTTE, G.; SERRES, E.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P.; PERIERES, J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Annales de Parasitologie Humaine et comparée**, v. 65, p. 111–25, 1990.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267–75, 1990.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M.; Control of visceral leishmaniasis in Latin America: A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, p. 1–17, 2010.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman-Donovan and further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**,; v. 2, p. 1261–1401, 1903.

SALOMÓN, O. D.; FERNÁNDEZ, M. S.; SANTINI, M. S.; SAAVEDRA, S; MONTIEL, N.; RAMOS, M.; ROSA, J. R.; SZELAG, E. A.; MARTÍNEZ, M. F. Distribución de *Lutzomyia longipalpis* en la Mesopotamia Argentina, 2010. **Medicina (B Aires)**, v. 71, p. 22–6, 2011.

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**, v. 45, n. 5, p. 643–5, 2012.

SCHIMMING, B. C. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 10, n. 19, p. 1–17, 2012.

SILVA, M. A. L.; MEDEIROS, R. A.; Brandão- Filho, S.; MEDEIROS, Z. Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, p. 1–15, 2010.

STEINDEL, M.; MENIN, A.; EVANGELISTA, T.; STOCO, P. H.; MARLOW, M. A.; FLEITH, R. C.; PILATI, C.; GRISARD, E. C. Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 490–6, 2013.

SADLOVA, J.; PRICE, H. P.; SMITH, B. A.; VOTÝPKA, J.; VOLF, P.; SMITH, D. F. The stagereregulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*. **Cellular Microbiology**, v. 12, p. 1765–79, 2010.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–9, 2011.

TARTAROTTI, A. L.; DONINI, M. A.; ANJOS, C.; RAMOS, R. R. Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Sul - Vigilância de reservatórios caninos. **Boletim Epidemiológico**, v. 13, n. 1, p.5 - 6, 2011.

TELES, N. M. M.; AGOSTINI, M. A. P.; BIGELLI, J. G.; NOLETO, R. V.; OLIVEIRA, J. D.; OLIVEIRA-JUNIOR, W. P. Molecular and parasitological detection of *Leishmania* spp. in dogs caught in Palmas, TO, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 21, n. 3, p. 278-82, 2012.

THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E. A.; NAVARRO, I. T.; FARIAS, M. R.; 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**, v. 18, n. 3, p. 46-51, 2009.

THOMAZ-SOCCOL, V.; LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PRATLONG, F.; MARTINIDUMAS, A.; SERRES, E. Phylogenetic Taxonomy of New World *Leishmania*. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 68, n. 2, p. 104-106, 1993.

THOMAZ-SOCCOL, V.; LUZ, E.; BISETTO-JUNIOR, A.; CASTRO, E. A.; FERREIRA DA COSTA, E. S.; NAVARRO, I.T. Visceral and cutaneous leishmaniasis in the Paraná State, southern of Brazil border with Argentina and Paraguay. In: Worldleish 5, 2013, Porto de Galinhas. worldleish5. v. 5. p. 76.

WERNEC, G. L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2937-40, 2008.

ZACKAY, A.; NASEREDDIN, A.; TAKELE, Y.; TADESSE, D.; HAILU, W.; HURISSA, Z.; YIFRU, S.; WELDEGEBREAL, T.; DIRO, E.; KASSAHUN, A.; HAILU, A.; JAFFE, C. L. Polymorphism in the HASPB repeat region of East African *Leishmania donovani* strains. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, p. 1-9, 2013.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- As localidades analisadas, que fazem fronteira com a Argentina e Paraguai, possuem características ambientais e geográficas que favorecem a manutenção do ciclo da *L. infantum*.

- Pelas análises das sequências dos isolados da aspiração dos linfonodos e de camada leucocitária, a espécie *L. infantum* está presente no município de Foz do Iguaçu, em localidades de fronteira com a Argentina e Paraguai;

- A autoctonia dos isolados foi confirmada em inquérito epidemiológico;

- O estudo confirma a emergência da leishmaniose visceral no Paraná com a identificação da *Leishmania infantum* em cães no município de Foz do Iguaçu.

ANEXO I

TERMO DE CIÊNCIA E AUTORIZAÇÃO



Eu _____, portador (a) do RG nº _____ concordo em participar do projeto de pesquisa “PESQUISA ANTICORPOS ANTI LEISHMANIA-SPP E O PERFIL SANITÁRIO DE CÃES ÁREA URBANA DE FOZ DO IGUAÇU-PR.” realizado pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) / Centro de Ciências Agrárias (CCA) / Universidade Estadual de Londrina (UEL) e Regional de Saúde de Foz do Iguaçu, PR e Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. A pesquisa tem por objetivo determinar a infecção por Leishmania spp e o perfil sanitário dos cães de Foz do Iguaçu, PR e associar aos fatores de risco encontrados. Todos os procedimentos serão realizados por médicos veterinários utilizando apenas material estéril e descartável.

Afirmo que os cães abaixo listados estão sob minha posse e responsabilidade e autorizo a equipe deste projeto a entrar na minha residência e coletar amostras de sangue e carrapatos e biópsia se houver lesões característica de Leishmania cutânea dos _____ cães (estimação) ali presentes e identificados pelos nomes: _____

Estou ciente que serei informado sobre o resultado do exame dos meus cães e que devo procurar assistência veterinária caso o exame de pelo menos um destes animais seja positivo.

Sei que as informações fornecidas são confidenciais e quando divulgados os resultados do trabalho, serão de forma global e anônima, preservando minha identidade, da minha residência e dos meus animais.

Entendo que não precisarei efetuar qualquer pagamento e que tenho a liberdade de entrar em contato com a pesquisadora responsável para maiores esclarecimentos sobre a pesquisa e/ou para não mais participar do projeto, no momento em que eu quiser, sem qualquer prejuízo.

Foz do Iguaçu, PR, _____ de _____ de 201__.

Proprietário Participante

	Responsável pela Equipe de Coleta Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro (Médico Veterinário) Universidade Estadual de Londrina (UEL) Fone: (43) 3371 5871 e-mail: italmar@uel.br	
--	---	--

ANEXO II



INVESTIGAÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA – FOZ DO IGUAÇU

1. IDENTIFICAÇÃO: **ID da casa:** _____

Protocolo: _____ DATA: ____/____/2013

Nome do proprietário: _____

Rua: _____ **n°** _____

Rua Transversal D: _____

Rua Transversal E: _____

Bairro: _____

Telefone Residencial: _____ **Celular:** _____

Referência: _____ Distrito: _____

2. DADOS DA RESIDÊNCIA:

2.1 Local da residência: 1. zona urbana 2. zona rural 3. peri-urbano

2.2 Presença de mosquitos: 1. ausente 2. pouco 3. muito
 Controle: 1. tela 2. repelente de contato 3. protetor “elétrico” 4. outros: _____

2.3 Presença de bosques: 1. sim 2. não
 Qual? 1. mata ciliar 2. mata nativa 3. reflorestamento 4. outros: _____
 Distância da moradia: 1. até 300 m 2. de 300 a 500 m 3. mais de 500 m
 Área aproximada: _____ m²

2.4 Presença de outros animais: 1. sim 2. não
 Quais? 1. macacos 2. eqüinos 3. muares 4. animais silvestres 5. gambá
 6. rato 7. camundongo 8. gato 9. outros: _____

2.5 Presença de material orgânico no quintal: 1. sim 2. não
 Qual (is)? 1. horta 2. pomar 3. jardim 4. lixo
 5. folhas amontoadas 6. entulhos 7. outros: _____

2.6 Destino do esgoto doméstico: 1. rede pública 2. fossa 3. céu aberto 4. rio/córregos

2.7 Destino do lixo: 1. coleta pública 2. terreno baldio 3. quintal 4. outros: _____

2.8 Presença de depósitos de água: 1. sim 2. não
 Qual (is)? 1. poças d’água 2. várzea 3. alagadiços 4. vasilhames com água
 5. pneus velhos com água 6. outros _____
 A área alagadiça demora para secar? 1. sim 2. não Quanto tempo? _____

3. DADOS CLÍNICOS DO MORADOR

3.1 Algum morador apresenta lesão de pele? 1. sim 2. não Quantas? _____
 Local da lesão: _____
 Tipo da lesão? 1. ulcerada 2. nodular 3. outros: _____
 Qual a característica da lesão? _____
 Quanto tempo tem a lesão _____
 Tem diagnóstico? 1. sim 2. não Qual? _____
 Fez tratamento? 1. sim 2. não Qual? _____
 Morador viaja ou viajou recentemente? 1. sim 2. não
 Para onde/ Cidade: _____ Estado: _____
 1. zona urbana 2. zona rural Há quanto tempo? _____

3.2 Algum morador apresenta sinais compatíveis com LV? 1. sim 2. não
 Órgão afetado: Rim Fígado Outros: _____
 Sinais clínicos apresentados: _____
 Quanto tempo apresenta os sinais? _____
 Tem diagnóstico? 1. sim 2. não Qual? _____
 Fez tratamento? 1. sim 2. não Qual? _____
 Morador viaja ou viajou recentemente? 1. sim 2. não
 Para onde/ Cidade: _____ Estado: _____
 1. zona urbana 2. zona rural Há quanto tempo? _____


4. DADOS DO CÃO - Identificação
ID do cão: _____

Nome do animal: _____ **Nº de registro do animal:** _____

Raça: 1. SRD 2. outra: _____ **Microchip:** _____

Sexo: 1. macho 2. Fêmea **Idade:** _____ Filhote Jovem Adulto Idoso

Peso aproximado: _____

End. atual do cão: _____

Tempo de moradia neste endereço: _____

Cão veio de outra cidade? 1. sim 2. não **Qual?** _____ **Há quanto tempo?:** _____

Deslocamento do cão nos últimos 12 meses: Município/ UF	Zona		Tempo de permanência neste município
	Rural	Urbana	
a. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
b. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
c. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
d. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____

4.1. Apresenta algum sinal clínico de doença? 1. sim 2. não

Qual? 1. febre 2. desidratação 3. prostração 4. diarreia 5. anorexia

 6. perda de peso 7. onicogribose 8. sarna 9. alterações dermatológicas

 10. linfadenopatia 11. outros: _____

Data do início dos primeiros sinais clínicos: ____/____/____

4.2 Cão apresenta lesão de pele? 1. sim 2. Não **Quanto tempo?** _____

Tipo da lesão: 1. ulcerada 2. nodular 3. outros: _____

Local da lesão: 1. orelha 2. bolsa escrotal 3. focinho 4. Peri-vulvar 5. perianal

 6. membros 7. abdômen 8. outros locais: _____

Característica da lesão: _____

Tem diagnóstico? 1. sim 2. não **Qual?** _____

Fez tratamento? 1. sim 2. não **Qual?** _____ **Quanto tempo?** _____

4.3 Presença de Carrapatos: 1. sim 2. não

Quantidade: 1. poucos 2. muitos

Controle no animal: 1. Banho carrapaticida 2. outros: _____

Controle no ambiente: 1. Pulverização 2. outros: _____

4.4 Animal foi vacinado contra leishmaniose? 1. sim 2. Não

Nome da clínica: _____

Nome do Médico Veterinário: _____

Laboratório/ nome da vacina: _____

Data da última dose: ____/____/____ **Nº de doses aplicadas:** _____

