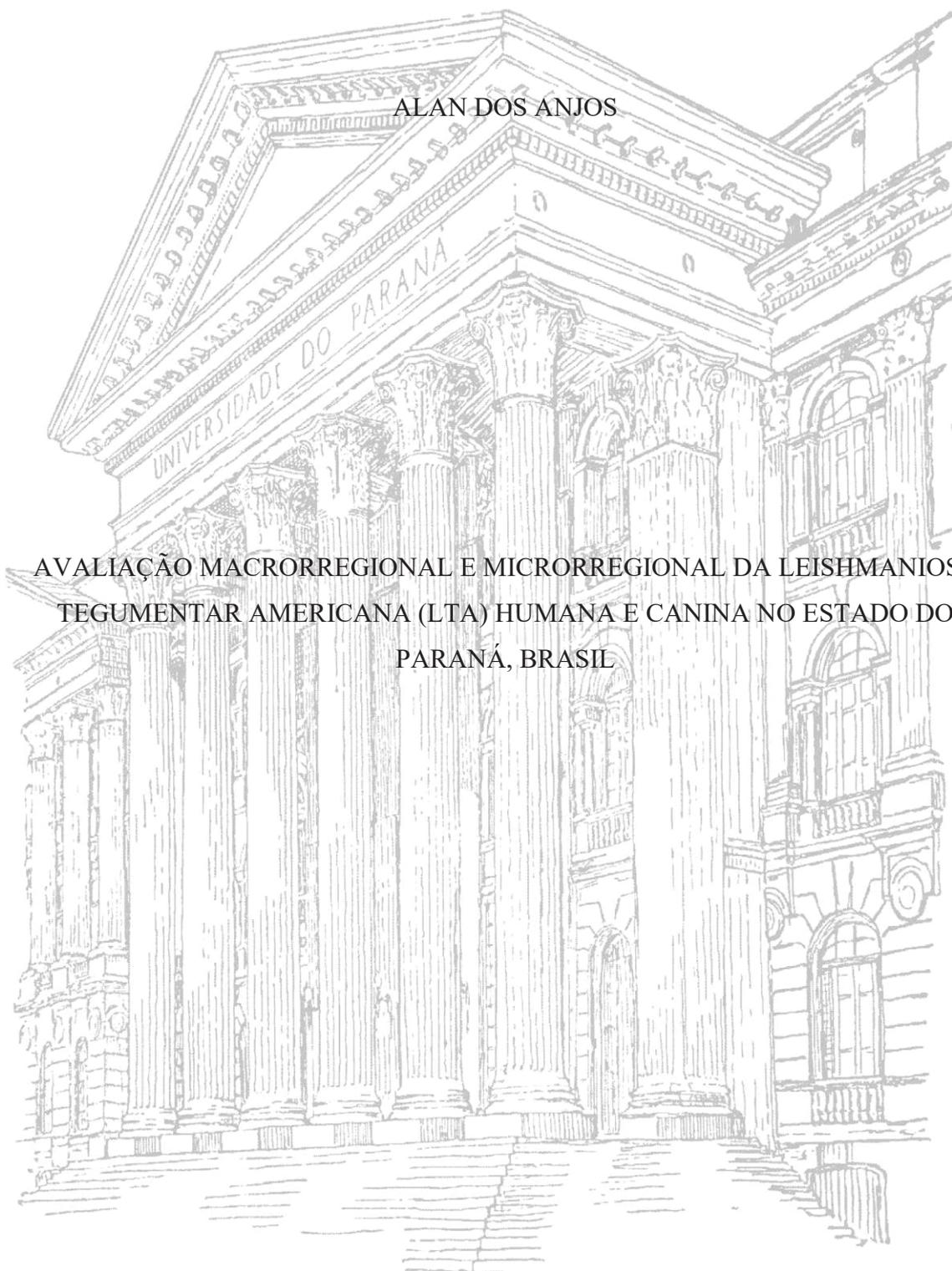


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALAN DOS ANJOS

AVALIAÇÃO MACRORREGIONAL E MICRORREGIONAL DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA (LTA) HUMANA E CANINA NO ESTADO DO
PARANÁ, BRASIL



CURITIBA

2018

ALAN DOS ANJOS

AVALIAÇÃO MACRORREGIONAL E MICRORREGIONAL DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA HUMANA (LTA) E CANINA NO ESTADO DO
PARANÁ, BRASIL

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre. Área de concentração: Parasitologia, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. Departamento de Patologia Básica. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro.

Co-orientador: Prof. Dr. Andrey José de Andrade

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Anjos, Alan dos.

Avaliação macrorregional e microrregional da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) humana e canina no estado do Paraná, Brasil. / Alan dos Anjos. – Curitiba, 2018.
134 f. : il.

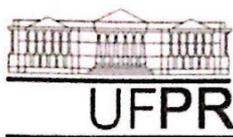
Orientadora: Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro.

Coorientador: Andrey José de Andrade.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Leishmania. 2. Leishmaniose. 3. Epidemiologia. 4. Cães. I. Título. II. Ribeiro, Magda Clara Vieira da Costa. III. Andrade, Andrey José de. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20.ed.) 616.9364



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

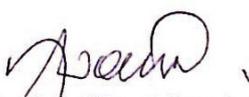
**“Avaliação macrorregional e microrregional da
Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) humana e
canina no Estado do Paraná, Brasil”**

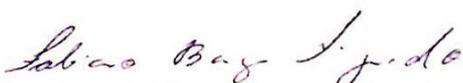
por

Alan dos Anjos

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:


Profa. Dra. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro - Presidente


Profa. Dra. Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo


Prof. Dr. Fabiano Borges Figueiredo


Prof. Dr. João Carlos Minozzo

Curitiba, 29 de março de 2018.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder força e paciência nos momentos mais difíceis, me auxiliando em mais essa etapa da minha vida.

À minha querida esposa Jéssica, e meu filho Arthur, por estarem sempre ao meu lado, sendo companheiros, amigos e muito pacientes. Obrigado por terem feito do meu sonho o nosso sonho!

Aos meus pais e irmã, Eder, Dirce e Stefanie, por todo apoio, amor e carinho e incentivo, estando sempre comigo.

Aos orientadores Profa. Magda e Prof. Andrey, pela orientação, pelos ensinamentos, pela oportunidade e pela atenção durante todo esse processo.

Aos meus tios, tias, primos e primas, que tanto vibraram com as conquistas.

À todos os docentes e pesquisadores que colaboraram para minha formação, em especial o Dr. Fabiano, o Dr. Minozzo, a Dra. Juliana e Dr. André.

Aos amigos de longa data pelo apoio e incentivo, desde sempre.

Aos amigos que fiz durante essa trajetória.

Aos amigos do laboratório, os antigos e novos, pela ótima convivência e risadas

Aos técnicos que tanto auxiliaram, em especial Eliana (UFPR), Artur (Fiocruz), Adilson (Fiocruz) e Gustavo (Fiocruz).

Aos animais, parte fundamental desse trabalho.

À Secretaria de Cerro Azul por todo apoio, estrutura e suporte durante a execução dos trabalhos de campo.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

À todos que de alguma forma, contribuíram para esta conquista.

Ninguém vence sozinho...OBRIGADO A TODOS!

“Stay hungry, stay foolish”
(Steve Jobs)

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença tropical negligenciada (DTN) que acomete grande diversidade de espécies de mamíferos. A sintomatologia dessa enfermidade é ampla, podendo ser caracterizada por lesões granulomatosas localizadas e autolimitantes, até lesões destrutivas orais e nasais, o que prejudica o campo psicossocial do indivíduo. Este estudo objetivou: a) realizar uma análise macrorregional dos casos de LTA humana no estado do Paraná, por meio de uma análise detalhada dos dados obtidos do Sistema de Agravos de Notificação (SINAN) do Sistema Único de Saúde (SUS) no período de 2001 a 2015, associando-os aos dados climáticos obtidos do Sistema Meteorológico do Paraná (SIMEPAR), tendo como auxílio Sistema de Informação Geográfica (SIG) e, b) analisar em escala microrregional a prevalência da LTA canina no município de Cerro Azul, estado do Paraná, em dois dos bairros com maior número de notificações (Centro e Quarteirão), por meio de coletas de amostras de sangue e biópsias dos cães com lesões sugestivas para LTA. A análise macrorregional dos casos de LTA humana no Paraná demonstrou que o estado é endêmico para a doença, notificando casos em mais de 330 dos 399 municípios, tendo as regiões Norte e Nordeste do estado como as mais prevalentes. Observou-se também que os casos de LTA humana estão correlacionados estatisticamente ao sexo masculino, com faixa etária entre 20 e 59 anos, na forma clínica cutânea, em áreas urbanas de locais quentes e secos. Com base na análise da situação epidemiológica da LTA canina no município de Cerro Azul, Paraná, encontrou-se uma prevalência de 2% (4/198) e soroprevalência de 53% (100/189). O risco relativo “*odds ratio*” de se encontrar um cão (macho/fêmea), sem raça definida (SRD) em área urbana do município e positivo para anticorpos anti-*Leishmania* é de 68%. Observou-se também que esta é uma doença de difícil diagnóstico, e somente a associação de vários métodos diagnósticos pode fornecer maior confiabilidade. Durante a execução do estudo sobre LTA canina, duas novas vertentes foram originadas, sendo a primeira, a padronização de PCR Bplex para diagnóstico de LTA em mamíferos, utilizando um controle de viabilidade da amostra e do processo de extração para o gene prepronociceptina (primeira vez utilizado para este fim). Já a segunda vertente foi o relato do isolamento e caracterização de *L. braziliensis* proveniente de lesão cicatrizada em cão (primeiro relato em cão naturalmente infectado e não tratado). Dessa forma, este trabalho está subdividido em cinco capítulos, com ampla abordagem sobre diversos aspectos da LTA. O primeiro capítulo se resume a revisão bibliográfica sobre o tema; o segundo retrata a análise macrorregional dos casos de LTA humana no Paraná; o terceiro se refere à análise regional da prevalência de LTA canina em Cerro Azul, Paraná; o quarto se trata da padronização da PCR Bplex; e por último, o relato do isolamento e caracterização de *L. braziliensis* em cicatriz de um cão.

Palavras-chave: *Leishmania*, diagnóstico, epidemiologia, leishmaniose tegumentar americana canina

ABSTRACT

The American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a Neglected Tropical Disease (NTD) that infects a large diversity of mammalian species. The disease has a wide symptomatology, characterized by granulomatous and self-healing lesions, until oral and nasal destructive wounds which affects the psychosocial field of the individual. This study aimed to: a) perform a macro-regional analysis of the ATL human cases in Paraná State, through a detailed analysis of the data obtained from Notification Injuries System (SINAN) of the Unified Health System (SUS), between 2001 and 2015, associating them with the climatic data obtained from the Paraná Meteorological System (SIMEPAR), having Geographic Information System (GIS) as assistance and, b) to analyze on a micro-regional scale the prevalence of canine ATL in the municipality of Cerro Azul, Paraná State, in two of the highest number of notifications neighborhoods (Centro and Quarteirão), through blood sampling and biopsies of dogs with ATL suggestive lesions. The macro-regional analysis of human ATL cases in Paraná has shown that the state is endemic for the disease, reporting cases in more than 330 of the 399 municipalities, with the North and Northeast regions of the state as the most prevalent. It was also observed that the human ATL cases are statistically correlated to the male sex, with ages between 20 and 59 years, in cutaneous clinical form, in urban areas of hot and dry places. Based on the regional analysis of the canine ATL's epidemiological situation in Cerro Azul, Paraná, a prevalence of 2% (4/198) and seroprevalence of 53% (100/189) were found. The relative risk “*odds ratio*” of finding a dog (male/female), without a defined breed (SRD), from urban areas, positive for anti-*Leishmania* antibodies in serology is 68%. It was also observed that this disease is difficult to diagnose, and only the association of several diagnostic methods can provide greater reliability. During the execution of the canine ATL study, two new strands were originated, being the first, the standardization of Biplex PCR for the diagnosis of ATL in mammals, using a sample viability and extraction process control for the prepronociceptin gene (first used for this purpose). The second one was the report of isolation and characterization of *L. braziliensis*, from a scar in a dog (first report in a naturally infected and untreated dog). Therefore, this study is subdivided into five chapters, with a broad approach on several aspects of the ATL. The first chapter summarizes the bibliographic review of the subject; the second describes the macro-regional analysis of human ATL cases in Paraná State; the third refers to the regional analysis of the prevalence of canine ATL in Cerro Azul, Paraná; the fourth is the Biplex PCR standardization; and finally, the report of isolation and characterization of *L. braziliensis*, from a dog's scar.

Keywords: *Leishmania*, diagnosis, epidemiology, canine american tegumentary leishmaniasis

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 – FORMAS EVOLUTIVAS DA *Leishmania* spp.....29

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 – DIVISÃO DAS MACRORREGIONAIS DA SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ, SEGUNDO A SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ (SESA).....43

FIGURA 2 – TAXA DE INCIDÊNCIA ANUAL DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA, NO BRASIL, NA REGIÃO SUL E NO ESTADO DO PARANÁ DE 2001 A 2015.....47

FIGURA 3 – MUNICÍPIOS ACOMETIDOS POR ANO E TAXA DE INCIDÊNCIA MÉDIA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DO PARANÁ DURANTE O PERÍODO DE 2001 A 2015.....47

FIGURA 4 – CASOS CONFIRMADOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA DIVIDIDOS POR MESORREGIÕES DA SAÚDE, DURANTE O PERÍODO DE 2001 A 2015, NO ESTADO DO PARANÁ.....48

FIGURA 5 – NÚMERO DE CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA PREDITOS, DE ACORDO COM O AUMENTO DA TEMPERATURA MÉDIA (°C) NO ESTADO DO PARANÁ.....51

FIGURA 6 – NÚMERO DE CASOS PREDITOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA DE ACORDO COM A PRECIPITAÇÃO ACUMULADA (mm) NO ESTADO DO PARANÁ.....51

FIGURA 7 – DISTRIBUIÇÃO ANUAL DOS CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO ESTADO DO PARANÁ DE 2001 A 2015.....52

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 – ÁREA DE ESTUDO.....72

FIGURA 2 – FATORES DE RISCO PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, PARANÁ.....73

FIGURA 3 – MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, ESTADO DO PARANÁ.....73

FIGURA 4 – FERIDA SUGESTIVA DE LTA CANINA.....75

FIGURA 5 – FLUXOGRAMA ILUSTRANDO OS AS AMOSTRAS COLETADAS E A TÉCNICA DIAGNÓSTICA A QUE FOI DESTINADA.....	75
FIGURA 6 – TUBOS COM MEIO NNN UTILIZADAS PARA CULTIVO DE <i>Leishmania</i>	77
FIGURA 7 – PRODUTOS DE PCR OBTIDOS COM OS <i>primers</i> B1/B2 E PNOC.....	79
FIGURA 8 – DOSAGEM DO EXTRATO BRUTO DE PROTEÍNAS DE <i>Leishmania. braziliensis</i> POR MÉTODO DE BRADFORD.....	81
FIGURA 9 – AMOSTRA CA131 COM LESÃO CLÁSSICA DE LTA: BORDAS ELEVADAS COM FUNDO GRANULOMATOSO.....	81
FIGURA 10 – PLACA UTILIZADA NA PADRONIZAÇÃO DO ELISA INDIRETO.....	82
FIGURA 11 – CURVA ROC OBTIDA A PARTIR DA ANÁLISE DAS ABSORBÂNCIAS DOS CONTROLES NEGATIVOS E DAS AMOSTRAS DE CÃES DO MUNICÍPIO DE CERRO AZUL.....	83
FIGURA 12 – CORRELAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE OBTIDAS A PARTIR DAS ANÁLISES DAS ABSORBÂNCIAS DO SORO DOS CONTROLES NEGATIVOS E AMOSTRAS DE SORO DOS CÃES DO MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, PARANÁ.....	83
FIGURA 13 – NÚMERO ABSOLUTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE E TECIDO DE CÃO (<i>C. familiaris</i>) POSITIVOS PARA <i>L. braziliensis</i> , MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, ESTADO DO PARANÁ.....	88
FIGURA 14 – VALORES DAS ABSORBÂNCIAS OBTIDAS COM A LEITURA DAS PLACAS DE ELISA INDIRETO.....	89
FIGURA 15 – CÃES (<i>C. familiaris</i>) POSITIVOS PARA ANTICORPOS ANTI- <i>Leishmania</i> NO ELISA INDIRETO, DE ACORDO COM O SEXO, RAÇA E ZONA DE RESIDÊNCIA.....	90
FIGURA 16 – AMOSTRAS POSITIVAS PARA LTA, SEGUNDO SUA ORIGEM (SANGUE/BÍOPSIA) E MÉTODO DIAGNÓSTICO POSITIVO.....	91

CAPÍTULO 4

FIGURA 1 – PCR BIPLEX COM <i>PRIMERS</i> B1/B2 E PNOC.....	119
--	-----

CAPÍTULO 5

FIGURA 1 – LESÃO SUSPEITA (ORELHA ESQUERDA) PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA DE UM CÃO (<i>C. familiaris</i>) PROVENIENTE DE CERRO AZUL, PARANÁ.....	127
--	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1 – TOTAL DE CASOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA OBTIDOS NO ESTADO DO PARANÁ ENTRE 2001 E 2015. OS DADOS ESTÃO CLASSIFICADOS DE ACORDO COM SEXO, FAIXA ETÁRIA, ZONA DE RESIDÊNCIA E TIPO DE ENTRADA, CORRELACIONADOS COM A FORMA CLÍNICA.....	49
APÊNDICE 1 – MACRORREGIONAIS DA SAÚDE E SUAS MICRORREGIÕES DA SAÚDE (= REGIONAIS) DO ESTADO DO PARANÁ, SEGUNDO A SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ (SESA).....	63
APÊNDICE 2 – TOTAL DE CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DO PARANÁ.....	64
APÊNDICE 3 – TOTAL DE CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NOTIFICADOS POR ANO, DE CADA REGIONAL DA SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ, DURANTE O PERÍODO DE 2001 A 2015.....	65
APÊNDICE 4 – COEFICIENTE DE INCIDÊNCIA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA, POR FAIXA ETÁRIA, NO ESTADO DO PARANÁ DURANTE O PERÍODO DE 2001 A 2015.....	66

CAPÍTULO 3

TABELA 1 – FATORES RELACIONADOS AOS CÃES (<i>C. familiaris</i>) PROVENIENTES DOS BAIROS CENTRO E QUARTEIRÃO, MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, ESTADO DO PARANÁ.....	86
TABELA 2 – MÉTODO DIAGNÓSTICO (CULTIVO CELULAR) PARA DETECÇÃO DE <i>Leishmania</i> sp NO SANGUE E BIÓPSIA DE CÃO (<i>C. familiaris</i>), MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, ESTADO DO PARANÁ.....	87
TABELA 3 – MÉTODO DIAGNÓSTICO (REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE-PCR) PARA DETECÇÃO DE <i>Leishmania</i> sp NO SANGUE E BIÓPSIA DE CÃO (<i>C. familiaris</i>), MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, ESTADO DO PARANÁ.....	87
TABELA 4 – AMOSTRAS POSITIVAS DE CÃO (<i>C. familiaris</i>) PARA A PRESENÇA DE <i>L. braziliensis</i> POR CULTIVO CELULAR OU PCR, E SUA RESPECTIVA	

ÁREA DE RESIDÊNCIA, MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, ESTADO DO PARANÁ.....	88
TABELA 5 – RESULTADO DA ANÁLISE DAS AMOSTRAS NO ELISA INDIRETO....	89
APÊNDICE 2 - AMOSTRAS POSITIVAS PARA O ELISA INDIRETO.....	109

CAPÍTULO 4

TABELA 1 – INFORMAÇÕES REFERENTES AOS PARES DE PRIMERS.....	117
---	-----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BSA	-	Albumina sérica bovina
CA	-	Cachorro
CEUA	-	Comitê de Ética no Uso de Animais
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
DTN	-	Doença tropical negligenciada
EDTA	-	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	-	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FUNASA	-	Fundação Nacional de Saúde
g	-	Gramas
G6PDH	-	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GLM	-	Modelo Linear Generalizado
GLMM	-	Modelo Linear Generalizado Misto
GPI	-	Glicose fosfoisomerase
hab	-	Habitantes
HRP	-	Estraptavidina peroxidase
Hz	-	Hertz
IBGE	-	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDRM	-	Intradermorreação de Montenegro
kDNA	-	Ácido Desoxorribonucléico do Cinetoplasto
kg	-	Quilogramas
km ²	-	Quilômetros quadrados
LC	-	Leishmaniose cutânea
LCD	-	Leishmaniose cutânea difusa
LDPC	-	Leishmaniose dérmica pós-calazar
LiCl	-	Cloreto de Lítio
LMC	-	Leishmaniose mucocutânea
LRT	-	Razão de verossimilhança
LTA	-	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	-	Leishmaniose Visceral
Mg	-	Miligramas
mL	-	Mililitro
MM	-	Marcador molecular

Mm	-	Milímetros
Ng	-	Nanogramas
NH1	-	Nucleotidase
Nm	-	Nanômetro
NNN	-	Novy, Neal, Nicole
°C	-	Graus Celsius
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
OPD	-	Ortofenileno diamina
PAHO	-	Pan American Helth Organization
Pb	-	Pares de base
PCR	-	Reação em cadeia pela polimerase
PNOG	-	Preponociceptina
PR	-	Paraná
Prec	-	Precipitação
Prof ^a	-	Professora
RIFI	-	Reação de imunoflorescência
ROC	-	Receiver Operating Characteristic
Rpm	-	Rotações por minuto
SESA	-	Secretaria do Estado da Saúde
SIG	-	Sistema de Informação Geográfica
SIMEPAR	-	Sistema Meteorológico do Paraná
SINAN	-	Sistema de Agravos de Notificação
SRD	-	Sem raça definida
SUS	-	Sistema único de Saúde
TBE	-	Tris-Borato-EDTA
TCLE	-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TELT	-	Tris-HCl 1M; EDTA 0,5 M; LiCl 5M; Triton X-100
Temp	-	Temperatura
U	-	Unidades
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná
µg	-	Micrograma
µL	-	Microlitro
Umid	-	Umidade
WHO	-	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	20
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA.....	21
1 CARACTERIZAÇÃO DAS LEISHMANIOSES.....	22
2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	23
2.1 AGENTES ETIOLÓGICOS.....	23
2.2 VETORES.....	23
2.3 MAMÍFEROS SILVESTRES	25
2.4 MAMÍFEROS DOMÉSTICOS.....	26
2.5 CICLO.....	28
2.6 EPIDEMIOLOGIA DA LTA.....	29
2.7 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.....	30
3 REFERÊNCIAS.....	32
CAPÍTULO 2 – FATORES RELACIONADOS À OCORRÊNCIA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA HUMANA NO ESTADO DO PARANÁ.....	39
RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	40
1 INTRODUÇÃO.....	41
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1 ÁREA DE ESTUDO.....	43
2.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	43
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
2.4 ANÁLISE ESPACIAL.....	45
2.5 ASPÉCTOS ÉTICOS.....	45
3 RESULTADOS.....	46
3.1 RESULTADOS GERAIS REFERENTES AO PARANÁ E REGIÕES.....	46
3.2 POPULAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ.....	48

3.3 ANÁLISES DAS VARIÁVEIS ABIÓTICAS.....	49
3.4 MAPA DE KERNEL.....	50
4 DISCUSSÃO.....	54
5 REFERÊNCIAS.....	58
6 APÊNDICES.....	63

CAPÍTULO 3 – PREVALÊNCIA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM CÃES (*Canis lupus familiaris*) DO MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, PARANÁ, BRASIL.....67

RESUMO.....	68
ABSTRACT.....	68
1 INTRODUÇÃO.....	70
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	72
2.1 ÁREA DE ESTUDO.....	72
2.2 INVESTIGAÇÃO DE LTA CANINA.....	74
2.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.....	75
2.3.1 Cultivo celular.....	76
2.3.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	77
2.3.2.1 Extração de DNA genômico.....	77
2.3.2.2 A reação de PCR.....	78
2.3.3 ELISA indireto.....	79
2.3.3.1 Obtenção de antígeno.....	80
2.3.3.2 Padronização do ELISA.....	80
2.3.3.3 Protocolo.....	84
2.3.4 Caracterização isoenzimática.....	84
2.3.5 Análise dos dados.....	84
3 RESULTADOS.....	86
4 DISCUSSÃO.....	92
5 REFERÊNCIAS.....	98
6 APÊNDICES.....	106

CAPÍTULO 4 – PCR BIPLEX COMO FERRAMENTA PARA DIAGNÓSTICO DE *Leishmania (viannia) braziliensis* COM CONTROLE DE VIABILIDADE AMOSTRAL.....113

RESUMO.....	114
ABSTRACT.....	114
1 INTRODUÇÃO.....	115
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	117
3 RESULTADOS.....	119
4 DISCUSSÃO.....	120
5 REFERÊNCIAS.....	121

CAPÍTULO 5 – ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Leishmania braziliensis* (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) DE LESÃO CICATRIZADA EM ORELHA DE *Canis lupus familiaris*.....124

RESUMO.....	125
ABSTRACT.....	125
1 INTRODUÇÃO.....	126
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	127
2.1 AREA DE ESTUDO E PACIENTE.....	127
2.2 PROCEDIMENTOS.....	127
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	129
4 REFERÊNCIAS.....	130

CONCLUSÃO GERAL.....132

PERSPECTIVAS.....133

1 INTRODUÇÃO

Algumas espécies de *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), incluindo *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) mexicana* estão entre os agentes etiológicos mais importantes das leishmanioses em mamíferos nas Américas (ALVAR et al., 2012). Esses parasitos são caracterizados por alta heterogeneidade genética e ecletismo biológico, como evidenciado nas variadas ordens de mamíferos com infecção relatada (ROQUE & JANSEN, 2014). Como resultado, essas espécies de protozoários possuem ciclos de transmissão complexos, com características epidemiológicas específicas de cada região (ASHFORD, 1996; ROTUREAU, 2006).

As várias espécies do gênero *Leishmania*, são transmitidas pela picada de fêmeas dos flebotomíneos (Diptera: Phlebotominae) durante o repasto sanguíneo. As leishmanioses possuem um amplo espectro de manifestações clínicas e as diferentes sintomatologias estão relacionadas à espécie envolvida na infecção. Essas estão divididas em Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC). A primeira ainda é subdividida em leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose cutânea difusa (LCD). As leishmanioses são importantes doenças de impacto em Saúde Pública e estão classificadas como afecções de notificação obrigatória (ZIJLSTRA et al., 2003; BAILEY et al., 2007; WHO, 2016).

As leishmanioses são a segunda entre as seis doenças infecciosas e parasitárias mais comuns no mundo. Esse conjunto de doenças é considerado negligenciado pelo fato de serem limitados os recursos investidos em seu diagnóstico, tratamento e controle, além da sua relação com a pobreza (ALVES et al., 2013).

Todo ano, novos casos são reportados e milhares de pessoas e animais são acometidos. Aproximadamente 0,2 a 0,4 milhões de novos casos humanos são atribuídos a leishmaniose visceral (LV) e 0,7 a 1,2 milhões a leishmaniose cutânea (LC) (WHO, 2016). Segundo dados epidemiológicos da Organização Mundial de Saúde (2016), 399 milhões de pessoas estão sob risco de transmissão de LTA no mundo.

A LTA é um grande problema nos países do Novo Mundo, incluindo o Brasil. Sua importância consiste não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas persistentes e de difícil cura clínica que geram lesões que podem afetar o campo psicossocial do indivíduo acometido pela doença (GONTIJO & CARVALHO, 2003; ALCÂNTARA et al., 2016).

Inicialmente a LTA estava associada a áreas de mata primária e zonas rurais, atingindo com mais frequência trabalhadores que invadiam as florestas tropicais ou que moravam próximo a elas (JIRMANUS et al., 2012). Atualmente, algumas mudanças têm ocorrido na ecoepidemiologia da doença, passando a existir em zonas rurais desmatadas e em regiões periurbanas (PASSOS, 2003).

No momento, a LTA está distribuída em todo território nacional e encontra-se em fase de expansão geográfica com diferentes coeficientes de incidência entre as regiões do país, concentrando-se no norte e centro-oeste, seguidas das regiões nordeste, sudeste e sul (BRASIL, 2017). No Estado do Paraná essa expansão continua, principalmente devido à periurbanização do ciclo da *Leishmania*, apresentando um número crescente de casos autóctones, e até então a espécie *L. braziliensis* era incriminada como responsável por 100% deles (CASTRO et al., 2002; THOMAZ-SOCCOL et al., 2003; MONTEIRO et al., 2008; THOMAZ-SOCCOL et al., 2009), contudo ela não é a única espécie circulante, pois recentemente foi relatado a detecção de DNA de *L. amazonensis* em roedores de área urbana de Londrina (CALDART et al., 2017).

Devido aos recentes fatos relatados para a ocorrência da LTA, como a mudança em seu perfil ecoepidemiológico, passando de um ciclo silvestre para um periurbano, o presente estudo objetivou obter dados sobre a epidemiologia da doença em mamíferos (cães) da área endêmica para LTA no Paraná. Portanto, essa dissertação está dividida em cinco capítulos: sendo o primeiro uma revisão de literatura sobre o tema; o segundo se trata de uma análise epidemiológica dos casos de LTA humana no estado do Paraná; o terceiro apresenta os dados sobre a infecção de cães (*Canis lupus familiaris*) por *Leishmania* spp. por meio de métodos molecular, sorológico e parasitológico de uma área sabidamente endêmica (município de Cerro Azul); os dois últimos capítulos são vertentes que surgiram durante a execução do estudo, sendo o quarto capítulo acerca da padronização de PCR Biplax para diagnóstico de LTA contando com controle de viabilidade amostra; e por último, está retratado o isolamento e caracterização de *L. braziliensis* em cicatriz de um cão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar nas escalas macrorregional e microrregional, aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana humana e canina, respectivamente, no Estado do Paraná, Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a ocorrência de LTA humana no Estado do Paraná por meio dos dados do Sistema de Agravos de Notificação (SINAN) em relação às variáveis abióticas (temperatura, umidade, precipitação), biótica (sexo, idade, formas clínicas) e ambientais no período de 2001 a 2015;
- b) Avaliar a prevalência de infecção por *Leishmania* spp. em cães domésticos *Canis (Lupus) familiaris* por meio de método molecular, parasitológico e sorológico;
- c) Identificar a(s) espécie(s) de *Leishmania* spp. relacionada(s) às amostras positivas dos cães analisados;
- d) Padronizar para a técnica de PCR Biplax a detecção de *L. braziliensis* e do gene PNOC de mamíferos.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1 CARACTERIZAÇÃO DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são parasitoses de importância em saúde pública, podendo acometer o ser humano com diferentes formas clínicas, visceral, cutânea e mucocutânea (LAINSON & SHAW 2005; WHO, 2016; BRASIL, 2017). Essas doenças estão entre as enfermidades tropicais de maior relevância, com ampla distribuição por todo mundo (WHO, 2016).

As leishmanioses podem se apresentar de diversas formas clínicas, sendo a mais comum a Leishmaniose Cutânea (LC) ou Leishmaniose Tegumentar (LT), que é caracterizada por graves feridas na pele (lesões únicas ulceradas ou nodulares, até múltiplas lesões disseminadas) e em mucosas, tanto em humanos quanto em mamíferos domésticos, e essas manifestações são dependentes do agente etiológico envolvido, e a resposta imune do hospedeiro. Em alguns casos pode ocorrer tamanho comprometimento com lesões destrutivas que ocasionam transtornos psicossociais (GONTIJO & CARVALHO, 2003; DA-CRUZ e PIRMEZ, 2005; GOTO e LINDOSO, 2010; BRASIL, 2017). O complexo da LTA está subdividido de acordo com as manifestações clínicas: lesões ulcerativas desenvolvidas no local da picada do flebotômio (Leishmaniose Cutânea Localizada - LC); múltiplos nódulos não-ulcerados (Leishmaniose Cutânea Difusa - LCD); inflamação destrutiva das mucosas (Leishmaniose Mucocutânea - LM) (BRASIL, 2017).

A forma mais severa e que quase sempre pode ser fatal, se não tratada, é a Leishmaniose Visceral (LV), caracterizada em humanos principalmente por febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa, hepatoesplenomegalia e emagrecimento progressivo. No cão, principal hospedeiro depois dos humanos, é caracterizada por descamação e eczema, pêlo opaco, onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômito, além da hiperqueratose (MICHEL et al., 2011; HIRVE et al., 2016, BRUSCHI & GRADONI, 2017).

O outro tipo de manifestação clínica é denominado Leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC), tal qual é caracterizada por erupções maculares, maculo-papulares e nodulares em pacientes curados clinicamente de LV (ZIJLSTRA et al., 2003; WHO, 2016; BRUSCHI & GRADONI, 2017).

2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

2.1 AGENTES ETIOLÓGICOS

O gênero *Leishmania* compreende protozoários com ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores. Segundo Levine *et al.* (1980) os agentes etiológicos das leishmanioses estão posicionados no Reino: Protista Haeckel, 1866; Sub-reino: Protozoa Goldfuss, 1817; Filo: Sarcomastigophora Honigberg e Balamuth, 1963; Sub-filo: Mastigophora Desing, 1866; Classe: Zoomastigophorea Calkins, 1909; Ordem: Kinetoplastida Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976; Sub-ordem: Trypanosomatina Kent, 1880; Família: Trypanosomatidae Doflein, 1901 emend. Grobben, 1905; Gênero: *Leishmania* Ross, 1903; Subgêneros *Leishmania* Saf'Janova, 1982, *Viannia* Lainson & Shaw, 1987, *Sauroleishmania* Ranque, 1973 e *Mundinia* Shaw, Camargo & Teixeira, 2016 (WHO, 2016; ESPINOSA *et al.*, 2016). Dentre esses subgêneros, somente as espécies pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* e apenas uma espécie de *Mundinia* (Tailândia), são capazes de infectar os mamíferos (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

Nas Américas, são atualmente reconhecidas 14 espécies dermatrópicas de *Leishmania* spp. causadoras de doença em mamíferos. No Brasil já foram descritas 10 espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e quatro do subgênero *Leishmania*: *L. (V.) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lindenberg*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Leishmania) forattinii* e *Leishmania (Leishmania) enrietti*, *Leishmania (Leishmania) deanei* (LAINSON & SHAW, 2010; ALVAR *et al.*, 2012; ROQUE & JANSEN, 2014; BRASIL, 2017).

2.2 VETORES

Os flebotomíneos são os insetos responsáveis pela transmissão da *Leishmania* spp. agente etiológico das leishmanioses. Estes são pertencentes à Ordem Diptera, Subordem Nematocera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae (YOUNG & DUNCAN, 1994; GALATI, 2016). São insetos que apresentam o tórax abaulado, corpo coberto por cerdas, conferindo a eles um aspecto “piloso”, e pequenos alcançando de 2 a 3 mm de comprimento.

Possuem vários nomes populares, como: “mosquito-palha”, devido à sua coloração amarelada semelhante à palha vegetal; “asa-branca” e “asa-dura”, por possuírem asas grandes de formato lanceolado que se mantêm eretas durante o pouso; “tatuquira”, devido ao hábito de se abrigarem em buracos de tatu; “arrepido”, por possuírem o corpo “piloso”; e “pula-pula”, devido ao voo do tipo saltitante (NASCIMENTO, 2006). No município de Cerro Azul o flebotomíneo é vulgarmente conhecido como “mosquito da bananeira”, pela associação da presença deste onde havia bananeiras. Esses nomes vernaculares são importantes, pois permitem acessar a população local sobre a presença desse inseto (MARTINS et al., 1978).

Esses insetos, durante o desenvolvimento, apresentam as fases de ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto e a duração de cada estágio varia de acordo com a espécie, condições ambientais e alimentares. Nos primeiros estágios, locais úmidos, com matéria orgânica em decomposição, e com pouca ou nenhuma luz, são ideais para seu desenvolvimento (YOUNG & DUNCAN, 1994).

Os flebotomíneos possuem uma grande importância médico-veterinária, pois são vetores de arbovírus (*Phlebovirus* sp.), bactérias (*Bartonella* sp.) e protozoários (*Leishmania* spp.). Os machos são exclusivamente fitófagos, enquanto as fêmeas, além de ingerirem seiva vegetal, são hematófagas. O sangue ingerido pelas fêmeas é uma importante fonte de proteínas necessárias para a maturação dos seus oócitos. Além disso, os carboidratos servem como fonte de energia inclusive podendo atuar no desenvolvimento e na infectividade do protozoário no tubo digestivo dos insetos vetores (JACOBSON & SCHLEIN, 2001).

Segundo a classificação de Young e Duncan (1994) algumas espécies incluídas no gênero *Lutzomyia* são os vetores comprovados e/ou suspeitos pela transmissão de *Leishmania* spp nas Américas. De acordo com a proposta de classificação de flebotomíneos da região Neotropical, com abordagem filogenética (GALATI, 1995; 2003), o gênero *Lutzomyia* estaria subdividido em 19 gêneros, dos quais, algumas espécies estariam envolvidas na epidemiologia das leishmanioses. Atualmente, são conhecidas 1.003 espécies no mundo, das quais, mais de 521 estão presentes na região Neotropical e destas, 281 foram registradas no Brasil, representando 29% do total e 54% das que ocorrem na Região Neotropical (GALATI, 2018; SHIMABUKURO et al., 2016). No Novo Mundo, 48 espécies de flebotomíneos são incriminadas como vetores potenciais de *Leishmania* spp, outras 38 espécies são suspeitas de transmitir o protozoário causador das leishmanioses. No Brasil, esses números são de 16 espécies incriminadas e 14 suspeitas (MAROLI et al., 2013; READY, 2013).

As espécies *Nyssomyia whitmani* (ANTUNES & COUTINHO), *Nyssomyia neivai* (PINTO), *Migonemyia migonei* (FRANÇA), *Pintomyia fischeri* (PINTO) e *Pintomyia pessoai* (COUTINHO e BARRETTO) são importantes na epidemiologia da LTA e têm uma ampla distribuição nos estados do Paraná (MEMBRIVE et al., 2004, TEODORO et al., 2006, 2010, SILVA et al., 2008), Rio Grande do Sul (PITA-PEREIRA et al., 2011), Santa Catarina (DIAS et al., 2013, MARCONDES et al., 2009), além de outros das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste (REINHOLD-CASTRO, 2015). Essas espécies habitam, primariamente, florestas primitivas e de formação secundária, encontrando-se adaptadas à borda das matas e aos ambientes modificados (REY, 1991) podendo ser encontrados tanto no peridomicílio quanto no intradomicílio (MIRANDA, 1998; SOUZA et al., 2002).

2.3 MAMÍFEROS SILVESTRES

Para um animal ser considerado um bom reservatório, algumas características devem ser observadas: se o parasito vive e se multiplica no organismo; se há uma capacidade de transmissibilidade do parasito ao vetor; o mamífero deve promover a manutenção do parasito na natureza e a interação parasito-hospedeiro não necessita ser harmônica. Entretanto, os reservatórios de *Leishmania* mostram variação regional e temporal, e apenas um estudo local, incluindo análises ecológicas e parasitológicas, e xenodiagnóstico poderia determinar se esses "potenciais reservatórios" poderiam funcionar como tal em um determinado ambiente (ROQUE & JANSEN, 2014). Para incriminar um hospedeiro como reservatório, é necessária a comprovação que o parasito circulante é mantido no ambiente pelo vertebrado (ASHFORD 1996; WHO 2010).

Em locais que mais de uma espécie de hospedeiro podem ser infectadas, eles são divididos em hospedeiros reservatórios primários e secundários e hospedeiros acidentais: o hospedeiro reservatório primário é o hospedeiro responsável por manter o parasito indefinidamente em natureza; O hospedeiro reservatório secundário é um hospedeiro que pode transmitir infecção, mas não consegue manter a transmissão do parasito na ausência do hospedeiro primário, enquanto o hospedeiro acidental é um hospedeiro que, apesar de infectado, não desempenha nenhum papel na manutenção do ciclo de transmissão (SILVA et al. 2005; WHO, 2010; QUINNELL & COURTENAY, 2009; BRUSCHI & GRADONI, 2017).

Nas Américas mais de 40 espécies de mamíferos podem abrigar *Leishmania* spp. dentre os quais destacam-se os grupos: Edentata, Carnivora, Hyracoidea, Roedores, Primata, Marsupialia e Perissodactyla. Segundo Roque e Jansen (2014), no Brasil tem-se conhecimento de algumas espécies de mamíferos que são hospedeiros comprovados para *Leishmania* spp. por detectar a presença de DNA do parasito ou o próprio parasito no organismo estudado, e entre essas espécies estão: *Didelphis albiventris* (QUARESMA et al., 2011; CARDOSO et al., 2015), *Micoreus paraguayanus* (QUINTAL et al., 2011), *Gracilinanus agilis* (QUARESMA et al., 2011; CARDOSO et al., 2015), *Thrichomys apereoides* (QUARESMA et al., 2011), *Nectomys squamipes* (PETERSON et al., 1988), *Akodon arviculoides* (FORATTINI et al., 1972; ROCHA et al., 1988) e *Mus musculus* (DE FREITAS et al., 2012). Há ainda algumas espécies de mamíferos que são considerados possíveis reservatórios, por detectarem DNA de *Leishmania* no mamífero e no flebotomíneo de determinada região, ou relatos de manutenção do parasito no organismo por um longo período (até 12 meses) após a infecção, e algumas dessas espécies são: *Thrichomys laurentius* (ROQUE et al., 2010), *Rattus rattus* (VASCONCELOS et al., 1994; DE LIMA et al., 2002), *Necromys lasiurus* (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; DE FREITAS et al., 2012; CARDOSO et al., 2015), e *Oligoryzomys nigripes* (FORATTINI et al., 1972).

2.4 MAMÍFEROS DOMÉSTICOS

Sabe-se que a LTA é uma zoonose que originalmente era restrita ao ciclo silvestre, entretanto, as modificações ambientais induzidas pelos humanos em áreas rurais e urbanas levaram o parasito para locais mais povoados, aumentando a incidência da doença em humanos e animais domésticos (CASTRO et al., 2002). Essas infecções por *Leishmania* spp. foram descritas em várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos e equídeos). Com relação a este último (domésticos), seu papel na manutenção do parasito no meio ambiente ainda não foi definitivamente esclarecido. O homem é considerado um hospedeiro acidental nas Américas e parece não ter um papel importante na manutenção dos parasitos na natureza (DANTAS-TORRES, 2007; BRASIL, 2017).

Até o momento, o cão é comprovadamente reservatório doméstico da *L. infantum*, causadora da LV, por apresentar o parasito em vasos sanguíneos periféricos e na pele íntegra, o que favorece a disseminação da doença por meio do repasto sanguíneo do vetor (ALVAR et

al., 2004; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006; DANTAS-TORRES, 2007). Entretanto, a atuação do cão no ciclo biológico dos agentes etiológicos da LTA vem sendo muito discutida, uma vez que sua participação ainda não foi confirmada. Marquez et al. (2017) e Jesus et al. (2006), sugeriram que os cães têm participação no ciclo biológico da *Leishmania* spp. Marquez et al. (2017) detectaram a presença do parasito em diferentes órgãos de uma amostragem de oito animais naturalmente infectados, e em três deles foram observados parasitos em pele íntegra; ou detectaram anticorpos anti-*Leishmania* em ensaios clínicos, respectivamente. Entretanto, Roque e Jansen (2014) afirmaram que a detecção de parasitos em órgãos internos e em sangue ou a detecção de anticorpos não necessariamente viabiliza a infectividade pelo vetor, e consequentemente a caracterização como possível reservatório. Para se comprovar a participação ativa do cão no ciclo, o xenodiagnóstico deve ser realizado, comprovando a infectividade. Travi et al., (2006) realizaram esse procedimento obtendo um resultado negativo de infecção quando colocou flebotomíneos para fazer o repasto sanguíneo nas lesões de cães naturalmente infectados por *L. braziliensis*, na Colômbia. Dessa forma, sugere-se que os cães são hospedeiros acidentais da LTA, assim como os humanos, já que ambos desenvolvem lesões clínicas clássicas da doença (BASANO & CAMARGO, 2004).

A infecção por *Leishmania* em equídeos no Novo Mundo foi relatada no Brasil, Venezuela, Porto Rico e Estados Unidos (OLIVEIRA-NETO et al., 1988; RAMOS-VARA et al., 1996; CASTRO et al., 2002; SOLANO-GALLEGO et al., 2003; BRANDÃO-FILHO et al., 2003; ROLAO et al., 2005; TRUPPEL et al., 2014). Apesar das espécies de equídeos serem infectados pelo parasito e adoecerem, aparentemente não apresentam importância no ciclo biológico deste, a não ser por servirem de fontes de repasto sanguíneo. As lesões se apresentam na forma de nódulos que podem ulcerar e geralmente se localizam na cabeça, pavilhão auricular, escroto, pernas e pescoço (TRUPPEL et al., 2014).

Os gatos são naturalmente infectados pelas mesmas espécies de *Leishmania* que afetam cães e humanos em áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo e sua suscetibilidade ao desenvolvimento de sinais clínicos da doença também já foi confirmada (POLI et al., 2002; PENNISI et al., 2013). O relato de casos de Leishmaniose Tegumentar em bovinos é escasso, mas também já foi confirmada a suscetibilidade destes (DUBEY et al., 1998; LOBSIGER et al., 2010).

Os animais domésticos, descritos acima (cães, equídeos e gatos) podem sim serem infectados por espécies de *Leishmania* spp., e desenvolver sinais clínicos, entretanto não

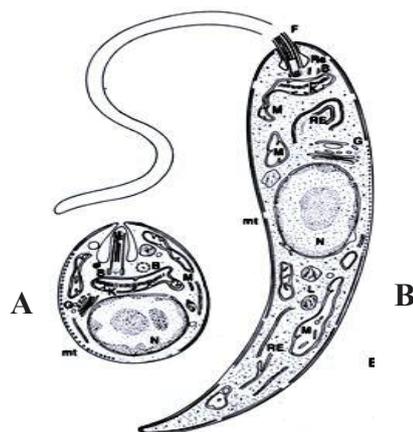
apresentam grande importância para o ciclo da *Leishmania*. Essas espécies atuam como atrativos (fontes para repasto sanguíneo) dos flebotomíneos para o peridomicílio (MEMBRIVE et al., 2012; TRUPPEL et al., 2014; PENNISI et al., 2013).

2.5 CICLO

O gênero *Leishmania* spp. compreende espécie de protozoários parasitos, que durante o ciclo, se alternam entre os hospedeiros vertebrados e invertebrado (insetos vetores), estes últimos sendo responsáveis pela transmissão de um mamífero a outro (LAINSON & SHAW, 1978; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

O ciclo tem início com a inoculação de promastigotas infectantes (forma flagelada) (FIGURA 1) por meio da picada da fêmea de flebotomíneos, durante o repasto sanguíneo. No organismo dos hospedeiros vertebrados, os parasitos assumem a forma amastigota (forma sem flagelo) (FIGURA 1), arredondada e imóvel, que se multiplica por divisão binária, obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário. À medida que as formas amastigotas vão se multiplicando, os macrófagos são rompidos liberando mais parasitos que serão fagocitados por outros macrófagos (KILLICK-KENDRICK, 1990, KILLICK-KENDRICK et al., 1991; GONTIJO & CARVALHO, 2003). Na tentativa de eliminar o parasito, o sistema imune do hospedeiro vertebrado é ativado, entretanto, as espécies deste gênero são capazes de evadir aos mecanismos extracelulares de defesa e invadir as células-alvo (macrófagos), modificar o ambiente intracelular e estabelecer a infecção (CASTELLANO, 2005).

As fêmeas desses insetos irão se infectar quando realizarem o repasto sanguíneo em mamíferos positivos, ingerindo as formas amastigotas. As leishmânias vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo dos insetos, e ali, as formas amastigotas ingeridas se diferenciam em formas flageladas chamadas promastigotas, sendo estas morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas, e posteriormente serão inoculadas em mamíferos suscetíveis durante o repasto sanguíneo das fêmeas infectadas (KILLICK-KENDRICK, 1990, KILLICK-KENDRICK et al., 1991; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

FIGURA 1 – FORMAS EVOLUTIVAS DA *Leishmania* spp.

A) FORMA AMASTIGOTA. B) FORMA PROMASTIGOTA. FONTE: Rey (2002).

2.6 EPIDEMIOLOGIA DA LTA

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (2016), ocorrem anualmente cerca 0,7 a 1,2 milhões de novos casos de LTA, e aproximadamente 12 milhões de pessoas estão infectadas no momento. Além disso, mais de 399 milhões de pessoas estão sob risco de transmissão de LTA, apenas nos 11 países com maior incidência desta. Dos 200 países que reportam seus casos a Organização Mundial da Saúde, pelo menos 87 são endêmicos para a doença. A maioria dos casos de LT ocorrem no Afeganistão, Algéria, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria. Em 2014, mais de 90% dos casos reportados foram provenientes de seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão.

O continente americano, o segundo maior continente do mundo com 35 países, destes, 18 já registraram casos de LTA (PAHO, 2013). Segundo o relatório da Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO, 2016), foram reportados nas Américas entre 2001 e 2015, 843.931 casos com uma média anual de 56.262 casos de LTA, gerando um coeficiente de incidência de 18,35 casos por 100 mil habitantes. O Brasil foi o país com maior número de notificações (377.892), seguidos da Colômbia e Peru.

Atualmente no país a LTA está distribuída em todo território nacional com uma média anual de mais de 25 mil indivíduos acometidos nos últimos 30 anos (BRASIL, 2017). Foram ao todo mais de 377 mil casos entre 2001 e 2015 no país. A LTA encontra-se em fase de expansão geográfica com diferentes coeficientes de incidência entre as regiões do Brasil, com a região norte (59,6 casos por 100.000 habitantes) no topo da lista, seguida pela centro-oeste

(28,1 casos por 100.000 habitantes), nordeste (14,2 casos por 100.000 habitantes), sudeste (12 casos por 100.000 habitantes) e sul (2,1 casos por 100.000 habitantes) (ANJOS et al. no prelo).

O estado do Paraná conta com 92% (7875) dos casos humanos da região Sul (8539) ocorridos entre os anos de 2001 e 2015 (ver CAPÍTULO 2). Ao todo 331 municípios dos 399 do Estado já notificaram casos. Até então, a espécie *L. braziliensis* era responsável por 100% dos casos de LTA, produzindo um amplo espectro de manifestações clínicas nos indivíduos acometidos, contudo, já foi relatada a presença de *L. amazonensis* em roedores de área urbana no município de Londrina (MONTEIRO et al., 2008; CALDART et al., 2017).

A forma como ocorre a exposição e consequentemente a infecção por *Leishmania* foi classificado em três perfis epidemiológicos: 1) Silvestre – em que ocorre a transmissão em áreas de vegetação primária (zoonose de animais silvestres); 2) Ocupacional ou lazer – a transmissão está associada à exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, ecoturismo (antropozoonose) e, 3) Rural ou periurbana – em áreas de colonização (zoonose de matas residuais) ou periurbana, em que houve adaptação do vetor ao peridomicílio (zoonose de matas residuais e/ou antropozoonose) (BRASIL, 2017).

A LTA era associada inicialmente, a áreas de floresta primária e áreas rurais, atingindo mais frequentemente trabalhadores que adentravam nessa mata ou os que moravam próximo a ela (JIRMANUS, 2012). Contudo, já foram reportados casos em áreas rurais desmatadas e regiões peri-urbanas, colocando os animais domésticos e humanos em um maior risco de exposição (PASSOS, 2003; CAPÍTULO 2).

2.7 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de LTA abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. O diagnóstico laboratorial constitui fundamentalmente de três grupos de exames: parasitológicos, imunológicos e moleculares. Ainda não há um método diagnóstico “padrão-ouro”, portanto, a associação de técnicas diferentes deve ser adotada para uma melhor confiabilidade (DORVAL et al., 2006; BRASIL, 2017; ANJOS et al., no prelo). O diagnóstico clínico é realizado com base nas características da lesão, em associação à anamnese, onde os dados epidemiológicos são de extrema importância.

Os exames parasitológicos consistem na pesquisa do parasito (formas amastigotas ou promastigotas) por meio de diferentes técnicas diretas e indiretas. O método mais simples é o da pesquisa direta das formas amastigotas em material obtido da lesão por meio de escarificação, aspiração ou biópsia de borda, corado pelo método de Giemsa ou Leishman (FURTADO, 1980; FUNASA, 2000). A histopatologia, o cultivo celular e a inoculação em animais de laboratório constituem técnicas indiretas de visualização do parasito. A histopatologia possibilita a observação de formas amastigotas nas amostras pesquisadas, além da visualização de outros agentes como fungos e bactérias. No cultivo celular, fragmentos das lesões (biópsia) são inoculados em meio de cultura sólido NNN (Neal, Novy e Nicolle) com fase líquida de solução salina e antibiótico. Esse material é incubado a 24°C, sendo realizadas análises semanais por 30 dias em busca de formas promastigotas (GONTIJO & CARVALHO, 2003; MADEIRA et al., 2006).

Os métodos imunológicos consistem na reposta de hipersensibilidade tardia, ou na pesquisa por anticorpos anti-*Leishmania*. A intradermorreação de Montenegro (IDRM) ou da leishmanina baseia-se na visualização da resposta de hipersensibilidade celular tardia após inoculação do antígeno na pele. Os exames sorológicos buscam detectar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* no soro do paciente suspeito, sendo os principais métodos: a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA) (GONTIJO & CARVALHO, 2003; ROQUE & JANSEN, 2014; BRASIL, 2017).

O método molecular mais utilizado é a Reação da Cadeia da Polimerase (PCR), tal qual baseia-se na detecção do DNA do parasito em diversos tipos de amostras clínicas. O principal tipo de amostra clínica utilizada é a biópsia da borda das lesões por LTA. (MADEIRA et al., 2006). No entanto, é uma técnica que requer preparo técnico do operador, alto custo, e geralmente empregada em atividades de pesquisa, (BRILHANTE et al., 2016). Atualmente, o método emergente “real-time quantitative PCR” (qPCR) vêm ganhando destaque no diagnóstico das doenças infecciosas por apresentar índices de sensibilidade e especificidade melhores que a PCR convencional, além do menor risco de contaminação em ambiente laboratorial (ANTINORI et al., 2009; ALMEIDA et al., 2017).

3 REFERÊNCIAS

AKHOUNDI M, KUHLS K, CANNET A, VOTÝPKA J, MARTY P, DELAUNAY P, et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLOS Negl Trop Dis**; 2016.

ALCÂNTARA, L.R.D.S.; DEMARCHI, I.G.; ARISTIDES, S.M.A. Evolution of american tegumentary leishmaniasis cases reported in paraná state, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**; v. 58, 2016.

ALMEIDA, M. E. D.; KORU, O.; STEURER, F.; HERWALDT, B. L. Detection and differentiation of *Leishmania* spp. In clinical specimens by use of SYBR green-based real-time PCR assay. **J Clin Microbiol**; v.55, p.3–7, 2017.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv Parasitol**; v.57, p.1–88, 2004.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M.; WHO, L. C. T. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLOS ONE**; 2012.

ALVES, P. F. R.; RIBAS-SILVA, R.C. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana na região centro ocidental do Paraná. **Rev de Saúde Bio**; v.8, n.1, p.77-84, 2013.

ANTINORI, S.; CALATTINI, S.; PIOLINI, R.; LONGHI, E.; BESTETTI, G.; CASCIO, A.; PARRAVICINI, C.; CORBELLINO, M. Is real-time polymerase chain reaction (PCR) more useful than a conventional PCR for the clinical management of leishmaniasis? **Am J Tr Med Hyg**; v.81, p.46–51, 2009.

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoir and their significance in control. **Clin Dermatol**; v.14, p.523–532, 1996.

BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous Leishmaniasis. **Clin Derm**; v.25, p.203–211, 2007.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev Bras Epi**; v. 07, n. 03, p. 328-337, 2004.

BRANDÃO-FILHO, S.P., BRITO, M.E., CARVALHO, F.G., ISHIKAWA, E.A., CUPOLILLO, E., FLOETER-WINTER, L. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**; v.97, p.291–296, 2003.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília – DF, 2ª Edição, 2017.

BRILHANTE, A.F.; SOUZA, A.I.; DORVAL, M.E.C.; FRANÇA, A.O.; LIMA, R.B.; GALATI, E.A.B. NUNES, V.L.B. Canine cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an agricultural settlement, endemic area for leishmaniasis. **Arq Bras Med Vet Zool**; v. 68, n. 4, p. 927-930, 2016.

BRUSCHI, F.; GRADONI, L. **The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases**. Springer International Publishing; p.107–125. Print, 2018.

CALDART, E. T.; FREIRE, R. L.; FERREIRA, F. P.; RUFFOLO, B. B.; SBEGHEN, M. R.; MAREZE, M.; GARCIA, J. L.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T. *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Braz J Vet Paras**; v.26, p.17–27, 2017.

CARDOSO, R. M.; DE ARAÚJO, N. N. S. L.; ROMERO, G. A. S.; SOUZA, T. T. C. M.; DIETRICH, A. G.; MENDES, J. D.; REIS, M. L.; FERREIRA, J. B. C.; HECHT, M. M.; GURGEL-GONÇALVES, R. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. **Parasit Vectors**; v.8, 2015.

CASTELLANO, L. Anti-*Leishmania* immune response and evasion mechanisms. **Vitae Acad Biom Dig**; n. 25, 2005.

CASTRO, E. A.; SOCCOL, V. T.; MEMBRIVE, N.; LUZ, E. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Rev Soc Bras Med Trop**; v.35, p.445–452, 2002.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Vet Paras**; v. 149, p. 139-146, 2007.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev Inst Med Trop**. São Paulo; v.48, p.151–156, 2006.

DE FREITAS, T.P.; D'ANDREA, P.S.; DE PAULA, D.A.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; BONVICINO, C.R. Natural infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Mus musculus* captured in Mato Grosso, Brazil. **Vec Bor Zoo Dis**; v.12, p.81–83, 2012.

DIAS, E.S.; MICHALSKY, É.M.; NASCIMENTO, J.C.; FERREIRA, E.C.; LOPES, J.V.; FORTES-DIAS, C.L. Detection of *Leishmania infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis, in *Lutzomyia neivai*, a putative vector of cutaneous leishmaniasis. **J Vector Ecol**; v.38, p.193-196, 2013.

DORVAL, M.E.M.C.; OSHIRO, E.T.; CUPOLLILO, E.; CASTRO, A.C.C.; ALVES, T.P. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Rev Soc Bras Med Trop**; v. 39, p.43–46, 2006.

DUBEY, J.P.; BWANGAMOI, O.; COURTNEY, S.P.; FRITZ, D.L; *Leishmania* like protozoan associated with dermatitis in cattle. **J Parasitol**; v.84, p.865–867, 1998.

FORATTINI, O.P.; PATTOLI, D.B.G.; RABELLO, E.X.; FERREIRA, O.A. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado de São Paulo. **Bras Rev Saúde Pública**; v.6, p.255–261, 1972.

FUNASA, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**, 65 p. 2000.

FURTADO, T. Critérios para diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **An Bras Derm**; v. 65, p. 51-86, 1980.

GALATI, E.A.B. **Apostila de bioecologia e identificação de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae)** – Departamento de Epidemiologia p. 127, 2015. Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, Brasil. Disponível em: <<http://www.fsp.usp.br/egalati>> Acesso em: 01 mar 2018.

GALATI, E.A.B. **Classificação de Phlebotominae**. In EF Rangel, R Lainson, Flebotomíneos do Brasil, Fiocruz, p.23-51, 2003.

GALATI, E.A.B. **Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): classificação, morfologia, terminologia e identificação de adultos** [apostila]. v.1. São Paulo: USP; 2016.

GALATI, E.A.B. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. **Bol Dir Malariol Saneam Amb**; v.35, p.133-142, 1995.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev Soc Bras Med Trop**; v. 36, n.1, p.71-80, 2003.

JACOBSON. R.L.; SCHLEIN, Y. *Phlebotomus papatasi* and *Leishmania major* parasites express alpha-amylase and alpha-glucosidase. **Acta Trop**; v.78, p.41-9, 2001.

JESUS, J. R.; ARAÚJO, F. A. P.; SPALDING, S.; TIECHER, F. Avaliação sorológica de anticorpos para *Leishmania* spp. na população canina em região de foco de leishmaniose tegumentar americana na Lomba do Pinheiro, Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brasil. **Paras. Latin**; v.61, p.121–125, 2006.

JIRMANUS, L.; GLESBY, M.J.; GUIMARAÃES, L.H.; LAGO, E.; ROSA, M.E.; MACHADO, P.R.; CARVALHO, E.M. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. **Am J Tr Med Hyg**; v.86, p.426–433, 2012.

KILLICK-KENDRICK, R. The life cycle of *Leishmania* in the sandfly with special references to the form infective to the vertebrate host. **Ann Paras Hum Comp**; v.65 (suppl. 1), p.37-42, 1990.

KILLICK-KENDRICK, R.; RIOUX, J.A. Intravectorial cycle of *Leishmania* in the sandflies. **Ann. Paras. Hum. Comp.** (suppl. 1), p.71-74, 1991.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, n.273, 1978.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **New World Leishmaniasis**. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 2010.

LIMA, H.; DE GUGLIELMO, Z.; RODRIGUEZ, A.; CONVIT, J.; RODRIGUEZ, N. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara State, Venezuela. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v.97, p.169–174, 2002.

LOBSIGER, L.; MÜLLER, N.; SCHWEIZER, T.; FREY, C.F.; WIEDERKEHR, D. ZUMKEHR, B.; GOTTSTEIN, B. An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. **Vet Parasitol**; v.169, p.408–14, 2010.

MADEIRA, M.F.; O. SCHUBACH, A., SCHUBACH, T.M.P., PEREIRA, S.A., FIGUEIREDO, F.B., BAPTISTA, C., LEAL, C.A., MELO, C.X., CONFORT, E.M., MARZOCHI, M.C.A. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. **Vet Paras**; v.138, p.366–370, 2006.

MARCONDES, C.B.; BITTENOURT, I.A.; STOCO, P.H.; EGER, I.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia)* spp. in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**; v.103, p.1093-1097, 2009.

MARCONDES, C.B. **Entomologia médica e veterinária**. Editora Atheneu, São Paulo, 1ªEd., p.432., 2001.

MAROLI, M.; FELICIANGELI, M.D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R.N.; GRADONI, L. Phlebotomine sand flies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Med Vet Entomol**; v.27, p.123-147, 2013.

MARQUEZ, E. S.; DE CASTRO, E. A.; NABUT, L. B.; DA COSTA-RIBEIRO, M. C. V.; ARAÚJO, L. D. C. T.; POUBEL, S. B.; GONÇALVES, A. L.; CRUZ, M. F. R.; DOS SANTOS TRAD, A. P. M. E.; DIAS, R. A. F, NAVARRO, I. T.; THOMAZ-SOCCOL, V. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs in Paraná, Brazil, and the epidemiological implications of *Leishmania (Viannia) braziliensis* detection in internal organs and intact skin. **Vet Parasit**. 2017.

MARTINS, A.V.; WILLIAMS, P; FALCÃO, A.L. American Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Rio de Janeiro, Acad. Bras. Ciências, 195 p.; 1978.

MEMBRIVE, N. A.; RODRIGUES, G.; GUALDA, K. P.; BERNAL, M. V. Z.; OLIVEIRA, D. M.; LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; TEIXEIRA, J. J. V.; SILVEIRA, T. G. V. Environmental and animal characteristics as factors associated with American Cutaneous Leishmaniasis in rural locations with presence of dogs, Brazil. **PLOS ONE**. 2012.

MEMBRIVE, N.A.; RODRIGUES, G.; MEMBRIVE, U.; MONTEIRO, W.M.; NEITZKE, H.C.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V; TEODORO, U. Sand flies of municipalities in north of Paraná state, south of Brazil. **Entomol Vect**; v.11, p.673-680, 2004.

MONTEIRO, W. M.; NEITZKE, H. C.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V.; FERREIRA, M. E. M. C.; TEODORO, U. Distribuição geográfica e características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em áreas de colonização antiga do

Estado do Paraná, Sul do Brasil. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, n.6, p.1291-1303, 2008.

NASCIMENTO, A. C. B. **Microanatomia ultraestrutural dos ovos, larvas e órgãos sensoriais de vetores de leishmanioses através da microscopia eletrônica de varredura**. Dissertação (Mestre em Ciências da Saúde) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte – MG, 2006.

OLIVEIRA-NETO, M.P.; PIRMEZ, C.; RANGEL, E.F.; SCHUBACH, A.; GRIMALDI JR, G. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v.83, n.4, p.427-435, 1988.

PAHO, **Pan American Health Organization**. 2013. Disponível em: <<http://www.paho.org/>> Acesso em: 2 mar 2018.

PAHO, **Pan American Health Organization**. 2016. Disponível em: <<http://www.paho.org/>> Acesso em: 2 mar 2018.

PASSOS, L. N. **Avaliação da reação em cadeia de polimerase (PCR) no diagnóstico da leishmaniose cutânea no Estado do Espírito Santo, Brasil**. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PENNISI, M.G., HARTMANN, K., LLORET, A., ADDIE, D., BELAK, S., BOUCRAUT-BARALON, C., et al. Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **J Fel Med Surg**; v.15, p.638–642, 2013.

PETERSON, N.E.; VEXEMAT, J.A.; ROSA, A.C.O.C.; LAGO, P.R.L. Isolation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from the rodent *Nectomys squamipes* captured in Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v.83 (S1), p.28, 1988.

PITA-PEREIRA, D.; SOUZA, G.D.; PEREIRA, T.A.; ZWETSCH, A.; BRITTO, C.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia (Pintomyia) fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of american cutaneous leishmaniasis: Detection of natural infection by *Leishmania (Viannia)* DNA in a specimen from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. **Acta Trop**; v.120, p.273-275, 2011.

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

QUARESMA, P.F.; REGO, F.D.; BOTELHO, H.A.; DA SILVA, S.R.; MOURA JUNIOR, A.J.; TEIXEIRA NETO, R.G. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**; v.105, p.579–585, 2011.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasit**; v.136, p.1915–34, 2009.

QUINTAL, A.P.; RIBEIRO, E.S.; RODRIGUES, F.P.; ROCHA, F.S.; FLOETER-WINTER, L.M.; NUNES, C.M. *Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: didelphidae) of Brazil. **Vet Parasitol**; v.176, p.112–119, 2011.

RAMOS-VARA, J.A.; ORTIZ-SANTIAGO, B.; SEGALES, J.; DUNSTAN, R.W. Cutaneous leishmaniasis in two horses. **Vet Pathol**; v.33, p.731–734, 1996.

READY, P.D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annu Rev Entomol**; v.58, p.227-50, 2013.

REINHOLD-CASTRO, K. R.; GASPAROTTO, J. C.; NEITZKE-ABREU, H. C.; TEODORO, U. Larval habitats of sand flies in rural areas of southern Brazil. **J Vec Eco**; v.40 (2), p.269-276, 2015.

REY, L. **Parasitologia**. 2nd ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 731, 1991.

ROCHA, N.M.; MELO, M.N.; BABA, E.H.; DIAS, M.; MICHALICK, M.S.; DA COSTA, C.A. *Leishmania braziliensis braziliensis* isolated from *Akodon arviculoides* captured in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. **Trans R. Soc Trop Med Hyg**; v.82, p.68, 1988.

ROLAO, N. Equine Infection with *Leishmania*. **Paras J**; v.12, p.183–186, 2005.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **Int J Parasit: Paras Wild**, p.251-262, 2014.

ROQUE, A.L.; CUPOLILLO, E.; MARCHEVSKY, R.S.; JANSEN, A.M. *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: patterns of experimental infection. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 4, e589, 2010.

ROTUREAU, B. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. **Am J Trop Med Hyg**; v.74, p.81–96, 2006.

SHIMABUKURO, P.H.F.; ANDRADE, A.J.; GALATI, E.A.B. *Phlebotominae* in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. 2016. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/3297>>. Acesso em: 7 mar 2018.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.; MELO, M.N. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. **Trends Parasitol**; v.21(12), p.550–2, 2005.

SILVA, A.M.; CAMARGO, N.J.; SANTOS, D.R.; MASSAFERA, R.; FERREIRA, A.C.; POSTAI, C.; CRISTÓVÃO, E.C.; KONOLAISEN, J.F; BISETTO, A.; PERINAZO, R.; TEODORO, U.; GALATI, E.A.B. Diversity, distribution and abundance of sand flies (Diptera: Psychodidae) in Paraná state, southern Brazil. **Neotrop Entomol**; v.37, p.209-225, 2008.

SOLANO-GÁLLEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON, H.; SERRA, R.; GALLEGO, M.; RAMIS, A.; FONDEVILA, D.; FERRER, L. Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain. **Eq Vet J**; v.35, p. 320-323, 2003.

SOUZA, N.A.; ANDRADE-COELHO, C.A; VILELA, M.L.; PEIXOTO, A.A.; RANGEL, E.F. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v.97, p.759-65, 2002.

TEODORO, U.; SANTOS, D.R.; SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L.P.; SILVA, A.M.; NEITZKE, H.C.; MONTEIRO, W.M.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V. Preliminary information on sand flies in the north of Paraná state, Brazil. **Rev Saúde Públ**; v.40, p.327-330, 2006.

TEODORO, U.; SANTOS, D.R.; SILVA, A.M.; MASSAFERA, R; IMAZU, L.E.; MONTEIRO, W.M.; NEITZKE-ABREU, H.C. Sand fly fauna in counties of the pioneer north of Paraná state, Brazil. **Rev Patol Trop**; v.39, p.322-330, 2010.

TRAVI, B. L.; TABARES, C. J.; CADENA, H. *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in two Colombian dogs: a note on infectivity for sand flies and response to treatment. **Biomedica**, v.26, s249–s253, 2006.

TRUPPEL, J.H.; OTOMURA, F.; TEODORO, U.; MASSAFERA, R.; COSTA-RIBEIRO, M.C.V.; THOMAZ- SOCCOL, V. Can equids be a reservoir of *Leishmania braziliensis* in endemic areas? **PLoS One**, 2014.

VASCONCELOS, I.A.; VASCONCELOS, A.W.; FE FILHO, N.M.; QUEIROZ, R.G.; SANTANA, E.W.; BOZZA, M. The identity of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturité, northeastern Brazil. **Am J Trop Med Hyg**; v.50, p.158–164, 1994.

WHO – **World Health Organization**, 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>> Acesso em: 1 fev 2018.

WHO – **World Health Organization**, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>> Acesso em: 1 fev 2018.

YOUNG, D.G; DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Mem Am Entomol Inst**; v.54, p. 881, 1994.

CAPÍTULO 2

FATORES RELACIONADOS À OCORRÊNCIA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA HUMANA (LTA) NO ESTADO DO PARANÁ

Manuscrito a ser submetido para a Revista Brasileira da Sociedade de Medicina Tropical na forma de “Artigo Original”

FATORES RELACIONADOS À OCORRÊNCIA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA HUMANA NO ESTADO DO PARANÁ

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença endêmica em diversas regiões do mundo. O Brasil é um dos países com o maior número de casos da doença. Ela é considerada uma Doença Tropical Negligenciada (DTN) por estar relacionada à população com pouca visibilidade social e por limitados recursos em pesquisas. O presente estudo objetivou analisar fatores de risco relacionados à ocorrência da LTA humana no estado do Paraná, Brasil. Os casos da doença de 2001 a 2015 foram compilados do banco de dados do Sistema de Agravos e Notificações (SINAN) do Sistema Único de Saúde (SUS). Variáveis climáticas foram obtidas do Sistema Meteorológico do Paraná (SIMEPAR). Os dados foram analisados e correlacionados por Modelo Linear Generalizado Misto e Teste de Verossimilhança. Por meio do software QGIS, mapas de distribuição dos casos foram confeccionados. No Estado, ser do sexo masculino, ter entre 20 e 59 anos, morar em área urbana de regiões quentes e secas, são fatores de risco para a ocorrência da LTA, principalmente para a forma clínica cutânea. Observou-se a partir dos mapas confeccionados, que há casos notificados em todas as regiões do Estado, com a dispersão da doença nos últimos anos.

Palavras-chave: *Leishmania*, doença negligenciada, clima, epidemiologia, modelos lineares.

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is an endemic disease in several regions of the world. Brazil is one of the countries with the highest number of cases. It is considered a Neglected Tropical Disease (NTD) due to the relationship with poor social visibility population and the limited research resources. The study aimed to analyze risk factors related to the occurrence of human ATL in Paraná State, Brazil. ATL cases between 2001 and 2015 were compiled from the Notifications and Injuries System database, from Health Unic System. Climatic variables were obtained from the Meteorological System of Paraná. The data were analyzed and correlated by Mixed Generalized Linear Model and Likelihood Test. Through the QGIS software, kernel distribution maps were prepared. In the state, being male, between 20 and 59 years old, live in urban areas of hot and dry regions, works as a risk factor for the occurrence of ATL, mainly for the cutaneous clinical form. It was observed from the prepared maps that there are reported cases in all regions of the state, with an enlargement of the disease coverage area in recent years.

Keywords: *Leishmania*, neglected disease, climate, epidemiology, linear models.

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças primárias de animais e podem ser transmitidas naturalmente ao ser humano, sendo assim consideradas antropozoonoses e apresentando ampla distribuição mundial (MAROLI et al., 2013; BRUSCHI & GRADONI, 2018). Esse complexo de doenças é o segundo entre as seis doenças infecciosas e parasitárias mais comuns no mundo (BRASIL, 2017; GOSCH et al., 2017). Em 2016 a "AsiaOne Health" elegeu-as como uma das cinco doenças infecciosas emergentes mais importantes do mundo. As leishmanioses apresentam um grande impacto na saúde pública (DESJEUX, 2004) e, no Brasil, são classificadas como doenças de notificação obrigatória (BRASIL, 2017). A Organização Mundial da Saúde (OMS) (2006) as classifica como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), entre outros motivos, devido aos recursos limitados investidos em diagnóstico, tratamento e controle além da sua relação com a pobreza (ALVAR et al., 2006). O descaso em relação à leishmaniose tegumentar (LT) é ainda mais significativo devido ao seu baixo índice de mortalidade (GHATEE et al., 2017). Em todo o mundo, ocorrem anualmente cerca de 0,7 a 1,2 milhões de novos casos de LT, e em torno de 12 milhões de pessoas estão atualmente infectadas (ALVAR et al., 2012; WHO, 2013). Ainda de acordo com dados da OMS (2016), 399 milhões de pessoas correm o risco de transmissão da LT.

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (Novo Mundo) apresenta alta incidência e ampla distribuição geográfica e as manifestações clínicas podem acometer o campo psicossocial visto que o indivíduo infectado pode manifestar clinicamente lesões agressivas e desfigurantes (GONTIJO e CARVALHO, 2003). O aumento dos casos da doença nos últimos 20 anos está associado a variações cíclicas na sua incidência influenciadas, principalmente, pela fauna de flebotomíneos (Diptera: Phlebotominae) os quais sofrem influência dos fatores ambientais e climáticos, como precipitação, umidade e temperatura (GHITHEKO et al., 2000; PATZ et al., 2000; GAGNON et al., 2002; DELGADO et al., 2004; FERREIRA DE SOUZA et al. 2015)

Atualmente, no país, a LTA está distribuída em todo território nacional com mais de 377 mil casos notificados entre 2001 e 2015, apresentando uma média anual de mais de 25 mil indivíduos acometidos nos últimos 30 anos (BRASIL, 2017). A LTA encontra-se em fase de expansão geográfica com diferentes coeficientes de incidência entre as regiões do país, com a região Norte (59,6 casos/100.000 habitantes) no topo da lista, seguida pela Centro-Oeste (28,1 casos/100.000 habitantes), Nordeste (14,2 casos/100.000 habitantes), Sudeste (12

casos/100.000 habitantes) e Sul (2,1 casos/100.000 habitantes) (SINAN, 2018), sendo as espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*, as mais prevalentes (MELO et al., 2017).

O estado do Paraná conta com 92% (7.875) dos casos humanos da região Sul (8.675) registrado entre os anos de 2001 e 2015, seguido por Santa Catarina (650) e Rio Grande do Sul (150). Esses casos são atribuídos à *L. braziliensis* (CASTRO et al., 2002; THOMAZ-SOCCOL et al., 2003; MONTEIRO et al., 2008; THOMAZ-SOCCOL et al., 2009), embora a circulação de *L. amazonensis* tenha sido relatada em roedores de área urbana do município de Londrina (CALDART et al. 2017).

Inicialmente, a LTA estava associada a áreas de floresta primária e/ou rurais, atingindo mais frequentemente pessoas que adentravam na mata ou os que moravam próximo a ela (JIRMANUS et al., 2012; GOSCH et al., 2017). Atualmente, algumas mudanças ocorreram na epidemiologia da LTA, já que são reportados casos em áreas rurais desmatadas e regiões periurbanas (GRAZIANI et al., 2013; XAVIER et al., 2016). Dessa forma, o Ministério da Saúde (BRASIL, 2017) tem classificado a doença em três perfis epidemiológicos: silvestre; ocupacional e de lazer; rural e periurbana.

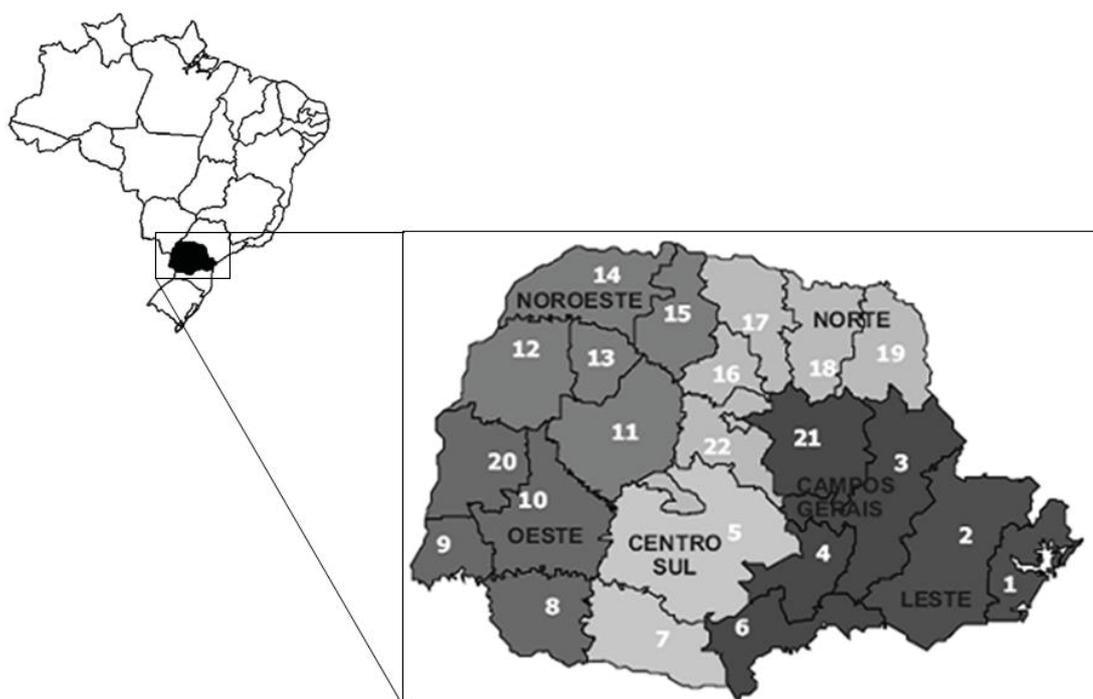
Séries temporais contribuem para uma análise mais aprofundada da ocorrência de doenças, sendo possível avaliar os efeitos das medidas de prevenção adotadas. Devido a grande importância da LTA, este estudo visou analisar os fatores relacionados à sua ocorrência no Estado do Paraná, por meio do estudo da série histórica de 2001 a 2015, em relação aos casos notificados de LTA, correlacionando com variáveis abióticas (temperatura, umidade, precipitação), bióticas (sexo, idade, formas clínicas) e ambientais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO

O Estado do Paraná é uma das 27 unidades federativas do Brasil e está localizado na Região Sul do Brasil. Sua área consiste em 199.307,922 km², com 399 municípios divididos, segundo a Secretaria de Saúde do Estado, em seis macrorregiões da saúde: leste, campos gerais, centro sul, oeste, noroeste e norte (FIGURA 1), as quais ainda se subdividem em 22 microrregiões (APÊNDICE 1). A população do estado totaliza 11.320.892 habitantes (IBGE, 2017).

FIGURA 1 – DIVISÃO DAS MACRORREGIONAIS DA SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ, SEGUNDO A SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ (SESA).



AS MICRORREGIONAIS ESTÃO REPRESENTADAS PELOS NÚMEROS (VER APÊNDICE 1 DO CAPÍTULO 1). FONTE: Adaptado da Secretaria do Estado da Saúde (SESA).

2.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

A população deste estudo está composta por casos confirmados e notificados de LTA no Brasil, com foco no Estado do Paraná, durante o período de 2001 a 2015 de acordo com as informações disponíveis no Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN).

Tratou-se de uma pesquisa retrospectiva, de série histórica com abordagem quantitativa onde as variáveis: 1) forma clínica; 2) sexo; 3) faixa etária e 4) zona de residência (urbana e rural) foram analisadas.

As variáveis climáticas de 2001 a 2015 foram obtidas do Sistema Meteorológico do Paraná (SIMEPAR). Os índices de temperatura média (°C), precipitação acumulada (mm) e umidade (%) foram empregados nas análises. Como não há estações meteorológicas nas 22 microrregiões da saúde, optou-se por utilizar as variáveis climáticas anuais do município central de cada uma das seis macrorregiões da saúde.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O número de casos de acordo com as faixas etárias foi analisado por um Modelo Linear Generalizado (GLM) considerando uma distribuição binomial negativa. Testes de Tukey compararam par-a-par os níveis de cada variável preditora (forma clínica, sexo, faixa etária e zona de residência), sendo o valor de significância originalmente assumido para cada teste (0,05), ajustados seguindo a correção de Bonferroni. As faixas etárias foram divididas e nomeadas respeitando a seguinte formatação: 0 a 4 anos (A), 5 a 9 anos (B), 10 a 14 anos (C), 15 a 19 anos (D), 20 a 39 anos (E), 40 a 59 anos (F), 60 a 69 anos (G), 70 a 79 anos (H) e mais que 80 (I).

As variáveis climáticas foram analisadas por um Modelo Linear Generalizado Misto (GLMM) considerando a distribuição binomial negativa dos dados. As amplitudes de valores das variáveis: temperatura, precipitação e umidade foram padronizadas em escalas devido à grande variação entre os dados. A correlação entre as variáveis predictoras (temperatura, precipitação, umidade e zona de residência) foi avaliada por correlações par-a-par (FOX & SANFORD, 2011). As variáveis umidade e temperatura foram colineares ($r_s=0,79$; P-valor < 0.001), portanto dois modelos foram propostos, o primeiro (umidade, precipitação e zona de residência) contendo todas as variáveis predictoras, exceto a temperatura e o segundo (temperatura, precipitação e zona de residência) contendo todas as predictoras exceto a umidade. A significância das variáveis para o ajuste do modelo foi avaliada por um teste de remoção sequencial composto por teste de razão de verossimilhanças (LRT).

Todas as análises foram realizadas em ambiente R 3.4.2 (R Core Team, 2017) utilizando os pacotes MASS (VENABLES & RIPLEY, 2002), car (FOX & SANFORD, 2011) e effects (FOX, 2003) e assumiram valor de significância de 0.05.

2.4 ANÁLISE ESPACIAL

Os casos de LTA no Paraná foram analisados para a confecção de mapas de Kernel, que demonstram a distribuição espacial da doença. A confecção foi realizada por meio do software QGIS 2.18 (QGIS Development Team, 2015). Os casos de LTA foram plotados em uma única coordenada do respectivo município de ocorrência. A intensidade de casos de LTA foi representada por meio de três cores nos mapas de Kernel: azul para baixo número de ocorrências; amarelo para número de casos de LTA intermediário; e vermelho para alta densidade de casos.

2.5 ASPECTOS ÉTICOS

Segundo o Comitê de Ética em Pesquisa da UFPR a pesquisa, embora envolva dados relativos a seres humanos, estes são procedentes de banco de dados de uso e acesso público. Sendo assim, não houve a necessidade de ser submetido para aprovação.

3 RESULTADOS

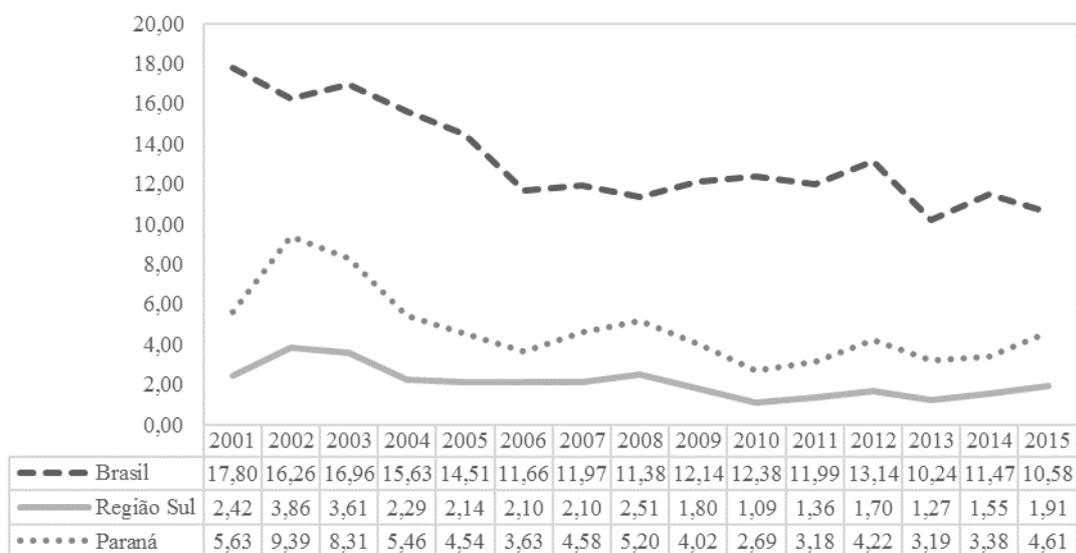
3.1 RESULTADOS GERAIS REFERENTES AO PARANÁ E REGIÕES

Durante os anos de 2001 e 2015, foram notificados 377.892 casos de LTA no país, com uma média de 25.200 casos/ano, gerando uma taxa de incidência média de 13,2 casos/100.000 habitantes (FIGURA 2). A região Sul demonstrou a menor taxa de incidência média (2,1 casos/100.000 habitantes) quando comparada às outras regiões do país (FIGURA 2). Apesar disso, o estado do Paraná figura na 12^a posição em notificações por estado, totalizando 7.875 (APÊNDICE 2) casos de LTA, o que representa 92% dos casos da região Sul, levando a uma taxa de incidência média de 4,8 casos/100.000 habitantes (FIGURA 2). Devido ao grande número de casos da doença no Paraná, a taxa de incidência de LTA na região Sul segue a mesma série histórica com um pico de casos no ano de 2002, e uma queda nos anos de 2010 e 2013 (FIGURA 2).

Um total de 331 dos 399 municípios do estado apresentaram notificações durante o período de 2001 a 2015. Houve uma variação de 89 a 168 municípios com notificações por ano (FIGURA 3). A LTA se mostrou, nesse período, como uma doença endêmica no estado, onde a partir de 2006 se observa uma queda da taxa de incidência quando comparada aos anos anteriores, porém com aumento no número de casos em 2008 e 2015. A partir do ano de 2010 a taxa de incidência apresentou pouca variação (2,7 a 4,6), mantendo-se em valores abaixo da média (4,8) com picos nos anos de 2012 e 2015, enquanto o número de municípios com notificações de casos durante esse período apenas aumentou.

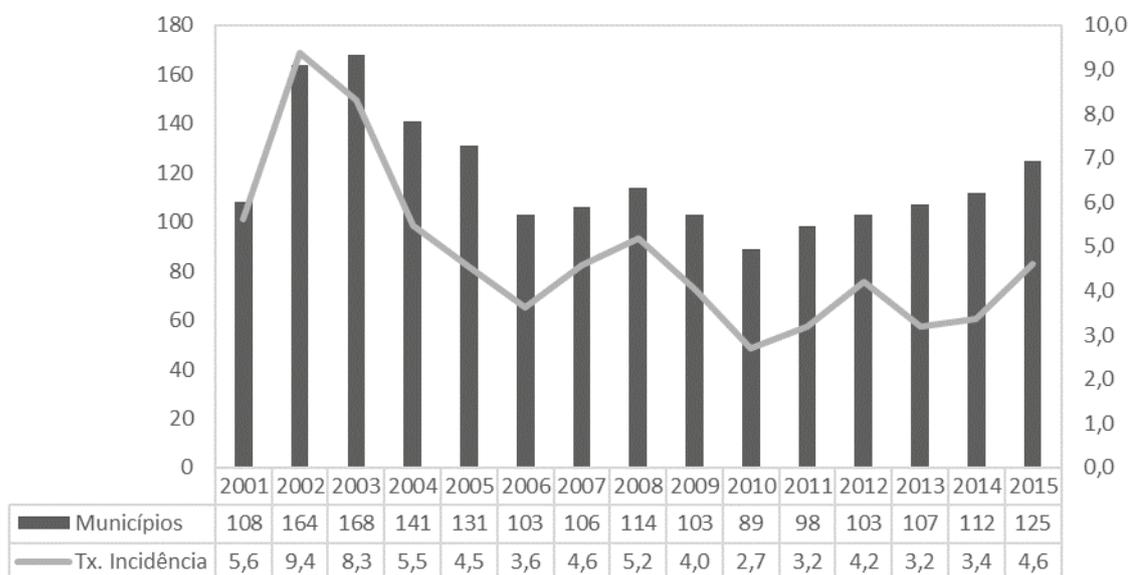
Das seis macrorregionais do Estado, a que apresentou o maior número de casos foi a Noroeste com 3.284 casos, seguida pela Norte com 2.311 casos (FIGURA 4). A macrorregião de Campos Gerais foi a que apresentou o menor número de casos, com 77 notificações. Todas as 22 microrregiões da saúde apresentaram notificações da doença e a microrregião de Cianorte foi a mais prevalente com 1.094 notificações (APÊNDICE 3).

FIGURA 2 – TAXA DE INCIDÊNCIA ANUAL DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA, NO BRASIL, NA REGIÃO SUL E NO ESTADO DO PARANÁ DE 2001 A 2015.



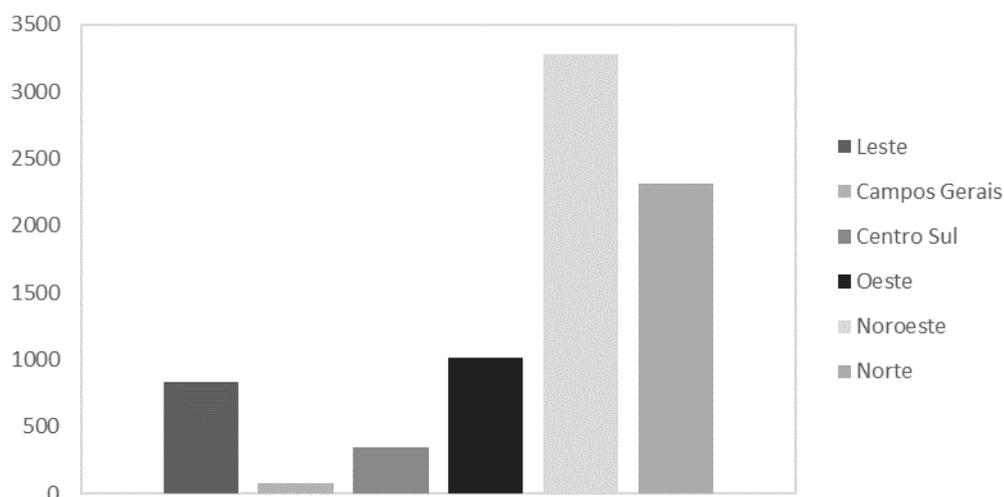
FONTE: Adaptado de SINAN.

FIGURA 3 – MUNICÍPIOS ACOMETIDOS POR ANO E TAXA DE INCIDÊNCIA MÉDIA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DO PARANÁ DURANTE O PERÍODO DE 2001 A 2015.



FONTE: Adaptado de SINAN.

FIGURA 4 – CASOS CONFIRMADOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA DIVIDIDOS POR MESORREGIÕES DA SAÚDE, DURANTE O PERÍODO DE 2001 A 2015, NO ESTADO DO PARANÁ.



FONTE: Adaptado de SINAN.

3.2 POPULAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ

No Paraná, dos 7.875 casos notificados o gênero masculino foi responsável por 5.513 (60%) notificações. Em relação à manifestação clínica, 6.808 (86%) dos casos foram notificados e classificados, clinicamente, como cutâneo e 1.046 (13%) como mucocutâneo. As variáveis que influenciaram significativamente no número de casos de LTA no Paraná foram o sexo do indivíduo ($F=11.2$, $gl=1$, $p=0.001$) e a idade ($F=15.1$, $gl=8$, $p<0.001$) (Tabela 1).

As faixas etárias com menor número de infectados foram as de A até D, e I. As faixas G e H, mas especificamente E e F, apresentaram maior número de pessoas infectadas. Apesar das faixas etárias entre 20 e 59 anos apresentarem o maior número de casos notificados de LTA, a faixa entre as idades de 60 a 69 anos, demonstraram a maior taxa de incidência média (9,2 casos/100.000 hab.) durante o período de estudo (Apêndice 4). O resultado da taxa de incidência diferiu, pois, este método leva em consideração, além da totalidade dos casos notificados, a população da faixa etária de estudo.

Dentro de cada faixa etária, não foram observadas diferenças significativas no número de casos de infecção entre homens e mulheres, bem como entre habitantes de zona rural e urbana, mas o número de infecções da forma cutânea foi significativamente maior do que a forma mucocutânea em pessoas das faixas B ($z=-6.06$, $p<0.001$), C ($z=-6.6$, $p<0.001$), D ($z=-6.01$, $p<0.001$) e E ($z=-5.25$, $p<0.001$).

TABELA 1 – TOTAL DE CASOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA OBTIDOS NO ESTADO DO PARANÁ ENTRE 2001 E 2015. OS DADOS ESTÃO CLASSIFICADOS DE ACORDO COM SEXO, FAIXA ETÁRIA, ZONA DE RESIDÊNCIA E TIPO DE ENTRADA, CORRELACIONADOS COM A FORMA CLÍNICA.

	Cutâneo		Mucosa		Total
	n	%	n	%	n
Sexo					
Masculino	4756	60%	757	10%	5513
Feminino	2052	26%	304	4%	2356
Faixa etária					
0 a 4 A	162	2%	11	0%	173
5 a 9 B	279	4%	9	0%	288
10 a 14 C	349	4%	9	0%	358
15-19 D	424	5%	17	0%	441
20-39 E	2325	30%	226	3%	2551
40-59 F	2190	28%	383	5%	2573
60-69 G	702	9%	214	3%	916
70-79 H	293	4%	151	2%	444
80 + I	89	1%	42	1%	131
Zona de Residência					
Urbano	3633	46%	764	10%	4397
Rural	2867	36%	249	3%	3116
Periurbano	65	1%	8	0%	73
TOTAL	6808		1061		7875

FONTE: Adaptado de SINAN.

3.3 ANÁLISES DAS VARIÁVEIS ABIÓTICAS

Não foi possível confeccionar um modelo estatístico completo, contendo todas as variáveis (temperatura, precipitação, umidade e zona de residência) juntas, pois as variáveis de temperatura e umidade não puderam ser utilizadas no mesmo modelo, devido à alta colinearidade (correlação) ($r_s=0.79$) entre elas. Portanto dois modelos foram confeccionados, um com umidade e sem temperatura, e outro com temperatura e sem umidade.

Com base no primeiro modelo proposto para as variáveis abióticas, ficou evidente a que a umidade não pode ser usada para explicar o número de casos preditos de LTA ($\beta=0,03$; $p=0,09$) nessa população, visto que seu valor de beta não foi significativo. Por esse motivo, as interpretações do estudo foram feitas sobre o segundo modelo.

O número de casos de LTA foi significativo em relação à temperatura média mensal (LRT=34,41, $p<0,001$, $\beta=0,80$), da precipitação acumulada (LRT=11,47, $p<0,001$, $\beta=-0,12$) e da localidade em que o indivíduo habitava (LRT=6,73, $p=0,01$, $\beta=0,18$).

O modelo para explicar a relação entre as variáveis preditoras e o número de casos preditos para LTA está descrito abaixo:

$$\text{Número de casos} = e^{-6,87+0,439 \cdot \text{temp} - 0,004 \cdot \text{prec} + 0,182 \cdot \text{local}},$$

onde: *temp* é a temperatura média mensal (°C); *prec* é a precipitação acumulada mensal (mm); *local* refere-se ao local de habitação do indivíduo, sendo 0 para área rural e 1 para área urbana (Fonte: presente estudo).

A temperatura média mensal apresentou influência muito maior sobre o número de casos preditos de LTA do que as demais variáveis. Exemplificando, o número esperado de casos para os valores médios de temperatura (20,3°C) e de precipitação acumulada (131,5 mm) para habitantes da zona rural é de 4,57. Já para habitantes da zona urbana, esse número subiu para 5,48. Em um novo cenário, em que a temperatura média mensal for superior (25°C), mas a precipitação for mantida constante, o número predito de casos passa a ser de 36,09 e 43,27, respectivamente para habitantes da zona rural e urbana (FIGURA 5).

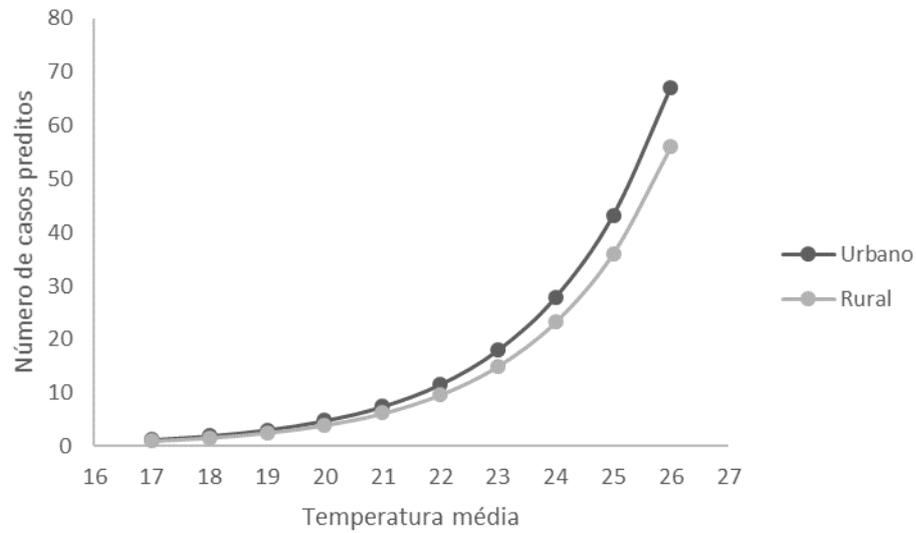
A precipitação acumulada apresentou uma correlação negativa com os casos preditos de LTA no Paraná (FIGURA 6). Pode-se observar que o número de casos preditos, com o modelo proposto, diminuiu na medida em que a precipitação aumenta.

3.4 MAPA DE KERNEL

Neste estudo objetivou-se representar, por meio de mapas de Kernel anuais, a distribuição dos casos de LTA no estado do Paraná durante o período de 2001 a 2015, buscando identificar as regiões de mais acometidas pela doença. A partir dos mapas obtidos pode-se observar um comportamento contínuo em algumas regiões e flutuações em outras (FIGURA 7). As regiões Noroeste e Norte foram as que mais apresentaram ocorrências, com focos contínuos nos municípios de Cianorte e Maringá (noroeste) e Londrina (norte). Com o passar dos anos nessas duas regiões, foi possível a observação de um maior número de municípios apresentando alto número de casos de LTA (coloração vermelha), demonstrando uma possível dispersão da doença.

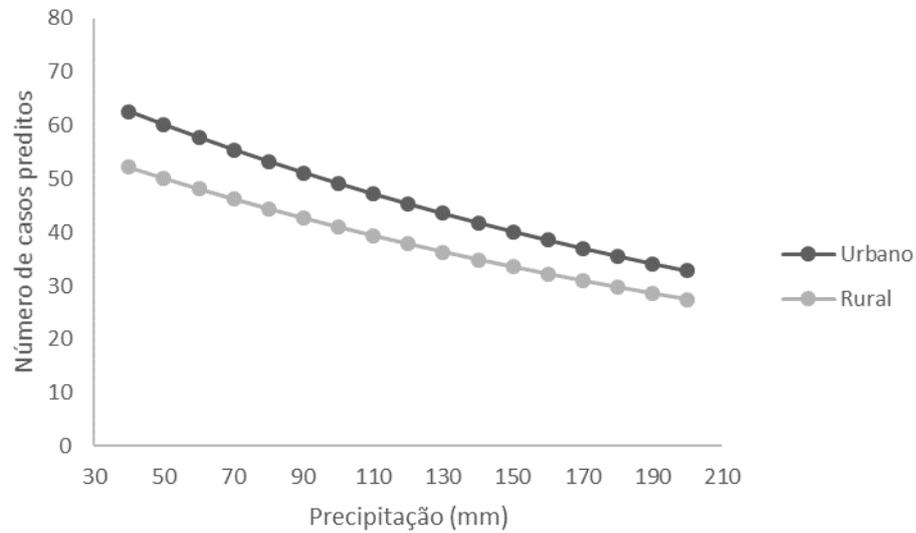
Na região leste, os municípios de Cerro Azul e Adrianópolis se destacam dos demais com altos e baixos. Em análise de taxa de incidência, Cerro Azul apresentou uma das maiores médias anuais de 123 casos/100.000 hab. A região de Campos Gerais não apresentou regiões endêmicas para a doença. Já nas regiões Oeste e Centro Sul, os municípios de Toledo e Guarapuava apresentaram o maior número de notificações durante o período.

FIGURA 5 – NÚMERO DE CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA PREDITOS DE ACORDO COM O AUMENTO DA TEMPERATURA MÉDIA (°C) NO ESTADO DO PARANÁ.



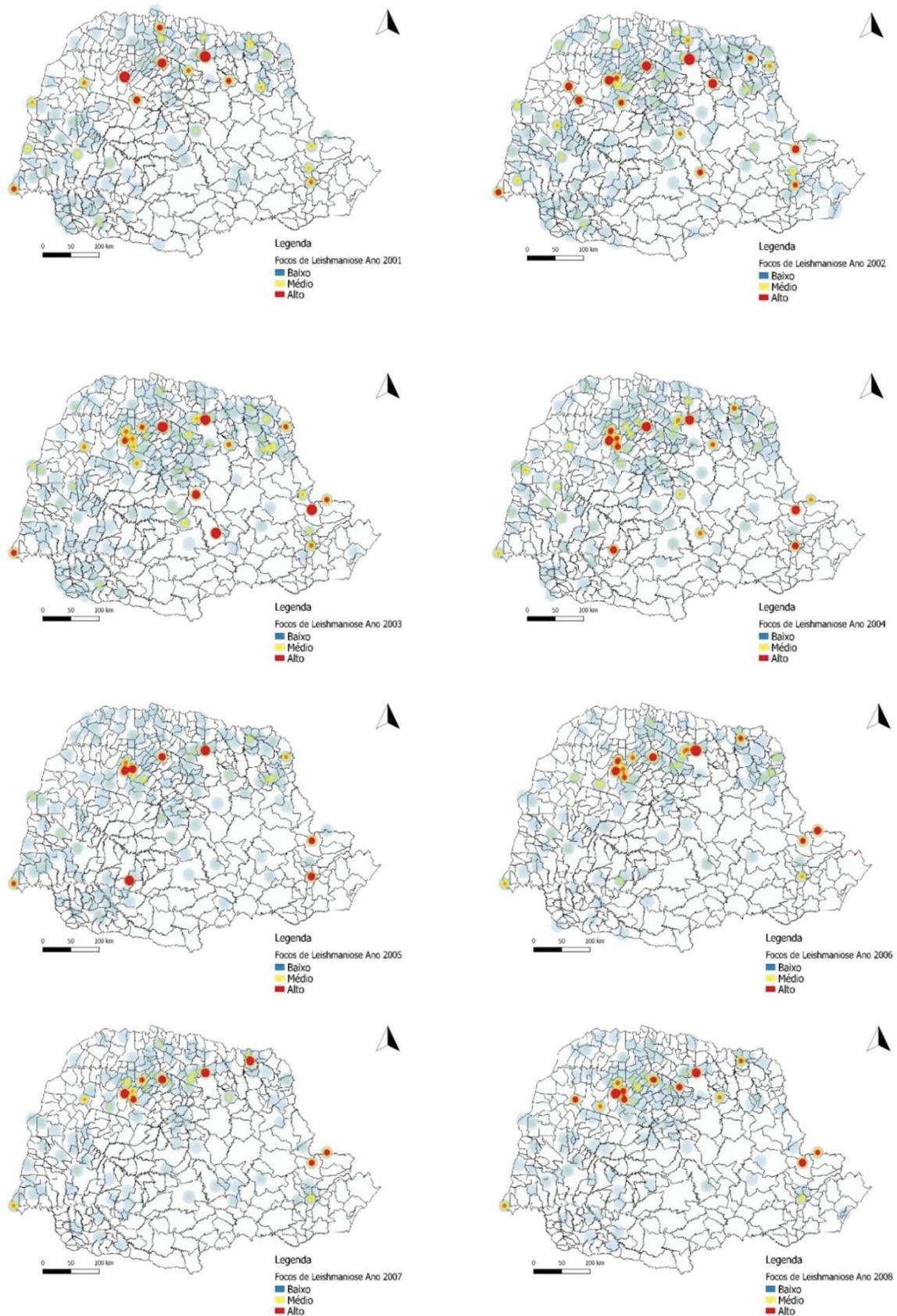
FONTE: O Autor (2017).

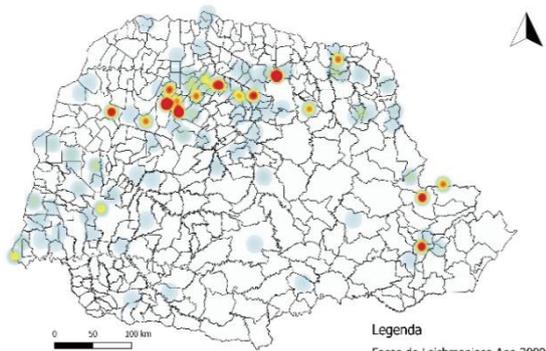
FIGURA 6 – NÚMERO DE CASOS PREDITOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA DE ACORDO COM A PRECIPITAÇÃO ACUMULADA (MM) A NO ESTADO DO PARANÁ.



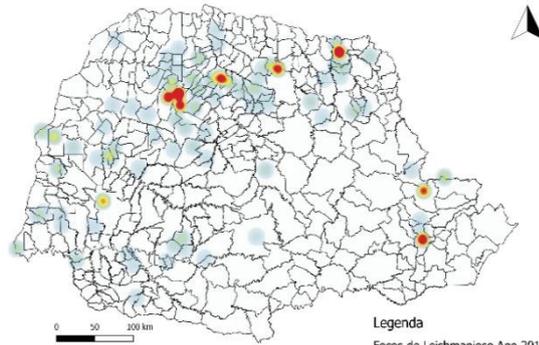
FONTE: O Autor (2017).

FIGURA 7 – DISTRIBUIÇÃO ANUAL DOS CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO ESTADO DO PARANÁ DE 2001 A 2015.

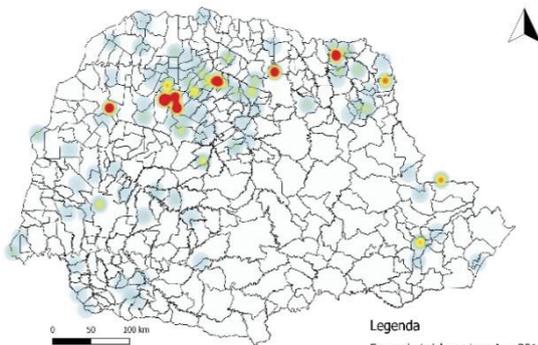




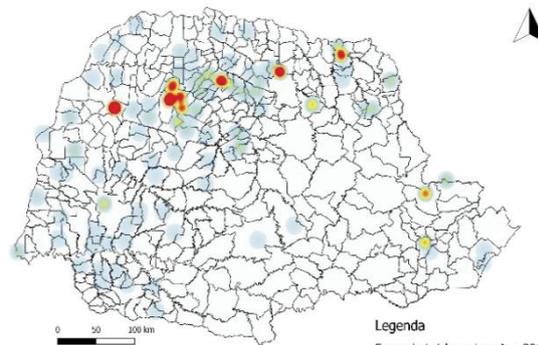
Legenda
Focos de Leishmaniose Ano 2009
Baixo
Médio
Alto



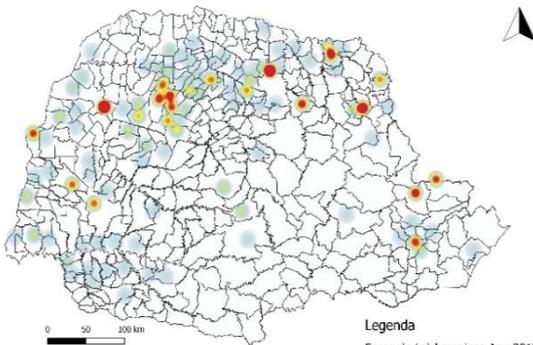
Legenda
Focos de Leishmaniose Ano 2010
Baixo
Médio
Alto



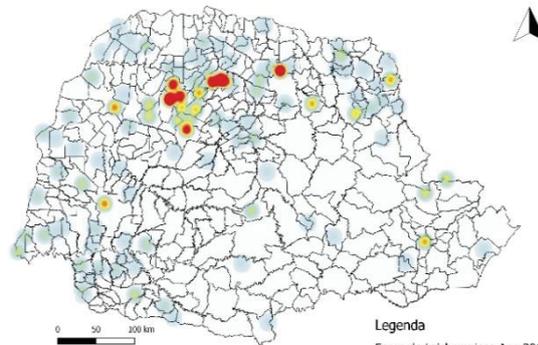
Legenda
Focos de Leishmaniose Ano 2011
Baixo
Médio
Alto



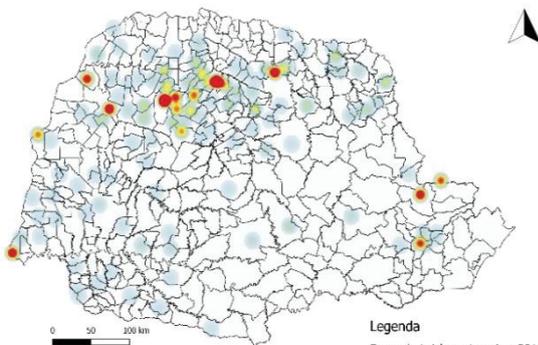
Legenda
Focos de Leishmaniose Ano 2012
Baixo
Médio
Alto



Legenda
Focos de Leishmaniose Ano 2013
Baixo
Médio
Alto



Legenda
Focos de Leishmaniose Ano 2014
Baixo
Médio
Alto



Legenda
Focos de Leishmaniose Ano 2015
Baixo
Médio
Alto

FONTE: O autor (2017).

4 DISCUSSÃO

O presente caracterizou os fatores ligados à ocorrência de LTA no estado do Paraná onde a doença se mostrou endêmica, com centenas de casos notificados a cada ano, ao longo do período de estudo (2001-2015) apresentando uma taxa de incidência média de 4,8 casos/100.000 habitantes. No Paraná, ser do sexo masculino e morar em área urbana funcionaria como fatores de risco para aquisição da doença, principalmente na forma cutânea, entre as faixas etárias de 20 a 59 anos. A temperatura se mostrou com um dado abiótico mais importante na incidência de casos do que a precipitação, onde áreas mais quentes seriam mais propensas para se adquirir a doença.

Sabidamente a LTA no Brasil está em expansão e segundo Alcântara et al. (2016), até 2002, 276 municípios do estado haviam notificado casos da doença, e desde 2008, mais de 300 municípios relataram ocorrências da LTA. Neste estudo um total de 331 municípios dos 399 existentes no Paraná apresentaram casos da doença, demonstrando uma ampliação das áreas de abrangência da LTA no estado nesse período. Com isso, o estado do Paraná representa mais de 92% dos casos notificados de LTA da região Sul do país figurando na 12ª colocação entre os estados com maior número de casos de LTA durante este período.

Dentre as macrorregionais, a Noroeste é que apresentou o maior número de casos entre as seis que compõem o estado. Isto se deve ao fato que as duas microrregionais (13ª Cianorte – 1.094 casos e 15ª Maringá – 1.056 casos) que mais detêm casos notificados de LTA se localizam nesta regional, corroborando com o encontrado por Melo et al. (2017), que encontraram altas taxas de incidência nessas regiões. O alto número de casos nessa região pode estar diretamente associado à alta temperatura média e baixos índices pluviométricos e de umidade.

A grande maioria dos casos de LTA no Paraná, se apresentou na forma clínica cutânea, com 86% (6.808 casos), concordando com os achados de Gosch et al. (2017), Rocha et al. (2015), e Xavier et al. (2016), Santos et al. (2016), França et al. (2009), Nascimento et al. (2011) que demonstraram altos índices de 94,5%, 95%, 96%, 93%, 94%, 93,85%, respectivamente. Entretanto, o número de casos relacionados à forma clínica mucocutânea (1.061/13%), é superior a apresentada pelo Ministério da Saúde, tal qual afirma que entre 3 e 5% das lesões de pele causadas pela LTA irão evoluir para a forma mucocutânea (BRASIL, 2017). O alto número de casos com forma clínica mucosa pode estar relacionado ao agente etiológico dos casos de LTA no estado, a *L. braziliensis*. Segundo Lainson e Shaw (2010), esse agente demonstra uma maior chance de produzir lesões metastáticas em mucosas, e até

hoje, é a única espécie incriminada como responsável pelos casos humanos de LTA no Paraná (MONTEIRO et al., 2008; ALCÂNTARA et al., 2016), apesar de outras espécies dermatrópicas já terem sido descritas por Caldart et al. (2017).

Ser do sexo masculino constitui um fator de risco para a LTA no estado do Paraná, corroborando com os relatos de Sessa et al. (1985), Silva et al. (2006); Sampaio et al. (2009); França et al. (2009); Monteiro et al. (2009), Nascimento et al. (2011); Rocha et al. (2015); Santos et al. (2016); Xavier et al. (2016); Moreira et al. (2016); Gosch et al. (2017) e Melo et al. (2017) e Bruschi e Gradoni (2018). Segundo Bruschi e Gradoni (2018), este fato pode ter algumas explicações como a maior exposição do homem à picada da fêmea do flebotomíneo devido à ocupação ou atividades sociais, desigualdade de gênero no acesso à assistência médica, ou até fatores biológicos ligados ao sexo.

Com relação à idade, ser adulto entre 20 e 59 anos constitui um importante fator de risco para a LTA como já demonstrado por outros autores (SAMPAIO et al. 2009; FRANÇA et al. 2009; NASCIMENTO et al. 2011; ROCHA et al. 2015, SANTOS et al. 2016; XAVIER et al. 2016; MOREIRA et al. 2016; GOSCH et al. 2017; MELO et al. 2017). A alta proporção de pessoas diagnosticadas em idade de trabalho pode estar associada a altos níveis de exposição à LTA durante longos períodos (BRUSCHI & GRADONI, 2018). Entretanto quando se observa o coeficiente de incidência, tal qual leva em conta a população total da faixa etária, notou-se que pessoas acima dos 60 anos apresentam o mais risco de infecção do parasito (APÊNDICE 4), corroborando o achado de Melo et al. (2017).

Ainda no presente estudo, o Paraná apresentou um grande número de casos notificados em regiões urbanas. Houve significância estatística que a zona urbana representa um fator de risco para a LTA no estado, corroborando com os resultados de Graziani et al. (2013) para o estado de Goiás, Xavier et al. (2016) em Minas Gérias, Moreira et al. (2016) no Mato Grosso e Gosch et al. (2017) no Tocantins.

A LTA no Brasil inicialmente era restrita a regiões de florestas tendo animais silvestres como reservatórios e os humanos eram acidentalmente infectados quando entravam nas florestas. Progressivamente, mais casos de LTA foram observados em áreas de desmatamento, regiões periurbanas e chegando em centros urbanos estando relacionado à adaptação do vetor às mudanças no ambiente. Foi possível a observação dessa mudança de perfil epidemiológico no estado do Paraná, como já observado por Passos et al. (2003) no Espírito Santo e por Gosch et al. (2017) no Tocantins.

Durante a confecção dos modelos estatísticos que envolviam os dados abióticos (temperatura, precipitação e umidade) associados à zona de residência, as variáveis

temperatura e umidade apresentaram uma alta colinearidade (correlação – $r_s=0.79$). Esse resultado atesta que os dois elementos são altamente correlacionados, porém de forma negativa, ou seja, altas temperaturas geram baixos índices de umidade. Devido a colinearidade dos dados, não foi possível gerar um modelo estatístico envolvendo todas as variáveis (temperatura, precipitação, umidade e zona de residência), pois a alta colinearidade (correlação – $r_s=0.79$) encontrada, entre esses parâmetros pode afetar consideravelmente as estimativas, até mesmo alterando o sinal da aferição (QUINN & KEOUGH, 2002). Sendo assim, dois modelos estatísticos foram confeccionados, os quais separavam esses elementos em duas equações distintas, a primeira contendo todas as variáveis exceto a temperatura, e a segunda com todas as variáveis, exceto a umidade.

Apesar do conhecimento que a umidade relativa do ar pode influenciar a fauna de flebotomíneos (SHIMABUKURO et al., 2010; FERREIRA DE SOUZA et al., 2015; AZIMI et al., 2017) e consequentemente os casos de LTA, estatisticamente, neste modelo a umidade não demonstrou importância para explicar os casos da doença.

A temperatura apresentou uma correlação positiva com aumento do número de casos da LTA. Este fato já foi demonstrado por Azimi et al. (2017) no Irã e Ferreira De Souza et al. (2015) no Amazonas, sendo esta a primeira descrição no estado do Paraná. Segundo Ready (2008) e Hlavacova et al. (2013), a temperatura pode afetar a distribuição de LTA por meio do aumento do número de flebotomíneos.

Com relação à precipitação, foi observada uma correlação negativa com os casos de LTA, ou seja, há um menor número de casos predito de acordo com o aumento da precipitação, diferente do observado por Azimi et al., (2017) para LT no Irã, e corroborando com o relato de Ferreira De Souza et al. (2015) no Amazonas, os quais afirmam que o clima quente e seco favorece o aumento da população de vetores e consequentemente o maior número de casos de LTA. Geralmente, altos índices pluviométricos são seguidos por reduções nos números de flebotomíneos, que esse fator limita a atividade de vôo do inseto e reduz a quantidade de locais para repouso diurnos dos adultos, além de eliminar estádios imaturos (DEPAQUIT et al., 2005; NAUCKE et al., 2011; SARWAR et al., 2017). No estado do Paraná, as regiões Norte e Noroeste se enquadram na descrição de Ferreira de Souza et al. (2015) sobre locais quentes e secos, pois as duas regiões apresentaram as maiores médias de temperaturas e menores índices pluviométricos.

Uma compreensão mais profunda da relação entre o clima e a dinâmica da doença é fundamental para antecipar os efeitos potenciais que as mudanças climáticas teriam sobre a incidência e distribuição da doença (CHAVES & PASCUAL, 2006).

São poucos os estudos que levam em consideração índices meteorológicos em associação com doenças de transmissão vetoriais, e esse foi o primeiro que correlacionou esses dados abióticos com outras variáveis preditoras de risco no estado, e ainda mapas de calor (Kernel) foram confeccionados para melhor visualização da distribuição da doença. A análise dessa distribuição de casos de LTA utilizando sistemas de informação geográfica (SIG) é de extrema importância pode ajudar a localizar os pontos de maior foco de transmissão no estado, orientando ainda mais as atividades de pesquisa e vigilância.

A partir desses dados, os casos de LTA no Paraná estão relacionados preferencialmente ao sexo masculino, com faixa etária de 20 a 59 anos, forma clínica cutânea, zona de residência urbana, e locais quentes e secos, como é o caso da região Noroeste e Norte do estado. A microrregião de Cianorte e Londrina foram as mais acometidas, exigindo assim, um maior esforço das instituições governamentais para controle da LTA nessas regiões. A urbanização da LTA começou a ser discutida recentemente e poucos são os estudos que encontraram um perfil epidemiológico semelhante ao observado nesse estudo. Destaca-se que são necessários mais estudos referentes à peridomiciliação dos vetores, em diferentes regiões.

O clima está diretamente relacionado aos casos de LTA no estado, e segundo Gosling et al., (2011) em “Climate: Observations, projections and impacts: Brazil” a média nacional de aumento da temperatura será de 3,5 °C até 2100. Com o auxílio do aumento das temperaturas, o número de casos e a distribuição da LTA no estado tende a aumentar no estado.

5. REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, L.R.D.S.; DEMARCHI, I.G.; ARISTIDES, S.M.A. Evolution of american tegumentary leishmaniasis cases reported in paraná state, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**; v. 58, 2016.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLOS One**; v.7, 2012.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Tren Parasitol**; v.22, p.552–7, 2006.
- AZIMI, F.; SHIRIAN, S.; JANGJOO, S.; AI, A.; ABBASI, T. Impact of climate variability on the occurrence of cutaneous leishmaniasis in Khuzestan Province, southwestern Iran. **Geo Health**; v.12, n.1, 2017.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília – DF, 2017.
- BRUSCHI, F.; GRADONI, L. **The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases**. Springer International Publishing; p.107–125. Print, 2018.
- CALDART, E.T.; FREIRE, R. L.; FERREIRA, F. P.; RUFFOLO, B. B.; SBEGHEN, M. R.; MAREZE, M.; GARCIA, J. L.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T. *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Braz J Vet Parasitol**; v.26, p.17–27, 2017.
- CASTRO, E.A.; THOMAS-SOCCOL, V.; MEMBRIVE, N.; LUZ, E. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Rev Soc Bras Med Trop**; v.35, p.445–452, 2002.
- CHAVES, L. F.; PASCUAL, M. Climate Cycles and Forecasts of Cutaneous Leishmaniasis, a Nonstationary Vector-Borne Disease. **PLOS Medicine**; v.3(8), e295, 2006.
- DELGADO, L.; C RDOVA, K.; RODRIGUEZ, A. J. Epidemiological impact of climatic variation on malaria dynamics in a Northeastern Region of Venezuela. **J Infect Dis**; v.8, p.23–4, 2004.
- DEPAQUIT, J.; NAUCKE, T. J.; SCHIMITT, C.; FERTE, H.; LEGER, N. A molecular analysis of the subgenus *Transphlebotomus* Artemiev, 1984 (*Phlebotomus*, Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA with new northern records of *Phlebotomus mascittii* Grassi, 1908. **Parasitol Res**; v.95 (2), p.113–116, 2005.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**; v.27(5), p.305–18, 2004.

FERREIRA DE SOUZA, R.A.F.; ANDREOLI, R.V.; KAYANO, M.T.; CARVALHO, A.L. American cutaneous leishmaniasis cases in the metropolitan region of Manaus, Brazil: association with climate variables over time. **Geo Health**; v.10, p.314, 2015.

FOX, J. Effect Displays in R for Generalised Linear Models. **J Stat Soft**; v.8(15), p.1-27, 2003.

FOX, J.; SANFORD, W. An R companion to applied regression. **Sage Public**, 2011.

FRANÇA, E.L.; MANDADORI, M.N.; FRANÇA, J.L.; BOTELHO, A.C.; FERRARI, C.K.; HONÓRIO-FRANÇA, A.C. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana no município de Juína, Mato Grosso, Brasil. **Sci Med**. Porto Alegre, v.19, p.103-7, 2009.

GAGNON, A.S.; SMOYER-TOMIC, K.E.; BUSH, A.B.G. The El Niño Southern Oscillation and malaria epidemics in South America. **Int J Biom**; v.46, p.81-89, 2002.

GHATEE, M.A.; HAGHDOOST, A.A.; KOORESHNIAB, F.; KANANNEJADD, Z.; PARISAIEE, Z.; KARAMIANF, M.; MOSHFEA, A. Role of environmental, climatic risk factors and livestock animals on the occurrence of cutaneous leishmaniasis in newly emerging focus in Iran. **J Inf Pub Health**, 2017.

GHITHEKO, A.; LINDSAY, S.; CONFALONIERI, U.; PATZ, J. Climate change and vector-borne diseases: A regional analysis. **Bull World Health Organ**; v.78, p.1136-47, 2000.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev Soc Bras Med Trop**; v. 36, n.1, p.71-80, 2003.

GOSCH, C.S.; MARQUES, C.P.; RESENDE, B.S.; SOUZA, J.S.; ROCHA, R.A.S.; LOPES, D.S.S.; GOSCH, M.S.; DIAS, F.R.; DORTA, M. L. American tegumentary leishmaniasis: epidemiological and molecular characterization of prevalent *Leishmania* species in the State of Tocantins, Brazil, 2011-2015. **Rev Inst Med Trop São Paulo**; v.59, 2017.

GOSLING, S. N.; DUNN, R.; CARROL, F.; CHRISTIDIS, N.; FULLWOOD, J. Climate: Observations, projections and impacts: Brazil. **Met Office**, 2011.

GRAZIANI, D.; OLIVEIRA, V. A.; SILVA, R. C. Estudo das características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana no estado de Goiás, Brasil, 2007-2009. **Rev Patol Trop**; v.42, p.417-24, 2013.

HLAVACOVA, J.; VOTYPKA, J.; VOLF, P. The Effect of Temperature on *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) Development in Sand Flies. **J Med Ent**; v.50, p.1-4, 2013.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades, 2017**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pr/panorama>> Acesso em 5 fev 2018.

JIRMANUS, L.; GLESBY, M.J.; GUIMARAES, L.H.; LAGO, E.; ROSA, M.E.; MACHADO, P.R.; CARVALHO, E.M. Epidemiological and clinical changes in American

tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. **Am J Tr Med Hyg**; v.86, p.426–433, 2012.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. **New World Leishmaniasis**. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 2010.

MAROLI, M.; FELICIANGELI, M.D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R.N.; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Med Vet Entomol**; v.27, p.123–147, 2013.

MELO, H.A.; ROSSONI, D.F.; TEODORO, U. Spatial distribution of cutaneous leishmaniasis in the state of Paraná, Brazil. **PLOS ONE**; v.12, 2017.

MONTEIRO, W.M.; NEITZKE, H.C.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V.; FERREIRA, M.E.M.C.; TEODORO, U. Distribuição geográfica e características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em áreas de colonização antiga do Estado do Paraná, Sul do Brasil. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, n.6, p.1291-1303, 2008.

MONTEIRO, W.M.; NEITZKE, H.C.; SILVEIRA, T.G.; LONARDONI, M.V.; TEODORO, U.; FERREIRA, M. E. Pólos de produção de leishmaniose tegumentar americana no norte do Estado do Paraná, Brasil. **Cad Saúde Pública**; v.25, p.1083-92, 2009.

MOREIRA, C.; SEGUNDO, A.S.; CARVALHOSA, A.A.; ESTEVAMC, L.S.; PEREIRA, S.A.; AGUILAR, A.M. Comportamento geoespacial da leishmaniose tegumentar americana no município de Tangará da Serra – MT. **J Health Sci**; v.18, p.171-6, 2016.

NASCIMENTO, A.P.; ALVES, J.B.; CARDOSO, V.S.; BRITO, W.I. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana no município de Primavera do Leste, Mato Grosso, MT, Brasil. **Saúde Colet**; v.8, p.210-4, 2011.

NAUCKE, T.J.; LORENTZ, S.; RAUCHENWALD, F.; ASPOCK, H. *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908, in Carinthia: first record of the occurrence of sandflies in Austria (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Parasitol Res**; v.109 (4), p.1161-1164, 2011.

PASSOS, L. N. **Avaliação da reação em cadeia de polimerase (PCR) no diagnóstico da leishmaniose cutânea no Estado do Espírito Santo, Brasil**. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PATZ, J.A.; GRACZYK, T.K.; GELLER, N.; VITTOR, M.Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **Int J Parasit**; v.30, n.12-13, p.1395-1405. Elsevier BV, 2000.

QUINN, G.P.; KEOUGH, M.J.; PETRAITIS, P.S.; QUINN, G.P.; KEOUGH, M.J. Experimental design and data analysis for biologists. **J Exp Mari Bio Eco**; v.277, p.197–198, 2002.

READY, P.D. Leishmaniasis emergence and climate change. **Rev Sci Tech**; v.27, p.399 – 412, 2008.

ROCHA, T.J.; SANTANA, E.P.; BARBOSA, A.C.; CALHEIROS, C.M. Aspectos epidemiológicos dos casos humanos confirmados de leishmaniose tegumentar americana no Estado de Alagoas, Brasil. **Ver Pan-Amaz Saude**; v.6, p.49-54, 2015.

SAMPAIO, R.N.; GONÇALVES, M.C.; LEITE, V.A.; FRANÇA, B.V.; SANTOS, G.; CARVALHO, M.S.; TAUIL, P.L. Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. **Rev Soc Bras Med Trop**; v.42, p.686-90, 2009.

SANTOS, J.C.; BINOW, A.M.; SANTOS, S.T. Estudo da incidência de casos de leishmaniose tegumentar americana no município de Espigão do Oeste – RO. **Rev Enferm Saúde Colet**; v.2, p.15-28, 2016.

SARWAR, M.; NADEEM, A.; SARWAR, M.H; NADEEM, J. Miscellaneous Ways to Repel Treat and Avoid Being Bitten by Sand Flies (Diptera: Pschodidae Phlebotominae) on Human. **Am J F Sci He**; v.3, p.64–69, 2017.

SESSA, P.A.; BARROS, G.C.; MATTOS, E.A.; CARIAS, V.R.D.; ALENCAR, J.T.A.; DELMAESTRO, D.; COELHO, C.C.; FALQUETO, A. Distribuição geográfica da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Espírito Santo- Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**; v.18, p.237-241, 1985.

SHIMABUKURO, P.; DA SILVA, T.; RIBEIRO, F.; BATON, L; GALATI, E. Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of São Paulo, Brazil. **Par Vec**; v.3, p.121, 2010.

SILVA, A. C.; CUPOLILO, E.; VOLPINI, A. C.; ALMEIDA, R.; ROMERO, G. A. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. **Trop Med Int Health**; v. 11, p.1388-98, 2006.

THOMAZ-SOCCOL, V.T.; CASTRO, E.A.; NAVARRO, I.T.; FARIAS, M.R.D.; SOUZA, L.M.D.; CARVALHO, Y.; MARQUES, E.; PEREIRA, E.F.; ALCANTARA, F.S.; MACHADO, A.M.; KOWALTHUK, W.; MEMBRIVE, N.; LUZ, E. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. **Rev Bras Parasitol Vet**; v.18(3), p.46-51, 2009.

THOMAZ-SOCCOL, V.T.; DEREURE, J.; PRATLONG, F.; MEMBRIVE, N.; DEDET, J.P. *Leishmania* species in two regions of Paraná, Brazil: biochemical characterization by isoenzyme electrophoresis. In: Roussos S, Soccol CR, Pandey A, Augur C, editors. **New Horizons in Biotechnology**. Springer Netherlands, p.387-395, 2003.

VENABLES, W.N.; RIPLEY, B.D. **Modern applied statistics with S**. New York: Springer Science & Business Media, n.200, p.183-206, 2002.

WHO – **World Health Organization**, 2006. Control of Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>> Acesso em: 1 mar 2018.

WHO – World Health Organization, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 1 mar 2018.

WHO – **World Health Organization**, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/en/>
Acesso em: 1 mar 2018.

XAVIER, K.D.; MENDES, F.C.; ROSSI-BARBOSA, L.A. Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico-epidemiológico. **Rev Univ Vale do Rio Verde**; v.14, p.1210-22, 2016.

6 APÊNDICES

APÊNDICE 1 – MACRORREGIONAIS DA SAÚDE E SUAS MICRORREGIÕES DA SAÚDE (= REGIONAIS) DO ESTADO DO PARANÁ, SEGUNDO A SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ (SESA).

Macrorregional da saúde	Regional da saúde
Leste	1 ^a - Paranaguá
	2 ^a - Metropolitana
Campos Gerais	3 ^a - Ponta Grossa
	4 ^a - Irati
	6 ^a - União da vitória
	21 ^a - Telêmaco Borba
Centro Sul	5 ^a - Guarapuava
	7 ^a - Pato Branco
Oeste	8 ^a - Francisco Beltrão
	9 ^a - Foz do Iguaçu
	10 ^a - Cascavel
	20 ^a - Toledo
Noroeste	11 ^a - Campo Mourão
	12 ^a - Umuarama
	13 ^a - Cianorte
	14 ^a - Paranavaí
	15 ^a - Maringá
Norte	16 ^a - Apucarana
	17 ^a - Londrina
	18 ^a - Cornélio Procópio
	19 ^a - Jacarezinho
	22 ^a - Ivaiporã

APÊNDICE 2 – TOTAL DE CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DO
PARANÁ.

Paraná																
Gênero	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
Masculino	427	686	623	400	315	277	319	429	333	190	257	322	229	320	378	5505
Feminino	211	327	316	187	168	141	164	143	111	83	100	123	86	78	126	2364
Ignorado	2	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Fx Etária detalhada																
Ignorado				1				2								3
<1 Ano		1	4	7	8	2	2	10	1	1	2	1	0	3	5	47
1 a 19	104	216	198	108	79	66	72	89	61	21	34	45	28	34	60	1215
20-39	228	348	360	189	149	134	128	197	141	69	119	135	76	127	152	2552
40-59	198	285	245	179	156	147	179	166	151	110	129	160	121	161	180	2567
60 a 79	105	157	122	94	84	64	92	101	84	63	67	94	80	64	91	1362
80 e +	5	13	10	9	7	5	10	7	6	9	6	10	10	9	16	132
Forma Clínica																
Ignorado	26	18	3				1									48
Cutânea	532	897	833	508	398	366	399	509	376	215	306	385	268	341	451	6784
Mucosa	82	105	103	79	85	52	83	63	68	58	51	60	47	57	53	1046
Zona Residência																
Ign/Ñ preenchido	10	45	115	28	14	17	9	4	13	3	8	6	6	7	5	290
Urbana	365	458	371	307	247	232	305	337	249	165	235	301	196	275	352	4395
Rural	264	515	448	247	216	167	164	213	173	104	112	133	108	113	144	3121
Periurbana	1	2	5	5	6	2	5	18	9	1	2	5	5	3	3	72
Total	640	1020	939	587	483	418	483	572	444	273	357	445	315	398	504	7875

APÊNDICE 3 – TOTAL DE CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NOTIFICADOS
 POR ANO, DE CADA REGIONAL DA SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ, DURANTE O PERÍODO DE
 2001 A 2015.

Região de Saúde	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
1ª RS Paranaguá	0	4	1	0	0	0	0	1	0	0	1	2	1	1	0	11
2ª RS Metropolitana	41	85	144	69	50	53	63	72	55	34	24	31	32	19	54	826
3ª RS Ponta Grossa	0	13	5	5	5	3	3	2	1	0	0	0	2	1	2	42
4ª RS Irati	5	1	2	3	1	0	4	0	1	0	0	0	0	2	0	19
5ª RS Guarapuava	7	39	105	45	59	15	6	6	1	8	4	3	7	5	9	319
6ª RS União da Vitória	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
7ª RS Pato Branco	2	4	3	0	3	1	2	2	1	1	0	2	2	3	3	29
8ª RS Francisco Beltrão	25	37	24	8	13	4	4	4	1	5	8	5	8	17	6	169
9ª RS Foz do Iguaçu	28	42	26	10	24	16	20	17	16	8	4	6	5	12	24	258
10ª RS Cascavel	32	35	23	21	14	8	13	14	15	16	12	17	13	18	7	258
11ª RS Campo Mourão	26	58	45	35	22	28	26	45	40	28	44	39	28	41	41	546
12ª RS Umuarama	15	68	17	12	4	7	14	28	21	4	21	65	35	17	54	382
13ª RS Cianorte	89	69	58	67	68	71	78	124	74	47	62	92	36	73	86	1094
14ª RS Paranavaí	15	43	18	12	24	3	9	12	6	5	13	8	10	14	14	206
15ª RS Maringá	96	82	124	83	31	60	83	74	69	35	59	60	21	78	101	1056
16ª RS Apucarana	17	21	33	21	17	17	20	41	31	10	16	12	12	10	13	291
17ª RS Londrina	108	156	106	69	60	85	52	63	41	18	19	32	27	29	35	900
18ª RS Cornélio Procopio	47	88	40	38	19	22	53	38	31	31	35	37	27	15	14	535
19ª RS Jacarezinho	31	70	69	22	36	23	7	7	14	6	26	12	24	25	16	388
20ª RS Toledo	40	51	36	36	17	10	16	13	20	14	6	11	23	13	19	325
21ª RS Telêmaco Borba	0	6	1	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	14
22ª RS Ivaiporã	12	41	55	25	13	4	9	7	6	2	3	11	1	4	4	197

APÊNDICE 4 – COEFICIENTE DE INCIDÊNCIA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA,
POR FAIXA ETÁRIA, NO ESTADO DO PARANÁ DURANTE O PERÍODO DE 2001 A 2015.

Coeficiente de incidência (100.000 hab) por faixa etária - Paraná									
Ano	0 a 4	5 a 9	10 a 14	15-19	20-39	40-59	60-69	70 ou mais	Média
2001	2,1	3,3	3,7	3,2	6,7	7,8	11,1	7,1	5,6
2002	2,5	7,9	7,4	7,7	10,2	11,2	16,9	11,3	9,4
2003	3,8	7,7	5,6	7,0	10,6	9,6	12,3	9,9	8,3
2004	3,1	3,3	2,7	4,6	5,6	7,0	9,3	8,1	5,5
2005	3,2	1,8	2,5	2,9	4,4	6,1	8,4	6,9	4,5
2006	0,8	2,0	2,9	2,3	3,9	5,8	6,9	4,6	3,6
2007	1,8	2,5	2,4	2,2	3,8	7,0	9,9	7,1	4,6
2008	2,2	2,3	3,0	4,1	5,8	6,5	11,7	6,0	5,2
2009	1,3	1,6	1,9	2,6	4,1	5,9	9,3	5,6	4,0
2010	0,3	0,7	0,7	1,0	2,0	4,3	5,1	7,5	2,7
2011	0,6	1,0	0,9	1,7	3,5	5,1	5,5	7,1	3,2
2012	0,7	1,0	1,6	1,9	4,0	6,3	7,6	10,5	4,2
2013	0,3	0,3	1,2	1,4	2,2	4,7	7,5	7,9	3,2
2014	0,6	0,9	0,8	2,0	3,7	6,3	5,5	7,1	3,4
2015	0,8	1,6	2,0	3,1	4,5	7,1	10,5	7,3	4,6
Média	1,6	2,5	2,6	3,2	5,0	6,7	9,2	7,6	4,8

CAPÍTULO 3

PREVALÊNCIA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM CÃES (*Canis lupus familiaris*) DO MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, PARANÁ, BRASIL

Manuscrito a ser submetido para a Acta Tropica na forma de “Artigo Original”

PREVALÊNCIA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM CÃES (*Canis lupus familiaris*) DO MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, PARANÁ, BRASIL

RESUMO

As leishmanioses estão entre as mais importantes doenças infecciosas e parasitárias do mundo, sendo conhecida por infectar várias espécies de mamíferos, dentre eles, o cão (*Canis lupus familiaris*). Este estudo teve como objetivo avaliar a prevalência de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em cães em área endêmica para LTA humana, por meio de técnicas parasitológica (cultivo celular), molecular (PCR) e sorológica (ELISA indireto), em área urbana e rural do município de Cerro Azul, Paraná. Foram amostrados 198 cães, sendo coletadas amostras de sangue e biópsia quando havia lesão sugestiva para LTA. Para caracterização da espécie de *Leishmania* circulante nas áreas, foi realizada a eletroforese isoenzimática. Para avaliar a significância entre os animais positivos para a sorologia, as variáveis sexo, área de residência e raça, foi realizado um Modelo Linear Generalizado e Teste de Razão de Verossimilhança. Quatro animais (2%/ N=198) foram positivos para *L. braziliensis* por cultivo celular e/ou PCR. Apenas um cão foi positivo nas três técnicas diagnósticas, a partir de uma amostra de biópsia de bolsa escrotal. Considerando somente a técnica de ELISA indireto, 100 animais (53%) foram positivos para anticorpos anti-*Leishmania*, dos quais, 80 indivíduos (80%) foram provenientes de área urbana, já os outros 20 (20%) de área rural. Por meio da análise dos dados, cão sem raça definida e de área urbana, independente do sexo, tem 68% de chance de ter entrado em contato com *L. braziliensis*. A partir deste estudo notou-se que para o diagnóstico da LTA em cães é necessária a associação de diferentes técnicas diagnósticas, uma vez que não há um método “padrão-ouro” para diagnóstico de *L. braziliensis* em cães. A prevalência de LTA canina foi baixa (2%), contudo, os dados sorológicos indicam que 53% dos cães amostrados entraram em contato com *L. braziliensis*, o que demonstra a circulação do parasito na área estudada.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*, sorologia, cultivo, PCR, diagnóstico.

ABSTRACT

The Leishmaniasis are among the most important infectious and parasitic diseases in the world, being known to infect several species of mammals, among them the dog (*C. familiaris*). The objective of this study was to evaluate the prevalence of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) in dogs from an endemic area for human ATL by means of parasitological (cell culture), molecular (PCR) and serological (indirect ELISA) techniques, in urban and rural areas of the municipality of Cerro Azul, Paraná. 198 blood samples were collected, and biopsy were collected when there was suggestive lesion for ATL. To characterize the circulating *Leishmania* species in the areas, the isoenzymatic electrophoresis was performed. To evaluate the significance of seropositive animals, the gender, the area of residence and the breed, were analyzed by Generalized Linear Model and Likelihood Ratio Test. Four animals (2%) were positive for *L. braziliensis* by cell culture

and/or PCR. Only one dog was positive in the three diagnostic techniques, from a scrotum biopsy sample. Considering only the indirect ELISA technique, 100 animals (53%) were positive for anti-*Leishmania* antibodies, of which 80 individuals (80%) came from urban areas, while the other 20 (20%) from rural areas. Through the analysis of data, being a dog with no defined breed and living in an urban area, regardless the gender, there is a 68% chance of already contacted *L. braziliensis*. In this study, it was noted that for a better diagnosis of ATL in dogs, it is necessary to associate different diagnostic techniques since there is no "gold standard" method for diagnosis of *L. braziliensis* in dogs. The prevalence of canine ATL was low (2%), however, serological data indicate that 53% of the dogs sampled already contacted *L. braziliensis*, which shows the circulation of the parasite in the studied area.

Keywords: *Leishmania braziliensis*, serology, cell culture, PCR, diagnosis.

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças de grande importância em saúde pública, sendo causadas por diferentes espécies de protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* Ross, 1903. O parasito é transmitido por meio da picada da fêmea de flebotomíneo, dípteros holometábolos pertencentes à família Psychodidae (GRAMICCIA, 2011; ROQUE & JANSEN, 2014; GALATI, 2016).

Segundo dados epidemiológicos da Organização Mundial de Saúde (OMS) (2016), 399 milhões de pessoas estão sob risco de transmissão de leishmaniose tegumentar (LT) nos 11 países com maior incidência desta. Sendo uma doença negligenciada e classificada como categoria 1 (enfermidade emergente e difícil controle) (VRIES et al., 2015; TALHARI et al., 2018).

No novo mundo a LT é denominada Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), devido a algumas particularidades da doença como a espécie de parasito e a manifestações clínicas específicas, a qual é uma zoonose originalmente restrita ao ciclo silvestre. Contudo ações antrópicas aproximaram o parasito das áreas rurais e urbanas, aumentando a incidência da doença em humanos e animais domésticos (CASTRO et al., 2002; DANTAS-TORRES, 2009; TRUPPEL et al., 2014; BRUSCHI & GRADONI, 2018). Em cães a LTA é caracterizada por feridas ulcerativas locais e autolimitantes, geralmente encontrados em orelhas, escroto, pés, cadeia mamária e focinho (MADEIRA et al., 2006; SASANI et al., 2016).

No Brasil a espécie responsável pela maioria de casos de LTA é a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e casos caninos têm sido desencadeados por esta espécie em diferentes regiões do país (CASTRO et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2012; LEÇA-JÚNIOR et al., 2015; BRILHANTE et al., 2016).

Há muita discussão acerca dos cães na epidemiologia da LTA. Atualmente, estes são classificados como hospedeiros acidentais do parasito, assim como os humanos (BASANO & CAMARGO, 2004; MADEIRA et al., 2005, 2006; CASTRO et al., 2007, LAINSON & SHAW, 2010). Apesar disso, Membrive et al. (2012) observaram que a presença de cães positivos para LTA poderia influenciar diretamente no risco de infecção em humanos, entretanto, eles não atuam na manutenção do parasito no ambiente, e sim como atrativo para as fêmeas de flebotomíneos.

Segundo Padilla et al. (2002), os cães são considerados importantes indicadores da ocorrência de LTA em humanos, pois podem sinalizar o risco para a doença, ou até mesmo

preceder casos de infecção em humanos. Assim sendo, os cães domésticos poderiam servir de animais sentinela para a LTA humana (REIS et al., 2011; CONSTANTINO et al., 2014).

O estado do Paraná é considerado endêmico para a LTA a qual está amplamente distribuída em todas as regiões do estado. Ao todo mais de 330 municípios notificaram casos autóctones da doença (SINAN, 2018). Algumas regiões se destacam das demais com altas taxas de incidência para LTA, tais como o município de Cianorte (norte do Estado) e a região do Vale do Ribeira que compreende os municípios de Adrianópolis, Cerro Azul, Rio Branco do Sul, Doutor Ulysses e Itaperuçu (MELO et al., 2017; SINAN, 2018) (ver CAPÍTULO 2).

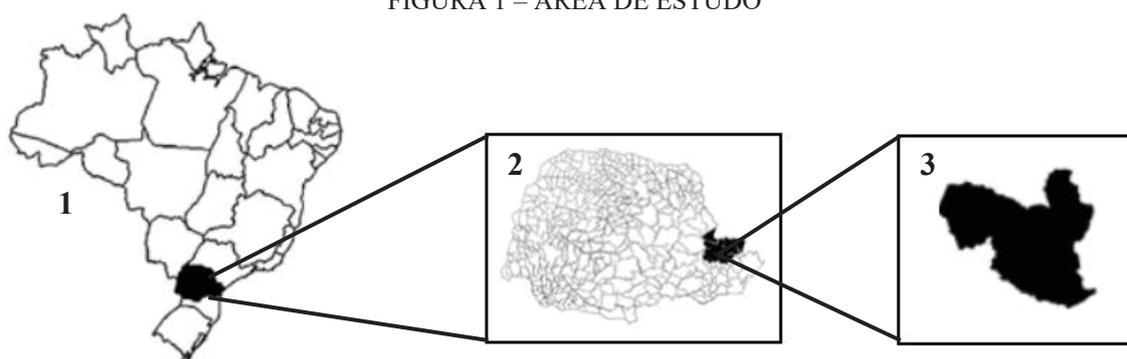
Dentre as áreas endêmicas para LTA no Estado do Paraná, a região do Vale do Ribeira (PR) representa 6% (508/7878) do total de casos da doença ocorridos no Estado durante os anos de 2001 a 2015. Desses 508 casos, Cerro Azul é responsável por 56% (n=286) das notificações (SINAN, 2017), e não há dados sobre a LTA em cães domésticos *Canis (lupus) familiaris* nesse município. Dessa forma, este estudo visou avaliar por meio de método parasitológico, molecular e sorológico os cães dos bairros (Centro e Quarteirão) com maior número de casos de LTA em humanos e assim estabelecer a prevalência de LTA canina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO

A região do Vale do Ribeira compreende 30 municípios, sendo que 23 destes estão localizados ao sul de São Paulo e sete a leste do Paraná: Adrianópolis, Bocaiúva do Sul, Cerro Azul, Doutor Ulysses, Itaperuçu, Rio Branco do Sul e Tunas do Paraná (FIGURA 1).

FIGURA 1 – ÁREA DE ESTUDO



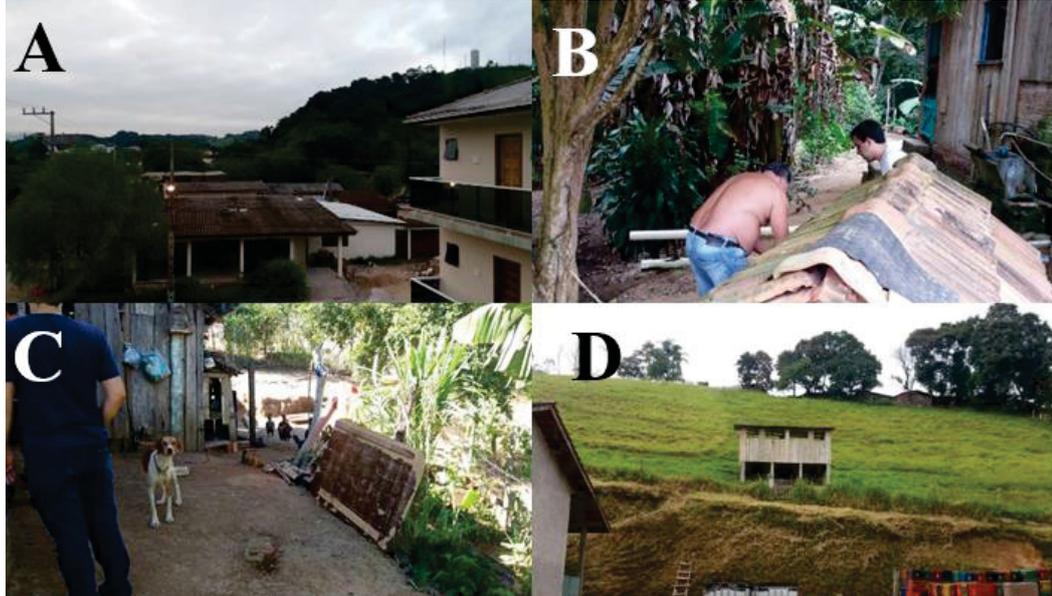
1- BRASIL COM DESTAQUE PARA O ESTADO DO PARANÁ; 2- ESTADO DO PARANÁ COM DESTAQUE PARA OS SETE MUNICÍPIOS QUE COMPÕEM O VALE DO RIBEIRA NO PARANÁ; 3- ÁREA DE ESTUDO, MUNICÍPIO DE CERRO AZUL. FONTE: O autor (2017).

O município de Cerro Azul está localizado na mesorregião Metropolitana de Curitiba, a aproximadamente 90 Km da capital, possuindo 17.755 habitantes, distribuídos em 1.341,189 km², totalizando 12,63 habitantes por Km² (IBGE, 2017). A região apresenta áreas extensas de mata atlântica remanescentes, favorecendo a presença de flebotômíneos e residências construídas próximas às matas. No bairro central do município também são vistos galinheiros e chiqueiros nas casas (FIGURA 2).

Devido a falta de dados referentes à LTA no município Cerro Azul foi realizado um levantamento de dados com base no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) onde foram considerados os casos humanos de LTA, durante o período de 2001 a 2015. O município de Cerro Azul apresentou taxa de incidência que variou entre 22 e 460 casos/100.000 habitantes durante esse período, com média anual de 123 casos/100.000 habitantes. Como o SINAN não fornece dados referentes aos casos de LTA por bairros, foi necessário acessar as fichas epidemiológicas da Secretaria de Saúde de Cerro Azul. Desta forma, considerando a distribuição espacial de casos de LTA na área de estudo, dois bairros, Centro (área urbana) e o Quarteirão (área rural) se destacaram com o maior número de casos

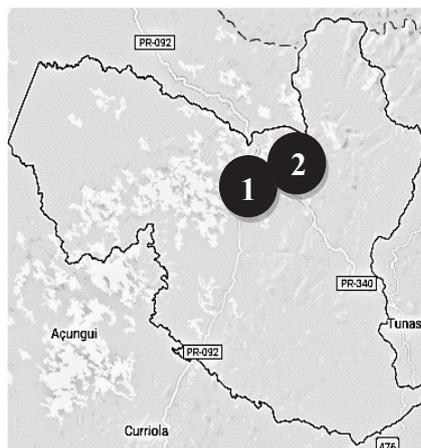
de LTA humana no município. Sendo assim, a amostragem dos cães se concentrou nessas duas importantes áreas (FIGURA 3).

FIGURA 2 – FATORES DE RISCO PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, PARANÁ.



A = VISÃO DE ÁREAS DE MATA, PRÓXIMO AS RESIDÊNCIAS NO BAIRRO CENTRAL; B = MATA DENTRO DA ÁREA DA RESIDÊNCIA, NO BAIRRO CENTRAL; C = GALINHEIRO AO LADO DA RESIDÊNCIA NO BAIRRO CENTRAL; D = CHIQUEIRO PRÓXIMO À RESIDÊNCIA, NO BAIRRO CENTRAL. FONTE: O autor (2017).

FIGURA 3 – MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, ESTADO DO PARANÁ.



PONTOS DE COLETAS DE CÃES: 1= CENTRO (ÁREA URBANA); 2= QUARTEIRÃO (ÁREA RURAL).
FONTE: O autor (2017)

2.2 INVESTIGAÇÃO DE LTA CANINA

Para a investigação de LTA nos cães do município de Cerro Azul, o presente projeto foi submetido para o Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná (CEUA/AG) e aprovado sob número de protocolo 049/2016.

Para avaliação da infecção por *Leishmania* spp. foram amostrados todos os cães domiciliados (*C. familiaris*) com mais de 4 meses de idade, de ambos os sexos oriundos dos bairros Centro e Quarteirão, desde que não fossem gestantes. Durante a anamnese, foi avaliada a qualidade de vida do cão, considerando sua condição corporal e habitação (ex. acorrentado, semi-domiciliado, disponibilidade de água e alimentos) (APÊNDICE 2).

A conduta para as coletas obedecia aos seguintes critérios: a) organização dos materiais de coleta e divisão das equipes. Cada equipe era composta de pelo menos dois veterinários e uma agente comunitária de saúde cedida pela Secretaria de Saúde de Cerro Azul; b) delimitação das ruas e casas que cada equipe abordaria. Todas as residências presentes nos bairros Centro e Quarteirão foram visitadas e todos os cães que fossem residentes nessas casas foram amostrados (se consentido); c) Abordagem ao proprietário do (s) cão(ões). Se consentido, o proprietário do (s) cão (es) era esclarecido sobre a LTA em humanos e cães, a respeito do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 1) e acerca do projeto. Após autorização, era realizada a anamnese do(s) cão (es), exame físico do animal em busca de possíveis lesões e, posteriormente, a coleta das amostras necessárias para as futuras análises; d) realização da coleta (sangue e/ou tecido).

Para a coleta de sangue, o cão foi contido fisicamente e realizada assepsia local com álcool 70%, para então prosseguir com a venopunção da jugular externa ou da braquicefálica em dois tubos BD Vacutainer de 5 ml, um tubo com EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético) e outro sem anticoagulante. Para a coleta de tecido, era observado se havia lesão sugestiva de LTA durante o exame físico, se sim, o cão era submetido à biópsia. No entanto houve uma única exceção, onde foram realizadas duas biópsias com intervalo entre elas de um mês no cão identificado como (CA134). Na primeira biópsia a ferida se encontrava ativa, e na segunda ela havia cicatrizado (ver CAPÍTULO 5). Para a realização das biópsias, os cães eram submetidos à sedação por acepromazina (0,1 mg/kg) e quetamina (15 mg/kg). A lesão foi assepsiada com solução de clorexidina 2%, iodopovidona (PVPI) e álcool 70% e aplicada anestesia local com lidocaína a 0,2%. A biópsia foi realizada nas bordas da ferida por meio de punch descartável (FIGURA 4), e acondicionados em microtubos de 2 mL contendo

antibiótico (10.000 U/mL penicilina-estrptomomicina) e antifúngico (50 mg/mL 5-fluorocitosina).

FIGURA 4 – LESÃO SUGESTIVA DE LTA CANINA



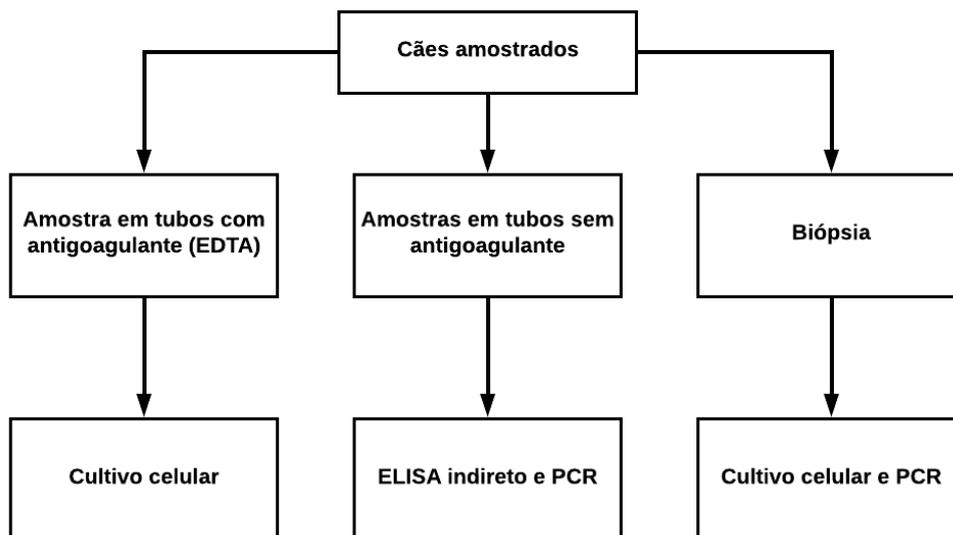
A = LESÃO ANTES DA BIÓPSIA. B = LESÃO APÓS REALIZAÇÃO DA BIÓPSIA COM PUNCH. FONTE: O autor (2017).

2.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Foram utilizados três métodos diagnósticos: cultivo celular (método parasitológico), reação em cadeia pela polimerase (PCR) (método molecular) e ELISA indireto (método sorológico) de acordo com a amostra coletada (FIGURA 5).

TROCAR BIÓPSIA POR LESÃO

FIGURA 5 – FLUXOGRAMA ILUSTRANDO OS AS AMOSTRAS COLETADAS E A TÉCNICA DIAGNÓSTICA A QUE FOI DESTINADA.



FONTE: O autor (2017).

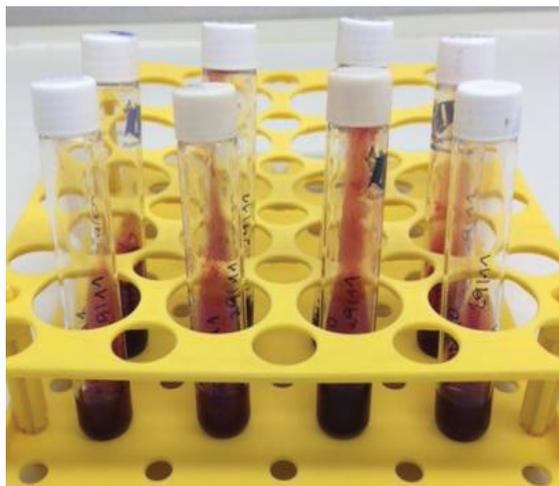
2.3.1 Cultivo Celular

Para a realização diagnóstico por meio do cultivo, foram utilizadas amostras de sangue em tubos com EDTA e amostras de biópsias de lesão de cão. Ambas as amostras foram transportadas refrigeradas a 4°C até o Laboratório de Parasitologia Molecular localizado no Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

As amostras de sangue coletadas em tubo com EDTA, no mesmo dia da coleta, foram centrifugadas a 1.800 RPM (rotações por minuto) durante 12 minutos para separação das fases do sangue sendo a superficial (composta pelo plasma), a intermediária, fina e delgada, formada pelas células “brancas” de defesa (camada leucocitária) e, última (o precipitado de eritrócitos). A camada leucocitária era retirada e inoculada em dois tubos de meio NNN (Novy, Neal e Nicole) acrescidos de 0,5 ml de solução fisiológica com antibiótico (10.000 U/ml penicilina; 10 mg/mL estreptomicina) (FIGURA 6).

As biópsias foram transportadas até o laboratório em frascos com antibiótico (10.000 U/mL penicilina; 10 mg/mL estreptomicina) e antifúngico (50 mg/mL de fluorocitocina). No laboratório, a amostra foi transferida para outro frasco com antibiótico e antifúngico e deixada em geladeira até o dia seguinte. Na sequência quando era novamente lavada com antibiótico (10.000 U/mL penicilina; 10 mg/mL estreptomicina) e antifúngico (50 mg/mL de fluorocitocina) e macerada em aproximadamente 1,2 mL de solução fisiológica contendo antibiótico (10.000 U/mL penicilina; 10 mg/mL estreptomicina). Na sequência, o macerado foi distribuído em dois tubos NNN, 0,6 mL para cada tubo e incubado a 24°C.

Cada amostra em cultivo, tanto as provenientes do sangue, como as obtidas de biópsia, foram analisadas em microscópio óptico para a presença de formas promastigotas de *Leishmania* spp. a cada sete dias, pelo período de quatro semanas. Considerava-se positivo se houvesse presença de formas promastigotas (EVANS, 1987).

FIGURA 6 – TUBOS COM MEIO NNN UTILIZADAS PARA CULTIVO DE *Leishmania*.

FONTE: O autor (2017).

2.3.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

2.3.2.1 Extração de DNA genômico

Para a realização da extração do DNA genômico e posterior PCR foram utilizados: amostras de sangue em tubos sem anticoagulante e amostras de biópsias de lesão. Ambas as amostras foram transportadas refrigeradas a 4°C até o Laboratório de Parasitologia Molecular localizado no Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, onde foram armazenadas em -80°C.

Para a obtenção do DNA genômico de *Leishmania* spp. foi utilizado um protocolo que utiliza tampão de lise TELT (Tris-HCl 1M; EDTA 0,5 M; LiCl 5M; Triton X-100). De acordo com o seguinte protocolo: 1) a partir de cada amostra de sangue sem anticoagulante do cão foi retirado 100 µL de sangue e adicionado em um tubo (1,5mL). Sobre o sangue foi adicionado 300 µL de tampão de lise TELT (Tris-HCl 1M; EDTA 0,5 M; LiCl 5M; Triton X-100). Na sequência inverteu-se o tubo três vezes e incubou-o por 5 minutos e 2) adicionou-se 800 µL de fenol e 120 µL de clorofórmio e inverteu-se o tubo levemente por 5 minutos; 3) centrifugou-se a amostra por 13.000 rpm por 25 minutos e coletou-se ≈ 200 µL do sobrenadante, transferindo-o para um novo tubo (1,5mL); 4) Sobre o sobrenadante foi adicionado 400 µL de 2-Propano, homogeneizado por 15 segundos e incubado “overnight” a -20°C; 5) no dia seguinte, centrifugou-se a amostra a 13.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante desprezado e o sedimento lavado com 1 mL de etanol 70% gelado; 6) a amostra

foi novamente centrifugada por 10 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante descartado; 7) os tubos foram mantidos abertos para que o precipitado secasse em temperatura ambiente, e depois de seco, o mesmo foi ressuspenso em 100 uL de H₂O Milli Q. O DNA foi quantificado em Thermo Scientific NanoDrop 2000 Spectrophotometer. (REFERÊNCIA MÉTODO FIOCRUZ)

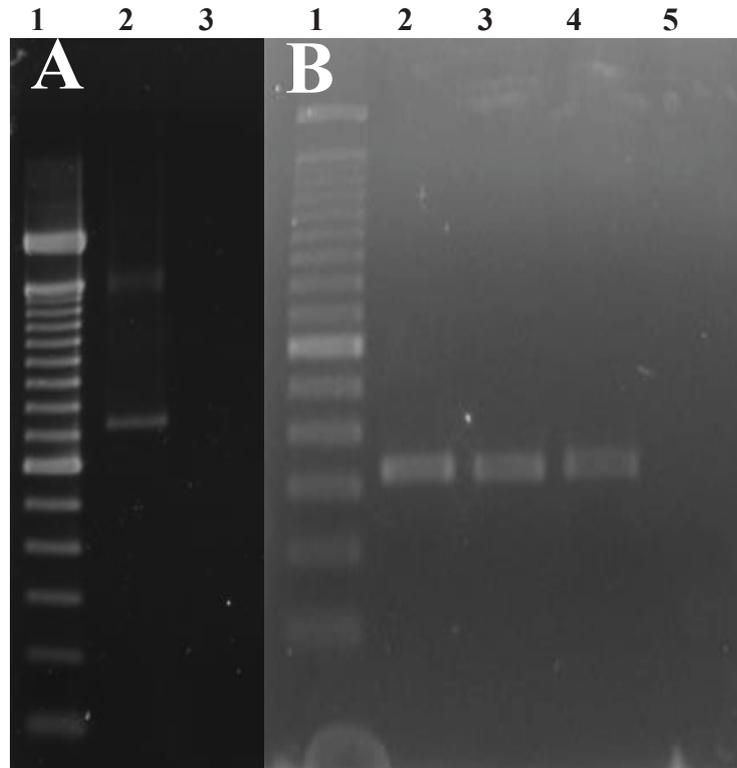
2.3.2.2 A reação de PCR

Para detecção de *Leishmania* foi realizada PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) empregando os iniciadores B1 (5' – GGGGTTGGTGTAATATAGTGG – 3') e B2 (5' – CTAATTGTGCACGGGGAGG – 3'), sendo considerados: 33 ciclos de 60,5 °C a 1 minuto; 72 °C por 1 minuto, 94 °C por 30 segundos com uma extensão final de 72 °C por 10 minutos (DE BRUJIN & BARKER, 1992; OLIVEIRA et al., 2005). Esses iniciadores amplificam uma região do cinetoplasto (kDNA) de aproximadamente 750pb (FIGURA 7).

Cada amostra também foi analisada utilizando-se iniciadores PNOC, um fragmento do gene Prepronociceptina (PNOC-330pb) de mamíferos (FIGURA 7). Utilizou-se este *primer* como controle positivo para a extração de DNA genômico de amostras de campo (cães). Sendo assim, foi padronizado um ensaio de PCR Bplex utilizando os primers B1/B2 e PNOC na mesma reação (ver CAPÍTULO 3).

Como controle positivo foi utilizado DNA *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904) mantida no Laboratório de Parasitologia Molecular da UFPR e cultivada a 24°C em meio NNN. Para o controle positivo de mamífero foi utilizado DNA de sangue de cão oriundo de Cerro Azul, Paraná, e negativo para LTA.

Os produtos amplificados pela PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,6%, imerso em tampão TBE 1X (Tris-Borato-EDTA), corados em brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Na eletroforese foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares de bases.

FIGURA 7 – PRODUTOS DE PCR OBTIDOS COM OS *primers* B1/B2 E PNOC

A) 1 = MM 100 PB; 2= PRODUTO DE PCR OBTIDO COM PRIMERS B1/B2 (750 PB); 3= CONTROLE NEGATIVO (ÁGUA). B) 1= MM 100PB; 2-4= PRODUTO DE PCR OBTIDO COM PRIMERS PNOC (330 PB). 5= CONTROLE NEGATIVO (ÁGUA). FONTE: O autor (2017).

2.3.3 ELISA indireto

Para a realização de ELISA indireto foram utilizadas amostras de sangue em tubos sem anticoagulante. Os tubos foram transportados até o laboratório de Parasitologia Molecular localizado no Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. As amostras foram submetidas à centrifugação 4.000 rpm por oito minutos para separação do soro e este era armazenado em microtubo de 2 ml em -80°C.

O método *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) baseia-se na reação antígeno-anticorpo detectáveis por meio de reações enzimáticas. Esta técnica foi utilizada com auxílio de enzimas para detectar e mensurar anticorpos específicos de *L. braziliensis*. A interação antígeno-anticorpo foi evidenciada pela ação de uma enzima (estreptavidina peroxidase), conjugada com anti-anticorpo, a reação foi revelada na presença de substrato para a enzima e um cromógeno, a ortofenileno diamina (OPD) que produz cor amarela. A reação final da ação da enzima foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda com

variação 492 nm (BRASIL, 1998; MADEIRA et al., 2003; TIZARD, 2009). A determinação da positividade baseou-se em leituras superiores ao *cut off*.

2.3.3.1 Obtenção de antígeno

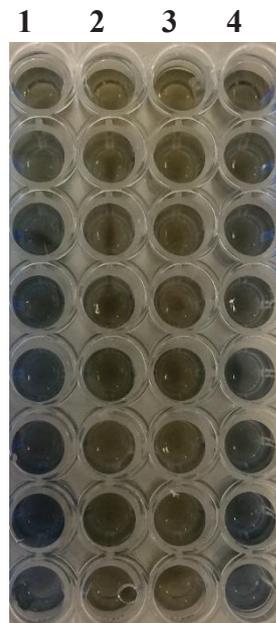
Para obtenção de massa de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904) a mesma foi cultivada em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Chem. St Louis, Mo, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal e 10% de antibiótico (penicilina/estreptomicina)

Para a obtenção de antígeno para sensibilização das placas, vários protocolos visando a obtenção de extrato bruto de proteínas de *L. braziliensis* foram testados (VEXENAT et al., 1996; AFRIN e ALI, 1997; AFRIN et al., 2002), utilizando-se 1×10^8 promastigotas para a padronização. O protocolo que obteve os melhores resultados foi o de Afrin e Ali (1997). Este protocolo foi adaptado em determinada etapa, e consiste em: 1) obtenção do precipitado puro do cultivo das células (1×10^8 células totais), o qual era 2) lavado três vezes em PBS (phosphate-buffered saline) gelado, 3) em seguida o precipitado era ressuspensão em 25 mL de solução tampão (coating buffer); 4) na sequência o mesmo foi homogeneizado em vortex, seis vezes por dois minutos cada, obedecendo intervalos de dez minutos entre cada ciclo; 5) posteriormente a amostra foi centrifugada a 2300g por dez minutos e; 6) resuspensão em 3 mL de solução tampão (coating buffer); 7) essa solução foi então sonicada seis vezes (adaptado) por um minuto cada e com intervalos de 30 segundos a 40 Hz para lise celular. 8) Após a sonicação, a amostra foi centrifugada por 30 minutos a 4500g, 9) para então prosseguir com a coleta do sobrenadante (extrato bruto de proteínas). O total de proteínas do extrato obtido, foi quantificado por meio do método de Bradford (FIGURA 8), e armazenado em -80°C .

2.3.3.2 Padronização do ELISA

Para a padronização do ELISA foi utilizado como controle negativo, amostras de soro de quatorze cães provenientes de área indene para LZTA e negativos para a doença. Como controle positivo foi utilizado a amostra de soro de um cão (CA131) com clínica para LTA, que apresentou ferida ativa, tal qual foi possível o isolamento de *L. braziliensis* em cultivo celular (FIGURA 9).

FIGURA 8 – DOSAGEM DO EXTRATO BRUTO DE PROTEÍNAS DE *Leishmania braziliensis* POR MÉTODO DE BRADFORD.



1= CURVA PADRÃO DE BSA (ALBUMINA SÉRICA BOVINA) DILUÍDA 1:10; 2= CURVA DO EXTRATO BRUTO DE PROTEÍNAS DILUÍDO 1:25; 3= CURVA DO EXTRATO BRUTO DE PROTEÍNAS DILUÍDO 1:10; 4= CURVA DO EXTRATO BRUTO DE PROTEÍNAS SEM DILUIÇÃO, O QUAL APRESENTOU ABSORBÂNCIA COMPATÍVEL COM A CURVA PADRÃO DE BSA (1:10). FONTE:O autor (2017).

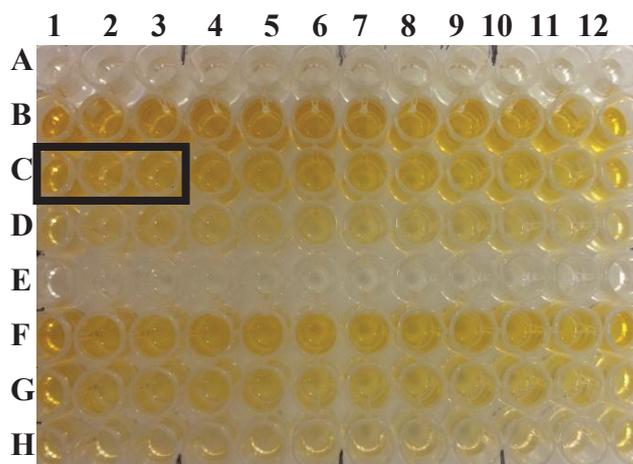
Foram testadas algumas concentrações de extrato bruto de proteínas (2 ng/mL, 1,5 ng/mL, 1 ng/mL, 0,5 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,1 ng/mL, 0,01 ng/mL e 0,005 ng/mL), do conjugado (Anti-dog IgG (Biotin)) (1:5.000, 1:8.000, 1:10.000) e soro (1:50, 1:100, 1:200), e observou-se que os resultados mais satisfatórios para sensibilização da placa, foram obtidos utilizando 1 ug/ml de antígeno, 1:5000 de conjugado [anti-dog IgG(Biotin)], 1:100 das amostras de soro e 1:10.000 de HRP (estraptavidina peroxidase), como demonstrado pela marcação Cada amostra foi analisada em triplicatas (FIGURA 10).

FIGURA 9 – AMOSTRA CA131 COM LESÃO CLÁSSICA DE LTA: BORDAS ELEVADAS COM FUNDO GRANULOMATOSO.



FONTE: O autor (2017)

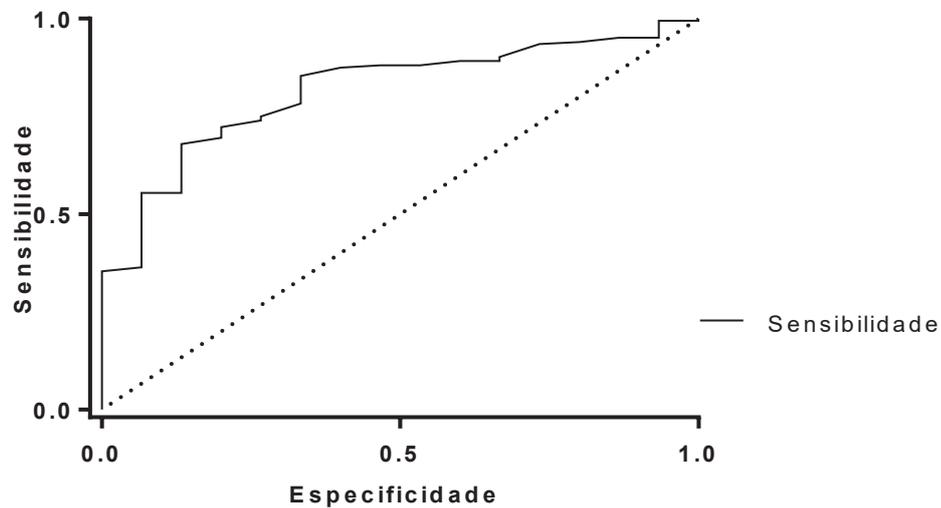
FIGURA 10 – PLACA UTILIZADA NA PADRONIZAÇÃO DO ELISA INDIRETO



OS POÇOS DEMARCADOS APRESENTARAM OS MELHORES NÍVEIS DE ABSORBÂNCIA. NA PLACA: COLUNAS 1, 2 E 3 – CONCENTRAÇÃO DE 1 ng/mL DE EXTRATO BRUTO DE PROTEÍNAS; COLUNAS 4, 5 E 6 – CONCENTRAÇÃO DE 0,5 ng/mL DE EXTRATO BRUTO DE PROTEÍNAS; COLUNAS 7, 8 E 9 – CONCENTRAÇÃO DE 0,25 ng/mL DE EXTRATO BRUTO DE PROTEÍNAS; COLUNAS 10, 11 E 12 – CONCENTRAÇÃO DE 0,1 ng/mL DE EXTRATO BRUTO DE PROTEÍNAS. LINHAS “A” E “E” – CONTROLE NEGATIVO DILUÍDO EM 1:100; LINHAS “B” E “F” – CONTROLE POSITIVO DILUÍDO EM 1:50; LINHAS “C” E “G” – CONTROLE POSITIVO DILUÍDO EM 1:100; LINHAS “D” E “H” – CONTROLE POSITIVO DILUÍDO EM 1:200. LINHAS “A” A “D” CONTÉM ANTI-ANTICORPO (ANTI-DOG IGG (BIOTIN)) DILUÍDO EM 1:5.000; LINHAS “E” A “H” CONTÉM ANTI-ANTICORPO (ANTI-DOG IGG (BIOTIN)) DILUÍDO EM 1:10.000. FONTE: O autor (2017).

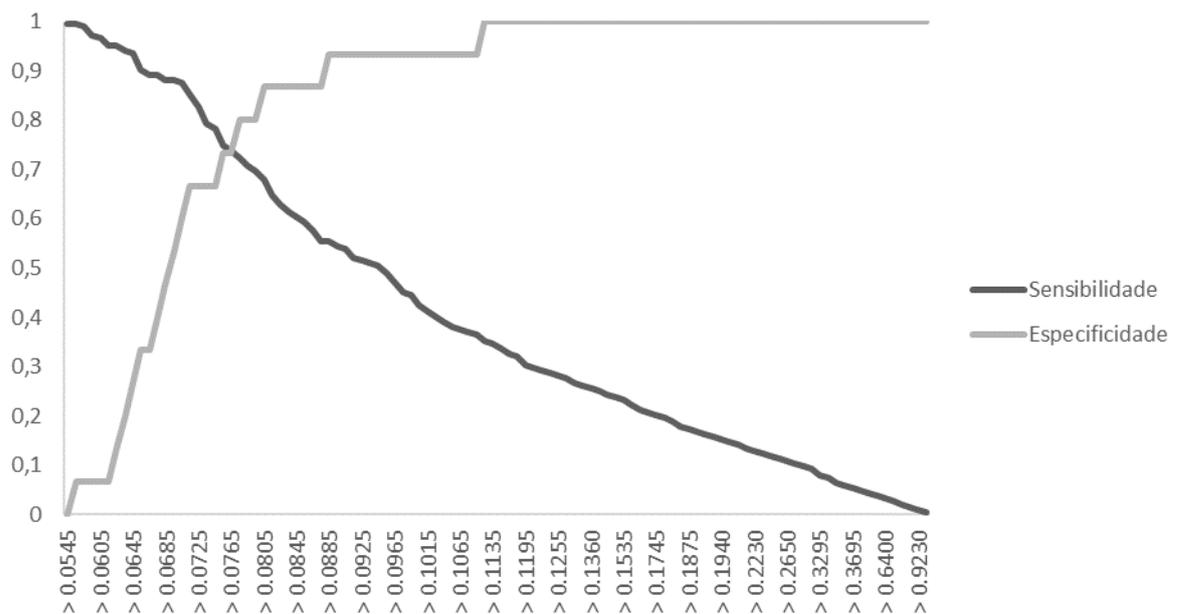
O *cut-off* (linha de corte) para as absorbâncias obtidas com o ELISA indireto, foi estabelecido pela análise da sensibilidade e especificidade em diferentes valores de *cut-off*, por meio da curva ROC (Receiver Operating Characteristic). Utilizou-se como controle negativo amostras conhecidamente negativas (n=14) e provenientes de área não endêmica para LTA. Dessa forma, foi obtida uma curva com valor de área de 0,81, considerado um teste com boa validade (FIGURA 11). E por meio da curva ROC, o teste de ELISA indireto apresentou uma sensibilidade de 55% e especificidade de 93% (FIGURA 12), gerando um *cut-off* de 0,089 nm. Sendo assim, foram considerados positivos os animais com absorbâncias maiores que a linha de corte (0,089 nm).

FIGURA 11 – CURVA ROC OBTIDA A PARTIR DA ANÁLISE DAS ABSORBÂNCIAS DOS CONTROLES NEGATIVOS E DAS AMOSTRAS DE CÃES DO MUNICÍPIO DE CERRO AZUL



FONTE: O autor (2017).

FIGURA 12 – CORRELAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE OBTIDAS A PARTIR DAS ANÁLISES DAS ABSORBÂNCIAS DO SORO DOS CONTROLES NEGATIVOS E AMOSTRAS DE SORO DOS CÃES DO MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, PARANÁ



Observa-se no eixo x, o *cut off* (linha de corte), tal qual indica que cães com absorvância acima deste são considerados positivos, e níveis mais baixos, negativos. O eixo y demonstra o percentual de sensibilidade e especificidade de acordo com cada *cut off*. FONTE: O autor (2017).

2.3.3.3 Protocolo

O protocolo para realização do ELISA indireto foi realizado segundo Ramada et al., (2013), sendo seguido as etapas: 1) sensibilizou-se da placa com a concentração desejada de extrato bruto de proteínas (1 μ g/mL) em cada poço, diluído em Tampão de Incubação (TI), “overnight” a 4°C. No dia seguinte realizou-se a lavagem com Solução de Lavagem (SL); 2) após a lavagem, aplicou-se 150 μ L de Solução de Bloqueio (caseína 2%) em cada poço, e a placa era incubada por 1 hora a 37°C, e após este período era lavada 3 vezes com SL; 3) pipetou-se 100 μ L de soro do paciente a ser analisado, diluído 1:100 em TI, e era incubada por 1 hora a 37°C, seguida de lavagem com SL; 4) após o soro do paciente, 100 μ L do conjugado diluído 1:5000 em TI foi adicionado, e a placa foi incubada por 1 hora a 37°C, prosseguindo com mais uma lavagem; 5) depois do conjugado, 100 μ L de estreptavidina peroxidase era pipetada e incubada por 1 hora a 37°C. Dessa vez foi realizado seis ciclos de lavagem para completa retirada da enzima; 6) 100 μ L da solução de 2mg ortofenileno diamina (OPD) + 2 μ L de H₂O₂ em Tampão Citrato (pH 5,0) foi pipetado e incubado em temperatura ambiente por 20 minutos; 7) 20 μ L de ácido sulfúrico diluído 1:20 em TI, foi adicionado em cada poço sobre a solução de OPD, para então prosseguir com a leitura da placa em 492nm de onda.

2.3.4 Caracterização isoenzimática

Dois isolados de cães (CA131 e CA134) provenientes das amostras de biópsia foram enviados e caracterizados por eletroforese de enzimas (isoenzimas), na Fundação Oswaldo Cruz, Manguinhos (RJ), empregando cinco sistemas enzimáticos: glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH; E.C. 1.1.1.49); glicose fosfoisomerase (GPI; E.C.5.3.1.9); nucleotidase 1 e 2 (NH1 e NH2; E.C.3.2.2.1); fosfoglicodesidrogenase (6PGDH; E.C.1.1.1.43). Todos os procedimentos foram baseados nos protocolos descritos por Madeira et al. (2006), sendo cada isolado comparado com o padrão de três amostras de referência: [*Leishmania (Viannia) braziliensis* - MHOM/BR/75/M2903, *Leishmania (Leishmania) chagasi* - MHOM/BR/74/PP75 e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* - IFLA/BR/67/PH8].

2.3.5 Análise dos dados

Visando responder se a análise sorológica dos animais amostrados pode ser influenciada pela raça, zona de residência (urbano ou rural) e o sexo, foi utilizado Modelo

Linear Generalizado (GLM), assumindo a distribuição binomial da variável resposta (sendo casos de sorologia negativa=0; positiva=1) em função das variáveis preditoras raça (raça definida=0, sem raça definida=1), zona (rural=0, urbano=1) e sexo (fêmea=0, macho=1). Um teste de remoção de variáveis composto por testes de razão de verossimilhanças (LRT) foi usado para verificar a importância de cada variável no modelo. Em seguida, foram realizadas comparações de Tukey com correção do valor de significância pelo método de Bonferroni.

Todas as análises foram realizadas em ambiente R 3.4.2 (R CORE TEAM 2017) utilizando os pacotes arm (GELMAN & SU, 2016) e multcomp (HOTHORN et al., 2008) e assumiram valor de significância de 0,05 (Intervalo de Confiança = 95%).

3 RESULTADOS

Foram amostrados 198 cães, os quais pertenciam a 104 proprietários/casa (1,9 cães por casa). Na TABELA 1 constam os dados referentes ao exame clínico e anamnese desses animais. Observou-se que 80% dos cães não tinham raça definida (SRD), os demais, 20%, eram das raças pinscher, pastor alemão, pit bull, lhasa apso, doberman, fox hound, doushound. Do total 80% eram adultos, a quantidade de machos foi maior do que de fêmeas, 53% e 47%, respectivamente. Em relação à zona de residência, 69% pertenciam a área urbana e 31% a rural. Foi observada qualidade de vida satisfatória e 3,5% dos cães apresentou lesão aparente sugestiva para LTA.

TABELA 1: FATORES RELACIONADOS AOS CÃES (*C. familiaris*) PROVENIENTES DOS BAIROS CENTRO E QUARTEIRÃO, MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, ESTADO DO PARANÁ

Cães	Absoluto (n=198)	Relativo
Sem raça definida	159	80%
Outras	39	20%
Machos	105	53%
Fêmeas	93	47%
Adulto	158	80%
Filhote	15	8%
Idoso	24	12%
Urbano	136	69%
Rural	62	31%
Sem lesão recente aparente	191	96,5%
Biópsias	7	3,5%
Condição boa	85	43%
Condição regular	56	28%
Condição ruim	57	29%

FONTE: O autor (2017).

Das 198 amostras de cães em que o sangue foi submetido ao cultivo celular e PCR, foram positivas: CA130 e CA176, respectivamente, totalizando dois animais (TABELAS 2 e 3).

Desses 198 cães amostrados, sete animais (CA111, CA119, CA124, CA128, CA131, CA134, CA213) foram submetidos à biópsia por demonstrarem ferida sugestiva. Das sete biópsias de ferida ativa, duas (1%/ N=198) foram positivas para *L. braziliensis* no cultivo, sendo uma proveniente de lesão ativa (CA131) e outra da lesão cicatrizada (CA134). A amostra de biópsia positiva em cultivo celular CA131 também foi positiva para a PCR (TABELA 3).

Para análise do sangue utilizando técnica de PCR e do soro para a técnica de ELISA indireto, foram analisadas 189 amostras das 198 coletadas. Um total de nove amostras não passou por essas técnicas por problemas técnicos no momento da coleta do sangue (animal extremamente agitado, ou agressivo).

TABELA 2: MÉTODO DIAGNÓSTICO (CULTIVO CELULAR) PARA DETECÇÃO DE *Leishmania* sp NO SANGUE E BIÓPSIA DE CÃO (*C. familiaris*), MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, ESTADO DO PARANÁ

CULTIVO CELULAR		
Amostras de sangue	n	%
Positivo	1	0,5%
Negativo	197	99,5%
Amostras de biópsia	n	%
Positivo	2	1%
Negativo	5	2,5%
Total de amostras analisadas	198	100%

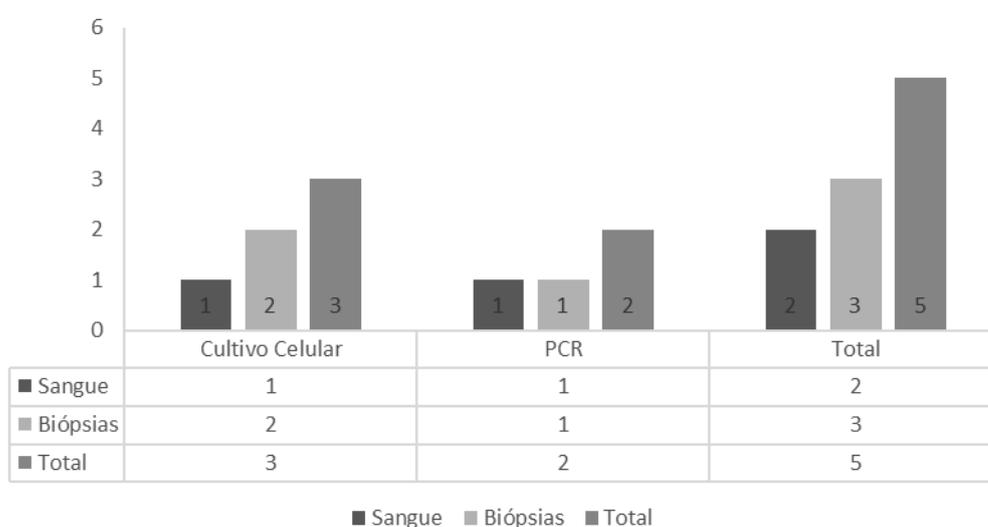
TABELA 3: MÉTODO DIAGNÓSTICO (REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE/PCR) PARA DETECÇÃO DE *Leishmania* sp. NO SANGUE E BIÓPSIA DE CÃO (*C. familiaris*), MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, ESTADO DO PARANÁ

PCR		
Amostras de sangue	n	%
Positivo	1	1%
Negativo	188	99%
Amostras de biópsia	n	%
Positivo	1	1%
Negativo	6	3%
Total de amostras analisadas	189	100%

FONTE: O autor (2017).

Quatro cães foram positivos (CA130, CA131, CA134 e CA176) (Tabela 4) para *Leishmania* sp. Os quatro animais positivos eram machos, adultos, sem raça definida (SRD) e foram reativos ao ELISA indireto e apenas um deles era de zona rural (TABELA 4). Em dois dos cães positivos (CA131 e CA134) a amostra foi proveniente de biópsia, já os outros dois (CA130 e CA176) a partir de sangue. No cultivo celular, três foram diagnosticados positivos (CA130, CA131 e CA134), e por PCR foram dois (CA131 e CA176). Sendo assim, o cão CA131 foi positivo para ambas as técnicas, cultivo e PCR (FIGURA 13 e TABELA 4).

FIGURA 13 - NÚMERO ABSOLUTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE E TECIDO DE CÃO (*C. familiaris*) POSITIVOS PARA *Leishmania* sp., MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, ESTADO DO PARANÁ



FONTE: O autor (2017).

TABELA 4 – AMOSTRAS POSITIVAS DE CÃO (*C. familiaris*) PARA A PRESENÇA DE *Leishmania* sp. POR CULTIVO CELULAR OU PCR, E SUA RESPECTIVA ÁREA DE RESIDÊNCIA, MUNICÍPIO DE CERRO AZUL, ESTADO DO PARANÁ.

Cães positivos		
Amostra	Técnicas positivas	Área de residência
CA 130	Cultivo celular do sangue	Urbano
CA 131	Cultivo celular de biópsia + PCR de biópsia	Urbano
CA 134	Cultivo celular de biópsia	Urbano
CA 176	PCR do sangue	Rural

FONTE: O autor (2017).

Pelo método de ELISA indireto, 100 amostras das 189 (53%) foram positivas para o anticorpo *anti-leishmania* (TABELA 5). As absorvâncias variaram entre 0,053 (menor valor negativo) a 1,262 (maior valor positivo) com valor médio de 0,149 (FIGURA 14).

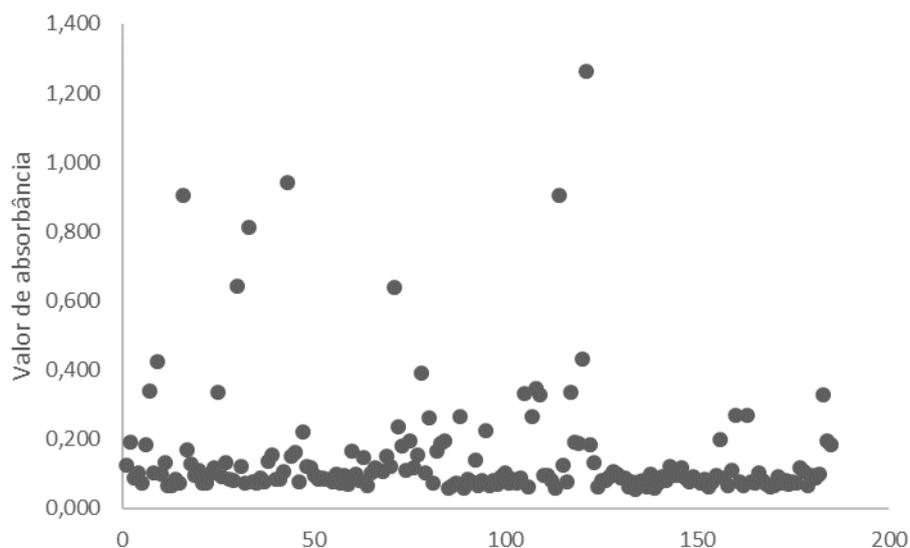
Dos sete cães que foram submetidos a biópsia, dois deles não foram positivos no ELISA indireto (CA111 e CA213), caracterizando que a lesão apresentada por eles, não era proveniente de infecção por *Leishmania* sp. No entanto, três animais (CA119, CA124 e CA128), dos que apresentaram feridas e foram submetidos à biópsia, positivaram apenas na sorologia.

TABELA 5: RESULTADO DA ANÁLISE DAS AMOSTRAS NO ELISA INDIRETO

ELISA indireto		
Amostras	n	%
Positivos	100	53%
Negativos	89	47%
Absorbâncias		
Média	0,149	-----
Mediana	0,095	-----
Desvio Padrão	0,166	-----
Valor Máximo	1,262	-----
Valor Mínimo	0,053	-----
Total de amostras analisadas	189	100%

FONTE: O autor (2017).

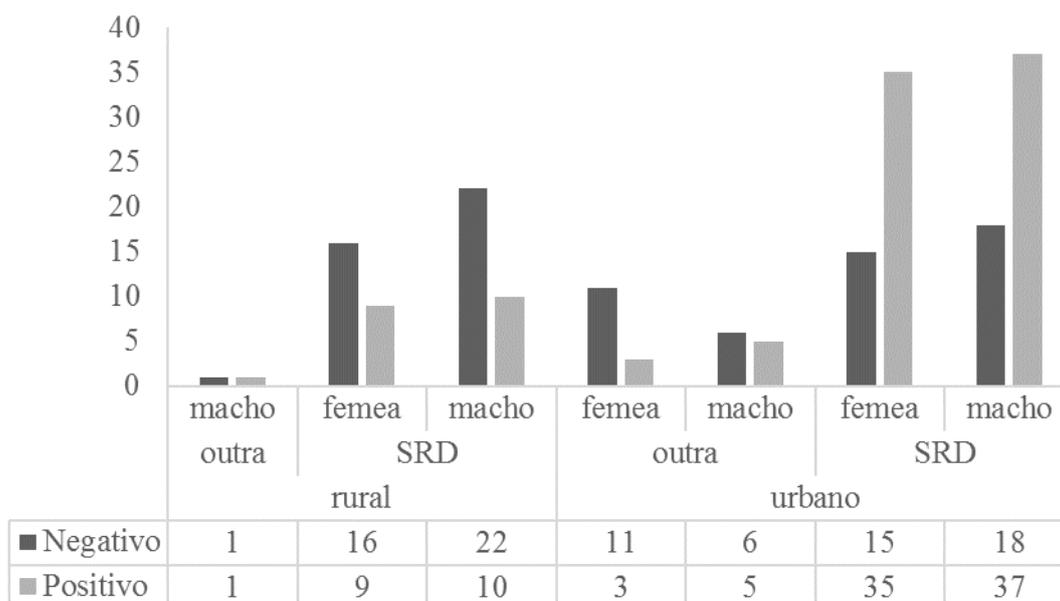
FIGURA 14 – VALORES DAS ABSORBÂNCIAS OBTIDAS COM A LEITURA DAS PLACAS DE ELISA INDIRETO



FONTE: O autor (2017).

Das amostras que foram positivas para anticorpos anti-*leishmania* no ELISA indireto (n=100), 91 (91%) cães não apresentavam raça definida (SRD), 53 (53%) eram machos, 80 (80%) eram provenientes de área urbana e 20 (20%) de área rural (FIGURA 15 e APÊNDICE 2).

FIGURA 15 - CÃES (*C. familiaris*) POSITIVOS PARA ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* NO ELISA INDIRETO, DE ACORDO COM O SEXO, RAÇA E ZONA DE RESIDÊNCIA



FONTE: O autor (2017).

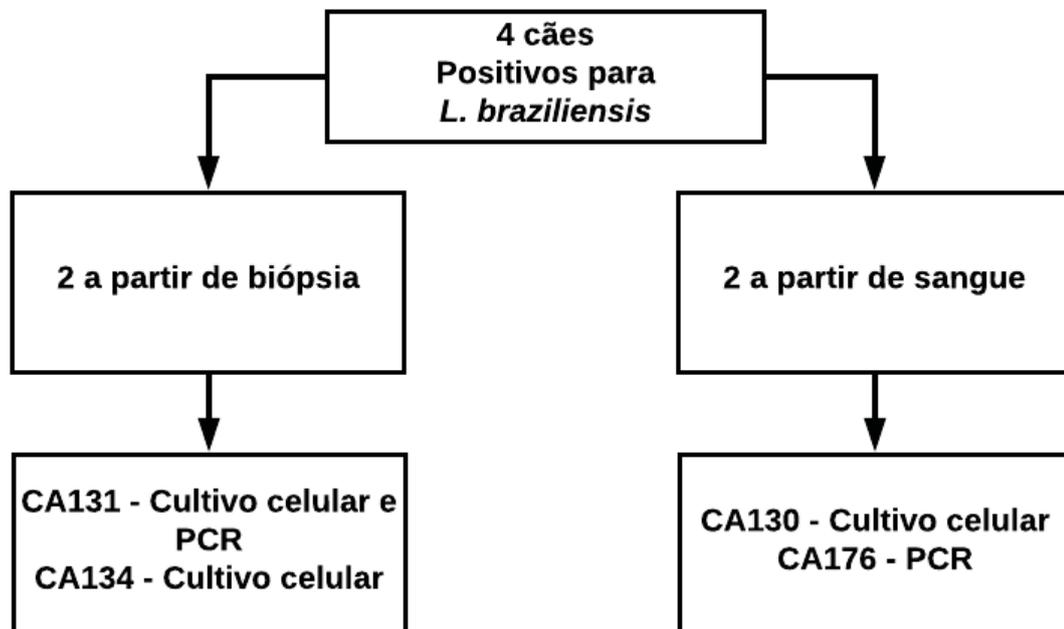
Após análise estatística foi observado que os cães positivos na sorologia (SRD) foi significativo em relação à raça (LRT=9.445, $z=2.2970$, $p=0.003$) e à zona em que o animal habitava (LRT=17.190, $z=4.017$, $p<0.001$), mas não em função do sexo do indivíduo (LRT=0.024, $z=0,154$, $p=0.877$).

Nesse sentido, a possibilidade um resultado de sorologia positivo para um indivíduo macho, SRD, vivendo em zona urbana foi estimada em 0,68 (68%). Já para o indivíduo macho, SRD, vivendo em zona rural, a razão cai para apenas 0,35 (35%). Em outro caso, se um indivíduo também macho possuir raça definida e viver em zona rural, o *odds ratio* é de apenas 0,12 (12%). Como não houve diferença estatística significativa entre sexos, a possibilidade de obter um resultado positivo na sorologia para um indivíduo SRD ou não, habitante de zona urbana ou rural e fêmea, é semelhante aos resultados obtidos da variável macho.

Ao todo neste estudo, foram considerados positivos para LTA quatro animais (CA130, CA131, CA134 e CA176) (FIGURA 16), totalizando 2% de prevalência. Esses,

foram diagnosticados por cultivo celular ou PCR, além da sorologia. Os parasitos isolados em cultivo celular, das amostras CA131 e CA134 foram submetidos à caracterização isoenzimática, sendo caracterizada a espécie *L. braziliensis* como a presente nos animais positivos para LTA.

FIGURA 16 - AMOSTRAS POSITIVAS PARA LTA, SEGUNDO SUA ORIGEM (SANGUE/BÍOPSIA) E MÉTODO DIAGNÓSTICO POSITIVO



FONTE: O autor (2017).

4 DISCUSSÃO

Durante o período de estudo sete (3,5%), dos 198 cães investigados, apresentaram ferida sugestiva e ativa para LTA, sendo realizada a biópsia. Velasquez et al. (2006), Castro et al. (2007), Leça-Junior et al. (2015), Brilhante et al. (2016) relataram o encontro de sinais clínicos semelhante em 39/143 (27,3%) em Mariluz (Paraná), 28/410 (7%) em diversas regiões do Paraná, 13/292 (4,5%) em Buerarema na Bahia e 13/40 (20%) em Xapuri no Acre, respectivamente, nos cães analisados.

Neste estudo, foi detectado *L. braziliensis* em um total de quatro cães (2%). Dois desses, foram provenientes de biópsia (CA131 e CA134), enquanto os outros dois a partir de sangue de animais sem manifestação clínica (CA130 e CA176). O percentual encontrado foi inferior aos estudos de Velasquez et al. (2006) em Mariluz (Paraná), Castro et al. (2007) também no Paraná, Brilhante et al. (2016) em Xapuri (Acre), e Leça Junior et al. (2015) em Buerarema na Bahia, que diagnosticaram ao todo 33/143 (23%), 13/410 (3%), 8/40 (20%) e 10/292 (3,66%) animais com presença do parasito, respectivamente.

As lesões cutâneas observadas neste estudo foram compatíveis com as descritas em outros estudos, ferida circunscrita, com fundo granulomatoso e encontradas nas orelhas, e bolsa escrotal (MARCO et al., 2001; MADEIRA et al., 2006; HEUSSER-JÚNIOR et al., 2010; SASANI et al., 2016; LEÇA-JÚNIOR et al., 2015). Não foram observadas feridas orais ou nasais.

Três cães (CA130, CA131, CA134) dos quatro positivos para *L. braziliensis* foram diagnosticados por cultivo celular. Desses, um foi isolado de uma ferida ativa, outro de uma lesão já cicatrizada e o último a partir de amostra de sangue. O quarto cão (CA176) foi considerado positivo por detecção de DNA do parasito no sangue, por meio da PCR.

O isolamento de *L. braziliensis* a partir de uma ferida cicatrizada caracteriza o primeiro relato em cães naturalmente infectados e não tratados o que indica que a persistência do parasito também pode ocorrer em ferida cicatrizada de cão (PIRMEZ et al., 1988). Esse fato já é relatado em humanos desde década de 1990 (SARAVIA et al., 1990; GUEVARA et al., 1993; AEBISCHER, 1994; SCHUBACH et al., 1998; SCHUBACH et al., 2001; MENDONÇA et al., 2004; GOMES et al., 2013). Dessa forma, alguns autores questionam se existe uma cura estéril da LTA (SARAVIA et al., 1990; MENDONÇA et al., 2004).

A biópsia de ferida ativa com clínica compatível para LTA, destinada ao cultivo celular é considerada o mais próximo de um método diagnóstico “padrão ouro”, tal qual constitui a melhor forma de diagnóstico, segundo Bruschi e Gradoni (2018).

Llanos-Cuentas et al. (1999), Reithinger et al. (2000, 2003), Velasquez et al. (2006) e Marquez et al. (2017) detectaram a presença de *Leishmania* spp. em vasos periféricos de cães, corroborando com o achado nesse estudo, onde foi encontrado *L. braziliensis* no sangue de dois cães (CA130 e CA176). Ambos os animais eram clinicamente sadios e sem lesão aparente no momento da coleta.

A ausência ou baixa detecção de parasitos de *L. braziliensis* em sangue periférico de cães tem contribuído pela não implicação desses animais na participação do ciclo de transmissão desse parasito (MADEIRA et al., 2005, 2006; CASTRO et al., 2007). Segundo Massunari et al., (2009) a baixa detecção de *Leishmania* spp. pode ser justificada pela disseminação hematogênica ter sido controlada pelo sistema imune. Scott e Novais (2016) e Ehrlich et al. (2014) relataram que as células T regulatórias são responsáveis pelo controle das respostas imunopatológicas, inibindo a progressão da doença pela diminuição da carga parasitária. Entretanto, é prematuro realizar argumentações generalistas sobre esse sistema, pois a resposta imune do hospedeiro pode ser influenciada tanto pela espécie e virulência do parasito, quanto pela sua própria genética (SCOTT & NOVAIS, 2016).

O baixo percentual de cães positivos por meio da PCR e cultivo celular corrobora as observações de Massunari et al., (2009) que relatam que a limitada sensibilidade destes testes dar-se-á em decorrência do pequeno número de parasitos circulantes. Cabe ressaltar que em teste para detecção de *L. braziliensis* na PCR no laboratório, foi observado que abaixo de 1×10^4 não há detecção do DNA do parasito na reação. O mesmo pode ocorrer quando é avaliado o sangue e/ou tecido.

Como ainda não há um método diagnóstico considerado “padrão ouro”, somente a associação de técnicas permite maior sensibilidade e confiabilidade no diagnóstico para LTA (REITHINGER et al., 2000; MADEIRA et al., 2005; DORVAL et al., 2006; SANTOS et al., 2010; BRASIL, 2017). A falta de um teste diagnóstico ideal acaba limitando diretamente o controle da doença, pois dados epidemiológicos acurados atuam em sinergia com as estratégias de controle da doença (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015; BRUSCHI & GRADONI, 2018).

Um total de 100 amostras de soro de cão, das 189 analisadas por ELISA indireto, para imunoglobulinas IgG, foram positivas, equivalendo a 53% de positividade. Este fato demonstrou que a maioria dos cães amostrados entrou em contato com o parasito em algum momento de sua vida. Essa porcentagem de infectados, é inferior ao encontrado por Zanzarini et al. (2005) no norte do Paraná 37/67 (55%). Por outro lado, o presente estudo apresentou níveis sorológicos reativos para *Leishmania* superiores ao de Constantino et al. (2014) em

Telêmaco Borba (PR) (n=13/191 – 6,81%); Pittner et al. (2009) em Maringá (PR) (n=12/50 – 24%); Reis et al. (2011) em Bela Vista do Paraíso (PR) (n=222/424 – 45%) e Castro et al. (2007) em Adrianópolis (PR), região central do Paraná e Noroeste do Paraná, que encontraram respectivamente, 6,3% (n=10/159), 20,5% (n=8/39) e 18,4% (n=39/212). Todos os animais que se detectou parasitos (CA130, CA131, CA134 e CA176), foram positivos no método de ELISA indireto.

A partir da análise das absorbâncias das amostras de soro, foi obtido um *cut-off* de 0,089 demonstrando uma sensibilidade de 55% e especificidade de 93%. Sarkari et al., (2014), Reis et al. (2011) e Brito et al., (1999) encontraram níveis de sensibilidade e especificidade de 83,6% e 62,7%, 79,3% e 95,1%, 62,1% e 71,4%, respectivamente. Testes altamente sensíveis tendem a ser positivos em pacientes com doença e raramente resultam em falsos-negativos, já testes com alta especificidade são capazes de identificar indivíduos que verdadeiramente não apresentam a doença, sendo responsável por diminuir a ocorrência de falsos-positivos. Apesar de serem características separadas, há certa conexão entre sensibilidade e especificidade. Testes extremamente sensíveis tendem a ter menor especificidade e vice-versa. Testes diagnósticos em que são usadas linhas de corte para determinar a positividade, o ajuste do limiar quase sempre melhora a sensibilidade ou especificidade ao custo do outro (NAEGER et al., 2013).

Para este estudo foi selecionado um *cut-off* que demonstrasse um nível de especificidade maior que a sensibilidade, pois em áreas endêmicas, assim como é em Cerro Azul, testes altamente específicos são almejados por médicos veterinários e proprietários que buscam segurança que somente os animais verdadeiramente infectados sejam tratados ou eutanasiados, dependendo da doença (ARRUDA et al., 2016).

Dentre os 189 cães analisados por ELISA indireto, 20 deles (11%) apresentaram níveis de absorbâncias próximas ao *cut off* (entre 0,084 e 0,094). Recomenda-se uma nova coleta de sangue desses animais para confirmação do diagnóstico, por novo exame sorológico.

Dois cães (CA111 e CA213) que apresentavam lesão sugestiva para LTA e foram submetidos à biópsia, não foram positivos em nenhum dos métodos utilizados. Conclui-se que esses animais apresentavam as feridas em decorrência de outras causas.

Três animais (CA119, CA124 e CA128) que apresentavam lesões sugestivas para LTA e foram submetidos à biópsia, positivaram apenas no ELISA indireto. Não foi possível a detecção de *L. braziliensis* nesses animais, sendo assim, não foram considerados positivos para a LTA. A baixa quantidade de parasitos nas lesões, com distribuição irregular pode ter

comprometido os resultados dos métodos de cultivo celular e PCR nesses animais (MASSUNARI et al., 2009; BRUSCHI & GRADONI, 2018).

Foi observado que os animais positivos para a sorologia eram provenientes de residências próximas, se apresentando em blocos, ou seja, vários animais positivos coletados em sequência. Essas áreas são consideradas de risco para LTA, e devem ser mapeadas e monitoradas para a presença do vetor.

Quanto à análise estatística, a positividade para o teste de ELISA indireto foi significativamente maior em animais SRD do que de outras raças ($z=2.2970$, $p=0.003$) e que vivem em ambiente urbano ($z=4.017$, $p<0.001$), independentemente do sexo do indivíduo ($z=0,154$, $p=0,877$). Dessa forma, a possibilidade de se obter resultado positivo na sorologia de um indivíduo SRD, proveniente de área urbana, de qualquer sexo é de 68%, contra os 35% de *odds ratio* para se obter animais positivos em indivíduos SRD de área rural.

A partir dos resultados obtidos no estudo, sugere-se que os cães do município de Cerro Azul são possíveis fontes de repasto sanguíneo para o flebotomíneo, corroborando com os achados de Baum et al. (2014), Marassá et al. (2013), Dias et al. (2003) e Afonso et al. (2005), que detectaram a presença de DNA de cães nesses insetos.

Membrive e colaboradores (2012) defenderam que a presença de cães positivos para LTA pode estar correlacionada com o risco de infecção em humanos no município de Arapongas, por atrair flebotomíneos para o peridomicílio. Apesar da relativa atratividade de cães para alguns vetores de *L. braziliensis*, algumas espécies como *Nyssomyia whitmani* parece ser significativamente mais atraído para seres humanos do que para cães (CAMPBELL-LENDRUM et al., 1999). Contudo, o encontro desses animais doentes e soroprevalentes em Cerro Azul, Paraná, pode ser um indicador para a ocorrência de casos humanos (PADILLA et al., 2002; REIS et al., 2011; CONSTANTINO et al., 2014).

É defendido que os cães não apresentam características que favoreçam a manutenção da *Leishmania* spp. na natureza, como demonstrado por Travi e colaboradores (2006), que permitiram que flebotomíneos não infectados, fizessem o repasto sanguíneo de lesões de LTA desencadeadas por *L. braziliensis* em dois cães, na Colômbia, e nenhum dos flebotomíneos se infectou. Até o momento o cão é considerado um hospedeiro acidental do parasito (ROQUE & JANSEN, 2014; BRASIL, 2017). Entretanto, Padilla et al. (2002), sugerem que os cães são importantes sentinelas da ocorrência da LTA humana, corroborando com o que ocorre no município de Cerro Azul, Paraná, onde a LTA humana e canina ocorre simultaneamente, como relatado por Zanzarini et al. (2005).

Três cães diagnosticados como positivos por cultivo celular ou PCR foram provenientes da área urbana e apenas um de área rural. E com base na análise estatística dos resultados da sorologia, houve diferença estatística significativa para animais positivos que residem em áreas urbanas do município de Cerro Azul. Dessa forma esses dados poderiam sinalizar para um ciclo periurbano e urbano da LTA. Uma possível mudança na ecoepidemiologia da LTA, passando de áreas rurais e de desmatamento para áreas mais urbanas já foi relatada por Jirmanus et al. (2012), Lima (2010) e Passos (2003) e poderia estar ocorrendo na área de estudo. Uma possível adaptação do vetor (ou vetores) e reservatórios em ambientes antrópicos pode ter propiciado a formação de ciclo de transmissão em ambientes peridomiciliares e periurbanas, favorecendo a infecção do homem e dos animais domésticos, sobretudo cães (AGUILAR et al., 1989; PIRMEZ et al., 1988; YOSHIDA et al., 1990; REIS et al., 2011).

A epidemiologia da LTA canina varia entre diferentes regiões de acordo com os fatores de risco associados à infecção. Um importante fator de risco é o estilo de vida do cão. Cães de guarda são mantidos do lado de fora das casas durante a noite, estando mais expostos à picada do flebotomíneo e conseqüentemente a um maior risco de infecção quando comparado com cães de companhia, os quais são mantidos dentro das casas (RONDON et al., 2008; OLIVEIRA & ARAÚJO, 2003; DANTAS-TORRES, 2009).

O uso de coleiras caninas impregnadas com inseticida (deltametrina 4%) e a aplicação de inseticidas com efeito repelente contra flebotomíneos nos canis são boas estratégias para interrupção do ciclo de vida do parasito e conseqüentemente controle da doença (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; MENCKE et al., 2003; LIÉNARD et al., 2013; DUMONT et al., 2015; FRANC et al., 2015). O impacto desse tipo de medida de controle também é dependente da correta aplicação e frequência de reaplicação dos repelentes e inseticidas, além da taxa de decréscimo do efeito das coleiras impregnadas. (GRAMICCIA & GRADONI, 2005).

A LTA é uma doença emergente e de difícil controle, pois acomete uma grande variedade de mamíferos. Depois dos humanos, os cães são os mais acometidos pela doença, e assim como nós, são vítimas que não são responsáveis pela manutenção do parasito. Apesar disso, autores sugerem que esses animais servem como atrativo para a aproximação das fêmeas de flebotomíneos ao peridomicílio, servindo como sentinelas para a infecção em humanos. Apesar de somente quatro animais serem positivos para a presença de *L. braziliensis*, o alto percentual (53%) de animais reativos à sorologia demonstra que o parasito está entrando em contato com esses cães. O número baixo de animais positivos para *L.*

braziliensis, tanto para cultivo celular quanto para PCR reforça que a LTA é uma doença de difícil diagnóstico devido ao baixo número de parasitos em lesões e no sangue, e somente a associação de técnicas pode permitir uma maior sensibilidade e confiabilidade no diagnóstico.

5 REFERÊNCIAS

- AEBISCHER, T. Recurrent cutaneous leishmaniasis: a role for persistent parasites? **Parasitol Today**, 1994.
- AFONSO, M.M.S.; GOMES, A.C.; MENESES, R.V.; RANGEL, E.F. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (N.) intermedia* (Diptera, Psychodidae), vector of cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Cad Saúde Pública**; v.21, n.6, 2005.
- AFRIN, F., RAJESH, R.; ANAM, K.; GOPINATH, M.; PAL, S.; ALI, N. Characterization of *Leishmania donovani* antigens encapsulated in liposomes that induce protective immunity in BALB/c mice. **Inf Imm**; p.6697–6706, 2002.
- AFRIN, F.; ALI, N. Adjuvanticity and protective immunity elicited by *Leishmania donovani* antigens encapsulated in positively charged liposomes. **Inf Imm**; p.2371–2377, 1997.
- AGUILAR, C.M.; RANGEL, E.F.; GARCIA, L.; FERNANDEZ, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI FILHO, G.; VARGAS, Z. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Brazil and Venezuela. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v.84, n.1, p.19-28, 1989.
- ARRUDA, M.M.; FIGUEIREDO, F.B.; MARCELINO, A.P.; BARBOSA, J.R.; WERNECK, G.L.; NORONHA, E.F.; ROMERO, G.A.S. Sensitivity and specificity of parallel or serial serological testing for detection of canine Leishmania infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v.111, p.168–173, 2016.
- BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev Bras Epi**; v.07, n.03, p.328-337, 2004.
- BAUM, M.; CASTRO, E.A.; PINTO, M. C.; GOULART, T. M.; BAURA, W.; KLISIEWICZ, D. R.; COSTA-RIBEIRO, M. C. V. Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American Cutaneous Leishmaniasis, Paraná State, Brazil. **Acta tropica**; v.143, p.8–12, 2014.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública**. Brasília, 1998.
- BRILHANTE, A.F.; SOUZA, A.I.; DORVAL, M.E.C.; FRANÇA, A.O.; LIMA, R.B.; GALATI, E.A.B. NUNES, V.L.B. Canine cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an agricultural settlement, endemic area for leishmaniasis. **Arq Bras Med Vet e Zoo**; v.68, n.4, p.927-930, 2016.
- BRITO, M.E.F. Desenvolvimento de um método diagnóstico para a leishmaniose tegumentar americana com base em Western blot de frações antigênicas de *Leishmania braziliensis*. **Rev Soc Bras Med Trop**; v.32, p.313–314, 1999.
- BRUJIN, M.; BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Trop**, 1992.

BRUSCHI, F.; GRADONI, L. **The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases.** Springer International Publishing. p.107–125. Print, 2018.

CAMPBELL-LENDRUM, D.H.; PINTO, M.C.; BRANDÃO-FILHO, S.P.; SOUZA, A.A.; READY, P.D.; DAVIES, C.R. Experimental comparison of anthropophily between geographically dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae). **Med Vet Entomol**; v.13, p.299–309, 1999.

CASTRO, E.A.; THOMAS-SOCCOL, V.; MEMBRIVE, N.; LUZ, E. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Rev Soc Bras Med Trop**; v.35, p.445–452, 2002.

CASTRO, E.A.; THOMAS-SOCCOL, V.; AUGUR, C.; LUZ, E. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). **Exp Parasitol**; v.117(1), p.13-21. 2007.

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

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasitol Vec**, 2009.

DIAS, F. O. P.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Blood feeding sources and peridomiciliation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cad Saúde Pública**; v.19, n.5, 2003.

DORVAL, M.E.M.C.; OSHIRO, E.T.; CUPOLLILO, E.; CASTRO, A.C.C.; ALVES, T.P. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Rev Soc Bras Med Trop**; v.39, p.43–46, 2006.

DUMONT P, et al. Repellent and insecticidal efficacy of a new combination of fipronil and permethrin against the main vector of canine leishmaniosis in Europe (*Phlebotomus perniciosus*). **Parasit Vectors**; v.8, p.49, 2015.

EHRlich, A. CASTILLO, T.M.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; CHAE, W.J.; BOTHWELL, A.L.; SPARWASSER, T.; MAC-MAHON-PRATT, D. The immunotherapeutic role of regulatory T cells in *Leishmania (Viannia) panamensis* infection. **J Immunol**; v.193, p.2961–2970, 2014.

EVANS, D. A. **In vitro methods for parasite cultivation.** In A. E. R. Taylor and J. R. Baker (ed.). *Leishmania*. Academic Press, New York, N.Y. p.52–75, 1987.

FIGUEIREDO, L.A.; PAIVA, M.C.; ALMEIDA, E.L.; FILHO, S.P.B.; TORRES, F.D. Clinical and hematological findings in *Leishmania braziliensis* infected dogs from Pernambuco, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**; v.21, n.4, p.418-420, 2012.

FRANC, M.; LIÉNARD, E.; JACQUIET, P.; BONNEAU, S.; NAVARRO, C.; BOUSHIRA, E. Efficacy of a new combination of fipronil and permethrin (Effitix®) against *Phlebotomus perniciosus* in dogs. **Vet Parasitol**; v.212(3–4), p.156–60, 2015.

GALATI, E.A.B. **Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): classificação, morfologia, terminologia e identificação de adultos** [apostila]. v.1. São Paulo: USP; 2016.

GELMAN, A.; YU-SUNG, S. **Data Analysis Using Regression and Multilevel/Hierarchical Models**. R package version; v.1, p.9-3, 2016.

GOMES, C.M.; DAMASCO, F.S.; MORAIS, O.O.; PAULA, C.D.R.; SAMPAIO, R.N.R. Recurrent cutaneous leishmaniasis. **An Bras Dermatol**; v.88(3), p.462–464, 2013.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Vet Parasit**; v.181, p.23–30, 2011.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Int. J. Parasitol**; v.35, p.1169–1180, 2005.

GUEVARA, P.; RAMIREZ, J. L.; ROJAS, E.; SCORZA, J.V.; GONZALEZ, N.; ANEZ, N. *Leishmania braziliensis* in blood 30 years after cure. **Lancet**; v.341, p.1341, 1993.

HEUSSER-JÚNIOR, A.H.; BELLATO, V.; SOUZA, A.P.; MOURA, A.B.; SARTOR, A.A.; SANTOS, E.G.; SILVA, V.L. Canine tegumentar leishmaniasis in the town of Balneário Camboriú in the State of Santa Catarina. **Rev Soc Bras Med Trop**; v.43, n.6, p.713-718, 2010.

HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P. Simultaneous Inference in General Parametric Models. **Bio J**; v.50(3), p.346-363, 2008.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Cidades**, 2017. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pr/cerro-azul/panorama>> Acesso em 05 fev 2018.

JIRMANUS, L.; GLESBY, M.J.; GUIMARAÃES, L.H.; LAGO, E.; ROSA, M.E.; MACHADO, P.R.; CARVALHO, E.M. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. **Am J Tr Med Hyg**; v.86, p.426–433, 2012.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, C.; DEREURE, J.; PUECH, M.P.; CADIERGUES, M.C. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Med Vet Entomol**; v.11, p.15-21, 1997.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. **New World Leishmaniasis**. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 2010.

LEÇA-JÚNIOR, N.F.; GUEDES, P.; SANTANA, L.; ALMEIDA, V.; CARVALHO, F. Epidemiology of canine leishmaniasis in southern Bahia, Brazil. **Acta Trop**; v.148, p.115-119, 2015.

LIÉNARD, E.; BOUSHIRA, E.; JACQUIET, P.; WARIN, S.; KALTSATOS, V.; FRANC, M. Efficacy of dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen combination spot-on on dogs against *Phlebotomus perniciosus* and *Ctenocephalides canis*. **Parasitol Res**; v.112(11), p.3799–805, 2013.

LIMA, A.C.V.M.R. **Estudo da variabilidade genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 de diferentes regiões do Brasil**. 166 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2010.

LLANOS-CUENTAS, E.A.; RONCAL, N.; VILLASECA, P.; PAZ, L.; OGUSUKU, E.; PEREZ, J.E. Natural infections of *Leishmania peruviana* in animals in the Peruvian Andes. **Trans R Soc Trop Med Hyg**; v.93, p.15–20, 1999.

MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.; PEREIRA, S.A.; FIGUEIREDO, F.B.; BAPTISTA, C.; LEAL, C.A.; MELO, C.X.; CONFORT, E.M.; MARZOCHI, M.C.A. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. **Vet Parasitol**; v.138, p.366-370, 2006.

MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.; SERRA, C.M.; PEREIRA, S.A.; FIGUEIREDO, F.B.; CONFORT, E.M.; QUINTELLA, L.P.; MARZOCHI, M.C. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? **Parasitol Res**; v.97, p.73-76, 2005.

MADEIRA, M.F.; UCHOA, C.M.; LEAL, C.A.; SILVA, R.M.M.; DUARTE, R.; MAGALHÃES, C.M.; SERRA, C.M.B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. **Rev Soc Bras Med Trop**; v.6, p.551–555, 2003.

MARASSÁ, A. M.; GALATI, E. A. B.; BERGAMASCHI, D. P.; CONSALES, C. A. Blood feeding patterns of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera, Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**; v.46, n.5. 2013.

MARCO, J.D.; PADILLA, A.M.; DIOSQUE, P.; FERNÁNDEZ, M.M.; MALCHIODI, E.L.; BASOMBRÍO, M.A. Force of infection and evolution of lesions of canine tegumentary leishmaniasis in northwestern Argentina. **Mem Instituto Oswaldo Cruz**; v.96, p.649-652, 2001.

MARQUEZ, E.S.; DE CASTRO, E.A.; NABUT, L.B.; RIBEIRO, M.C.V.C.; ARAÚJO, L.D.C.T.; POUBEL, S.B.; GONÇALVES, A.L.; CRUZ, M.F.R.; TRAD, A.P.M.E.S.; DIAS, R.A.F.; NAVARRO, I.T.; THOMAS-SOCCOL, V. Cutaneous leishmaniosis in naturally infected dogs in Paraná, Brazil, and the epidemiological implications of *Leishmania (Viannia) braziliensis* detection in internal organs and intact skin. **Vet Parasitol**, 2017.

MASSUNARI, G.K.; VOLTARELLI, E.M.; SANTOS, D.R.; SANTOS, A.R.; POIANI, L.P.; DE OLIVEIRA O.; VIOLATO, R.J.; MATSUO, R.; TEODORO, U.;

MELO, H.A.; ROSSONI, D.F.; TEODORO, U. Spatial distribution of cutaneous leishmaniasis in the state of Paraná, Brazil. **PLOS ONE**; v.12, 2017.

MEMBRIVE, N. A.; RODRIGUES, G.; GUALDA, K. P.; BERNAL, M. V. Z.; OLIVEIRA, D. M.; LONARDONI, M. V. C.; TEODORO, U.; TEIXEIRA, J. J. V.; SILVEIRA, T. G. V. Environmental and animal characteristics as factors associated with American Cutaneous Leishmaniasis in rural locations with presence of dogs, Brazil. **PLOS ONE**, 2012.

MENCKE, N.; VOLF, P.; VOLFOVA, F.; STANNECK, D. Repellent efficacy of a combination containing imadocloprid and permethrin against sandflies (*Phlebotomus papatasi*) in dogs. **Parasitol Res**; v.90, p.108-111, 2003.

MENDONÇA, M.G.; BRITO, M.E.F.; RODRIGUES, E.H.G.; BANDEIRA, V.; JARDIM, M.L.; ABATH, F.G.C. Persistence of *Leishmania* Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure? **J Infec Dis**; v.189(6), p.1018–1023, 2004.

NAEGER, D.M., KOHI, M.P., WEBB, E.M., PHELPS, A., ORDOVAS, K.G., NEWMAN, T.B. Correctly using sensitivity, specificity, and predictive values in clinical practice: How to avoid three common pitfalls. **Amer J Roentgenol**, 2013.

OLIVEIRA, F.S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M.Q.; BRAZIL, R.P.; PACHECO, R.S. PCR based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet Parasitol**; v.129, p.219-227, 2005.

OLIVEIRA, S.S.; ARAÚJO, T.M. Evaluation of control measures for visceral leishmaniasis (kalaazar) in an endemic area in Bahia, Brazil (1995-2000). **Cad Saúde Pública** / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. v.19, p.1681–90, 2003.

PADILLA, A.M.; MARCO, J.D.; DIOSQUE, P.; SEGURA, M.A.; MORA, M.C.; FERNANDEZ, M.M.; MALCHIODI, E.L.; BASOMBRI, M.A. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina. **Vet Parasitol**; v.110, p.1–10, 2002.

PAIVA-CAVALCANTI, M.P.; MORAIS, R.C.S.; SILVA, R.P.; SILVA, L.A.M.T.; ALBUQUERQUE, S. D.C.G.; TAVARES, D.H.C.; CASTRO, M.C.A.B.; SILVA, R.F.E.; PEREIRA, V.R.A. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. **Cell Biosc**, 2015.

PASSOS, L. N. **Avaliação da reação em cadeia de polimerase (PCR) no diagnóstico da leishmaniose cutânea no Estado do Espírito Santo, Brasil**. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PIRMEZ, C.; COUTINHO, S.G.; MARZOCHI, M.C.A.; NUNES, M.P.; GRIMALDI JR, G. Canine American Cutaneous Leishmaniasis: A Clinical and Immunological Study in Dogs Naturally Infected with *Leishmania Braziliensis Braziliensis* in an Endemic Area of Rio de Janeiro, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**; v.38, p.52-58, 1988.

PITTNER, E.; VOLTARELLI, E.; PERLES, T. F.; ARRAES, S.M.A.A.; SILVEIRA, T.G.V.; LONARDONI, M.V.C. Ocorrência de leishmaniose tegumentar em cães de área endêmica no Estado do Paraná. **Arq Bras Med Vet Zool**; Belo Horizonte, v.61, n.3, p.561-565, 2009.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing, 2017.

RAMADA, J.S.; BECKER-FINCO, A.; MINOZZO, J.C.; FELICORI, L.F.; AVILA, R.A.M.; MOLINA, F.; NGUYEN, C.; DE MOURA, J.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; ALVARENGA, L.M. Synthetic peptides for invitro evaluation of the neutralizing potency of *Loxosceles antivenoms*. **Toxicon**; v.73, p.47–55, 2013.

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

REITHINGER, R.; ESPINOZA, J.C.; COUTENAY, O.; DAVIES, C.R. Evaluation of PCR as diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). **J Clin Microbiol**; v.41, p.1486-93, 2003.

REITHINGER, R.; LAMBSON, B.E.; BARKER, D.C.; DAVIES, C.R. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dog blood and bone marrow. **J Clin Microbiol**; v.38, p.748–751, 2000.

RONDON, F.C.; BEVILAQUA, C.M.; FRANKE, C.R.; BARROS, R.S.; OLIVEIRA, F.R.; ALCANTARA, A.C.; DINIZ, A.T. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceara state, Brazil. **Vet Parasitol**; v.155, p.24–31, 2008.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **Int J Parasitol: Parasites and Wildlife**; p.251-262, 2014.

SANTOS, J.M.L.; DANTAS-TORRES, F.; MATTOS, M.R.F.; LINO, F.R.L.; ANDRADE, L.S.S.; SOUZA, R.C.A.; BRITO, F.L.C.; BRITO, M.E.F.; BRANDÃO-FILHO, S.P.; MATTOS, L.S. Prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* spp em cães de Garanhuns, Agreste de Pernambuco. **Rev Soc Bras Med Trop**; v.43, p.41-45, 2010.

SARAVIA, N.C.; WEIGLE, K.; SEGURA, I.; GIENNINI, S.H.; PACHECO, R.S.; LABRADA, L.A.; GONCALVES, A. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection - reactivation or reinfection? **Lancet**; v.336, p.398–402, 1990.

SARKARI, B.; ASHRAFMANSOURI, M.; HATAM, G.; HABIBI, P.; KHABISI, S.A. Performance of an ELISA and indirect immunofluorescence assay in serological diagnosis of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, 2014.

SASANI, F.; JAVANBAKHT, J.; SAMANI, R.; SHIRANI, D. Canine cutaneous leishmaniasis. **J Parasit Dis: Off Org Ind Soc Parasitol**; v.40(1), p.57-60, 2016.

SCHUBACH, A.; CRUZZI-MAIA, T.; OLIVEIRA, A.V.; SARTORI, A.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; MATTOS, M.S.; ARAÚJO, M.L.; SOUZA, W.J.S.; HADDAD, F.; PEREZ, M.A.; PACHECO, R.S.; MOMEM, H.; COUTINHO, S.G.; MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F.; COSTA, S.C.C. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions

and ancient scars of americantegumentary leishmaniasis patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v.96, n.7, p.987–996, 2001.

SCHUBACH, A.; MARZOCHI, M.C.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A.V.; ARAUJO, M.L.; OLIVEIRA, A.L.; PACHECO, R.S.; MOMEN, H.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; COUTINHO, S.G.; MARZOCHI, K. B. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. **Am J Trop Med Hyg**; v.58, p.824–7, 1998.

SCOTT, P.; NOVAIS, F.O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nat Rev Immunol**, v.16, n.9, p.581-592, 2016.

TALHARI, C.; NAKAJIMA, S.; GONTIJO, B. **Parasitic and Protozoal Infections**. In: Bonamigo R.R.; Dornelles S.I.T. (eds) *Dermatology in Public Health Environment*. Springer, Cham, 2018.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**, 8ª edição, Elsevier, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p.587, 2009.

TRAVI, B.L.; TABARES, C.J.; CADENA, H. *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in two Colombian dogs: a note on infectivity for sand flies and response to treatment. **Biomedica**; v.26, p. 249–253, 2006.

TRUPPEL, J.H.; OTOMURA, F.; TEODORO, U.; MASSAFERA, R.; RIBEIRO, M.C.V.C.; THOMAS-SOCCOL, V. Can equids be a reservoir of *Leishmania braziliensis* in endemic areas? **PLOS One**; v.9(4). WHO, 2014.

VELASQUEZ, L.G.; MEMBRIVE, N.; MEMBRIVE, U.; RODRIGUES, G.; REIS, N.; LONARDONI, M.V.C.; TEODORO, U.; TESSMANN, I.P.B.; SILVEIRA, T.G.V. PCR in the investigation of canine american tegumentary leishmaniasis in northwestern Paraná State, Brazil. **Cad Saúde Pública**; v.22, p.571–578, 2006.

VEXENAT, A.D.C.; SANTANA, J.M.; TEIXEIRA, A.R.L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa - **Rev Inst Med Trop SP**, 1996.

VRIES, H.J.C.; REEDIJK, S.H.; SCHALLIG, H.D.F.H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **Am J Clin Dermatol**; v.16, p.99–109, 2015.

WHO – **World Health Organization**, 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>> Acesso em: 1 fev 2018.

WHO – **World Health Organization**, 2016. Disponível em: <<http://www.asiaone.com/health/5-emerging-infectious-diseases-watch-out-2017>> Acesso em: 10 dez 2017.

YOSHIDA, E.; CORREA, F.; MARQUES, S.; STOLF, H.; DILLON, N.; MOMEN, H.; GRIMALDI JR, G. Human, canine and equine leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in the south-west region of São Paulo state. Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.85, p.133-134, 1990.

ZANZARINI, P.D.; SANTOS, D.R.; SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L.P.; LONARDONI, M.V.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T.G. Canine American cutaneous leishmaniasis in municipalities of northern Paraná State, Brazil. **Cad Saúde Pública**; v.21(6), p.1957-1961, 2005.

1. Diagnosticar gratuitamente se o seu animal apresenta a doença ou não.
 2. Contribuir para a compreensão do ciclo epidemiológico da doença na região.
 3. Esclarecimento da situação epidemiológica da doença no Estado do Paraná.
- No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico

- i) Os pesquisadores Prof^a Dra Magda Clara Vieira da Costa-Ribeiro docente da Universidade Federal do Paraná e Alan dos Anjos, mestrando da Universidade Federal do Paraná, responsáveis por este estudo poderão ser contatados no Laboratório de Parasitologia Molecular da UFPR, localizado no endereço R. Cel. Francisco Heráclito dos Santos, 210, Jardim das Américas Curitiba – PR, telefone: 3361 1701 no horário das 9h às 17h, e-mails: magdacostaribeiro@gmail.com e alandanjos@gmail.com para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.
- j) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado.
- k) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas: médico, vigilância epidemiológica. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade e do seu animal seja preservada e seja mantida a confidencialidade**.
- l) As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade. E pela participação neste estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.

Rubricas: Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____ Pesquisador Responsável _____ Orientador _____ Orientado _____
--

Comitê de Ética Animal do Setor de Ciências Agrárias da UFPR Rua dos Funcionários, 1540 – Curitiba-PR –CEP:80035-050 e-mail: ceua_sca@ufpr.br

Eu, _____, proprietário do(s) animal(is) _____, sexo _____, espécie _____, raça _____, com idade de _____ li esse termo de consentimento e com as explicações prévias fornecidas, compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e fui informado que meu animal será atendido sem custos para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Assinatura do participante de pesquisa ou responsável legal)
Local e data

Assinatura do Pesquisador

Comitê de Ética Animal do Setor de Ciências Agrárias da UFPR
Rua dos Funcionários, 1540 – Curitiba-PR – CEP:80035-050
e-mail: ceua_sca@ufpr.br

APÊNDICE 2 - AMOSTRAS POSITIVAS PARA O ELISA INDIRETO

Amostra	Raça	Classificação do bairro	Sexo
CA6	SRD	Urbano	Fêmea
CA7	SRD	Urbano	Macho
CA8	SRD	Urbano	Fêmea
CA9	SRD	Urbano	Fêmea
CA12	SRD	Urbano	Fêmea
CA13	SRD	Urbano	Fêmea
CA15	SRD	Urbano	Fêmea
CA17	SRD	Urbano	Fêmea
CA18	Doberman	Urbano	Fêmea
CA20	SRD	Urbano	Macho
CA25	SRD	Urbano	Macho
CA26	SRD	Urbano	Macho
CA27	SRD	Urbano	Macho
CA28	SRD	Urbano	Fêmea
CA29	Lhasa Apso	Urbano	Macho
CA32	SRD	Urbano	Macho
CA33	SRD	Urbano	Fêmea
CA34	SRD	Urbano	Fêmea
CA35	SRD	Urbano	Macho
CA36	SRD	Urbano	Fêmea
CA39	Duschound	Urbano	Fêmea
CA40	Border Collie	Urbano	Macho
CA42	SRD	Urbano	Macho
CA47	SRD	Urbano	Macho
CA48	SRD	Urbano	Macho
CA51	SRD	Urbano	Macho
CA52	SRD	Urbano	Fêmea
CA53	SRD	Urbano	Macho
CA54	SRD	Urbano	Macho
CA55	SRD	Urbano	Fêmea
CA56	SRD	Urbano	Fêmea
CA57	SRD	Urbano	Macho
CA58	SRD	Urbano	Fêmea
CA64	SRD	Urbano	Macho
CA66	SRD	Urbano	Fêmea
CA68	SRD	Urbano	Macho
CA70	Pit Bull	Urbano	Macho
CA72	SRD	Urbano	Fêmea
CA75	SRD	Urbano	Fêmea

Amostra	Raça	Classificação do bairro	Sexo
CA76	SRD	Urbano	Macho
CA77	SRD	Urbano	Fêmea
CA78	SRD	Urbano	Fêmea
CA79	SRD	Urbano	Macho
CA80	SRD	Urbano	Fêmea
CA81	SRD	Urbano	Fêmea
CA82	SRD	Urbano	Fêmea
CA83	SRD	Urbano	Macho
CA84	Pit Bull	Urbano	Fêmea
CA85	SRD	Urbano	Macho
CA86	SRD	Urbano	Fêmea
CA87	Pincher	Urbano	Macho
CA88	SRD	Urbano	Macho
CA89	SRD	Urbano	Macho
CA90	Pastor alemão	Urbano	Macho
CA92	SRD	Urbano	Macho
CA93	SRD	Urbano	Macho
CA94	SRD	Urbano	Fêmea
CA98	SRD	Urbano	Macho
CA102	Fox Hound	Rural	Macho
CA105	SRD	Rural	Macho
CA109	SRD	Rural	Fêmea
CA110	SRD	Urbano	Macho
CA114	SRD	Urbano	Macho
CA115	SRD	Urbano	Macho
CA117	SRD	Urbano	Fêmea
CA118	SRD	Urbano	Macho
CA119	SRD	Urbano	Macho
CA120	SRD	Urbano	Fêmea
CA121	SRD	Urbano	Fêmea
CA124	SRD	Urbano	Fêmea
CA125	SRD	Urbano	Fêmea
CA127	SRD	Urbano	Fêmea
CA128	SRD	Urbano	Fêmea
CA129	SRD	Urbano	Macho
CA130	SRD	Urbano	Macho
CA131	SRD	Urbano	Macho
CA132	SRD	Urbano	Fêmea
CA133	SRD	Urbano	Fêmea
CA134	SRD	Urbano	Macho
CA135	SRD	Urbano	Macho
CA139	SRD	Urbano	Fêmea
CA140	SRD	Urbano	Macho

Amostra	Raça	Classificação do bairro	Sexo
CA141	SRD	Urbano	Macho
CA150	SRD	Rural	Fêmea
CA153	SRD	Rural	Fêmea
CA155	SRD	Rural	Fêmea
CA156	SRD	Rural	Macho
CA157	SRD	Rural	Fêmea
CA158	SRD	Rural	Macho
CA161	SRD	Rural	Macho
CA168	SRD	Rural	Fêmea
CA169	SRD	Rural	Macho
CA172	SRD	Rural	Macho
CA173	SRD	Rural	Macho
CA176	SRD	Rural	Macho
CA179	SRD	Rural	Macho
CA200	SRD	Rural	Fêmea
CA209	SRD	Rural	Fêmea
CA210	SRD	Rural	Fêmea
CA212	SRD	Rural	Macho

APÊNDICE 3 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO ESTUDO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 049/2016, referente ao projeto "Prevalência de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e soroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em animais domésticos (cães e equinos) do município de Cerro Azul, Paraná, Brasil", sob a responsabilidade de Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 2 de invasividade, em reunião de 06/07/2016.

Vigência do projeto	Agosto/2016 até Março/2018
Espécie/Linhagem	Cão e equídeo
Número de animais	350 (300 cães e 50 equídeos)
Peso/Idade	Não especificado
Sexo	Ambos
Origem	Ruas, casas e fazendas do município de Cerro Azul – PR.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 049/2016, regarding the project "Prevalence of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) and seroprevalence of anti-*Leishmania* sp. antibodies in domestic animals (dogs and horses) from the municipality of Cerro Azul, Paraná, Brazil" under Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 2 of invasiveness, in session of 06/07/2016.

Duration of the project	August/2016 until March/2018
Species/Line	Dog and equidae
Number of animals	350 (300 dogs and 50 equids)
Weight/Age	Not specified
Sex	Both
Origin	Streets, houses and farms in the municipality of Cerro Azul – PR.

Curitiba, 6 de julho de 2016.

Simone Tostes de Oliveira Stedile
Presidente CEUA-SCA

CAPÍTULO 4

PCR BIPLEX COMO FERRAMENTA PARA DIAGNÓSTICO DE *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* COM CONTROLE DE VIABILIDADE AMOSTRAL

Manuscrito a ser submetido para a Journal of Biotechnology na forma de “Short Communication”

PCR BIPLEX COMO FERRAMENTA PARA DIAGNÓSTICO DE *Leishmania* (*viannia*) *braziliensis* COM CONTROLE DE VIABILIDADE AMOSTRAL

RESUMO

Os métodos moleculares, dentre eles a PCR, para diagnóstico de doenças parasitárias vêm sendo amplamente utilizados por demonstrarem alta sensibilidade e rapidez na execução, além de ser empregado em vários tipos de amostras clínicas. O objetivo deste estudo foi padronizar a técnica de PCR Biplex para diagnóstico de *L. braziliensis* (*primers* B1/B2). Visando a avaliação da viabilidade amostral, *primers* PNOC foram utilizados na reação, que amplificam a região do gene da preponocceptina de mamíferos. Estes *primers* foram testados em conjunto, sob diferentes temperaturas de reação. A reação de PCR Biplex amplificou ambos os fragmentos. Face ao primeiro relato da utilização dos *primers* PNOC como controle de viabilidade de amostras de mamíferos, recomenda-se a técnica de PCR Biplex para inquéritos clínico-epidemiológicos em estudos de Leishmaniose Tegumentar Americana.

Palavras-chave: Leishmaniose, multiplex, padronização, PNOC.

ABSTRACT

Molecular methods, such as PCR for the diagnosis of parasitic diseases, have been widely used because of its high sensitivity and rapidity in execution, besides being used in several types of clinical samples. The objective of this study was to standardize a Biplex PCR technique for diagnosis of *L. braziliensis* (B1 / B2 *primers*). In order to evaluate the viability of the samples, PNOC *primers* were used in the reaction, that amplify a region of the mammals preponocceptin gene. These *primers* were tested together, under different reaction temperatures. The Biplex PCR reaction amplified both fragments. In face of the first report of PNOC *primers* use as viability control of mammalian samples, this technique is recommended for clinical-epidemiological surveys in studies of American Tegumentary Leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis, Multiplex, standardization, PNOC.

1 INTRODUÇÃO

A *Leishmania (Viannia) braziliensis*, está entre os principais agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar americana (LTA), a qual é uma das doenças emergentes e negligenciadas mais importantes (GATHERER, 2016). Até o momento não há um método diagnóstico “padrão-ouro” para pacientes humanos ou animais, o que limita o controle da doença, visto que a obtenção de diagnósticos precisos está intimamente relacionada ao controle da LTA (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015).

Devido às limitações apresentadas pelos métodos diagnósticos para essa doença, se fez necessário o desenvolvimento de ferramentas capazes de promover um resultado acurado em curto espaço de tempo. Sendo assim, os métodos moleculares têm sido desenvolvidos e empregados, com destaque para a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, como a PCR Multiplex (BAHK et al., 2004; PIRES et al., 2017). A PCR é capaz de detectar espécies de *Leishmania* diretamente de vários tecidos de humanos, animais e até insetos, combinando alta sensibilidade com especificidade do alvo (MARCUSSE et al. 2008; FAGUNDES et al. 2010; NEITZKE-ABREU et al. 2013, CONTER et al., 2015, 2017).

A PCR ainda permite a possibilidade de combinar múltiplos alvos no mesmo ensaio, dando origem a PCR multiplex ou biplex (de acordo com a quantidade de pares de *primers* utilizados). Com este método é possível identificar o parasito alvo e avaliar a integridade da amostra de DNA em uma mesma reação (PITA-PEREIRA et al., 2008; ALBUQUERQUE et al., 2014), assim como detectar várias espécies de *Leishmania* rapidamente, por meio da aplicação de vários *primers* específicos para diferentes alvos (CONTER et al., 2017). Essa é uma nova área para estudos nas leishmanioses e poucos foram os autores que buscaram viabilizar o diagnóstico para *Leishmania* spp. em mamíferos e avaliar a integridade da amostra em uma PCR multiplex (GONÇALVES et al., 2012; ALBUQUERQUE et al., 2014).

Vários alvos de DNA foram utilizados para detecção de *Leishmania* spp., incluindo DNA de cinetoplasto (kDNA). O kDNA consiste em um tipo de DNA mitocondrial que compreende dois componentes: os maxicírculos e os minicírculos. Os maxicírculos tem de 20 a 40 kb, estão presentes de 30 a 50 cópias e os minicírculos tem aproximadamente 850 pares de base (pb) e estão presentes em cerca de 10.000 cópias/ célula, representando cerca de 95 % do kDNA (RAY, 1987). Desde Brujin e Barker (1992), estudos têm demonstrado a importância deste alvo para a identificação e classificação das espécies de *Leishmania* spp. (TRUJILLO et al., 2008; CONTER et al., 2017; AKHOUNDI, 2017).

O controle de integridade amostral em uma reação de PCR visa a avaliação da qualidade do DNA obtido com a extração de DNA e/ou presença de inibidores nesta, que poderiam resultar em falsos-negativo (GONÇALVES et al., 2012; ALBUQUERQUE, 2014). Em uma PCR clássica, esse controle amostral é realizado separadamente da reação que visa a identificação do parasito, aumentando o tempo para definição do diagnóstico e os custos do processo (ALBUQUERQUE, 2014). Sendo assim, uma PCR Biplex, amplifica simultaneamente dois fragmentos alvo de DNA na mesma reação e pode ser utilizada visando o diagnóstico de uma espécie de *Leishmania*, utilizando como controle um gene mamífero para reduzir a possibilidade de resultado falso-negativo. Neste estudo, foi padronizado um ensaio de PCR Biplex, específico para *L. braziliensis*, onde foi identificado, além do fragmento de kDNA (750 pb) do parasito, uma sequência do gene Prepronociceptina (PNOC-330pb) de mamífero. A utilização dos *primers* PNOC é uma potencial ferramenta para controle de qualidade de amostras de mamíferos em tecido e sangue.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para realização da PCR Biplex foi utilizado DNA de amostra de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904) mantida no Laboratório de Parasitologia Molecular da UFPR e cultivada a 24°C em meio NNN e utilizado como controle positivo para amplificação dos primers B1/B2. Como controle positivo para os primers PNOC, o DNA proveniente de sangue de cão (*C. familiaris*) oriundo de Cerro Azul, Paraná, e negativo para LTA foi utilizado.

O par de primers B1/B2 amplifica uma região do kDNA (cinetoplasto) de *L. braziliensis*, resultando em um fragmento de DNA de 750 pb (BRUJIN & BARKER, 1992). Já os primers PNOC (HAOUAS et al., 2007), amplificam uma região de 330 pb, do gene preponociceptina comum a 64 espécies de mamíferos, e alvo em estudos filogenéticos de mamíferos (MOLLEREAU et al., 1996; MURPHY et al., 2001) (TABELA 1).

TABELA 1 – INFORMAÇÕES REFERENTES AOS PARES DE PRIMERS

Organismo	Primer senso	Primer antisenso	Tamanho do fragmento	Referência
<i>Leishmania</i> sp. kDNA (B1/B2)	5'GGGGTTGGTG TAATATAGTGG3'	5'CTAATTGTG CACGGGGAGG3'	750 pb	Brujin & Barker, 1992
Preponociceptina (PNOC)	5'GCATCCTTGAG TGTGAAGAGAA3'	5'TGCCTCATAAA CTCACTGAACC3'	330 pb	Haouas et al., 2007

Para extração de DNA genômico, foi utilizado o protocolo à base de tampão de lise TELT (Tris-HCl 1 M pH 8,0; EDTA 0,5M pH 9,0; LiCl (P.M. 42,39) 5M; Triton X-100) (HONG et al., 1995), com adições de soluções de fenol e clorofórmio. Aproximadamente 100 milhões (1×10^8) de parasitos *L. braziliensis* inoculados em 100 µL de sangue de mamífero foram submetidas à extração de DNA. As amostras foram quantificadas em Thermo Scientific NanoDrop 2000/2000c Espectofotômetro e padronizadas para a concentração 10 ng/mL. As reações de PCR foram realizadas em Thermo Scientific Veriti 96-Well Termociclador.

Para a PCR Biplex foi feita uma reação de 25 uL em microtubos de 0.2 mL, contendo 2,5 uL/amostra de 10x buffer [500 mM KCl, 200 mM Tris (pH 8.4)], 2,5 pmol de cada desoxinucleotídeo trifosfato, 1 uL/amostra (50 mM MgCl₂), 0,3 uL/amostra de cada um

dos *primers* B1/B2 e PNOC diluídos a 10 pmol/uL, e 0,3 uL de Taq DNA polimerase recombinante (Thermo Fisher Scientific, 5 U/uL).

Diferentes temperaturas de anelamento foram testadas em várias reações desde 54°C a 60°C. Várias concentrações totais de DNA da reação: 120 ng, 80 ng, 60 ng, 40 ng e 20 ng; equivalentes respectivamente a 60 ng, 40 ng, 30 ng, 20 ng e 10 ng de cada controle positivo dos *primers* foram testadas.

Cinco microlitros do produto de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em TBE (89 mM de Tris borato e 2 mM de EDTA) e revelado em solução de 20 mg/ml de brometo de etídeo. Marcador molecular de 100 pares de base (GibcoBRL Life Technologies, USA) foi empregado na eletroforese. Os fragmentos de DNA esperados no produto de PCR apresentavam 750 pb (B1/B2) e 330 pb (PNOC).

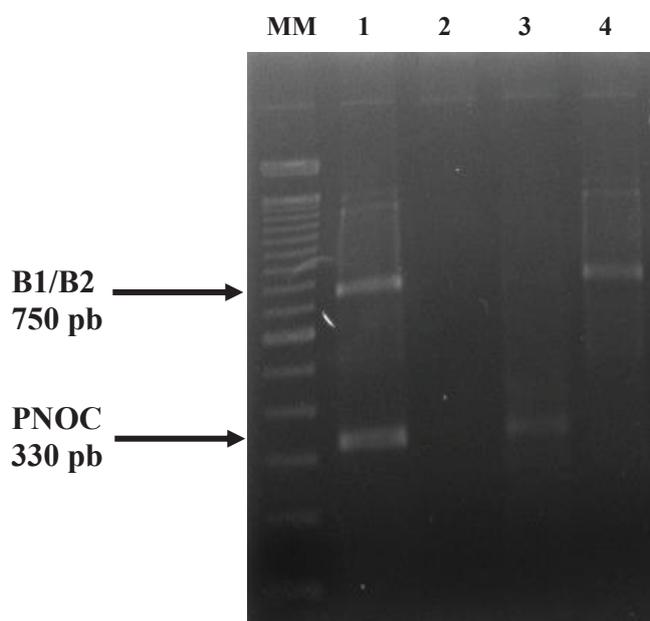
3 RESULTADOS

Este é o primeiro relato do emprego dos iniciadores PNOC para controle de integridade amostral em amostras clínicas para diagnóstico de LTA.

A reação de PCR com melhor resultado apresentou o seguinte delineamento: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, finalizando com uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Foi possível a amplificação de ambos os pares de primers na mesma reação (B1/B2 e PNOC) (FIGURA 1). Contudo a sensibilidade de cada um dos primers analisados foi distinta. A amplificação do fragmento de B1/B2 foi possível em todas as concentrações testadas (60 ng, 40 ng, 30 ng, 20 ng e 10 ng) de DNA controle. Quanto ao fragmento amplificado pelos primers PNOC, foi possível a amplificação nas concentrações totais de DNA 60 ng, 40 ng, 30 ng, e 20 ng.

FIGURA 1 – PCR BIPLEX COM PRIMERS B1/B2 E PNOC.



1- Controle com ambos pares de *primers* B1/B2 e PNOC (20 ng de DNA de *L. braziliensis* e 20 ng de DNA de mamífero). 2- Controle negativo (água). 3- Controle PNOC com 20 ng de DNA de mamífero. 4- Controle B1/B2 com 10 ng de DNA de *L. braziliensis*. 5- Controle com ambos pares de *primers* (10 ng de DNA de *L. braziliensis* e 20 ng de DNA de mamífero). 6- Controle negativo (água).

4 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi possível a amplificação e identificação dos dois pares de *primers* testados. No entanto, a extração de ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas é um passo crítico e pode resultar na perda de DNA alvo (MUMMY & FINDLAY, 2004), uma vez que vários fatores podem afetar a sensibilidade dos ensaios de PCR. O uso de uma sequência de DNA como controle de viabilidade e integridade amostral, pode revelar possíveis perdas de material genético durante os processos, diminuindo assim, a chance de resultados falso-negativos (ALBUQUERQUE, 2014).

Outro fator determinante para o diagnóstico da LT em uma amostra clínica seja (biopsia ou sangue) de humano ou cão, é a quantidade de DNA de *Leishmania* spp. O número de parasitos pode variar em função do decurso da doença e nem sempre é possível precisar se um resultado negativo para o parasito foi de fato negativo (BRUSCHI & GRADONI, 2018). Devido a isso, apenas a associação de técnicas diagnósticas, tais como a PCR, qPCR, cultivo celular e sorologia, podem conferir uma maior sensibilidade à essa doença (SANTOS et al., 2010; ANJOS et al., *in prep*).

Foi possível a observação durante os testes de uma diferença de sensibilidade dos pares de *primers*. O par B1/B2 amplificou mesmo com a utilização de 10 ng totais de DNA de *L. braziliensis*, enquanto o par PNOC não amplificou com a mesma concentração, corroborando com a afirmação de Polz e Cavanaugh (1998) e Henegariu et al. (1997), que afirmaram que a sensibilidade pode ficar comprometida com o uso de mais de um par de primer em uma mesma reação.

Geralmente os protocolos de PCR avaliam a qualidade da amostra em reações separadas, aumentando os custos e as chances de resultados falso-negativos. A PCR Biplax utilizada nesse estudo, visou a obtenção de dois fragmentos de DNA distintos em apenas uma reação de PCR, resultando em uma economia de reagentes e diminuição do tempo para diagnóstico definitivo. Além disso, este método pode ser adaptado para qualquer doença infecciosa, que o diagnóstico por via molecular esteja disponível. Trata-se assim do primeiro relato do emprego dos *primers* PNOC como controle de viabilidade amostral em diagnóstico de *L. braziliensis*.

Dessa forma, recomenda-se este protocolo como ferramenta rápida e segura para inquéritos clínico-epidemiológicos em estudos com Leishmaniose Tegumentar Americana.

5 REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, M.; DOWNING, T.; VOTÝPKA, J.; KUHLS, K.; LUKEŠ, J.; CANNET, A.; RAVEL, C.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; KASBARI, M. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. **Mol Asp Med**; v.57, p.1–29, 2017.
- ALBUQUERQUE, S.C.G. Otimização de ferramentas moleculares baseadas em multiplex PCR para inclusão de controles de qualidade amostral no diagnóstico das leishmanioses. **Dissertação de mestrado**. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2014.
- BAHK, Y.Y.; KIM, S.A.; KIM, J.S.; EUH, H.J.; BAI, G.H. Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis*: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. **Proteomics**; v.4, p.3299–3307, 2004.
- BRUIJN, M.H.; BARKER, D.C. Diagnosis of new world leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Trop**; v.52(1), p.45–58, 1992.
- BRUSCHI, F.; GRADONI, L. **The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases**. Springer International Publishing. p.107–125. Print, 2018.
- CONTER, C.C.; LONARDONI, M.V.C.; ARISTIDES, S.M.A.; CARDOSO, R.F.; SILVEIRA, T.G.V. New primers for the detection *Leishmania* species by multiplex polymerase chain reaction. **Parasitol Res**, 2017.
- CONTER, C.C.; NEITZKE-ABREU, H.C.; PEDROSO, R.B.; LONARDONI, M.C.V.; SILVEIRA, T.G.V.; ARISTIDES, S.M.A. Detection of *Leishmania (Viannia)* DNA in leucocytes from the blood of patients with cutaneous leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**; v.48(5), p.626–628, 2015.
- FAGUNDES, A.; SCHUBACH, A.; PAULA, C.C.; BOGIO, A.; ANTONIO, L.F.; SCHIAVONI, P.B.; MONTEIRO, V.D.E.S.; MADEIRAMDE, F.; QUINTELLA, L.P.; VALETE-ROSALINO, C.M.; VASCONCELLOS, E.D.E.C.; AZEREDO-COUTINHO, R.B.; PACHECO, R.S.; MARZOCHI, M.C.; MARZOCHI, K.B. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v.105(1), p.109–112, 2010.
- GATHERER, D. 5 emerging infectious diseases to watch out for in 2017, 2016. Disponível em: <<http://www.asiaone.com/health/5-emerging-infectious-diseases-watch-out-2017>>. Acesso em: 10 dez 2017.
- GONÇALVES, S.; SILVA, C.R.; BRITO, M.; FILHO, S.B.; CAVALCANTI, M.P. Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of leishmaniasis. **J Ven Ani Tox Incl Trop Dis**; v.18, p.188–197, 2012.

HAOUAS, N.; PESSON, B.; BOUDABOUS, R.; DEDET, J.P.; BABBA, H.; RAVEL, C. Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. **Am J Trop Med Hyg**; v.77, p.1054-1059, 2007.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N.A.; DLOUHY, S.R.; VANCE, G.H.; VOGT, P.H. Multiplex-PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques**; v.23, p.504-511, 1997.

HONG, Y.; KIM, S.; FULLER, M.P.; GIBOR, A. *Porphyra perforata* using. **Six Int Sea Symp**; v.7, p.101-107, 1995.

MARCUSSI, V. M. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: New primers for identification using polymerease chain reaction. **Exp Parasitol**; New York, v. 120, p.300-305, 2008.

MOLLEREAU, C.; SIMONS, M.J.; SOULARUE, P.; LINERS, F.; VASSART, G.; MEUNIER, J.C. Structure, tissue distribution and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. **Proc Natl Acad Sci**; v.3, p.8666-8670, 1996.

MUMY, K.L.; FINDLAY, R.H. Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and quantitative competitive PCR. **J Micro Meth**; v.57(2), p.259-268, 2004.

MURPHY, W.J.; EIZIRIK, E.; O'BRIEN, S.J.; MADSEN, O.; SCALLY, M.; DOUADY, C.J. Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics. **Science**; v.294, p.2348-2351, 2001.

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

PAIVA-CAVALCANTI, M.P.; MORAIS, R.C.S.; SILVA, R.P.; SILVA, L.A.M.T.; ALBUQUERQUE, S.C.G.; TAVARES, D.H.C.; CASTRO, M.C.A.B.; SILVA, R.F.E.; PEREIRA, V.R.A. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. **Cell Bio**, 2015.

PIRES, R.C.; MELO, M.D.F.A.D.; BARBOSA, R.H.; ROQUE, A.L.R. Multiplex PCR as a tool for the diagnosis of *Leishmania* spp. KDNA and the gapdh housekeeping gene of mammal hosts. **Plos One**; v.12, 2017.

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M.A.B.; ALVES, C.R.; BRAZIL, R.P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Trop**; v.107, p.66-69, 2008.

POLZ, M. F.; CAVANAUGH, C. M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. **Appl Env Micro**; Lion, v.64, p.3724-3730, 1998.

RAY, D. S. Kinetoplast DNA minicircles: high-copy-number mitochondrial plasmids. **Plasmid**; v. 17, n. 3, p. 177-190, 1987.

SANTOS, J.M.L.; DANTAS-TORRES, F.; MATTOS, M.R.F.; LINO, F.R.L.; ANDRADE, L.S.S.; SOUZA, R.C.A.; BRITO, F.L.C.; BRITO, M.E.F.; BRANDÃO-FILHO, S.P.; MATTOS, L.S. Prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* spp em cães de Garanhuns, Agreste de Pernambuco. **Rev Soc Bras Med Trop**; v.43, p.41-45, 2010.

TRUJILLO, A.V.; REINA, A.E.G.; CABRERA, O. L.; SANTAMARIA, E.; ALVAREZ, L. S.B.; ORJUELA, A.G. Identificación de *Leishmania (Viannia) guyanensis* en caninos, en zona rural del municipio de Villavicencio, Meta, Colombia. **Rev Orin (Villavicencio)**; v.12, 2008.

CAPÍTULO 5

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Leishmania braziliensis*
(KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) DE LESÃO CICATRIZADA EM
ORELHA DE *Canis lupus familiaris*

Manuscrito a ser submetido para Journal of Infectious Diseases no formato de “Brief Report”

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Leishmania (Viannia) braziliensis*
(KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) DE LESÃO CICATRIZADA EM
ORELHA DE *Canis lupus familiaris***

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma das mais importantes doenças negligenciadas que acomete humanos e animais. A detecção de DNA e a persistência de parasitos viáveis em cicatrizes já foram descritas em humanos. Este estudo relata o isolamento e caracterização de *L. braziliensis* de uma cicatriz na orelha de um cão. Após biópsia foi realizado o cultivo celular de promastigotas e para a identificação utilizou-se eletroforese isoenzimática. Esse estudo reforça que a persistência e a viabilidade de parasitos em cicatrizes não são restritas apenas à humanos. A persistência do parasito em cicatrizes sugere um potencial risco para a transmissão do parasito ao vetor, mesmo quando cicatrizadas.

Palavras-chave: Leishmanioses, promastigotas, biópsia, cão doméstico, Saúde Pública

ABSTRACT

The American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is one of the most neglected diseases, that afflicts humans and animals. The DNA detection and the persistence of viable parasites in scars have already been described in humans. This study presents the isolation and characterization of *L. braziliensis* from a scar in a dog's ear. After the biopsy, promastigotes cell culture and isoenzyme electrophoresis for identification of the parasites were realized. This study reinforces that the persistence and feasibility of parasites in scars are not restricted to humans. The persistence of the parasite in scars, is a potential risk for transmission of the parasite to the vector, even when the lesion is healed.

Keywords: Leishmaniasis, promastigotes, biopsy, dog, Public Health.

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma antropozoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) que infectam o hospedeiro vertebrado após o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectados (Diptera: Psychodidae). A LTA é considerada uma das três mais importantes doenças tropicais negligenciadas causadas por protozoários (FENWICK et al., 2012; BRUSCHI & GRADONI, 2018).

A LTA humana pode se apresentar de forma subclínica, ou exibir diversos espectros clínicos, desde lesões cutâneas localizadas e potencialmente auto-limitantes, até lesões severas mutilantes em mucosas e lesões nodulares difusas (BRUSCHI & GRADONI, 2018). Nos cães, esta doença apresenta uma evolução crônica e geralmente gera lesões localizadas em pele, mucosas e estruturas cartilaginosas, em decorrência da infecção das células do sistema fagocítico mononuclear parasitadas pelas formas amastigotas (SASANI et al., 2016).

Na LTA humana, a persistência de *Leishmania* após o tratamento e cura clínica, já foi relatado onde a presença de DNA do parasito foi descrita em sangue periférico (DELGADO et al., 1996; MENDONÇA et al., 2004; CAMERA et al., 2006) e parasitos viáveis foram isolados de cicatrizes de pacientes (MENDONÇA et al., 2004; SCHUBACH et al., 1998; 2001; GOMES et al., 2013).

Este estudo apresenta um relato do isolamento de *Leishmania (Viannia) braziliensis* viáveis proveniente de uma lesão cicatrizada em cão (*Canis lupus familiaris*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO E PACIENTE

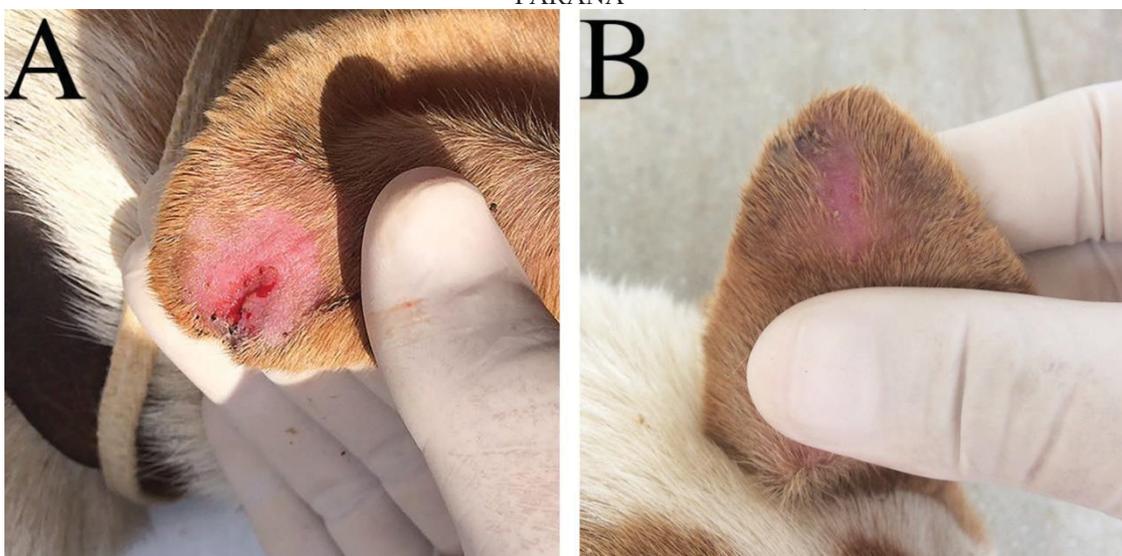
Um cão macho de 2 anos de idade, com porte grande e sem raça definida, apresentou ferida ativa sugestiva de LTA em pavilhão auricular interno. Este cão é residente de Cerro Azul – PR, uma área endêmica para LTA humana, com uma taxa de incidência média por ano de 123 casos/100.000 habitantes nos últimos 16 anos. Essa região é localizada a 90 km de distância de Curitiba, a capital do estado do Paraná, Brasil.

No dia 06/04/2017 foi realizado biópsia em ferida ativa (FIGURA 1A) e no dia 09/05/2017 na ferida já cicatrizada (FIGURA 1B).

2.2 PROCEDIMENTOS

O cão foi levemente sedado com acepromazina (0.1 mg/kg) e cetamina (15 mg/kg). Antes da biópsia, as lesões foram assepsiadas com solução de clorexidina (2%) e álcool 70%. Anestesia local com lidocaína (0.2%) foi utilizada, e por meio de punch de biópsia descartáveis, foram coletados fragmentos de pele da borda da ferida, e esses foram alocados em microtubos de 2 ml contendo solução salina 0.9% suplementada com antibiótico (10.000 U/ml penicilina-estrptomomicina) e antifúngico (50 mg/mL 5-fluorocitosina).

FIGURA 1 – LESÃO SUSPEITA (ORELHA ESQUERDA) PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA DE UM CÃO (*C. familiaris*) PROVENIENTE DE CERRO AZUL, PARANÁ



A) ferida ativa biopsiada em 06/04/2017; B) cicatriz biopsiada em 09/05/2017. FONTE: O autor (2017).

No laboratório de Parasitologia Molecular de Universidade Federal do Paraná as amostras foram lavadas com antibiótico (10.000 U/mL penicilina-estrptomomicina) e antifúngico (50 mg/mL 5-fluorocitosina), e maceradas em aproximadamente 1,2 ml de solução salina 0,9% suplementada com antibiótico. Após essa etapa, cada fragmento macerado era distribuído em dois tubos com meio NNN (Novy, Neal Nicole), e esses foram incubados em 24°C durante 30 dias. Os tubos eram analisados semanalmente para visualização de formas promastigotas (FIGUEIREDO et al., 2008). Além do cultivo, foi realizada a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) como técnica complementar ao cultivo. Para caracterização foi realizar eletroforese isoenzimática utilizando cinco sistemas enzimáticos (MADEIRA et al., 2006).

Todo procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, sob número de protocolo 049/2016.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No cultivo e PCR da ferida ativa animal foi negativo para a presença de *Leishmania*. Quando a ferida se apresentou cicatrizada promastigotas desse parasito foram isoladas os quais foram identificados por eletroforese isoenzimática como *L. braziliensis*. Massunari et al. (2009), também relataram o diagnóstico negativo de animais com sintomatologia clínica para LTA, por meio de método molecular e parasitológico. A distribuição irregular de parasitos nas feridas, associado com a baixa densidade de leishmânias nas lesões, podem ser os fatores responsáveis pela diminuição da sensibilidade desses métodos de diagnóstico (MASSUNARI et al., 2009).

A infecção por *L. braziliensis* é caracterizada por cronicidade, latência e a tendência por metastatizar em mucosas (MENDONÇA et al., 2004). Alguns autores questionaram se esses parasitos realmente desapareciam das feridas após a cura clínica da LTA (MENDONÇA et al., 2004; SARAVIA et al., 1990).

Em humanos, o isolamento de espécies de *Leishmania* provenientes de cicatrizes já foi descrito (MENDONÇA et al., 2004; SCHUBACH et al., 1998, 2001; GOMES et al., 2013; SARAVIA et al., 1990; GUEVARA et al., 1993; AEBISCHER, 1994). Schubach et al. (1998) isolaram *L. braziliensis* viáveis após 11 anos da cura clínica por tratamento com antimonial.

Em cães Pirmez et al. (1988) conseguiram isolar parasitos de uma lesão cicatrizada, um mês após o tratamento com antimonial.

O presente estudo relata pela primeira vez o isolamento de *L. braziliensis* de uma cicatriz proveniente de um cão naturalmente infectado e não tratado para LTA.

As consequências para a persistência de espécies de *Leishmania* dermatrópicas em feridas ainda é desconhecido, e mais estudos sobre viabilidade e persistência desses parasitos em cicatrizes de cães são necessários. Entretanto, com base na literatura de clínica humana e veterinária sobre o isolamento de parasitos em cicatrizes, sugere-se que a persistência desses em feridas cicatrizadas não são exceções, e sim a regra em casos de LTA.

A demonstração da persistência e viabilidade parasitária em cicatrizes de cães levantam questões sobre o controle da doença e sua evolução clínica. É importante investigar se cães clinicamente curados, mas imunocomprometidos possam atuar como possíveis reservatórios do parasito em áreas endêmicas. Esses achados sugerem um potencial risco à saúde pública por meio da transmissão do parasito ao vetor mesmo após a cura clínica.

4 REFERÊNCIAS

AEBISCHER, T. Recurrent cutaneous leishmaniasis: a role for persistent parasites? **Parasitol Today**; v.10, p.25–28, 1994.

BRUSCHI, F & GRADONI, L. **The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases**. 1st ed. Switzerland: Springer International Publishing, 2018.

CAMERA, P.O.; JUNGER, J.; PIRES, F.E.S.S.; MATTOS, M.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; FERNANDES, O.; PIRMEZ, C. Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**; v.100(12), p.1112–1117, 2006.

DELGADO, O.; GUEVARA, P.; SILVA, S.; BELFORT, E.; RAMIREZ, J.L. Follow-up of a human accidental infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis* using conventional immunologic techniques and polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg**; v.55, p.267–72, 1996.

FENWICK, A. **The global burden of neglected tropical diseases**. *Public Health*; v.126, p.233–6, 2012.

FIGUEIREDO, F. B.; GREMIÃO, I. D.F.; PEREIRA, S.A.; FEDULO, L.P.; MENEZES, R.C.; BALTHAZAR, D.A.; SHULBACH, T.M.P.; MADEIRA, M.F. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**; v.102(2), p.200–201, 2008.

GOMES, C.M.; DAMASCO, F.S.; MORAIS, O.O.; PAULA, C.D.R.; SAMPAIO, R.N.R. Recurrent cutaneous leishmaniasis. **Anais Bras Dermatol**; v.88(3), p.462–464, 2013.

GUEVARA, P., RAMIREZ, J. L., ROJAS, E., SCORZA, J.V., GONZALEZ, N., ANEZ, N. *Leishmania braziliensis* in blood 30 years after cure. **Lancet**; v.341, p.1341, 1993.

MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T.M.P.; PEREIRA, S.A.; FIGUEIREDO, F.B.; BAPTISTA, C.; LEAL, C.A.; MELO, C.X.; CONFORT, E.M.; MARZOCHI, M.C.A. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. **Vet Parasitol**; v.138, p.366–370, 2006.

MASSUNARI, G.K.; VOLTARELLI, E.M.; SANTOS, D.R.; SANTOS, A.R.; POIANI, L.P.; DE OLIVEIRA O.; VIOLATO, R.J.; MATSUO, R.; TEODORO, U.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V. A serological and molecular investigation of American cutaneous leishmaniasis in dogs, three years after an outbreak in the Northwest of Paraná State, Brazil. **Cad Saúde Pública**; v.25, n.1, p.97–104, 2009.

MENDONÇA, M.G.; DE BRITO, M.E.F.; RODRIGUES, E.H.G.; BANDEIRA, V.; JARDIM, M.L.; ABATH, F.G.C. Persistence of *Leishmania* Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure? **J Inf Dis**; v.189(6), p.1018–1023, 2004.

PIRMEZ, C.; COUTINHO, S.G.; MARZOCHI, M.C.A.; NUNES, M.P.; GRIMALDI JR, G. Canine American Cutaneous Leishmaniasis: A Clinical and Immunological Study in Dogs Naturally Infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an Endemic Area of Rio de Janeiro, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**; v.38, p.52-58, 1988.

SARAVIA, N.C.; WEIGLE, K.; SEGURA, I.; GIENNINI, S.H.; PACHECO, R.S.; LABRADA, L.A.; GONCALVES, A. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection - reactivation or reinfection? **Lancet**; v.336, p.398-402, 1990.

SASANI, F.; JAVANBAKHT, J.; SAMANI, R.; SHIRANI, D. Canine cutaneous leishmaniasis. **J Parasit Dis**; v.40, p.57-60, 2016.

SCHUBACH, A.; CRUZZI-MAIA, T.; OLIVEIRA, A.V.; SARTORI, A.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; MATTOS, M.S.; ARAÚJO, M.L.; SOUZA, W.J.S.; HADDAD, F.; PEREZ, M.A.; PACHECO, R.S.; MOMEM, H.; COUTINHO, S.G.; MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F.; DA COSTA, S.C.C. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v.96, n.7, p.987-996, 2001.

SCHUBACH, A.; MARZOCHI, M.C.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A.V.; ARAUJO, M.L.; OLIVEIRA, A.L.; PACHECO, R.S.; MOMEN, H.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; COUTINHO, S.G.; MARZOCHI, K.B. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. **Am J Trop Med Hyg**; v.58, p.824-7, 1998.

CONCLUSÃO GERAL

- Os casos de LTA no estado do Paraná estão relacionados, principalmente, ao sexo masculino, as faixas etárias de 20 a 59 anos, em zona urbana de áreas quentes e secas.
- Observou-se a prevalência de 2% (4/198) para LTA canina, utilizando os três métodos de diagnóstico, com soroprevalência de 53%, sendo que somente um indivíduo foi positivo para todas as técnicas.
- A espécie relacionada com os casos de LTA canina em Cerro Azul é *L. braziliensis*.
- O protocolo de PCR Biplax foi padronizado para detecção de *L. braziliensis* com um controle de viabilidade.
- A persistência e viabilidade em feridas cicatrizadas de *L. braziliensis* foi detectada em ferida cicatrizada de cão.

PERSPECTIVAS

Como fechamento desta dissertação, foi traçado o perfil dos casos de LTA humana no estado do Paraná, ocorrendo principalmente em homens em idade ocupacional, residentes em área urbana de locais quentes e secos, diferindo de boa parte dos relatos na literatura. No entanto, o estudo de flebotomíneos e reservatórios sinantrópicos são necessários para melhor entendimento do ciclo epidemiológico da LTA no estado, visto que tanto os humanos quanto os cães não são responsáveis pela manutenção do parasito na natureza.

Em Cerro Azul, um dos principais municípios acometidos pela LTA em humanos no estado do Paraná, observou-se alta soroprevalência de anticorpos contra o parasito em cães, ou seja, os cães também estão servindo para o repasto sanguíneo dos flebotomíneos e consequentemente entrando em contato com o parasito, fato que, pode estar acontecendo em outras regiões do estado. Contudo, mais estudos epidemiológicos sobre a LTA em cães e a fauna de flebotomíneos são necessários.

A utilização de um controle de viabilidade amostral, sendo este, o gene *prepronociceptina* constitui uma valiosa e inédita ferramenta para uso em ensaios epidemiológicos, podendo ser adotado para diagnósticos de outras doenças e não só a LTA.

Por fim, os relatos de demonstração da persistência e viabilidade parasitária em feridas curadas de humanos, juntamente com o achado do capítulo 5, a reagudização de uma ferida cicatrizada de cão, reforçam a hipótese que a cura clínica das lesões de LTA não é estéril. Apesar disso, mais ensaios controlados em laboratório abordando o isolamento de parasitos em cicatrizes devem ser realizados.