

MINISTÉRIO DA SAÚDE

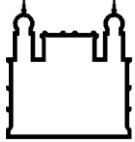
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em MEDICINA TROPICAL

**ESTUDO DO CICLO DE TRANSMISSÃO SILVESTRE E  
SUBURBANO DE *Leishmania (Viannia) panamensis* NA COLÔMBIA:  
AVALIAÇÃO DO PAPEL DE *Didelphis marsupialis*  
(Didelphimorphia) E *Canis familiaris* (Carnívora) COMO  
POTENCIAIS RESERVATÓRIOS**

LINA MARIA CARRILLO BONILLA

Rio de Janeiro  
Março de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

*LINA MARIA CARRILLO BONILLA*

ESTUDO DO CICLO DE TRANSMISSÃO SILVESTRE E SUBURBANO DE *Leishmania panamensis* NA COLÔMBIA: INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DE *Didelphis marsupialis* (Didelphimorphia) E *Canis familiaris* (Carnivora) COMO POTENCIAIS RESERVATÓRIOS

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Ciências

**Orientador (es):** Prof. Dr. Elisa Cupolillo  
Prof. Dr. Ivan Dario Velez

RIO DE JANEIRO

Março 2017

Bonilla, Lina Maria Carrillo.

ESTUDO DO CICLO DE TRANSMISSÃO SILVESTRE E SUBURBANO DE *Leishmania (Viannia) panamensis* NA COLÔMBIA: AVALIAÇÃO DO PAPEL DE *Didelphis marsupialis* (*Didelphimorphia*) E *Canis familiaris* (*Carnívora*) COMO POTENCIAIS RESERVATÓRIOS / Lina Maria Carrillo Bonilla. - Rio de Janeiro, 2017.

261 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Orientadora: Elisa Cupolillo.

Co-orientador: Iván Dario Vélez .

Bibliografia: f. 146-163

1. Leishmanioses . 2. Reservatório. 3. Gambá. 4. Cães. 5. Colômbia. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Aos meus pais Lilian Bonilla e Jaime Carrillo, que são minha razão de ser, a meu irmão Gabriel e minha sobrinha Valentina, a felicidade tem seus nomes.**

**Para meu amor, amigo, companheiro da vida, Juan Carlos e nossa Rufamilia.**

**Para meu anjo, minha avó Graciela e meu anjinho Amelia**

**Para mis padres Lilian Bonilla y Jaime Carrillo, que son mi razón de ser, a mi hermano Gabriel y mi sobrina Valentina, la felicidad tiene sus nombres.**

**Por mi amor, amigo y compañero de vida Juan Carlos y nuestra Rufamilia.**

**Para mi ángel mi ab<sup>4</sup>uelita Graciela y mi angelito Amelia**

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Elisa Cupolillo pela, disponibilidade de se aventurar neste projeto, de me apoiar na ideia de fazer algo diferente, não obstante as limitações e o trabalho que poderia lhe trazer. Muito obrigada professora por me ajudar a cumprir meu sonho.

À Ivan Dario Velez (diretor do Programa de Estudio y Control de las Enfermedades Tropicales –PECET-) que contribuiu de forma decisiva na minha formação, desde o mestrado até este momento. A forma como abordo os problemas científicos me foi ensinado por você.

Ao chefe do Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses (LPL) Renato Porrozi por seu acolhimento.

À Martha Suárez Mutis coordenadora da pós-graduação pela revisão do texto, a paciência e compressão.

À Sara Robledo professora e pesquisadora do PECET pela disponibilidade, competência, generosidade e especialmente por sua amizade.

À Mariana Boité minha colega que se tornou minha amiga e guia. Não existem as palavras para agradecer tudo o que você fez por mim. Tem gente que chega a sua vida e muda ela para sempre.

À Andres Velez, Horacio Cadena e Juan Estaban Perez pela imensa e dedicada contribuição no trabalho com os animais silvestres.

À Patricia Cuervo, Sandra Vargas e Natalia Souza por me oferecer sua casa como se fosse a minha, e nesse calor familiar fornecer uma linda e duradoura amizade. Precisei muito de essa familiaridade que consegui com vocês, obrigada sempre.

À Andres Montoya, Gustavo Blandon, Carlos Montoya, Amanda Cavalcanti pela complicitade e valiosa contribuição na padronização da PCR e PCR em tempo real.

À Luz Adriana Acosta e Karina Mondragon, pela especial amizade e valorosa contribuição nas coletas e identificação dos insetos em Choco (Colombia). Viraram de ser minhas “filhas” para ser grandes amigas.

À Omar Cantillo do laboratório de Biología y Control de la Enfermedades Infecciosas – BCI-, Samantha Cristina de Chagas Xavier e Ana Jansen do Laboratório de Biología de Tripanosomatídeos e pelo carinho e auxílio indispensável na realização das IFAT.

As irmãs da vida Diana Tobon, Sandra Aguilar e Erika Loaiza por persistir nesta amizade apesar da distância e o abandono, nos “momentos de dificuldades” são nestas horas que reconhecemos os verdadeiros amigos. Obrigada por ser verdadeiras amigas.

As comunidades de Acandí, Chocó e Puerto Valdivia, Antioquia por sua disposição, paciência e amor.

Aos funcionários de saúde nas áreas de estudo tanto por sua valiosa ajuda quanto por seu trabalho generoso, silencioso e pouco reconhecido mas fundamental para as comunidades e o desenvolvimento do país.

Aos colegas do laboratório e amigas, Natalia Alvarez, Maria Fernanda Florez, Eugenia Cardona, pelo poio em todo momento, seu carinho e amizade sempre presente.

À todos os Colegas do Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses Camila Braga, Caroline Batista, Fernanda Morgano, Luiza Pereira, Gabriel Ferreira, Erika Costa, Andres Rodriguez, Monica Losada. Aos pesquisadores e todos os amigos do laboratório PECET e LPL. Comunidade de cientistas cheios de sonhos e todos dispostos a colaborar, faz mais fácil o caminho do doutorado.

À Babarela por estar viva e seguir espalhando sua energia maravilhosa, suas palavras mágicas conseguiram me tranquilizar nos momentos de desespero.

À toda minha família Bonilla, minhas tia Fabiola, Mercedes, Gloria e Alcira, meus primos e seus filhos que sempre acompanharam a minha trajetória e acreditaram em mim. Todo meu amor para vocês

À Patricia Montoya ela foi o sol na escuridão, devo a você as coisas essenciais que eu tenha que aprender neste doutorado, agradecida por sempre.

Finalmente agradeço a vida por me dar esta grande oportunidade de viver a grandeza do povo Brasileiro

***“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.  
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”***Antoine de Saint-Exupéry  
***“É tentando o impossível como se consegui o possível”***

Henry Barbusse

ESTUDO DO CICLO DE TRANSMISSÃO SILVESTRE E SUBURBANO DE *L. panamensis* NA COLÔMBIA: INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DE *Didelphis marsupialis* E *Canis familiaris* COMO POTENCIAIS RESERVATÓRIOS

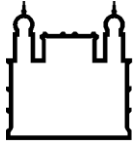
RESUMO

DISSERTAÇÃO TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Lina Maria Carrillo Bonilla

O conhecimento dos reservatórios de *Leishmania* spp. é chave para seu controle. O trabalho teve como alvo a avaliação do papel de *Didelphis marsupialis* e *Canis familiaris* como potenciais reservatórios de *L. panamensis* no ciclo silvestre e suburbano, na Colômbia. Amostras de sangue e pele foram coletadas dos animais. Realizamos isolamento do parasito da lesão e teste de Montenegro na população humana, PCR com Hsp70, eletroforese de isoenzimas, tipagem por sequências multilocus, e carga parasitária por qPCR, assim como xenodiagnóstico. Um total de 675 amostras foi obtido, incluindo 27 isolados de lesões de pacientes e três de gambás, identificadas como *L. panamensis*. O teste de Montenegro demonstrou a endemicidade da doença, 67/233 (29%) na área silvestre e 61/143 (43%) na área suburbana. Os títulos de anticorpos em cães por IFI foram de 21% na área suburbana e 28% na área silvestre. Os resultados da PCR demonstraram uma alta positividade para ambas as espécies, com aproximadamente 40% na área suburbana e 3% na área silvestre. O sequenciamento de hsp70 e de outros genes identificou a *L. panamensis* como a única espécie infectante. A carga parasitária foi medida, tendo como alvos DNAPol e ssRNA. Para a área silvestre, as médias foram muito baixas para as duas espécies, de maneira contrária à área suburbana. Em um total de 13 xenodiagnósticos, nenhum dos animais foi positivo por microscopia, no entanto seis de oito cães foram positivos por PCR dos insetos usados no xenodiagnóstico. Além de caracterizar o perfil epidemiológico, o presente estudo aplicou métodos moleculares para a tipagem genética das cepas de *L. panamensis* nas diferentes áreas de estudo, indicando elevada homogeneidade genética. O mesmo foi observado nas análises da estrutura populacional, que identificaram só dois complexos clonais com a maioria das cepas. Finalmente, observamos uma tendência na frequência de positividade dos animais com respeito ao regime de chuva. Esses resultados sugerem que ambos animais possuem papéis diferentes em cada ciclo de transmissão, correspondendo isso à teoria de foco em leishmanioses. Na área silvestre, com um ciclo de transmissão principalmente extradomiciliar e selvático, os gambás são os que possuem o papel de maior preponderância que os cães, no entanto, sendo uma área que tem uma alta diversidade, pode ser que outras espécies estejam envolvidas no ciclo de transmissão, reduzindo a importância das espécies estudadas. Na área suburbana, o rol de ambas as espécies parece aumentar. Ainda que alguns resultados não cumpram com os critérios teóricos para categorizar as espécies de estudo como reservatório, esses resultados se acoplariam à nova teoria dinâmica dos reservatórios como um conjunto de espécies que atuam como fonte de manutenção do parasito, especialmente na área suburbana, muito provavelmente fazendo parte da população que mantém e perpetua o ciclo que contribui para a endemicidade da LTA causada por *L. panamensis* na Colômbia.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### ABSTRACT

#### PHD THESIS MEDICINA TROPICAL

**Lina Maria Carrillo Bonilla**

Knowledge of *Leishmania* reservoirs is key to its control, but currently there are few conclusive results. The main aim of this work was to evaluate the role of *Didelphis marsupialis* and *Canis familiaris* as potential reservoirs of *L. panamensis* in sylvatic and suburban transmission cycles in Colombia. Samples of blood and skin were collected from the animals. The activities performed in order to achieve this were: isolation of skin lesion parasite, Montenegro test in the human population, PCR with Hsp70, isoenzyme electrophoresis, multilocus sequence typing, and parasitic load by qPCR, as well as xenodiagnosis. 675 samples were obtained, including addition to 27 isolates from patient lesions and three from opossums, all identified as *L. panamensis*. Montenegro tests confirmed the continued endemicity of the disease, 67/233 (29%) in the sylvatic area and 61/143 (43%) in the suburban area. Antibody titers in dogs by IFI were 21% in the suburban area and 28% in the sylvatic area. PCR results showed a high positivity for both species, with approximately 40% and 3% in the suburban area and the sylvatic area respectively. Sequencing of hsp70 and other genes identified *L. panamensis* as the only infecting species. Parasite load was measured with DNAPol and ssRNA as targets. For the sylvatic area, parasite load was very low for the two species of animals, with the two targets. The opposite was observed in the suburban area. In the suburban area 13 xenodiagnoses were carried out none of the animals were positive by microscopy. However, in insects used in xenodiagnoses of six out of eight dogs were PCR positive. In addition to characterizing the epidemiological profile, molecular methods were applied for the genetic typing of *L. panamensis* strains in the different study areas, indicating high genetic homogeneity. The same was observed in analyzes of the population structure, where only two clonal complexes were identified for most strains. Finally, we observed a trend that may link the positivity frequency of the animals with the rain regime and the possible density of vectors. These results suggest that these animals have dissimilar roles in each transmission cycle, corresponding with the focus theory in leishmaniasis. In the sylvatic area, with mainly extradomiciliary and jungle transmission cycles, the opossums play a more important role than dogs; however, being a high diversity area other species may be involved in the transmission cycle, reducing the importance of the studied species. In the suburban area, the importance of both reservoirs seems to increase. Some results do not fulfill the theoretical criteria to categorize the studied species as reservoirs. However, these results would be matched to the new dynamic theory of the reservoirs as a set of species that act as a source of maintenance for the parasite. This would be especially true in the suburban area, probably forming part of the population that perpetuates the cycle contributing to the endemicity of American tegumentary leishmaniasis caused by *L. panamensis* in Colombia.

## Conteúdo

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>14</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>18</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1 Aspectos epidemiológicos e características gerais das leishmanioses.....	21
1.2 Leishmanioses Tegumentar .....	22
1.2.1. Leishmanioses Tegumentar na Colômbia.....	24
1.3 Vetores.....	25
1.4 Hospedeiros e reservatórios vertebrados .....	26
1.4.1. Reservatórios silvestres.....	28
1.4.2. Reservatórios domésticos.....	29
1.5 Diagnóstico das leishmaniases .....	31
1.6 Epidemiologia molecular .....	33
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>35</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
3.1 Objetivo Geral .....	36

3.2 Objetivos Específicos .....	36
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
4.1 Área de estudo .....	38
4.1.1 Área silvestre.....	38
4.1.2 Área suburbana. ....	39
4.2 Inquérito Humano .....	40
4.2.1 Dados epidemiológicos.....	40
4.2.1 Busca Ativa de Pacientes .....	41
4.2.2 Intradermorreação de Montenegro (IDRM).....	41
4.2.3 Avaliação sorológica. ....	42
4.3 Inquérito em animais .....	42
4.3.1 Gambás. ....	42
4.3.2 Cães.....	44
4.4 Processamento das amostras de animais .....	45
4.4.1 Isolamento dos parasitas.....	45
4.4.2 Avaliação Sorológica.....	45
4.4.2.1 Cães .....	45
4.4.2.2 Gambás .....	46
4.4.3 Xenodiagnóstico. ....	47
4.4.4 Extração de DNA.....	48
4.4.5 Caracterização molecular e isoenzimática. ....	48
4.4.5.1 Caracterização molecular de espécies de Leishmania por hsp70 PCR-RFLP. ....	48
4.4.5.2 Eletroforese de isoenzimas (Multi Locus Enzyme Electrophoresis). ....	49

4.4.5.3 Tipagem por sequenciamento de ITS1rDNA.....	49
4.4.5.4 Tipagem por sequenciamento multilocus (MLST). .....	52
4.4.5.4.1 Análise de complexos clonais por BURST. ....	52
4.4.5.4.2 Rede Neighbor-net. ....	53
4.4.5.5 Real time PCR .....	54
4.3.4.6 Extração de RNA .....	55
4.5 Ética .....	55
4.6 Inquérito de flebotomíneos.....	56
4.8 Dados climatológicos.....	56
4.9 Equipe de trabalho .....	57
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
5.1 Resultados do objetivo 1 .....	59
5.1.1 Atenção de pacientes. ....	60
5.2 Resultados do objetivo 2 .....	65
5.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	68
5.2.1.1 RIFI em Cães .....	68
5.2.1.2 RIFI em <i>D. marsupialis</i> .....	72
5.3 Resultados do objetivo 3 .....	74
5.3.1 Identificação por Isoenzimas em parasitas isolados.....	74
5.3.2 PCR-Hsp 70 P4 e sequenciamento em amostras clínicas .....	76
5.3.2.1 PCR vs IFI .....	79
5.3.2.2 Frequência da infecção em cães e gambás avaliada por PCR-hsp70 P4 e na precipitação .....	81
5.4 Resultados do objetivo 4 .....	83
5.4.1 Relação entre PCR hsp70-P4 e a Carga Parasitária .....	89

5.5 Resultados do Objetivo 5.....	92
5.5.2 Xenodiagnóstico na área suburbana.....	92
5.6 Resultados do objetivo 6 .....	94
5.6.1 MLST em amostras de cultura .....	98
5.6.2 Análises de cada locus individualmente (análise Single Locus - SL) .....	108
5.6.3 Análises single locus com ITS .....	115
5.7 Resultados do objetivo 7 .....	117
5.7.1 Resultados da captura entomológica na área silvestre .....	117
5.7.2 Distribuição das espécies de flebotomíneos segundo o local de captura .....	121
5.7.3 Importância epidemiológica das espécies de <i>Lutzomyia</i> spp. ....	122
5.8 Outros Resultados .....	124
5.8.1 Revisão de Literatura.....	124
5.8.2 Socialização e educação na saúde.....	124
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>126</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>142</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>146</b>
<b>TAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA .....</b>	<b>164</b>
<b>APENDICE B: ARTIGO REVISÃO DE RESERVATORIOS SILVESTRES .</b>	<b>165</b>
<b>APÊNDICE C: ARTIGO ASPETOS SOCIAIS NA AREA SILVESTRE.....</b>	<b>222</b>
<b>APÊNDICE D: ARTIGO ENTOMOLOGIA .....</b>	<b>232</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4. 1: Localização geográfica das áreas de estudo na Colômbia, localizada na região norte de América do Sul. Fonte: Mapa obtido pelo GoogleEarth .....	38
Figura 4.2: Zona do estudo: Ubicação geográfica e fotografias da área de estudo .	40
Figura 4. 3: Diagrama de Fluxo da metodologia do estudo. ....	58
Figura 5.1: Número de casos de LTA dos últimos cinco anos em Acandí, área silvestre e Puerto Valdivia, área suburbana e casos totais da Colômbia. Fonte: Dados de INS-SIVIGILA (16) .....	59
Figura 5.2: Frequência relativa dos resultados da prova de Montenegro por grupo etário e gênero nas duas áreas de estudo .....	63
<b>Figura 5.3:</b> Resultados da prova de Monenegro nas duas áreas de estudo por sexo e idade .....	64
Figura 5.4: Lesão suspeita de LTA na bolsa escrotal do cão na área silvestre .....	67
Figura 5.5: Distribuição percentual dos títulos da Reação de Imunofluorescência Indireta entre os cães nas duas regiões de estudo. ....	69
Figura 5.6: Distribuição da positividade da RIFI/Leishmania por idade na área suburbana. ....	71
Figura 5.7: Padrão electroforético das enzimas 6pG dos isolados obtidos usando como padrão as cepas de referência: .....	75
Figura 5.8: Resultados da PCR para <i>T. cruzi</i> dos isolados da área suburbana. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR com uso dos primers TcZ1 TcZ2, demonstrando a positividade nas amostras de cultura (canaleta 1,2,3). CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo.....	76
Figura 5.9: Gel de agarose 2% com produtos amplificados de Hps70 P4 colunas 1,3,5: Amostras positivas. Coluna 2,4,6: Amostra negativas. CP: Controle Positivo. CN: Controle Negativo. PM. Marcador do peso molecular de 1Kb ....	77
Figura 5.10: Frequência relativa dos resultados da PCR Hsp70 P4 em cães e gambás das duas áreas de estudo de acordo com o tipo de amostra .....	78

Figura 5.11: Relacionamento do diagnóstico das amostras positivas para <i>Trypanosoma</i> e <i>Leishmania</i> de acordo com títulos de anticorpos e a confirmação por PCR.....	81
Figura 5.12: Relação da positividade por PCR em gambás e cães da área suburbana com a pluviosidade durante o tempo de captura.....	82
Figura 5.13: Médias do número de parasitos em <i>Canis familiaris</i> e <i>Didelphis marsupialis</i> nas duas áreas de estudo determinada por qPCR, empregando os genes DNAPol e ssRNA.....	84
Figura 5.14: Frequência relativa da carga parasitária avaliada com dois genes, ssRNA e DNAPol, nas amostras das duas áreas de estudo .....	86
Figura 5.15: Distribuição da frequência do número de parasitos de <i>L. panamensis</i> em <i>C. familiaris</i> determinada por PCR em tempo real: a) com o gene DNAPol; e b) com o gene ssRNA, nas duas áreas de estudo. Os números de parasitas são expressos em ul em sangue (barra mais obscura) e em mg na orelha (barra clara) e em mg em cauda (barra mais clara). As cores verdes pertencem à área silvestre e as azuis à área suburbana.....	87
Figura 5.16: Distribuição da frequência do número de parasitos de <i>L. panamensis</i> em <i>D. marsupialis</i> determinada por PCR em tempo real: a) com o gene DNAPol; e b) com o gene ssRNA, nas duas áreas de estudo. O número de parasitos está expresso em ul em sangue (barra mais obscura) e em mg na orelha (barra clara) e em mg em cauda (barra mais clara). As cores verdes pertencem à área silvestre e as azuis à área suburbana.....	89
Figura 5.17: Carga parasitária (em logaritmo) comparada com os resultados da PCRhsp70P4. Os dados negativos em qPCR foram tomados como 0 e os dados de 1 como 0.01. A) Resultados de todos os tecidos. B). Resultados por tipo de tecido com o gene ssRNA. C). Resultados por tipo de tecido com o gene DNAPol.....	90
Figura 5.18: Relação entre o logaritmo da carga parasitária e o resultado do xenodiagnóstico. ....	93
Figura 5.19: Produtos amplificados a partir de amostras clínicas, tendo como alvo os diferente genes do painel de MLSA. Eletroforese em gel de agarose 1.5 % corado com brometo de etídeo. Linhas 1-4 amostras com diluições de 1:5;	

linhas 5-8 amostras com adição de parasitos; ND: Não diluição; em círculo vermelho as bandas positivas; PM: peso molecular, o padrão do peso molecular está em cada gel.....97

**Figura 5.20:** Exemplo de resultados obtidos através da reamplificação de amostras que foram negativas ou fracamente positivas. Eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo. Linha 1,4-5: amostras fracamente positivas. Linhas 7,8,10: reamplificação positiva das amostras. Linha 9: reamplificação positiva MP: marcador de peso molecular 1Kb .....98

**Figura 5.21:** Produto amplificado a partir das cepas de *Leishmania* isoladas para cinco genes usados no MLSA. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Linha1: 1022pb para o gene ICD. Linha2: 1010 pb para o gene MDHnc. Lihna 3: 836pb para G6pd. Lihna 4: 821 pb para o gene MDHmt. Lihna 5: 681 pb para o gene MPI. MP: marcador de peso molecular de 1kb....99

**Figura 5.22:** Representação dos Complexos Clonais usando as sequências de Boité et al. (2012) (88), mediante o eBURST. O número nas figuras corresponde ao número do isolado na tabela do artigo referido. .... 103

**Figura 5.23:** Neighbour-Net construída a partir das sequências concatenadas das amostras de *L. panamensis* das duas áreas de estudo para sete genes analisados. .... 104

Figura 5.24: Neighbour-Net baseada nas sequências concatenadas dos genes e usando as sequências de outras espécies obtidas do genbank. O ramo correspondente ao complexo *L. guyanensis* aparece em detalhe para mostrar a inserção das cepas de *L. panamensis* deste estudo..... 106

Figura 5.25: Árvore filogenética com as sequências concatenadas dos genes do MLST gerado em MEGA 7 ..... 107

igura 5.26: Dendrogramas obtidos para os genes G6P, 6PG, HsP70, MPI ICD e MDHmt. As análises foram conduzidas no MEGA 7 usando o modelo T92 e 1000 replicatas de bootstrap. .... 114

Figura 5.27: Dendrograma das sequencias do ITS1 das amostras clonadas. As analises foram conduzidas no MEGA 7 usando o modelo T92 e 1000 replicatas de bootstrap. .... 116



Figura 5.28: Distribuição das espécies *Lutzomyia* spp. de importância médica (*Lu. panamensis*; *Lu. gomezi*; *Lu. trapidoi*) com respeito ao domicílio. Acandi, Choco.  
.....121

## LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1: Resultados das provas diagnósticas dos pacientes com lesões suspeitas de LTA em área silvestre. ....	61
Tabela 5.2: Resultados dos testes de diagnóstico dos pacientes com lesões suspeitas de LTA na área suburbana .....	61
Tabela 5.3: Resultados da prova de intradermorreação Montenegro, de acordo com a faixa etária (anos) e gênero da população nas diferentes áreas de estudo. ...	62
Tabela 5.4: Resultados da amostragem nos animais, nas duas áreas de estudo.....	65
Tabela 5.5: Lista de outras espécies mamíferas capturadas nas armadilhas Tomahawk®, nas duas áreas de estudo.....	66
Tabela 5.6: Número de amostras com resposta sorológica para <i>Leishmania spp.</i> e <i>T. cruzi</i> e respectivos títulos obtidos na prova de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), em <i>D. marsupialis</i> na área suburbana .....	72
Tabela 5.7: Resultados da PCR para <i>Trypanosoma spp.</i> e <i>Leishmania spp.</i> dos cães positivos por sorologia para ambos parasitas. ....	79
Tabela 5.8: Comparação da carga parasitária das amostras dos cães e gambás nas duas áreas de estudo e com os diferentes genes usados. ....	85
Tabela 5.9: Tipos alélicos determinados a partir da análise multilocus de cepas de <i>L. panamensis</i> isoladas de animais e humanos nas duas áreas de estudo.....	101
Tabela 5.10: Composição das espécies de flebotomíneos e sua abundância relativa (Pi) na área silvestre .....	119
Tabela 5.11: Índice de Sorensen calculado para as espécies de flebotomíneos capturadas em Acandí, Choco. ....	122

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CC	Complexo Clonal
CDC	Centro de controle de doenças (Control Center Disease)
DNA	Acido Dexorribonucleico
DNApol	DNA polimerase
EDTA	“Ethylenediaminetetracetic Acid” (Ácido Etilenodiaminotetracético)
Hsp70	Proteína de choque térmico 70 (Heat-shock protein 70)
IC	Intervalo de confiança
ICD	Isocitrato desidrogenase (Isocitrate dehydrogenase)
ITS	Espaço Interno Transcrito (Internal Transcribed Spacer)
kDNA	DNA de cinetoplasto
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose mucocutânea
Lu	Lutzomyia
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
m.a.n.m	Metros acima do nível do mar
MDHmt	Malato desidrogenase mitocondrial (Malate Dehydrogenase Mitochondrial)
MDHnc	Malato desidrogenase nuclear (Malate Dehydrogenase Nuclear)
MLSA	Análise de sequências multilocus (Multilocus Sequence Analysis)
MJ	Median-joining
ML	Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood)
MLST	Tipagem multi loci por sequenciamento (Multilocus Sequence Typing)
MPI	Manose-6-fosfato isomerase (Manose-6-posphate Isomerase)
nM	Nanomol
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmentos obtidos por restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RPM	Rotações por minuto

UV	Ultravioleta
°C	Graus Celsius.
RNA	Ácido ribonucleico
ssRNA	Subunidade 18S do RNA ribossomal
ul	Microlitros
WHO	World Health Organization
6PGD	6-Fosfogluconato desidrogenase (6-phosphogluconate dehydrogenase)

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos epidemiológicos e características gerais das leishmanioses

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários heteroxênicos, do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), que compreende um complexo de doenças com uma importante diversidade clínica e epidemiológica. O gênero *Leishmania* compreende cerca de 30 espécies, das quais em torno de 20 são responsáveis por causar doenças em humanos (1).

Dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que a doença afeta 14 milhões de pessoas e, a cada ano, há dois milhões de novos casos. Ocorre em quatro continentes, sendo considerada endêmica em 98 países, com 350 milhões de pessoas em risco a nível mundial. Está diretamente relacionada com a pobreza, mas também é influenciada por fatores ambientais e climáticos. Anualmente, ocorrem entre 1,5 a 2 milhões de novos casos da doença: 0,2 a 0,4 milhões casos de Leishmanioses Visceral (LV) e 0,7 a 1,2 milhões casos de Leishmaniose cutânea (LC), com 20.000 a 40.000 mortes decorrentes, majoritariamente, da forma visceral da doença (2). Esse número pode parecer baixo em relação à mortalidade de outras doenças infecciosas, mas o impacto estimado da leishmaniose como agravo é da perda de 2,4 milhões de anos de vida ajustados pela incapacidade (DALYs) para cada ano (3), representando um enorme peso econômico e social.

Apesar da incidência crescente e representar a nona maior carga de doença entre doenças infecciosas individuais, as leishmanioses permanecem na categoria das doenças negligenciadas, que recebem menor atenção por parte das agências financiadoras, das autoridades de saúde pública e dos profissionais de saúde responsáveis pela implementação de atividades de investigação, prevenção e controle (4).

Os parasitos classificados no gênero *Leishmania* possuem duas formas distintas em seu ciclo de vida: uma forma promastigota, com flagelo livre, móveis e que vivem de forma extracelular dentro do tubo digestivo do inseto vetor, e uma

forma amastigota, imóvel, com flagelo intracelular e que reside dentro dos macrófagos do hospedeiro vertebrado. (1)

O parasito é transmitido ao homem pela picada de insetos hematófagos da subfamília Phlebotominae, que se alimentaram previamente em um mamífero infectado. A apresentação clínica da doença, de um modo geral, divide-se em: leishmaniose tegumentar, que acomete pele (LC) e mucosas (LMC); e visceral, causando comprometimento de órgãos internos, especialmente o fígado e o baço. Isto traduz uma importante diversidade clínica da doença, que, dependendo da espécie de *Leishmania* e da resposta imune do indivíduo infectado, pode causar desde infecções inaparentes, oligossintomáticas até casos graves e fatais (5).

As *Leishmanias* são divididas taxonomicamente em dois subgêneros: *Leishmania* (*Leishmania*), na qual estão classificadas espécies que circulam no Velho e no Novo Mundo, e *Leishmania* (*Viannia*), representado por espécies encontradas somente nas Américas. Estudos revelam heterogeneidade genética em *Leishmania*. Desde a década de 80, várias espécies novas de *Leishmania* foram descritas nas Américas; algumas são patogênicas para os humanos, enquanto outras infectam aparentemente apenas animais silvestres (2,6).

## **1.2 Leishmanioses Tegumentar**

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade, existindo relatos e descrições encontrados na literatura desde o séc. I D.C. Nas Américas, foram encontradas cerâmicas pré-colombianas, huacos (vasos de cerâmica com reprodução de figuras humanas), datadas de aproximadamente 400 a 900 anos D.C., feitas pelos índios do Peru, que apresentam mutilações de lábios e narizes, características da espúndia, hoje conhecida como leishmaniose cutânea-mucosa ou mucocutânea (LMC) (7). As lesões de LTA receberam diversas denominações em todo o continente americano. As menos destrutivas eram chamadas de uta seco, úlcera de Velez, úlcera dos chicleros, buba, úlcera de Baurú, ferida brava, “forest yaws”, “Baysore”, “pian-bois” e “bosch-yaws”; já as mais destrutivas receberam as seguintes

denominações: espúndia, chaga corrosiva, cancro espúndico, nariz de tapir, tiacaraña, gangosa, ferida esponjosa, e cancro fagendênico (8).

Posteriormente, através de estudos de paleomedicina, foram descobertas múmias com lesões de pele e mucosas características da leishmaniose (9). Classicamente, a doença é classificada de duas formas: cutânea e mucosa, também conhecida como mucocutânea. O espectro clínico é polimórfico, atingindo pele e mucosas, e caracterizado pela presença de lesões ulcerosas indolores, únicas e de duração limitada (forma cutânea localizada), lesões papulares (forma cutânea disseminada), lesões nodulares não ulceradas (forma cutânea difusa) ou mucocutâneas que afetam a mucosa nasofaríngea após infecção cutânea inicial (forma mucocutânea) (10).

Coletivamente, leishmaniose cutânea e mucocutânea são referidas como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Continente Americano (11). Em casos raros, a LTA pode evoluir para duas formas mais graves da doença, a forma disseminada ou difusa (12). Na América, a apresentação clínica mais comum é a forma cutânea, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, excetuando Chile e Uruguai. Globalmente, estima-se que entre 70 e 75% de todos os casos de leishmaniose cutânea estão concentrados em 10 países, sendo quatro localizados nas Américas: Brasil (4), Colômbia, Peru e Costa Rica. (4) As espécies implicadas nesta forma clínica são classificadas tanto no subgênero *L. (Leishmania)* quanto no *L. (Viannia)*. Algumas das espécies mais importantes são: *L. (L.) amazonensis* (Lainson e Shaw, 1972); *L. (V.) guyanensis* (Floch, 1954); *L. (V.) naiffi* (Lainson & Shaw, 1989); *L. (V.) panamensis* (Lainson e Shaw, 1972) e *L. (V.) braziliensis* (Vianna, 1911). As duas últimas são as mais importantes na Colômbia (4).

A LTA vem sofrendo mudanças no perfil epidemiológico, que muitas vezes se associam às alterações ambientais. O seu recrudescimento tem sido apontado como produto do desequilíbrio ecológico produzido pelo homem que invade os nichos ecológicos do parasito. Como exemplo, cita-se o caso das populações de baixa renda que desmatam a periferia de regiões urbanas para implantar bairros

sem qualquer preocupação com o equilíbrio ambiental e entram em contato com o meio ambiente silvestre (13).

### **1.2.1. Leishmanioses Tegumentar na Colômbia.**

Na Colômbia, a primeira referência da LTA foi feita por Indalecio Camacho, em 1872 (14). A modalidade clássica de transmissão da LC na Colômbia é a forma silvestre, com o homem adquirindo a infecção quando adentra ao foco natural da parasitose, onde interagem seus reservatórios naturais e vetores; nesta circunstância, a doença atinge predominantemente o sexo masculino na faixa etária produtiva. Manifesta-se de forma endêmica em quase todos os territórios e, ocasionalmente, ocorre sob a forma de surtos epidêmicos (15).

Na década dos anos de 1990, a média de casos por ano era de 8.000; no entanto, de 2006 até 2014, o Instituto Nacional de Saúde (INS) (16) informou uma média de 12.380 casos por ano, mostrando uma variação interanual, possivelmente pelo incremento nos modelos de chuva e variação climática (17).

Na Colômbia, 98% dos casos são de leishmaniose cutânea produzida principalmente por *L. panamensis* e *L. braziliensis*, 1.3% são casos de LMC e 0.7% de LV. No país, tem sido reportado um baixo número de casos de leishmanosis visceral, que são restritas a, principalmente, dois focos: o primeiro na região da costa atlântica (Departamentos de Sucre, Córdoba y Bolivar) e o segundo na veira do Rio de Magdalena (Departamentos de Cundinamarca, Tolima e Huila). A espécie *L. infantum* tem sido envolvida nesta forma clínica e *Lu. longipalpis* y *Lu. evansi* como seus vetores(18). A LMC tem também poucos casos, no entanto, não apresenta uma distribuição mais ampla, sem ter focos definidos. Nas lesões mucosas dos pacientes tem sido isoladas as espécies de *L. panamensis*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (19,20).

A doença está distribuída em todo o território (com a exceção das ilhas de San Andrés e Providencia) e ocorre em forma endêmica em focos naturais de infecção localizada principalmente em zonas da floresta, rurais e semirurais que têm condições ecoepidemiológicas favoráveis para sua transmissão. Desde os



anos 80 a leishmaniose não é mais exclusivamente uma doença da floresta; ela deixa de afetar apenas os homens que trabalham na floresta e passa a apresentar comprometimento intradomiciliar, aumentando a população de risco com a inclusão de mulheres e crianças (15). A LTA na Colômbia vem mostrando uma mudança não só no aumento do número de casos, mas precisamente no cenário epidemiológico, passando de um padrão de transmissão eminentemente rural até a década de 1990 para um padrão de transmissão periurbano (e.x. Departamento de Sucre) e urbano (e.x Departamento de Bolivar) (21).

### 1.3 Vetores

A transmissão de *Leishmania* spp. ocorre através da picada de insetos hematófagos, os flebotomíneos, cuja atividade é predominantemente crepuscular ou noturna. Os flebotomos passam muitas vezes despercebidos, devido ao seu tamanho reduzido em relação a outros insetos e ao fato de realizarem um voo silencioso. Os flebotomos pertencem à classe Insecta, Ordem Diptera, Subordem Nematocera, Família *Psychodidae* e Subfamília Phlebotominae e é constituída por cinco gêneros, sendo as espécies do gênero *Phlebotomus* as responsáveis pela doença, nos continentes europeu, asiático e africano, enquanto o gênero *Lutzomyia* ocorre nas Américas (22).

A primeira referência a estes insetos como vetores de *Leishmania* foi feita em 1904, na Argélia, pelos irmãos Sergent e, mais tarde, em 1913, por Mackie, na Índia (23). Os flebotomos são insetos dípteros de cor amarelada, corpo revestido de formações quitinosas com a forma de pelos e tamanhos muito pequenos (2 a 3 milímetros). No ambiente natural, os adultos vivem durante o dia nas fendas das rochas e troncos de árvores. As larvas desenvolvem-se em lugares onde existe matéria orgânica em decomposição. Alguns se adaptam à vida doméstica, encontrando-se em casas, estábulos, jardins e galinheiros, onde obtêm alimento e proteção (22).

Estes dípteros apresentam uma estrutura designada por cárdia, que divide o seu intestino anterior e o intestino médio, e que consiste numa válvula estomodeal, tendo um papel essencial na alimentação e capacidade infectante

como vetores. Esta válvula, em condições normais, assegura o fluxo “num só sentido” do sangue ingerido por estes dípteros, evitando a sua regurgitação. No entanto, quando ocorre a segunda refeição sanguínea, as fêmeas dos flebotomos infectadas por *Leishmania* têm dificuldade em permitir a passagem do sangue para o intestino médio, tendo que realizar várias picadas no hospedeiro para se alimentarem (24). Este fato está relacionado com a formação de um gel viscoso por parte dos promastigotas de *Leishmania*, que uma vez depositado na cárdia, contribui para o bloqueio da válvula estomodeal, que limita o fluxo da refeição sanguínea e causa um refluxo do sangue; este sangue transporta formas infectantes de *Leishmania* que são, numa nova picada, inoculadas na pele do hospedeiro (25). A saliva do flebotomo injetada durante a sua refeição sanguínea contém um grande número de substâncias farmacologicamente ativas, com efeito anti-hemostático, vasodilatador e anti-inflamatório/imunossupressor, que auxiliam o vetor a localizar e manter o fluxo sanguíneo sem induzir uma resposta inflamatória por parte do hospedeiro (26).

Na Colômbia, os flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* se encontram desde os 0 aos 2.400 m.a.n.m em uma grande variedade de ecossistemas (27). Até o presente, foram identificadas 163 espécies de *Lutzomyia* no país, sendo pelo menos 11 consideradas como vetores de *Leishmania* spp.: *Lu. longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912), *Lu. evansi* (Nuñez-Tovar, 1924), *Lu. spinicrassa* (Morales, Osorno, Osorno e Muñoz, 1969), *Lu. trapidoi* (Fairchild e Hertig, 1952), *Lu. umbratilis* (Ward e Fraiha, 1977), *Lu. hartmanni* (Fairchild e Hertig, 1957), *Lu. gomezi* (Nitzulescu, 1931), *Lu. yuilli* (Young e Porter, 1972), *Lu. panamensis* (Shannon, 1926). *Lu. flaviscutellata* (Mangabeira), *Lutzomyia ylephiletor* (Fairchild G.B., Hertig M., 1952) (28,29).

#### **1.4 Hospedeiros e reservatórios vertebrados**

A ecologia dos parasitos do gênero *Leishmania* está, inevitavelmente, associada aos seus hospedeiros, de modo que todos os fatores que afetem a sobrevivência e o comportamento destes podem interferir no ciclo de transmissão do parasito. A maioria das leishmanioses são zoonoses, em que distintas espécies

de animais atuam como reservatórios do parasito para os seres humanos. Para se efetuar a transmissão do parasito aos seres humanos é importante que haja interseção entre o nicho ecológico do vetor, do homem e de um reservatório silvestre ou doméstico (30).

No entanto, a infecção do hospedeiro não significa que este seja um reservatório; os diferentes agentes infecciosos, como *Leishmania*, podem infectar mais de uma espécie de hospedeiro. De fato, 62% de todos os patógenos humanos são classificados como zoonoses, 57 das 70 doenças animais consideradas de maior importância internacional envolvem patógenos que infectam vários hospedeiros. A capacidade de agentes patogênicos para infectar uma ampla gama de hospedeiros tem sido demonstrada como fator de risco para o aparecimento da doença em seres humanos e animais domésticos (31). Assim, a compreensão incompleta de reservatórios tem dificultado o controle de muitas doenças, como a infecção pelo vírus Ebola, Úlcera de Buruli e Raiva (32).

O conceito do reservatório de leishmania mudou muito desde 1952, quando Ponte os chamava animais depositários (33). O principal critério para a definição de uma espécie como hospedeiro reservatório é que esta(s) espécie(s) garanta(m) a circulação do microrganismo na natureza dentro de um período de tempo e espaço. Nesse sentido, deve-se considerar que a interação reservatório e parasito é um sistema complexo, dinâmico e multifatorial, que envolve o homem, o animal doméstico, o parasito, o vetor e o animal reservatório dentro de um determinado ambiente. Essas relações encontram-se em constante mudança, em função das alterações do meio ambiente e das interações entre os seres vivos. Sendo assim, apenas o acompanhamento de longo prazo e o atendimento a critérios preestabelecidos poderão definir uma espécie animal como reservatório de um agente patogênico e, a partir de daí, resultar em informações consistentes o suficiente para nortear as medidas de controle. (34)

Segundo Ashford, 1996 (32), para determinar uma espécie como hospedeiro reservatório é necessário estabelecer os seguintes parâmetros: *status* taxonômico correto do animal; distribuição geográfica do hospedeiro e do parasito dentro da área de distribuição do hospedeiro; distribuição microrregional do

parasito e reservatórios em distintos ecossistemas dentro de um mesmo bioma; prevalência da infecção entre machos, fêmeas, adultos e jovens de possíveis hospedeiros; dinâmica das populações de hospedeiros no tempo (identificação dos efeitos de um determinado parasito na população e/ou indivíduo; flutuação sazonal; estabilidade da infecção e transmissibilidade) e que esta espécie seja infecciosa para o vetor, no caso em que se envolvam a transmissão por insetos vetores. (36)

Entretanto, devido às grandes quantidades de mamíferos encontrados infectados e, sendo mais holísticos, o conceito mais recente define o reservatório como uma ou mais populações ou ambientes nos quais os patógenos podem se manter constantemente e desde os quais a infecção é transmitida a uma população definida (31).

#### **1.4.1. Reservatórios silvestres.**

Muitos mamíferos silvestres têm sido identificados como reservatórios de *Leishmania spp.* Poucas revisões do tema têm sido feitas; a mais recente de Roque e Jasen , 2014 (34), identifica 121 espécies animais infectadas com espécies de leishmania como *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, entre outras. As espécies animais foram classificadas como potenciais reservatórios ou hospedeiros do parasito de acordo com alguns critérios, incluindo capacidade de transmissão por xenodiagnóstico ou isolamento do parasito, assim como a capacidade de retenção do parasito (persistência).

De acordo com esses critérios, a espécie *D. marsupiais* foi qualificada como potencial reservatório de *L. guyanensis*, considerando os isolamentos obtidos de sangue (35,36). No entanto, para *L. amazonensis*, o gambá foi qualificado como hospedeiro do parasito (40). Outros estudos desta espécie têm detectado anticorpos e conseguido isolar parasitos da espécie *L. panamensis* e *L. braziliensis* neste ultimo caso foi medida sua capacidade de transmissão aos vetores (19,41,42).

*D. marsupialis* é a espécie mais comum das 65 que pertencem à ordem Didelphimorphia (Opossum) e é a única espécie da ordem de marsupiais existentes no continente americano, distribuída desde o norte dos Estados Unidos até o sul da Argentina. É o animal silvestre que melhor resiste à antropização. De fato sua população é favorecida nessa situação, já que não tem a pressão dos predadores mamíferos (43,44). O vocábulo “gambá”, nome como se conhece comumente em português, deriva-se do tupi-gurani e significa ‘ventre aberto’, ou seja, foi o modo de reprodução que chamou a atenção dos povos pré-colombianos (45).

Na Colômbia, *D. marsupialis* é conhecido com diferentes nomes como “chucha”, “chucha de oreja negra”, “zorro mochilero”, “rabipelao”, “zorro hediondo”, “raposo(a)”, “comadreja”, “chucho”, “faro”, “fara”, “runcho” y “zorra” (46). Tem uma ampla distribuição, que vai de 0 até os 2.500 m.a.n.m em diferentes ecótopos. Em muitos lugares, sua carne serve de alimento e é comparada com o sabor do frango. Inclusive, como experiência durante as capturas para este estudo, muitos camponeses nos solicitavam que déssemos a espécie capturada, e por tal motivo, sempre liberávamos os animais em áreas apartadas e fora do alcance da comunidade. Por outro lado, é um animal considerado praga, odiado e perseguido, pois devido a sua alta capacidade de adaptação e dieta onívora, alimenta-se de galinhas, patos, aves cantoras, frutas etc, sendo esta a outra razão para protegê-los no momento de sua liberação.

O *D. marsupialis* também é uma espécie permissiva para a manutenção de microrganismos, como, por exemplo, o *Trypanosoma cruzi* (45). Em estudos recentes, ele tem sido associado como a fonte preferencial de sangue de insetos do gênero *Lutzomyia*, que também foram encontrados em ninhos de *D. albiventris* (46,47).

#### **1.4.2. Reservatórios domésticos.**

A incriminação de reservatórios domésticos no ciclo de transmissão de espécies de *Leishmania* que produzem lesões cutâneas tem sido relativamente

recente. Um dos primeiros estudos foi feito por Aguilar et al. (48), mas muitos autores refutaram esta ideia, com base nas evidências epidemiológicas que não suportam os animais domésticos como reservatórios por conta de estarem praticamente ausentes em áreas endêmicas, como na Amazônia, reforçando a hipótese de que a fauna silvestre tem a maior probabilidade da manutenção e de transmissão dos parasitos. Desde então, vários animais domésticos têm sido encontrados infectados com *Leishmania* sp.; entre os mais relevantes estão os gatos, equinos e os cães. Até hoje não existe um consenso entre os pesquisadores sobre o papel dos animais domésticos como reservatórios de espécies de *Leishmania*.

No gato, as primeiras referências à leishmaniose foram descritas por Mazza, em 1927 (49), semidentificação parasitológica. Outros reportes incluem determinação de infecção natural em Brasil, Venezuela, Egito e Texas (50–54). É importante referir que textos de parasitologia de Neveu-Lemaire, datados de 1942, mencionavam a possibilidade de *Leishmania donovani* infectar naturalmente o gato, apesar de, na época, ser considerada situação excepcional (52). Os gatos foram encontrados infectados com várias espécies de *Leishmania*, como *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* e *L. infantum* (53). Seu papel epidemiológico ainda não está claro, pois há poucos estudos que evidenciem sua capacidade de transmitir os parasitos a vetores (54). Porém, tem sido possível infectar *Phlebotomus perniciosus* com *L. infantum*, no Velho Mundo, e *Lu. Longipalpis*, no Novo Mundo, depois de terem sido alimentados em gatos naturalmente infectados (55). Simões-Mattos et al. (2005) (56) sugerem que o gato doméstico apresenta um alto grau de resistência natural ao parasito, conforme observado em infecções experimentais. Entretanto, a resistência do gato à leishmaniose pode depender também de fatores genéticos não relacionados à resposta celular (57). Gatos infectados com *Leishmania* e coinfectados com o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e/ou vírus da leucemia felina (FeLV), concomitantemente, comprovaram que tanto os agentes virais quanto o estresse podem induzir danos à resposta imunológica mediada por células e, desta forma, apressar os sintomas clínicos no gato (58).

As informações em relação às leishmanioses envolvendo os felinos vêm aumentando, mas ainda existem muitas questões que devem ser respondidas através de novos estudos, principalmente em relação à patogenia e ao real papel do gato como reservatório de *Leishmania* spp. (55).

Outros animais domésticos estudados são os equídeos domésticos. A leishmaniose foi primeiramente relatada por Mazza (1927) (59), em um cavalo na Argentina; e depois, no Brasil, por de Alencar (1959) (62), em um jumento no estado do Ceará. Desde então vários relatos vêm sendo descritos em diversos estados do Brasil e em outros países, como Venezuela, identificando como agente infectante, em alguns desses casos, a espécie *L. braziliensis* (50,63–67). Na Colômbia, até onde sabemos, não há nenhum caso relatado.

Os cães domésticos são bem estudados e conhecidos como reservatórios de *L. infantum* (*syn. L. chagasi*), agente causal da leishmaniose visceral (66). Este parasito foi identificado pela primeira vez na Tunísia, em 1908, por Charles Nicolle e Comte. No entanto, seu papel como reservatórios das espécies causais de LTA é ainda discutido. Travi et al. (2006) (67) e Vélez et al. (2012) (70) sugeriram que os cães infectados têm o mesmo comportamento que o humano, como um hospedeiro acidental. Outros autores indicam que os cães poderiam estar envolvidos na transmissão das espécies de *Leishmania* associadas à LTA, considerando observações como: a coincidência destes animais infectados com casos humanos, a proximidade com as pessoas nas áreas endêmicas, a correlação positiva entre o risco de infecção de LC em humanos e positividade LC em cães, coincidência das espécies infectantes em humanos e cães e atração relativa dos cães para algumas espécies de flebotomíneos vetoras (69–71).

### **1.5 Diagnóstico das leishmanioses**

O diagnóstico das leishmanioses envolve aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. No caso da LC, considerando a semelhança com sintomas que também são observados em outras doenças frequentes nas áreas endêmicas de leishmaniose, como hanseníase, câncer de pele, esporotricose e tuberculose cutânea, o diagnóstico diferencial é relevante (15).

Desde o ponto de vista laboratorial, é importante sempre fazer reconhecimento do parasito. Em alguns países, como na Colômbia, não é possível administrar tratamento até que se faça a confirmação parasitológica. O exame parasitológico direto pode ser feito pela visualização microscópica do parasito, sendo tal procedimento o de primeira escolha por ser mais rápido, de menor custo e de fácil execução, desde que tenha um técnico treinado para executar esse diagnóstico. Para a pesquisa direta são utilizados os seguintes procedimentos: escarificação, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa, porém, o rendimento diagnóstico é maior quando se retira material da borda da lesão. Outro método de observação direta do parasito é o isolamento em cultivo, contudo, este método é menos sensível e requer até um mês para seu resultado. O diagnóstico parasitológico permanece como sendo o padrão ouro no diagnóstico de leishmaniose, devido sua alta especificidade (11).

Existem outras técnicas diagnósticas, como intradermorreação de Montenegro (IDRM), que consiste na aplicação intradérmica de antígeno de formas promastigotas de *Leishmania*, fazendo-se a leitura entre 48 e 72 horas após a aplicação. Observa-se a presença de induração, percebida pela palpação, maior ou igual a 5 mm, o que caracteriza a positividade do teste. A positividade da reação de Montenegro (RM) não significa necessariamente infecção, mas sim sensibilização. Também existem testes sorológicos como o ELISA (Ensaio Imunoenzimático/ Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ou RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) (74).

Entretanto, esses métodos são incapazes de, definitivamente, diferenciar as espécies de *Leishmania* e apresentam baixa sensibilidade. De tal forma, muitos laboratórios passaram a usar métodos de PCR para o diagnóstico de casos, quando possível. Várias outras abordagens, como o uso de genes de rRNA, os minicírculos de DNA do cinetoplasto (k-DNA) ou os genes do mini-exon e outras sequências repetidas e polimórficas que apresentam maior discriminação, como gp63, hsp70, e cisteíno-proteases, têm sido investigadas para identificação de *Leishmania* via PCR. A técnica de análise de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) do produto amplificado e o sequenciamento



dessas regiões têm sido associados a PCR para a diferenciação das espécies (75–77).

## 1.6 Epidemiologia molecular

Além dos métodos epidemiológicos tradicionais, a aplicação de métodos moleculares na pesquisa epidemiológica pode aumentar consideravelmente a eficácia, a abrangência e o entendimento dos resultados da pesquisa. Estudos epidemiológicos estão progressivamente utilizando métodos moleculares para a investigação das leishmanioses (78). A epidemiologia molecular pode contribuir para a identificação das espécies, especialmente na investigação de surtos, estudos de prevalência e identificação da estrutura populacional, padrões de migração e dispersão do parasito e dos vetores. Além disso, os métodos moleculares possibilitam o rastreamento e o conhecimento sobre a origem de novos genótipos, a investigação de marcadores genéticos de suscetibilidade ou resistência para o hospedeiro humano e ao tratamento medicamentoso, a identificação da fonte de *Leishmania* (hospedeiros naturais), e determinação da existência de fluxo gênico entre as populações provocada pelas migrações do reservatório humano ou não-humano (77).

A ideia de relacionar diferentes parâmetros sejam bioquímicos, clínicos e moleculares, entre as populações parasitárias de animais e humanos com o fim de relacioná-los epidemiologicamente, não é nova. Grogl et al. (1991) (80) relacionou uma cepa de *L. mexicana* isolada de *Neotoma micropus* com diferentes cepas de *L. mexicana* (isolada de humanos provenientes de Texas, México, Guatemala e Belize), utilizando eletroforese de isoenzimas, eletroforese de campo pulsado e hibridização do DNA, encontrando relação entre elas e incriminando dessa maneira esse mamífero como reservatório de *L. mexicana*. Minori et al. (1989) (79) no Equador fizeram um trabalho similar ao relacionar cepas de diferentes espécies de mamíferos com cepas humanas da mesma região sem encontrar relação entre elas.

No entanto a maioria dos estudos usa metodologias que têm uma limitada aplicação na epidemiologia, mas são comumente usados pelas vantagens

dependendo do tipo de estudo a ser desenvolvido e das perguntas a serem respondidas assim como da facilidade nos protocolos. As metodologias mais comuns são PCR, PCR-RFLP ou amplificação randômica a partir de polimorfismos na sequência de DNA (randomly amplified polymorphic DNA – RAPD). Porém existem outras metodologias mais complexas que podem gerar melhor informação epidemiológica, como as análises de microsatélites (MLMT) e as análises de “tipagem por sequências multilocus” (multilocus sequence typing - MLST), proposta por Maiden et al. (1998) (80) e que tem tido sucesso em diferentes microrganismos (81,82).

O MLST está baseado na amplificação e sequenciamento de fragmentos internos de genes essenciais, não ligados (genes “housekeeping”). A relação entre as cepas é tipicamente representada através de dendrogramas ou redes contruídas com base nas diferenças dos perfis alélicos, os quais identificam as cepas similares em grupos. As sequências usadas em MLST também podem ser utilizadas para explorar as relações entre cepas já que, por exemplo, a recombinação pode ocorrer frequentemente em muitas espécies de microrganismos e o uso destes programas tem um impacto evidente na capacidade de discernir a verdadeira relação entre as cepas. Considerando que os parasitos do gênero *Leishmania* possuem um genoma aneuploide, a análise de populações torna-se consideravelmente mais complexa e demorada. No entanto, MLST já foi empregado em *Leishmania* (83–85) ainda mais recentemente a técnica foi padronizada por Boite et al. (2012) (86) com cepas do novo continente e usada em estudos epidemiológicos no Brasil (87), demonstrando que essa é uma ferramenta de muita utilidade nestes tipos de estudo.

## 2. JUSTIFICATIVA

Falar de leishmaniose não é somente dizer que há milhões de pessoas infectadas ou em risco de se infectar, ou que é uma enfermidade entre muitas categorizadas pela OMS como negligenciada, mas também falar de uma doença que contribui significativamente com o subdesenvolvimento de muitos países e, ao conseguir controlá-la, não somente serão salvas atemilhões de vidas, senão contribuirá para o crescimento dessas nações.

O estabelecimento de ações efetivas de controle da LTA representa um grande desafio, uma vez que esta doença apresenta grande diversidade e constantes mudanças nos seus padrões epidemiológicos de transmissão, devido a diferentes espécies de vetores, reservatórios e agentes etiológicos, associados à ação do homem sobre o meio ambiente. Porém, para propor e implementar medidas de prevenção e controle efetivo é necessário conhecer as formas de transmissão e os agentes envolvidos como hospedeiros, vetores e reservatórios. O conhecimento sobre os animais reservatórios na transmissão da leishmaniose cutânea se torna mais significativo devido ao aumento do número de casos na Colômbia desde o ano 2000 e o surgimento de novas áreas de transmissão suburbanos e urbanos, como por exemplo, surtos em grandes cidades como Sincelejo, Bucaramanga, Remedios, Villeta, Durania, Leticia e Neiva, entre outros, aumentando o risco de transmissão para áreas até então livres da doença no país (2,71,88).

O presente trabalho pretende conhecer melhor o ciclo de transmissão da principal espécie associada com a LTA na Colômbia, a *L. panamensis*. O papel de duas espécies de mamíferos, *D. marsupialis* e *C. familiaris*, nesse ciclo, precisa ser esclarecido. Essas espécies de mamíferos têm sido implicadas como reservatórios de tripanosomatídeos e outras espécies de *Leishmania*. Ambas, por sua vizinhança com os ambientes humanos, tornam-se especialmente importantes nos novos ciclos de transmissão, como o ciclo urbano, onde a população em risco é muito maior do que nos ciclos silvestres. Com o avanço das metodologias moleculares para a tipagem dos parasitas, as análises da população de parasitas dos reservatórios, em comparação com as populações dos parasitas de humanos, poderão ser realizadas de forma mais acurada.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Estudar o ciclo de transmissão silvestre e suburbano de *L. panamensis* em dois municípios endêmicos da Colômbia, avaliando a fauna flebotomínica e o papel de *Didelphis marsupialis* e *Canis familiaris* como potenciais reservatórios.

#### 3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Conhecer o status epidemiológico da leishmaniose tegumentar na população humana nas duas áreas de estudo, por meio da atenção de casos suspeitos e da prova de Intradermoreação de Montenegro.

3.2.2 Identificar e descrever as características clínicas da infecção por *Leishmania* e a soroprevalência nas espécies *Canis familiaris* e *Didelphis marsupialis*, em duas regiões da Colômbia, uma com ciclo silvestre e outra com ciclo suburbano.

3.2.3 Avaliar a infecção natural e identificar as espécies de *Leishmania* de amostras de gambás, cães e humanos que circulam na Colômbia usando PCR e ensaio de isoenzimas.

3.2.4 Determinar o grau de infecção através do cálculo da carga parasitária de *Leishmania* spp. por PCR, em tempo real, em cães e gambás de duas regiões da Colômbia.

3.2.5 Avaliar a capacidade de transmissão dos parasitos de cães e gambás aos flebotomíneos através do método de xenodiagnóstico

3.2.6 Avaliar a heterogeneidade genética das populações de *L. panamensis* em amostras de reservatórios e humanos em duas regiões na Colômbia.

3.2.7 Identificar a fauna flebotomínica e os possíveis vetores, visando relacionar sua distribuição com a presença e positividade de cães e gambás em área silvestre.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Área de estudo

As áreas de estudo foram escolhidas de acordo com a endemicidade, ou seja, que tiveram casos de LTA durante todo o ano, bem como casos relatados por mais de cinco anos contínuos. Também foram importantes para escolha as características biogeográficas e de desenvolvimento econômico e urbanístico para determinar o tipo de área, categorizando em área silvestre ou área urbana. Com essas características, foram escolhidos o município de Acandí, em Chocó e Valdivia, em Antioquia, ambas na república da Colômbia (Figura 4.1).



**Figura 4. 1:** Localização geográfica das áreas de estudo na Colômbia, localizada na região norte de América do Sul. Fonte: Mapa obtido pelo GoogleEarth

#### 4.1.1 Área silvestre.

O Município de Acandí está localizado no norte do departamento de Chocó ( $8^{\circ} 31'24''$  N,  $77^{\circ} 16'19''$  W), região noroeste da Colômbia, no litoral do mar Caribe, estando a 366km de Quibdó, capital de Chocó. Limita na área noroeste com Panamá, na parte oriental com o mar Caribe e ao sul com o município de Unguía (89). (Figura 4.2). Esta região é essencialmente silvestre e é a ecorregião que,

provavelmente, tem a maior densidade pluviométrica do planeta; a temperatura média é de 28°C e uma altitude de 3 m.a.n.m. O departamento de Chocó se localiza na região do Pacífico colombiano, incluindo a floresta do Darién e as bacias hidrográficas dos rios Atrato e San Juan.

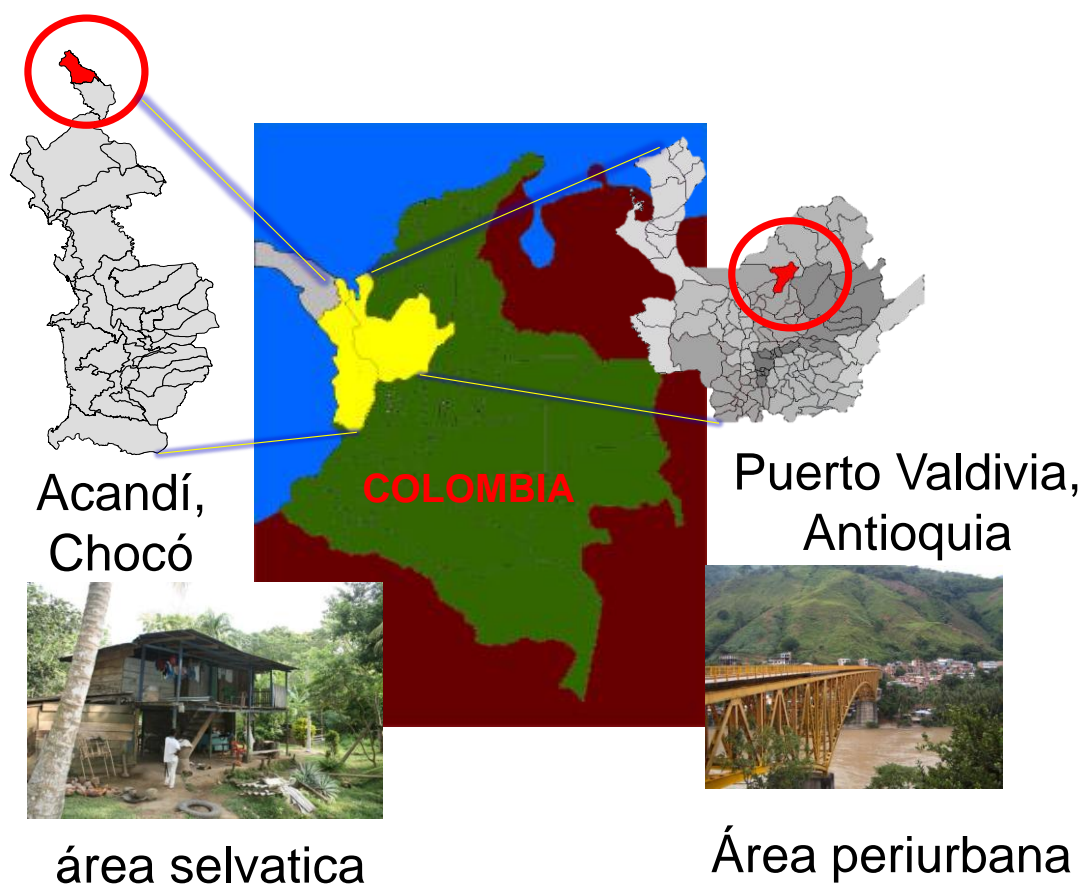
Esse município possui uma população total de 10.455 habitantes, dos quais 5.107 moram na área urbana e os outros 5.348 moram na área rural (90). Entretanto, a presença constante de grupos paramilitares e guerrilheiros, bem como a difícil situação econômica da população, tem levado ao deslocamento de cerca de 1.530 famílias; 730 delas estão na capital do município, representando umas 1.200 pessoas adicionais ao que os dados estatais informam para a zona urbana (91). Neste município, realizaram-se as amostragens na região de “El Aguacate”, “Sardi” e “San Francisco”.

Na área de estudo selvático encontram-se quatro grupos humanos: 1) População afrodescendente, que estão em maior proporção em San Francisco; 2) “Chilapos”, nome como se conhecem os camponeses mestiços entre brancos e índios provenientes dos departamentos de Córdoba e Sucre, que migraram de suas terras para dedicarem-se à agricultura, se encontrando com mais frequência em Sardi; 3) “Paisas”, indivíduos provenientes de diferentes regiões do país, principalmente do departamento de Antioquia, que se estabelecem principalmente em El Aguacate; 4) Ameríndios, Emberá e Emberá katio, com uma baixa representatividade e ocupando zonas de resguardos que não foram incluídas neste estudo. É uma área de alto tráfico de cocaína por estar em uma zona geograficamente estratégica para chegar por mar através da América Central até América do Norte. Por esse motivo, diferentes grupos armados se fazem presentes na zona, incluindo a guerrilha, paramilitares e os bacrim (Grupos criminosos) (92,93). O período da coleta das amostras foi de setembro de 2008 até novembro de 2009.

#### **4.1.2 Área suburbana.**

O município de Valdivia está localizado no norte do departamento de Antioquia, na região Andina, com temperatura média de 21°C e altura de 400 m.a.n.m. (Figura 4.2). Possui uma população urbana de aproximadamente 6.552 habitantes e uma população rural de 15.627. Neste município, foi escolhida a localidade de “Puerto Valdivia”, uma área urbanizada às margens do Rio Cauca, um dos rios mais importantes do país. Em uma área onde se estreita o rio, o povoado está dividido em dois por uma rodovia que leva ao litoral e por onde passam grandes

quantidades de automóveis de todo tipo. As casas estão construídas com cimento, não tendo peridomicílio, possuem luz elétrica e até serviço de transporte público. Há paróquia, posto de saúde, escolas e um colégio principal. A economia gira em torno da mineração, das plantações de coca e do comércio. Existe pouca investigação sociológica nesta área, por isso as referências são poucas ou antigas. O período de coleta foi de março de 2012 até julho de 2015. Esta área foi descrita como suburbana, de acordo com as definições descritas por Shochat et al. 2006 (96), sendo um área intermedia entre a área rural e área urbana, pois não tem o desenvolvimento da segunda mas já não tem características rurais.



**Figura 4.2:** Zona do estudo: Localização geográfica e fotografias da área de estudo

## 4.2 Inquérito Humano

### 4.2.1 Dados epidemiológicos

Os dados sobre os casos de LTA foram obtidos da ficha de notificação obrigatória do Instituto Nacional de Saúde –INS- (16). Na Colômbia, a leishmaniose é uma doença de notificação obrigatória e só pode ser notificada pela confirmação parasitológica do parasito, seja pela observação direta do parasita pelo método de



“imprint” em lâminas de vidro, pelo isolamento em meio de cultura ou pelo uso de métodos histológicos.

#### **4.2.1 Busca Ativa de Pacientes**

Durantes as saídas de campo nas áreas de estudo, foram feitas buscas ativas de pacientes com lesões suspeitas de leishmanioses para seu diagnóstico. Foram coletadas amostras para diagnóstico parasitológico direto, procurando amastigotas em esfregaço das lesões após a coloração de Giemsa. Foi realizada escarificação da borda e fundo da lesão. Com o objetivo de isolar os promastigotes de *Leishmania*, se fez aspirado das lesões para semear em meio NNN – (Neal, Novy e Nicolle) (97), modificado (3,4 ml de água destilada, 0,6 de sangue de coelho desfibrinado e 40g de blood agar base - DIFCO), o qual foi mantido em estufa a 26C° durante quatro semanas, com passagens semanais. Os detalhes do procedimento podem ser encontrados na referência de Ramirez et al (98).

#### **4.2.2 Intradermoreação de Montenegro (IDRM).**

Para a realização da Intradermoreação de Montenegro (IDRM) foi usado o antígeno de Montenegro produzido pelo laboratório PECET, na Universidade de Antioquia, Medellin, Colombia.

O antígeno foi preparado com uma mistura de promastigotes de *L. panamensis* (cepa de referência MHOM/PA/71/LS94) a uma concentração final de  $2 \times 10^6$  (96). O antígeno foi mantido sob refrigeração em caixa térmica, durante a permanência no campo. Após antissepsia do local, com álcool a 70%, inoculou-se com agulha 13 x 4,5 mm e seringa do tipo tuberculínica, 0,1ml da suspensão do antígeno por via intradérmica na face anterior do antebraço direito, 2 a 3 cm abaixo da dobra do cotovelo, longe da rede vascular. Uma vez aplicado o antígeno, observou-se a formação de uma pequena pápula ou elevação. A leitura da reação foi efetuada com 48 a 72 horas após o inóculo, de acordo com a técnica descrita por Sokal (1975) (97), que consiste em exercer pressão moderada na pele, traçando uma linha com uma caneta esferográfica a partir de um ponto exterior até encontrar resistência ou endureção, marcando cada ponto cardinal e utilizando régua milimetrada para medir o tamanho da endureção. A interpretação baseou-se na área de endureção apresentada, sendo a prova positiva segundo os seguintes valores de referência: <5mm (= negativo), ≥ 5mm (= positivo).

### **4.2.3 Avaliação sorológica.**

A avaliação sorológica foi feita por imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos contra *Leishmania spp.* em amostras de soro de humanos. Na reação, foi utilizado como antígeno  $6 \times 10^6$  promastigotas/ml de *L. (V) panamensis* e conjugado anti-IgG humana marcada com fluoresceína (SIGMA F-4512) obtida em coelhos.

Foram usadas placas de teste, sensibilizadas com 15-20 uL de antígeno previamente preparado. Para a reação sorológica foram preparadas diluições seriadas de soro com PBS pH 7,2 estéreis, a partir de 1:8 a 1:128 ambos os soros e controles. Entre 15 e 20 µL de soro diluído foi colocado nos poços das placas e sensibilizado com antígeno por 45 min a 37°C, em câmara úmida. As placas foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,2 por 5 minutos e, depois, com água destilada por dois minutos. O conjugado anti-IgG humana marcada com fluoresceína (SIGMA F-4512) foi preparado em uma diluição de 1:100 em PBS pH 7.2 mais o corante de contraste (azul de Evans), também na concentração de 1:100 no mesmo volume. Foram adicionados aos poços das placas 22 µL do conjugado com o antígeno e com as diferentes amostras e se deixou para incubar a 37°C durante 45 min em câmara úmida no escuro. As placas foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,2, por 5 minutos e, depois, com água destilada por 2 minutos. A fluorescência foi observada em microscópio de fluorescência Nikon® Labophot 2 com lente 40x. O teste foi considerado positivo quando a reatividade com soros diluídos foi maior ou igual a 1:32.

## **4.3 Inquérito em animais**

### **4.3.1 Gambás.**

Foram utilizadas armadilhas do tipo Tomahawk®, de aço galvanizado, de 66 x 23 x 23 cm. As capturas foram realizadas no extradomicílio e peridomicílio. A média de armadilhas foi de 80 na área silvestre e 40 na área suburbana, em cada amostragem. As armadilhas foram instaladas pela manhã e revisadas muito cedo no dia seguinte. No caso de captura, o animal foi transportado ao centro de processamento de amostras; caso contrário o atrativo alimentício era substituído. Na área silvestre, as gaiolas foram colocadas em um transecto em torno das casas cobrindo todos os pontos cardeais a cada 10 metros e até os 90 metros. A

amostragem foi feita a cada dois meses, por um ano, de outubro de 2008 até novembro de 2009.

Na área suburbana, as armadilhas foram colocadas em áreas do peri e extradomicílio, onde é mais provável capturar os gambás, como na base das árvores, ou lugares onde havia comida. Foram feitas cinco amostragens, nos meses de outubro, novembro de 2012, um em cada semestre de 2013 (abril e outubro) e mais um em junho de 2015. As armadilhas eram colocadas com diferentes atrativos alimentícios; usou-se banana madura, ovo cozido e bolas de manteiga de amendoim com aveia e essência de baunilha. As armadilhas se mantinham no mesmo local de três a cinco noites. Sempre se utilizaram luvas para manuseio das iscas, com a intenção de minimizar o rastro humano, para ter melhor sucesso na captura. Na estação de amostragem, realizava-se uma identificação preliminar dos animais no campo, com base em caracteres morfológicos externos, como tamanho e forma do corpo, coloração e tipo de pelagem, além do registro das características ambientais dos locais de captura de cada espécie.

Os animais capturados foram anestesiados com uma mistura 1:9 de Imalgene® 500 - ketamina (Merial) + Rompun® - Xilazina (Bayer), respectivamente, por via intramuscular. O sexo e o peso foram registrados, assim como o comprimento total, da cauda, da espiga e o comprimento da perna, além de tomar alguns dados taxonômicos de interesse e fazer um registro fotográfico.

Foram coletados da veia cauda e, ocasionalmente, por via intracardíaca, pelo menos 200µL de sangue em tubos BD Vacutainer® com EDTA como anticoagulante, que foram devidamente rotulados e armazenados a 4 ° C até o processamento laboratorial. Foram realizadas biópsias de orelha e cauda com “punch” estéril de 2mm AcuPunch® (Acuderm inc). As biópsias foram armazenadas em meio NET (NaCl 150 mmol/L; Tris-HCl 15 mmol/L; EDTA 1 mmol/L a pH 8.3) e solução salina de 100 ug/ml de estreptomicina e 100ug/ml de penicilina.

Além disso, os animais foram cuidadosamente examinados quanto a lesões sugestivas de leishmaniose e, no caso de observação de lesões, amostras foram coletadas para o diagnóstico, isolamento e cultivo de parasitas. Foram sacrificados trinta e dois machos adultos na área silvestre; com a intenção de não afetar a população nesta área, sua escolha foi aleatória. A eutanásia dos animais foi realizada utilizando-se uma sobredosagem do medicamento Euthanex®. No caso dos animais eutanasiados, além do que já foi descrito, foram coletadas amostras de fígado, armazenadas em álcool absoluto.

Quanto a medir a porcentagem de recaptura, para os estudos deste tipo, idealmente, técnicas de marcação usam microchip, que possibilitam informação precisa nos casos de recaptura. Porém, devido limitações orçamentárias, este tipo de tecnologia não foi utilizado. A maneira de saber se um animal foi examinado antes foi através de um corte pequeno na ponta da orelha esquerda. No entanto, a recaptura foi muita baixa, somente uma na área suburbana. Um resultado explicado pelo comportamento normal desta espécie com hábitos nômades, sendo marcado mais em machos que em fêmeas (98). Estudos apontam que *Didelphis* podem caminhar por mais de 1km por noite (101). Por exemplo, o estudo de Taniguchi (2010) (102) teve recaptura de apenas 10 indivíduos de *D. marsupialis*, em nove anos de estudo.

#### **4.3.2 Cães.**

A procura por cães foi feita de casa em casa, com o acompanhamento de agentes oficiais de saúde da região, que têm censo canino da área. Os donos de cães da comunidade eram informados e convidados com suas mascotes a um posto fixo onde amostras eram obtidas. Antes da amostragem dos animais, foi fornecida a instrução básica sobre a leishmaniose e sobre a execução do projeto aos proprietários dos animais, que assinaram o consentimento informado.

Seguindo corretamente as normas de antisepsia e biossegurança, os animais foram submetidos à coleta de sangue. As amostras de sangue foram obtidas através de punção da veia cefálica (membro anterior), femoral ou jugular; de cada cão foram coletados 5 mL de sangue, sendo que 3 mL foram depositados em tubos sem anticoagulante e 2 ml em BD Vacutainer® EDTA como anticoagulante. O sangue no tubo sem anticoagulante foi deixado em repouso até formação do coágulo a 4°C e, depois, centrifugado para a separação do soro. As amostras foram armazenadas a -20°C, até o processamento para a determinação de anticorpos por IFAT.

Foram realizadas biópsias de orelha com punch de 2 milímetros AcuPunch® estéreis, prévia anestesia local com 1.5-2 ml de Lidocaína ao 2%. Os animais que ficaram mais nervosos ou agressivos foram tranquilizados com uma mistura de Imlagene ® 500 (ketamina), na dose de 8-10 mg / kg + Rompun ® (xilazina) e na dose de 1 mg / kg por via intramuscular. As biópsias foram armazenadas em tubos

com meio e solução salina com antibiótico estreptomicina 100 ug/ml e penicilina 100ug/ml e processados de acordo com Alexander et al., (1998) (103).

Os cães incluídos no estudo passaram por exame clínico, avaliando-se parâmetros fisiológicos relevantes à análise de sinais e sintomas compatíveis com a LC. Em caso de apresentarem lesões sugestivas de leishmaniose, foi feito o preenchimento da história clínica e o procedimento de diagnóstico por exame direto, isolamento e cultivo do parasita e biópsia da lesão. Da mesma maneira, foi avaliada sua condição física, de acordo com os parâmetros estabelecidos por Laflamme D. 1997 (104).

#### **4.4 Processamento das amostras de animais**

Com o sangue em EDTA no laboratório, a técnica de buffy coat descrita por Bowdre et al., 1981 (105) foi feita. Esta técnica permite separar os glóbulos brancos por centrifugação. A metade do material foi armazenada em frascos estéreis de 1,5 mL a -20C<sup>a</sup> e a outra metade foi usada para cultura com NNN – Neal, Novy e Nicolle modificado (3,4 ml de água destilada, 0,6 de sangue de coelho desfibrinado e 40g de blood agar base - DIFCO) para o isolamento de parasitas. Metade das amostras de tecido foi macerada e inoculada em meio de cultivo NNN e a outra metade usada para extração de DNA (106).

##### **4.4.1 Isolamento dos parasitas.**

As amostras de sangue e tecido foram semeadas em meio bifásico NNN. As culturas foram conservadas em estufa biológica a 26-28°C e examinadas semanalmente durante 30-40 dias por exames diretos, buscando evidenciar formas flageladas. Nos casos onde ocorreu crescimento parasitário, as amostras foram expandidas para produção de massa parasitária, para posterior caracterização etiológica (107).

##### **4.4.2 Avaliação Sorológica.**

###### **4.4.2.1 Cães**

A avaliação sorológica foi feita por imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos contra *Leishmania* spp em amostras de soro de cães. A

reação foi feita com o mesmo protocolo com que foi feita a sorologia humana, porém usando anti-IgG de cão.

Os soros também foram avaliados para anticorpos de *Trypanosoma cruzi* por IFAT, usando como antígeno  $1 \times 10^6$  parasitas de *Trypanosoma cruzi* cepas Cas15 e Mg8, com o mesmo conjugado descrito anteriormente e soro de cão (referência). Diluições foram consideradas positivas quando maiores ou iguais a 1:40, de acordo com as condições padronizadas por Cantillo-Barraza et al (47).

Os cães para o xenodiagnóstico foram escolhidos de acordo com seus títulos de anticorpos.

#### **4.4.2.2 Gambás**

Para preparação de antígenos utilizados na RIFI e ELISA, foram mantidas e ampliadas cepas padrão 579 (*L. infantum*) e 566 (*L. braziliensis*). Os meios de cultura utilizados foram NNN (Nicolle, Novy and Mc Neal) com Schneider, para o crescimento respectivamente de *Leishmania* spp. Os antígenos utilizados consistem em formas promastigotas de *Leishmania* spp., em fase exponencial de crescimento (108 parasitos/mL). Antígeno para o RIFI: os antígenos foram diluídos na concentração de 40 parasitos por campo, em solução de PBS 0,15M e, depois, fixados 10 µl/poço, em lâminas de microscopia específicas para RIFI.

A RIFI foi realizada através de pesquisa do nível de anticorpos séricos (anticorpos da classe IgG anti-*T. cruzi* e IgG anti-*Leishmania*). Os antígenos utilizados foram as cepas de referência F90 (Tcl) e Y (Tcll) para *T. cruzi* e 579 (*L. infantum*) e 566 (*L. braziliensis*) para *Leishmania* spp., respectivamente, ampliadas em culturas axênicas e misturadas em proporções iguais 1:1.

Os soros foram diluídos serialmente em uma proporção decrescente de 2x (1:10 - 1:320) e testados com antígenos totais de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. Os marsupiais foram testados com anticorpos intermediários específicos anti-IgG de *Didelphis* sp., obtidos em coelhos, sendo a reação revelada utilizando-se IgG anti-coelho conjugado a Isotiocianato de Fluoresceína da Sigma®. A leitura da reação foi feita utilizando um microscópio de fluorescência composto com uma fonte de luz de alta intensidade (luz Ultra Violeta). Os resultados foram expressos pela maior diluição do soro em que ainda se observa fluorescência específica. Nas amostras que tiveram titulação 1/320, a reação foi repetida e foi feita nova diluição (1/10 - 1/20480). Foram consideradas como positivas as reações que mostraram

fluorescência em pelo menos metade do campo observado ao microscópio com diluição  $\geq 1:40$ .

#### 4.4.3 Xenodiagnóstico.

Para os xenodiagnósticos, foi utilizada uma média de 60-80 fêmeas de flebotomíneos por animal, dispostos em pequenos potes com piso de gesso e, na parte superior, tela com pequenos poros por onde os insetos podem se alimentar. Os potes foram transportados em caixas de isopor com chumaços de algodão levemente umedecidos em água destilada no seu interior, para manutenção da umidade. Os insetos foram alimentados com açúcar diluído na proporção de 1:1 em água destilada, embebidos em filetes de algodão colocados na parte superior dos potes.

Para os xenodiagnósticos da área suburbana foram usadas *Lu. longipalpis* criadas no insetário do Instituto Nacional de Saúde (INS) em Bogotá. Os insetos foram alimentados por pelo menos 40 minutos, em diferentes locais do animal, como orelha e abdome, e, no caso dos machos, também no escroto. Os xenodiagnósticos foram feitos nas horas do dia pela falta de segurança de trabalhar à noite, quando os insetos são ativos de acordo com sua fisiologia. Com a intenção de simular essa condição de obscuridade, os potes foram envolvidos em sacolas plásticas pretas durante o repasso das fêmeas.

Os insetos alimentados foram transportados para o laboratório e, com o auxílio de sugador manual, foram transferidos para gaiolas maiores. As caixas foram mantidas em estantes no insetário com temperatura que variava de 25°C a 26°C e umidade de 70% a 80%. Os flebotomíneos foram mantidos até o sétimo dia, quando foram submetidos à temperatura negativa; em seguida, foram lavados com soro fisiológico, contendo uma gota de detergente, e dissecados, utilizando-se estiletes, em lâmina de vidro, com uma gota de solução salina estéril. Os espécimes foram examinados em microscópio óptico com aumento de 40x para observação de infecção por flagelados.

Os insetos dissecados foram colocados em tubo eppendorf® para armazenamento a -20 C° até a extração de DNA. As lâminas que apresentavam formas sugestivas de *Leishmania* spp. foram cultivadas em meio NNN. Os flebotomíneos mortos antes da dissecação foram acondicionados em “pools”, no

máximo dez indivíduos, e armazenados para posterior extração e amplificação de DNA.

#### **4.4.4 Extração de DNA.**

Antes de execução da PCR, procedeu-se à extração do DNA: a) dos isolados obtidos dos animais e humanos; b) de tecidos de orelha e cauda (gambás); c) de sangue dos gambás; d) de glóbulos brancos dos cães; e) de biópsias de lesões; d) dos flebotomíneos. Utilizou-se o “kit” comercial DNA DNaeasy® Blood and tissue kit (Qiagen Inc, Chatsworth, California, USA), de acordo com as instruções do fabricante, com uma variante que as biópsias foram maceradas e incubadas com proteinase K (20 mg/ml) overnight a 56°C antes dos procedimentos da extração. A pureza e concentração do DNA extraído foram quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific), em uma absorbância de 260 nm e armazenado a -20C°.

#### **4.4.5 Caracterização molecular e isoenzimática.**

##### **4.4.5.1 Caracterização molecular de espécies de *Leishmania* por hsp70 PCR-RFLP.**

Os DNAs extraídos das amostras foram submetidos a PCR convencional com o par de iniciadores hsp70 234p (hsp70P4) 5' GGA CGA GAT CGA GCG CAT GGT3' e 5' TCC TTC GAC GCC TCC TGG TTG3' que tem como alvo o gene que codifica para a “heat-shock” proteína de 70kDa (hsp70) e que amplifica teoricamente uma sequência de aproximadamente 240 pb, usando condições previamente descritas (76). Resumidamente, foram usados os iniciadores numa reação de volume final de 50µl, contendo 4 µl de DNA, 10µl de tampão de reação (100 mM Tris– HCl, pH 8.8; 500 mM KCl, 1% Triton X-100), 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 pmol de cada iniciador, 0,25 µM de dNTP e 1.0 U de Taq polimerase. A amplificação consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, 32 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, ligação dos iniciadores a 62°C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min e 30 s, seguido de uma extensão final de 10 min a 72°C. Dois tubos contendo todos os componentes da reação, à exceção do DNA molde, foram utilizados como controles negativos. Como controle positivo foi utilizado o DNA das cepas de referência: *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS94,), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/DR/75/M2903), *L. (L) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8)



Foi realizada uma eletroforese do produto amplificado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, usando o marcador de peso molecular de 100 pares de base. A corrida ocorreu a uma voltagem de  $\approx 90$  V / 5 minutos seguida de 110 V / 30 minutos. A visualização dos produtos de PCR das amostras de DNA amplificado foi efetuada sob iluminação ultravioleta, sendo em seguida fotografados no sistema UVIDOC (Alfagene, Fords, USA).

Os produtos de amplificação que tiveram bandas fortes foram digeridos separadamente com as enzimas *HaeIII* e *Sau3AI*, separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (Genephor®) e corados pelo nitrato de prata para visualização das bandas resultantes. No caso contrário, foram enviados a sequenciar no sequenciador automático (ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing) da Plataforma de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (PDTIS-FIOCRUZ), Rio de Janeiro. Sequências consenso de duas linhas para frente e duas reversas foram obtidas e editadas no pacote de software de Phred/Phrap/Consed (University of Washington, Seattle, WA, EUA). Sequências com valores de Phred abaixo de 20 (baixa qualidade) foram descartadas.

#### ***4.4.5.2 Eletroforese de isoenzimas (Multi Locus Enzyme Electrophoresis).***

As amostras isoladas em cultura foram identificadas pelo método-ouro aceito pelo Ministério da Saúde do Brasil e da Colômbia: eletroforese de isoenzimas ou “Multilocus Enzyme Electrophoresis” (MLEE). O ensaio foi realizado seguindo o fluxo do Serviço de Referência para Tipagem de Leishmania, oferecido pelo Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose do IOC (LPL), seguindo protocolo padronizado (108) para dois sistemas enzimáticos capazes de distinguir as principais espécies circulantes nas Américas (6-fosfogluconato desidrogenase -6PG e glicose 6 fosfato desidrogenase -G6P), sempre em associação com amostras de referência para todas as espécies circulantes nesse continente (109).

#### ***4.4.5.3 Tipagem por sequenciamento de ITS1rDNA***

O DNA extraído foi submetido à técnica de PCR para amplificação de ITS1 (internal transcribed spacer 1) do locus do DNA ribossomal (rDNA), usando primers já descritos (LITSR 5' CTGGATCATTTCGGATG 3' e L5.8S 5'

TGATACCACTTATCGCACTT 3'), que amplificam um fragmento de aproximadamente 350pb (110).

Na PCR, foi realizada a amplificação de um fragmento de aproximadamente 350pb por meio da seguinte reação: solução tampão 1x (200 mM Tris-HCl pH8,4, 500 mM KCl), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de mistura de dNTPs, 0,5 pmol do iniciador LITSR, 0,5 pmol do iniciador L5.8S, 1 U de Taq DNA polimerase e 5 µl de DNA molde, em um volume final de 25µL. A amplificação foi realizada alternando-se 33 ciclos de desnaturação a 95°C por 30seg, anelamento a 52°C por 1min e extensão a 72°C. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Tubos contendo todos os componentes da reação, à exceção do DNA molde, foram utilizados como controles negativos. Como controle positivo foi utilizado o DNA das cepas de referência *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS94.), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/DR/75/M2903), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8)

#### 4.4.5.3.1 Clonagem e sequenciamento.

As amostras de tecido e sangue dos animais, que apresentaram uma banda de aproximadamente 350pb, no gel da PCR do gene ITS1, foram clonadas por meio de transformação bacteriana, utilizando como células competentes a espécie bacteriana *Escherichia coli* (DH5-α) e o Kit comercial de clonagem Pgem® ref A3600 de Promega. A clonagem foi utilizada para aumentar o material gênico das amostras positivas e selecionar apenas o fragmento amplificado para sequenciamento.

Os procedimentos realizados na clonagem foram: preparação da célula competente pelo método químico (CaCl<sub>2</sub>), no qual as colônias de DH5-α foram incubadas a 37°C overnight sob agitação em 04 ml de meio Luria-Bertani (LB); no dia seguinte foram incubados 02 ml de cultura crescida em 100 mL de meio LB e incubados a 37° sob agitação até DO<sub>600</sub>=0,5. Após ter atingido a DO<sub>600</sub>, o meio com DH5-α foi centrifugado 4000 RPM/10/4°C, para formação de pellet, mantendo em gelo. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 40 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1M estéril e refrigerado; as amostras foram mantidas por uma hora em gelo. Em seguida foi realizada uma nova centrifugação a 4000 RPM/10/4°C, mantendo sempre em gelo. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante e o pellet foi ressuscitado em 01 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1M estéril e congelado; foram feitas alíquotas de 100ml utilizando microtubos de polipropileno de 1,5ml estéreis.

Após as células competentes terem sido preparadas, foi realizada a reação de ligação, com a utilização do kit comercial CloneJET™ PCR Cloning Kit. O preparo da reação foi realizado para cada amostra e se seguiu o protocolo do fabricante; foi utilizado um microtubo de polipropileno de 0,2 ml para realizar a reação. Na reação, foram adicionados 10µl de tampão 2x, 4µl de produto da PCR (~150ng), 3µl de água livre de DNA, 1µl de DNA Blunting Enzyme. Os reagentes foram incubados a 70°C/5min, em seguida resfriados no gelo e adicionados à reação 1µl de pJET 1.2 Blunt Cloning Vector (50ng/ µL) e 1µl de T4 DNA ligas. A reação de ligação foi incubada à temperatura ambiente por 30min, para que fosse realizada a próxima etapa da clonagem.

A última etapa da clonagem foi a transformação de células competentes DH5-α; nessa etapa, foi preparada para cada amostra uma solução em que foram utilizadas células competentes já preparadas na primeira etapa; a essas células foram adicionados 10µl da reação de ligação e homogeneizadas; as amostras foram mantidas em gelo por 45min; em seguida foi aplicado choque térmico a 42°C/2min, retornando para o gelo por 2min. Posteriormente, foi adicionado às amostras 1 mL de meio LB, incubou-se a 37°C sob agitação (150 RPM) por 60min, aplicou-se um “spin”, utilizando a centrifuga. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 200 µl de LB para concentrar a amostra; em seguida, as amostras foram plaqueadas em meio seletivo sólido contendo meio LB Agar com ampicilina; as placas foram incubadas a 37° C overnight. A partir daí só cresceram colônias transformadas.

Ao fim da clonagem, foram selecionadas, aleatoriamente, colônias nas placas com a bactéria transformada com realização da PCR das colônias, seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente, porém, a reação teve um volume final de 50µl com a substituição de 4µl de DNA molde por água livre de DNA e 1µl de colônias crescidas de bactérias transformadas. O ciclo utilizado no termociclador seguiu a mesma metodologia anteriormente descrita, assim como o procedimento para revelar os perfis de bandas amplificadas.

Do material amplificado na PCR das amostras clonadas, contendo perfil de banda de aproximadamente 350pb, foram utilizados 5µl para verificar os perfis de bandas amplificadas e o restante, 45µl (~150ng/µl) foram encaminhados para sequenciamento. Cada amostra teve seu DNA sequenciado nas duas direções. As amostras foram armazenadas em placas de 96 poços embaladas e enviadas para a

empresa MacroGen® (Seul, Coréia), onde foi utilizado o sequenciador automático (Applied Biosystems 3730XL).

As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas utilizando o programa MEGA® 6.0; a construção da árvore filogenética foi conduzida neste mesmo programa(111). As sequências foram agrupadas pelo método de distância por agrupamento, utilizando o algoritmo Neighbor-joining (112) e o modelo de substituição de nucleotídeos de Kimura- 2- parâmetros (113). A consistência estatística foi calculada por 1000 repetições pelo método de bootstrap (114).

Após a análise da árvore filogenética, foi realizada uma busca no banco de dados do NCBI utilizando como algoritmo Blast, para verificar a identidade entre espécie depositada no Genbank e as sequências amplificadas de infecção, na busca de se identificar a espécie de *Leishmania* presente nas amostras.

#### ***4.4.5.4 Tipagem por sequenciamento multilocus (MLST).***

As amostras foram sequenciadas para sete genes que codificam enzimas metabólicas: glicose-6-fosfato desidrogenase (G6P), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH), manose fosfato isomerase (MPI), isocitrato desidrogenase (ICD), malato desidrogenase mitocondrial (MDHmt), malato desidrogenase nuclear (MDHnc) e proteína de choque térmico 70kDa (hsp70). Esses genes estão localizados em cromossomos diferentes e já foram previamente utilizados para estudo da diversidade das espécies de *Leishmania* spp. a serem avaliadas. Tais dados justificam a escolha dos mesmos para o presente trabalho. Os genes foram amplificados por PCR com os iniciadores e seguindo o protocolo padronizado no LPL (88). Os produtos amplificados foram sequenciados e as sequências consenso geradas e editadas em Phred/Phrap/Consed Version: 0.020425.c. Sítios ambíguos foram marcados usando o código internacional IUPAC para combinações de duas ou mais bases. Todas as amostras foram manualmente alinhadas em MEGA 4.

##### ***4.4.5.4.1 Análise de complexos clonais por BURST.***

Complexos clonais foram definidos por BURST no software eBURSTv3 (Imperial College London, Londres, Reino Unido). O algoritmo BURST primeiramente identifica grupos mutuamente exclusivos de genótipos relacionados na população MLSA e tenta identificar os genótipos fundadores dos tipos de sequência de cada

grupo. Em seguida, o algoritmo prevê o genótipo fundador para os outros genótipos do grupo (115,116). A partir dessa análise, os complexos clonais podem ser inferidos, permitindo inferências epidemiológicas.

Um complexo clonal (CC) compreende organismos geneticamente relacionados, mas não idênticos. Para essa análise, os critérios para a formação dos CCs foram fixados no nível de maior estringência. Definiram-se os conjuntos de cepas relacionados como contendo pares de cepas que compartilham pelo menos L-1 alelos idênticos dos L loci com pelo menos um outro membro do CC, o que para os seis loci deste estudo resultaram em (6-1) ou cinco alelos idênticos.

O software eBURSTv3 foi originalmente criado para a análise MLST de bactérias, ou seja, organismos haplóides. As leishmanias são organismos aneuploides e apresentam eventos de recombinação. A abordagem utilizada permite o trabalho com modelos diploides, sendo que os dois alelos possíveis detectados quando há sítios ambíguos foram separados pelo algoritmo PHASE para cada marcador. Posteriormente, foram divididos aleatoriamente em dois bancos de dados, representando as combinações possíveis de dois alelos de cada isolado para os marcadores. Cada um dos bancos de dados foi, então, analisado separadamente para as análises BURST, produzindo dois resultados separados de possíveis complexos clonais. Dada a mínima diferença entre os dois resultados, um dos conjuntos de CCs foi escolhido ao acaso para representar os complexos clonais na última comparação com dados epidemiológicos.

#### *4.4.5.4.2 Rede Neighbor-net.*

Para visualizar as relações populacionais (rede filogenética) entre as cepas e a diferenciação fornecida pelos sete marcadores, a rede Neighbor-net (Nnet) foi montada no programa SplitsTree 4.0 (117).

Redes filogenéticas, tal como a rede Nnet, são mais convenientes para representar relações entre sequências intimamente relacionadas do que árvores estritamente hierárquicas, uma vez que permitem a exibição de todas as relações ambíguas em uma única figura (118).

A rede Nnet foi construída usando as sequências concatenadas de caracteres de nucleotídeos com os locais ambíguos criados a partir do MEGA5 para todos os loci e cepas. Os nodos da rede Nnet, representando cepas de indivíduos ou grupos,

foram modificados para representarem as variáveis epidemiológicas de origem da amostra e área de estudo.

#### **4.4.5.5 Real time PCR**

A determinação da carga parasitária por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi feita com os iniciadores direcionados para a amplificação da subunidade 18S do RNA ribossomal de *Leishmania* spp. (ssRNA) 5' (TACTGGGGCGTCAGA)3' e 3' (GGGTGTCATCGTTTGC)5' (119). A PCR foi feita de acordo com as condições descritas previamente (120). De forma resumida, a partir de 100ng de DNA da amostra e, para um volume final de reação de 20ul, foi adicionado 1X de Power Sybr Green (Applied Biosystems, Molecular Probes, Inc.) e 500 nM dos primers ssRNA. A qPCR foi desenvolvida com um primeiro passo de ativação de 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação, anidacão/extensão (95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 68°C por 30 segundo), processado em termociclador Step One (Applied Biosystems).

Usamos também outro primer de cópia única que amplifica o gene da DNA polimerase (DNAPol), empregando as condições descritas por Carrillo-Bonilla et al., (2014) (121), com os primers 5' - TTCCGCTTGCCATCCTCCTC-3' e 5'-TGAGCGCATCGAGTACCTCCTG-3'. Com as mesmas concentrações descritas, a PCR foi feita com as seguintes condições: amplificação 95°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 20 segundos a 60°C e 20 segundos a 72°C, com uma temperatura de fusão final entre 60°C e 90°C.

O cálculo da carga parasitária por amostra precisa de uma curva padrão; no caso da DNAPol, foi usada a curva padrão descrita no artigo acima referido, já que as amostras foram processadas no mesmo laboratório, com as mesmas condições descritas nesse artigo.

Com o gene ssRNA foi usada a curva padrão feita utilizando diluições em série de 10 vezes de 1 a 10<sup>9</sup> de DNA purificado total, extraído de 1x10<sup>6</sup> de *L. panamensis* (MHOM/PA/71/LS94). Este mesmo procedimento foi feito em cinco repetições; os dados com maior desvio padrão não foram considerados. As contagens dos parasitas foram feitas por microscopia em câmara de Neubauer. Os valores de Ct foram traçados em função das diluições de log (base 10) e as curvas padrão determinadas por regressão linear. Subsequentemente, as curvas padrão foram utilizadas para estimar o número total de parasitas (carga absoluta) na amostra.

Para determinar a carga relativa, o cálculo foi dado em mg no caso dos tecidos (orelha ou cauda) e em 100ul de sangue. Foi usado o número de parasitos da carga absoluta multiplicado pela quantidade de DNA da amostra, dividindo a quantidade de DNA inicial da amostra usada para a qPCR (geralmente 100ug). Em geral, o cálculo foi feito com os médias das quantificações nas extrações do DNA de cada amostra, para a sangue foi de 54,4 ng/ul, das orelhas de 455 ug/ul e das caudas foi de 702 ug/ul.

Nas amostras de animais usados para o xenodiagnóstico, o cálculo da carga parasitária foi dado de acordo com o número de células presentes na amostra; para isso, foi usada a metodologia padronizada por Cavalcanti et al. (2015) (120), para o qual foi determinado o número de células usando o gene constitutivo de cão hipoxantina fosforibosiltransferase (HPRT), o que permite normalizar o número de células na amostra com o fim de ter um dado mais preciso neste tipo de experimento.

#### **4.3.4.6 Extração de RNA**

Para a extração do RNA as amostras foram lisadas com 200-500 µl de Trizol (Invitrogen®), incubando por 10 minutos. Após, foram adicionados 500µl de trizol, mais 200µl de clorofórmio, incubando por 10 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 4°C por 15min a 14000rpm, removendo-se a fase aquosa, transferindo para um novo tubo com 600µl de isopropanol, incubando por 10 min a 4°C para precipitar o RNA. Depois foi centrifugado a 14 rpm durante 10 min o sobrenadante descartado e o RNA lavado com etanol 70% DEPC por 10 min à temperatura ambiente e ressuspendido com 30 µl de água livre de RNase. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%. A obtenção de DNAC foi feita usando 1 µg de RNA e o kit “Máxima first strand cDNA síntesis kit for RT-qPCR” de ThermoScientific®. O DNAC foi avaliado em gel de agarose.

#### **4.5 Ética**

Para todos os procedimentos seguiram-se as recomendações do Canadian Council on Animal Care (<http://www.ccac.ca/>), respeitando Direito Ambiental de Colômbia (Lei 99 de 1993). O trabalho tem aprovação do Comitê de Ética da Universidad de Antioquia CEEA Acta N° 2223 (Apêndice A).

#### **4.6 Inquérito de flebotomíneos**

Na área suburbana, o conhecimento da fauna flebotomínica foi obtido pelo laboratório parceiro na Colômbia –Programa de Estudo e Control de doenças Tropicais -(PECET), conforme resultados publicados por López et al., (2014) (90). O estudo de flebotomíneos foi feito na área silvestre. Os detalhes da coleta na área silvestre estão apresentados no Apêndice D.

Resumidamente, para a captura dos flebotomíneos na área silvestre foram escolhidas três localidades descritas anteriormente: El Aguacate, Sardi-Trigana, San Francisco. Em todas as áreas pesquisadas houve a ocorrência de casos de LTA, segundo informação do Serviço Municipal de Saúde. Foram escolhidas para a captura dos insetos nove casas, três em cada localidade, onde existiam casos humanos notificados de LTA, em pessoas que não se deslocaram. Alguns indivíduos possuíam lesões cicatrizadas e outras lesões ativas.

Armadilhas automáticas luminosas tipo CDC (122) foram instaladas bimensalmente por um ano, das 18h às 7h, uma no intra, quatro no peri e de uma a quatro no extradomicílio, durante três noites. Também foram utilizadas armadilhas tipo Shannon na cor branca no extradomicílio. Outros dois métodos de captura foram: i) armadilha adesiva (folhas de papel impregnadas com óleo de rícino) exposta de forma suspensa no extradomicílio, geralmente em um abrigo de animal, protegido de intempéries, sendo exposta, no mínimo, uma armadilha em cada ambiente. A exposição foi ininterrupta, de três a quatro dias, iniciando-se uma hora após o crepúsculo, do primeiro dia até a manhã do quarto ou quinto dia; ii) busca ativa nos sítios de criação, realizada com o auxílio de um tubo de sucção (tipo aspirador de Castro) e por uma fonte de luz, geralmente uma lanterna.

Os flebotomíneos capturados foram introduzidos em frascos, contendo álcool 70% devidamente rotulado, e transportados para o Laboratório Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales –PECET- e identificados com a chave de Young e Duncan (1994) (123).

#### **4.8 Dados climatológicos**

Os dados climatológicos de precipitação foram obtidos do site do IDEAM (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia). Para a



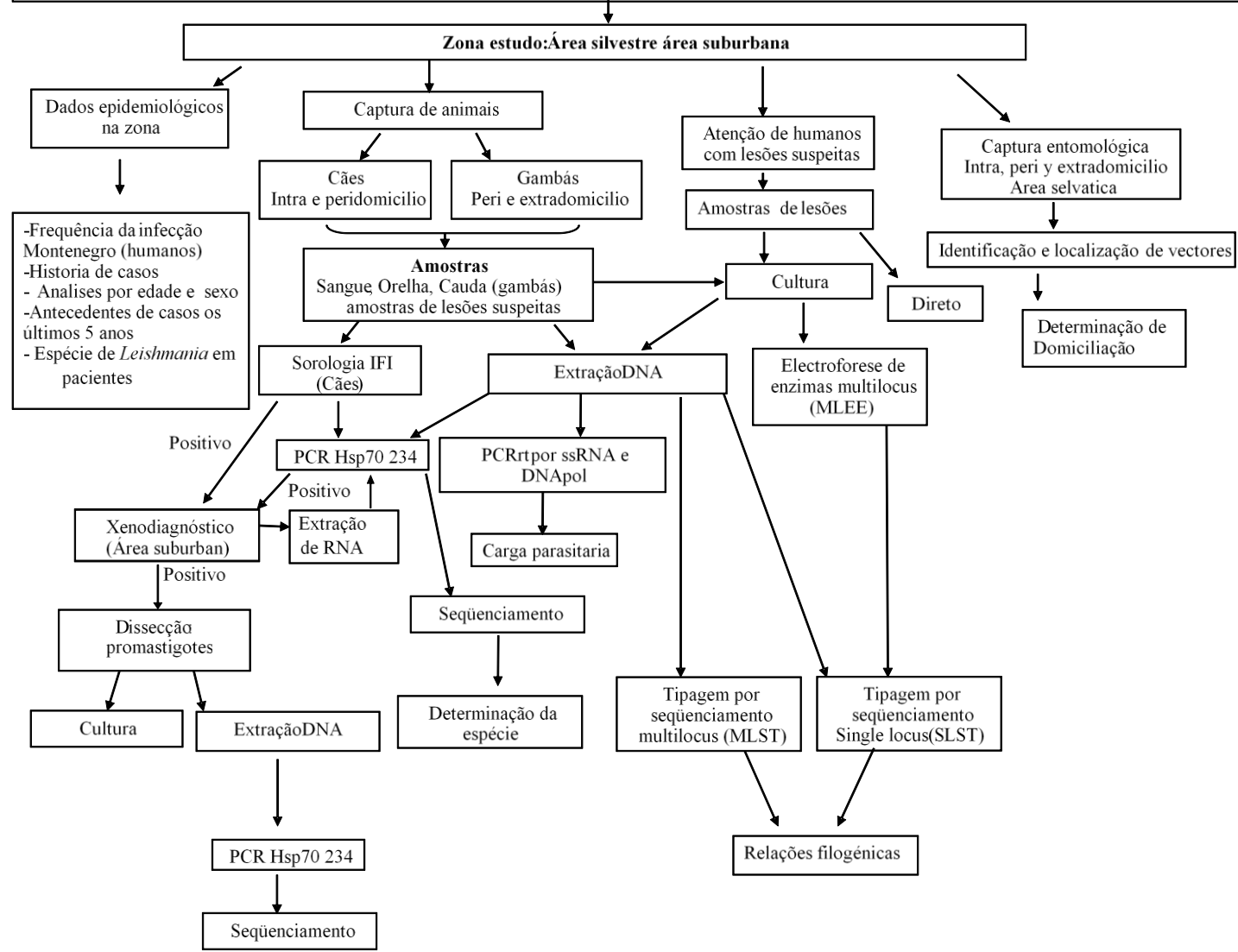
região silvestre foram usados os dados das estações de Titumate y Acandí. Para os dados da área suburbana foram usados os dados da estação de Puerto Valdivia.

#### **4.9 Equipe de trabalho**

Para o desenvolvimento do trabalho as seguintes pessoas fizeram parte da equipe; se descreve suas funções:

Trabalho entomológico: Horacio Cadena, Luz Adriana Acosta, Karina Mondragón. Trabalho com animais: Andrés Vélez, Horacio Cadena, Juan Esteban Perez, Diana Patricia Guzmán.

**ESTUDO DO CICLO DE TRANSMISSÃO SILVESTRE E SUBURBANO DE *Leishmania (Viannia) panamensis* NA COLÔMBIA: AVALIAÇÃO DO PAPEL DE *Didelphis marsupialis* (Didelphimorphia) E *Canis familiaris* (Carnívora) COMO POTENCIAIS RESERVATÓRIOS**



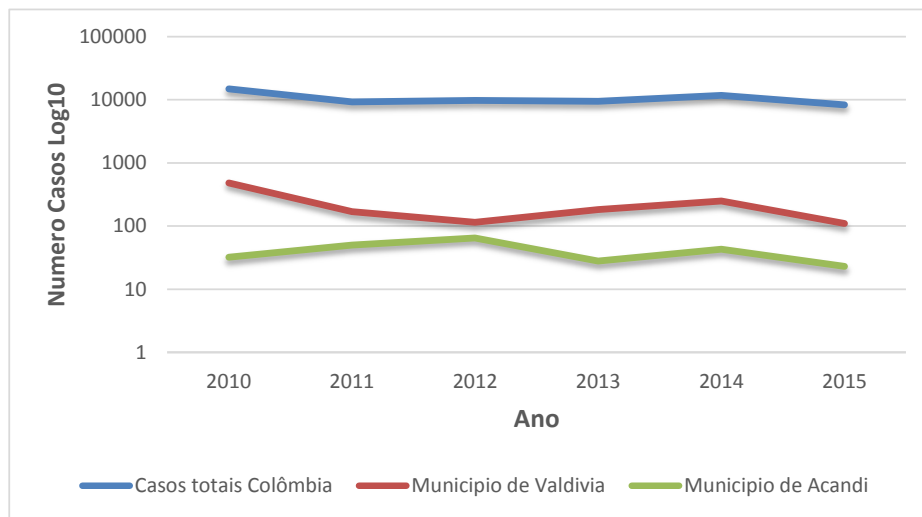
**Figura 4. 3:** Diagrama de Fluxo da metodologia do estudo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Resultados do objetivo 1

*Conhecer o status epidemiológico da leishmaniose tegumentar na população humana nas duas áreas de estudo através da atenção de casos suspeitos e a prova de Montenegro*

As análises dos resultados do banco de dados obtido do Instituto Nacional de Saúde (INS) permitem uma avaliação da epidemiologia da LTA nas duas áreas de estudo, pois mostram os casos notificados durante os últimos cinco anos. A média de casos de LT no país, entre 2010 e 2015, é de 10.540 casos por ano. Na área suburbana do estudo foi registrada uma média de 218 casos, enquanto que em Acandí (área rural) foi de 40 casos por ano. Na figura 5.1 estão apresentados esses resultados.



**Figura 5.1:** Número de casos de LTA dos últimos cinco anos em Acandí, área silvestre e Puerto Valdivia, área suburbana e casos totais da Colômbia. Fonte: Dados de INS-SIVIGILA (16)

### 5.1.1 Atenção de pacientes.

Durante o período do estudo, na área silvestre foram atendidos 36 pacientes com lesões suspeitas de LC e três de LMC. Desses, 16 pacientes (44%) tiveram confirmação parasitológica pelo método direto e 13 (36%) por cultura; dois casos de LMC foram confirmados por IFI e biopsia. Devido aos casos confirmados de LMC, fizeram-se RIFI nos pacientes com o fim de detectar pacientes com altos títulos de anticorpos que estão relacionados com suspeita de LMC (124). Nos pacientes positivos ou com história de LTA, foi feito um exame clínico rigoroso no septo nasal, com ênfase nos pacientes com títulos de anticorpos maiores de 1:32, mas nenhum dos pacientes com títulos de anticorpos maiores apresentou lesões compatíveis com LMC (Tabela 5.1). O tempo desde os primeiros sintomas até seu diagnóstico foi de 1,2 anos.

De maneira contrária, na área suburbana, a média no tempo das lesões informada pelos pacientes foi de 65 dias, muito menor que o encontrado na área silvestre, ainda que seja considerado um tempo longo. Nessa região, foram atendidos 54 pacientes com lesões suspeitas de LTA e dessas 22 (41%) foram positivas através do método direto, 14 (26%) por cultura e uma por IFI (LMC). Seis pacientes tiveram suspeita de LMC, principalmente por ter reações exacerbadas na prova de Montenegro, mas só uma paciente foi confirmada com LMC, a qual foi devidamente tratada (Glucantime® 20mg/kg por 28 dias). Na tabela 5.1 são apresentados os resultados da atenção de pacientes em área suburbana.

Por outro lado, na área silvestre, a proporção de pacientes homens e mulheres foi maior que da área suburbana. O número de homens foi de 24 (66%), com 10 (28%) positivos parasitologicamente, enquanto de mulheres foi de 12 (33%), com 6 (17%) positivas. Na área suburbana, o número de homens atingidos foi de 21 (39%), com 12 positivos (22%), embora o número de mulheres foi maior: 33 (61%), com 10 (19%) positivas.

**Tabela 5.1:** Resultados das provas diagnósticas dos pacientes com lesões suspeitas de LTA em área silvestre.

Área	Sexo	Faixa etaria	Direto		Cutura		Tempo Evolução (dias)	Media numero lesões
			Pos	Neg	Pos	Neg		
<b>SILVESTRE</b>	Masculino	Criança	1	1	1	1	365	1
		Adulto	8	10	6	12	478	1,1
		Idoso	0	3	0	3	N/A	N/A
	Femenino	Criança	3	1	3	1	243	1,3
		Adulto	3	4	2	0	365	1
		Idoso	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A: Não avaliado; Pos: Positivo; Neg: Negativo

**Tabela 5.2:** Resultados dos testes de diagnóstico dos pacientes com lesões suspeitas de LTA na área suburbana

Área	Sexo	Faixa etaria	Direto		Cutura		Tempo Evolução (dias)	Media numero lesões
			Pos	Neg	Pos	Neg		
<b>SUBURBANA</b>	Masculino	Criança	5	6	2	9	34,2	5,2
		Adulto	5	2	4	0	61	2
		Idoso	2	1	1	2	60	1
	Femenino	Criança	4	8	2	10	56	3
		Adulto	5	12	8	13	55	1,3
		Idoso	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A: Não avaliado; Pos: Positivo; Neg: Negativo

### 5.1.3 Intradermorreação de Montenegro

A intradermorreação de Montenegro é uma reação de hipersensibilidade tardia que se consagrou como uma das provas mais usadas nos inquéritos epidemiológicos de LTA. Uma reação de Montenegro positiva em indivíduos de

## V. RESULTADOS

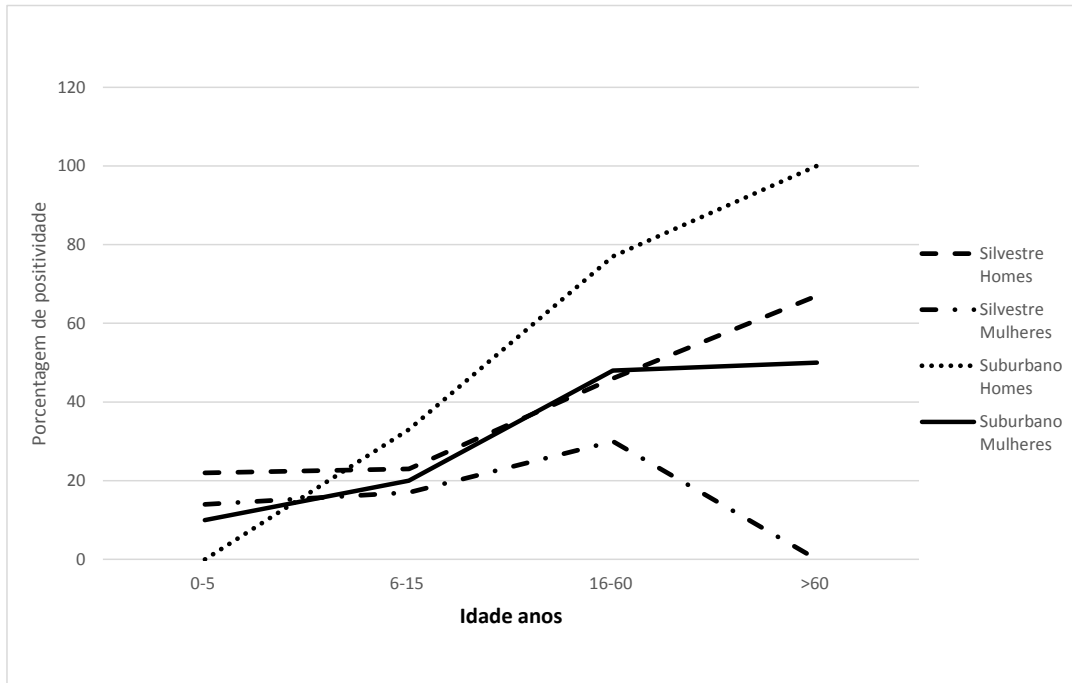
áreas endêmicas, mas sem história de leishmaniose tegumentar americana e sem qualquer lesão suspeita, indica contato do hospedeiro com o parasito. (125)

Na área silvestre 233, provas foram aplicadas, sendo 124 (53%) em homens e 109 (47%) em mulheres. A positividade global foi de 67 pessoas (29%), 43 (35%) homens e 24 (22%) mulheres. Na área suburbana, foi avaliado um total de 143 pessoas e a positividade foi maior do que na área silvestre: 61 (43%) foram positivas. Na tabela 5.3 apresentam-se os resultados da prova por sexo e grupo etário.

**Tabela 5.3:** Resultados da prova de intradermorreação Montenegro, de acordo com a faixa etária (anos) e gênero da população nas diferentes áreas de estudo.

Idade	Silvestre				Suburbano			
	Homens		Mulheres		Homens		Mulheres	
	Positivo/Total	Porcentagem	Positivo/Total	Porcentagem	Positivo/Total	Porcentagem	Positivo/Total	Porcentagem
0-5	5/23	22%	3/21	14%	0/9	0%	1/10	10%
6-15	9/39	23%	7/42	17%	6/18	33%	4/20	20%
16-60	27/59	46%	14/46	30%	20/26	77%	26/54	48%
>60	2/3	67%	0/0	0%	2/2	100%	2/4	50%
Total	43/124 (35%)		24/109 (22%)		28/55 (51%)		33/88 (38%)	
	67/233 (29%)				61/143 (43%)			

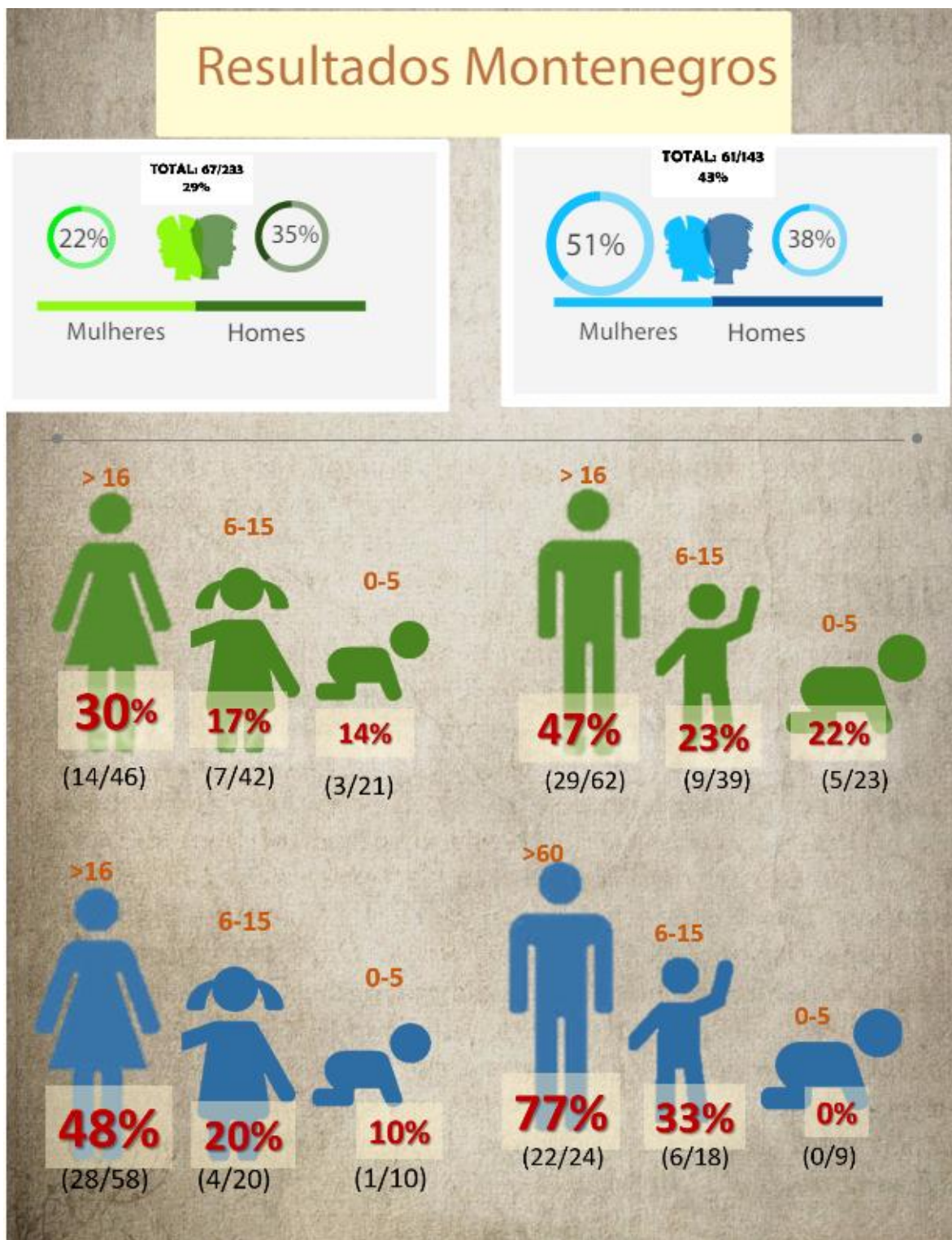
Na área silvestre, as análises estatísticas não mostraram diferenças entre as idades e os resultados de Montenegro. No entanto, nos resultados por sexo e a positividade de Montenegro, há diferenças ( $P=0,018$ ) com uma razão de prevalência de 1,36 (IC 95% 1,07- 1,73), sendo maior em homens que em mulheres. Na área suburbana, não foram encontradas diferenças estatísticas nem para gênero, nem para idade.



**Figura 5.2:** Frequência relativa dos resultados da prova de Montenegro por grupo etário e gênero nas duas áreas de estudo

Na figura 5.2 pode-se observar que a maior positividade se apresenta em homens da área suburbana seguido dos homens da área silvestre. Também é claro que a positividade da prova de Montenegro aumenta com a idade, sendo que as crianças começam a positivar muito precocemente, especialmente em área silvestre.

Os resultados se apresentaram de maneira gráfica na figura 5.3.



**Figura 5.3:** Resultados da prova de Monenegro nas duas áreas de estudo por sexo e idade



## 5.2 Resultados do objetivo 2

*Identificação e descrição das características clínicas da infecção por Leishmania e a soroprevalência nas espécies Canis familiaris e Didelphis marsupialis em duas regiões da Colômbia, uma com ciclo silvestre e outra com ciclo suburbano.*

Um total de 675 amostras de mamíferos e humanos foi coletado de 100 *Didelphis marsupialis*, 63 da área silvestre e 37 da área suburbana; 211 de cães, 82 da área silvestre e 129 da área suburbana; e 27 de humanos, 13 na área silvestre e 14 na área suburbana. Na Tabela 5.4, demonstra-se o tipo e quantidade de amostras nas duas áreas estudadas por espécie de animal examinado.

**Tabela 5.4:** Resultados da amostragem nos animais, nas duas áreas de estudo.

Característica/Espécie	SILVESTRE			SUBURBANO		
	<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>Canis familiares</i>	Humanos	<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>Canis familiares</i>	Humanos
<b>Total indivíduos</b>	63	82	36	37	129	54
<b>Número e tipo de amostras</b>						
Sangue	61	48		28	129	
Orelha	48	42		30	86	
Cauda	48	N/A		27	N/A	
Fígado	32	N/A		N/A	N/A	
Lesão	2	2	36	1	1	54
<b>Subtotal</b>	191	92	36	86	216	54
<b>Total</b>			<b>675</b>			

\*N/A: Não avaliado

Outras espécies silvestres foram capturadas nas armadilhas, como: *Proechymis semiespinosus*, *Metachyrus nudicaudatus*, entre outras. Na tabela, se apresenta a lista das espécies animais capturadas (além dos gambás), por área de estudo. (Tabela 5.5)

**Tabela 5.5:** Lista de outras espécies mamíferas capturadas nas armadilhas Tomahawk®, nas duas áreas de estudo

<b>Especie animal</b>	<b>Area Silvestre</b>	<b>Area Suburbana</b>
<i>Dasyprocta</i> sp.	1	-
<i>Dasypus novemcinctus</i>	1	-
<i>Marmosops</i> sp.	1	-
<i>Metachyrus nudicaudatus</i>	7	-
<i>Procyon cancrivorus</i>	1	-
<i>Proechymis semispinosus</i>	19	5
<i>Tamandua tetradactyla</i>	1	-

Em relação à recaptura, só houve uma, na área suburbana.

No exame clínico, a maioria dos cães apresentaram boas condições de saúde geral. Em alguns, foi observada uma baixa condição corporal e outros sinais clínicos não relacionados com a LTA, como conjuntivites, sarna etc. Dois cães apresentaram alterações dermatológicas sugestivas de LTA na área silvestre; ambos com lesões únicas e ulceradas, mas sem borda definida, localizadas na bolsa escrotal e de evolução crônica, de mais de um ano, sendo um dos animais com títulos de anticorpos de 1:64 e outro com 1:32. Uma das lesões teve uma área de 4cm<sup>2</sup> e a outra de 2cm<sup>2</sup>. No exame clínico geral, as condições foram normais, sem aumento de temperatura, raramente um aumento moderado de tamanho do linfonodo poplíteo. (Figura 5.3)



**Figura 5.4:** Lesão suspeita de LTA na bolsa escrotal do cão na área silvestre

Das amostras obtidas para exame parasitológico, somente em um dos cães foram observadas formas amastigotas, em pouca quantidade, >1 amastigote por campo. A cultura foi negativa, mas a PCR com o gen Hsp70P4 (234pb), feita da biopsia da lesão, foi positiva em dois animais com lesões dermatológicas. O produto da PCR foi sequenciado e resultou na identificação de *L. panamensis* como agente etiológico. Na área suburbana, um cão teve uma lesão sugestiva de LTA na orelha, mas todas os exames de diagnóstico realizados foram negativos.

Dois gambás apresentaram lesões sugestivas de LTA na orelha, ambos na área silvestre. Só uma das biopsias das lesões foi positiva na PCR, com a identificação de *L. panamensis* após o sequenciamento do produto de PCR.

A maioria dos animais não apresentou lesões, porém não se pode desconsiderar a possibilidade de que lesões incipientes tenham passado despercebidas.

### 5.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para Leishmaniose tem como objetivo conhecer o grau de contato dos cães com o parasito e seu status epidemiológico. Na RIFI os títulos variaram de 1:40, que são os positivos, a 1:160, que foi a última diluição testada.

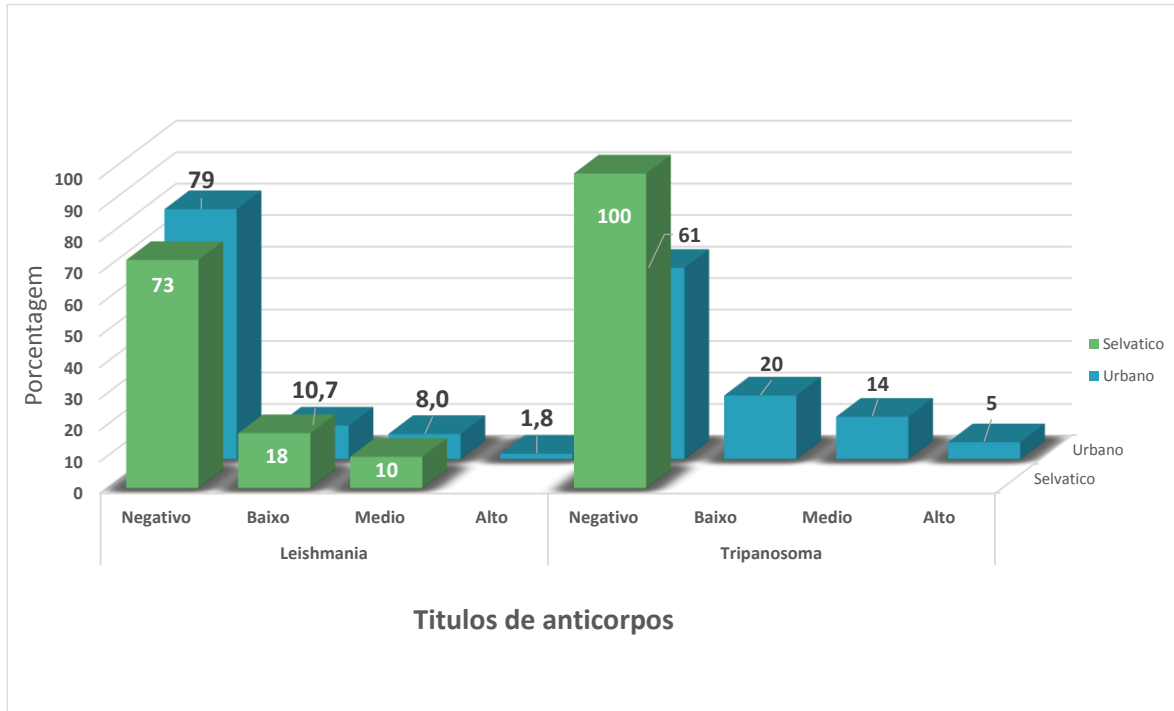
#### 5.2.1.1 RIFI em Cães

Foram realizadas 336 provas sorológicas, 192 para *Leishmania* spp. e 144 para *Trypanosoma cruzi*. A infecção natural por *Leishmania* spp. na área silvestre foi observada em 80/192 e a infecção por *T. cruzi* em 70/144 e, na área suburbana, foram 112/192 amostras positivas por *Leishmania* spp. e 74/144 positivas por *T. cruzi*.

O teste sorológico para *Leishmania* revelou a presença de 22 (27,5%) cães sororreagentes na área silvestre e 23 (20,5%) positivos na área suburbana; não houve diferenças estatísticas na sorologia de *Leishmania* spp. entre as áreas. Por outro lado, os resultados referentes à frequência de anticorpos anti-*Trypanosoma* mostram positividade somente na área suburbana, com 24 animais positivos (32%).

O grau de reatividade foi classificado em classes como: reatividade alta, quando os títulos são  $\geq 1:160$ ; reatividade intermediária, quando  $>1:40 < 1:160$  e reatividade baixa quando os títulos são = 1:40. Os dados referentes à frequência de animais positivos encontram-se na figura 5.4, na qual se pode observar a similaridade na distribuição dos títulos de anticorpos na área silvestre e suburbana para *Leishmania* spp., excetuando um par de animais com títulos altos de anticorpos na área suburbana. Assim, a maioria dos animais foram negativos para *Leishmania* spp., sendo 73% e 79% negativos em área silvestre e suburbana, respectivamente. Dos animais positivos para *Leishmania* spp., a maioria teve titulação baixa, sendo 18% na área selvática e 11% na suburbana. Um total de 10% e 8% apresentaram titulação intermediária, no ambiente silvestre e

suburbano, respectivamente. Apenas 1,8% (2/112) dos cães da área suburbana apresentam alta titulação ( $\geq 1:160$ ).



**Figura 5.5:** Distribuição percentual dos títulos da Reação de Imunofluorescência Indireta entre os cães nas duas regiões de estudo.

Foram observados cães positivos frente aos antígenos de *Leishmania* spp. e *T. cruzi* na área suburbana, em 13 amostras de cães positivo para ambos parasitos. De acordo com os seguintes critérios, esses cães foram considerados como tendo coinfeção ou como uma reação cruzada, sendo positivo para um dos parasitos.

- Se os títulos de anticorpos de ambos (*Leishmania* spp. e *T. cruzi*) são os mesmos e são  $> 1/40$ , a coinfeção é altamente sugestiva.

- Se os títulos de anticorpos de *T. cruzi* são mais altos que os títulos de anticorpos de *Leishmania* spp. e estes são  $\leq 1:40$ , foi considerado altamente sugestivo de reação cruzada positivo para *T. cruzi*.

## V. RESULTADOS

- Se os títulos de anticorpos de *T.cruzi* são mais altos que os títulos de anticorpos de *Leishmania* spp. e estes são  $> 1:40$ , foi considerado sugestivo de reação cruzada positivo para *T. cruzi*.








-Se os títulos de anticorpos de *Leishmania* spp. são mais altos que os títulos de anticorpos de *T. cruzi* e estes são  $\leq 1:40$ , foi considerado ser altamente sugestivo de reação cruzada positivo para *Leishmania* spp.

- Se os títulos de anticorpos de *Leishmania* spp. são mais altos que os títulos de anticorpos de *Trypanosoma* e estes são  $>1:40$ , foi considerado ser sugestivo de reação cruzada positivo para *Leishmania* spp.

De acordo com os critérios descritos, 8/13 amostras de cães apresentaram coinfeção e 5/13 foram consideradas reações cruzadas, conforme Tabela 5.5.

**Tabela 5.6:** Número de amostras com resposta sorológica para *Leishmania* spp. e *T. cruzi* e respectivos títulos obtidos na prova de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), em cães da área suburbana.

Numero de amostras em resposta sorologica a Tripanosoma	Numero de amostras em resposta sorologica a Leishmania					Totais
	Titulos	NR	1:40	1:80	1:160	
NR	37	2	5	1	45	
1:40	11	4	1	1	15	
1:80		3	1	1	5	
1:160		2	2		4	
Totais	48	11	8	2	69	

	Positivo para <i>Leishmania</i> spp.
	Titulação altamente sugestiva de reação cruzada (positivo para <i>Leishmania</i> )
	Titulação sugestiva de reação cruzada (positivo para <i>Leishmania</i> )
	Positivo para <i>Trypanosoma cruzi</i>
	Titulação altamente sugestiva de reação cruzada (positivo para <i>Trypanosoma</i> )
	Titulação sugestiva de reação cruzada (positivo para <i>Trypanosoma</i> )
	Sugestivo de coinfeção

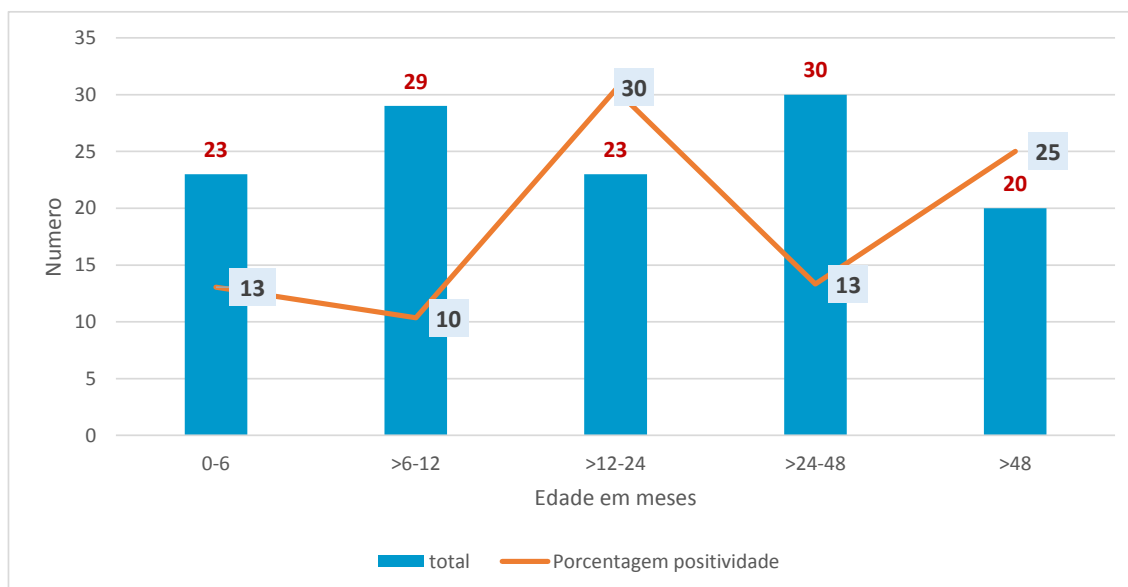
No total, foram 13 indivíduos positivos tanto para *Leishmania* spp. quanto para *Trypanosoma* spp., dos quais, na maioria (oito soros), os títulos para

## V. RESULTADOS

*Leishmania* spp. eram muito próximos aos títulos de *T. cruzi* e, portanto, foram classificados como coinfectados; em cinco amostras de soros foram observados títulos sorológico sugestivos de reação cruzada, quatro deles de *T. cruzi* com *Leishmania* spp., já que os títulos para *T. cruzi* foram mais altos que os títulos sorológicos para *Leishmania* spp.

Com estes resultados, subtraindo os quatro animais diagnosticados como falsos positivos por reação cruzada, a frequência de soros reagentes para *Leishmania* na área suburbana foi de 17%.

Por outro lado, fizemos análises dos resultados da sorologia de acordo com a idade na área suburbana, encontrando animais positivos desde tenra idade, menores de seis meses, indicando que o contato com o parasito se dá muito cedo na vida dos animais (Figura 5.5) e um ciclo de infecção ativo e recente na área de vida dos animais examinados. Diferentemente de vários estudos que demonstram que a taxa da infecção aumenta com a idade; neste caso, não se encontram diferenças estatísticas entre faixa etária, ou seja, ainda que os adultos tenham mais oportunidade de estar em contato com o parasito, o risco de infecção é o mesmo, inclusive em animais mais jovens.



**Figura 5.6:** Distribuição da positividade da RIFI/*Leishmania* por idade na área suburbana.

### 5.2.1.2 RIFI em *D. marsupialis*

Todas as amostras de soro dos *D. marsupialis* foram provenientes da área suburbana, já que as condições na área silvestre impediram a conservação adequada das amostras para a medição dos anticorpos nos soros dos gambás (Tabela 5.6).

**Tabela 5.6:** Número de amostras com resposta sorológica para *Leishmania spp.* e *T. cruzi* e respectivos títulos obtidos na prova de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), em *D. marsupialis* na área suburbana

Número de amostras em resposta sorológica a Trypanosoma	Número de amostras em resposta sorológica a <i>Leishmania spp.</i>							
	Títulos	NR	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	Totais
NR	2			1		1		4
1:20								0
1:40		2		1				3
1:80		1	3		1		5	
1:160		1		1				1
1:320				1				1
<b>Totais</b>		2	3	4	3	0	2	14

	Positivo para <i>Leishmania spp.</i>
	Titulação altamente sugestiva de reação cruzada (positivo para <i>Leishmania</i> )
	Titulação sugestiva de reação cruzada (positivo para <i>Leishmania</i> )
	Positivo para <i>Trypanosoma cruzi</i>
	Titulação altamente sugestiva de reação cruzada (positivo para <i>Trypanosoma</i> )
	Titulação sugestiva de reação cruzada (positivo para <i>Trypanosoma</i> )
	Sugestivo de coinfeção

Das 14 amostras de soros testadas, 9 (64%) foram reativos para *Leishmania spp.* com títulos que foram de 1:40 até 1:320. Dos dez positivos para *Leishmania spp.*, dois foram positivos para *T. cruzi*, com títulos de anticorpos similares e/ou altos para ambos parasitas, e estes foram considerados como animais coinfectados. Só dois animais apresentaram reação cruzada, sendo positivos para *T. cruzi* e falsos positivos para *Leishmania spp.*, apresentando títulos



## V. RESULTADOS

muito mais altos para *T. cruzi* do que para *Leishmania* spp. Finalmente, dois animais foram positivos para *T. cruzi*, mas tiveram reação cruzada. Nenhuma amostra foi positiva apenas para *T. cruzi*.

Comparando os resultados da sorologia com a PCR para *Leishmania* spp., observamos que, das 9 amostras positivas, apenas uma foi positiva na PCR. O único animal positivo na PCR apresentou títulos positivos.

### 5.3 Resultados do objetivo 3

*Avaliação da infecção natural por Leishmania spp. em gambás, cães e humanos e identificação da espécie de Leishmania infectante através do ensaio de isoenzimas e provas moleculares*

Uma das características básicas para o relacionamento de um animal como hospedeiro reservatório é a coincidência da espécie de *Leishmania* spp. na população humana com a espécie infectante na população animal. Para identificação das espécies de *Leishmania* spp. utilizamos os seguintes métodos previamente descritos na metodologia: Isoenzimas nos parasitas isolados e PCR-Hsp 70 P4 e sequenciamento em amostras clínicas.

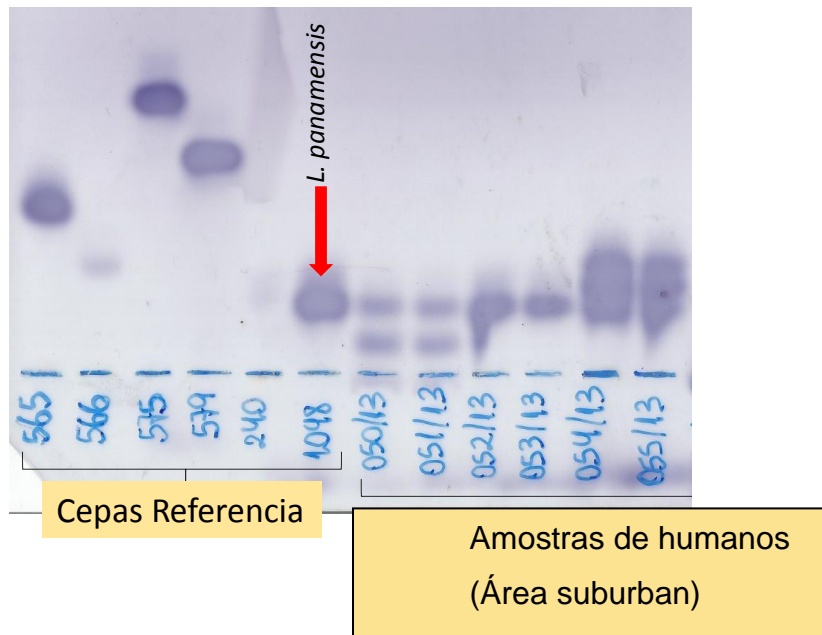
#### 5.3.1 Identificação por Isoenzimas em parasitas isolados

O material coletado nesse estudo gerou 2.655 culturas de cães e gambás e 80 de humanos, mas apenas um total de 34 (1.2%) isolamentos foram obtidos, sendo 16 na área silvestre e mais um na área suburbana. Na área silvestre, 13 isolamentos foram provenientes de lesões suspeitas de LTA em humanos, dois de sangue de gambás e um do intestino de *Lutzomyia* spp. Na área suburbana, 14 isolamentos foram obtidos de lesões de humanos e três de sangue de animais, dois gambás e um cão.

A identificação das espécies foi obtida através da comparação dos perfis isoenzimáticos para as enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH, 1.1.1.49) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH, E.C.1.1.1.44). A figura 5.6 apresenta os resultados obtidos pela análise das eletroforeses de isoenzimas. Para cada enzima, as bandas com mobilidade eletroforética idêntica foram consideradas como sendo o mesmo eletromorfo. A maioria dos isolados obtidos neste estudo apresentou perfil enzimático semelhante ao da cepa de referência *Leishmania panamensis* (MHOM/NI/1988/ZE09). Para a enzima 6PGD foi observado polimorfismo quando comparados à cepa de referência para os isolados 050/13, 051/13, 054/13, 056/13, todos de humanos da área suburbana (perfil heterozigoto para enzima 6PGD).

## V. RESULTADOS

Com estes resultados, todos os parasitas isolados foram tipados como *L. panamensis*. No entanto, os isolados dos animais da área suburbana foram identificados como *Trypanosoma spp.*



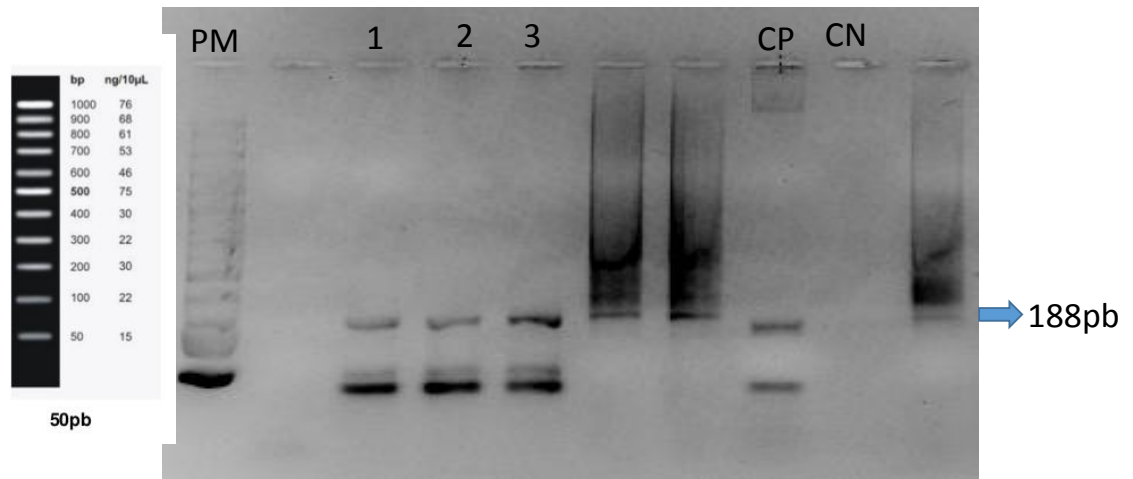
**Figura 5.7:** Padrão electroforético das enzimas 6pG dos isolados obtidos usando como padrão as cepas de referência:

- 565 - MHOM/BR/1975/M4147 *L. guyanensis*;
- 566 - MHOM/BR/1975/M2903 *L. braziliensis*
- 575 - IFLA/BR/1967/PH8 *L. amazonensis*
- 579 - MHOM/BR/1974/PP75 *L. infantum*
- 240 - MHOM/HN/1979/INC-4 *L. panamensis*
- 1048 - MHOM/NI/1988/ZE09 *L. panamensis*

Para complementar o resultado das amostras que tiveram um padrão electroforético diferente, essas foram submetidas a PCR e ao sequenciamento para os alvos Hsp70 e COI. O BLAST das seqüências obtidas por Hsp70 confirmaram se tratar de *L. panamensis*. Para as seqüências de COI, a análise foi feita por comparação com seqüências ainda não depositadas no NCBI, geradas pela Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz, (CLIOC). Este resultado também mostrou se tratar de *L. panamensis*.

## V. RESULTADOS

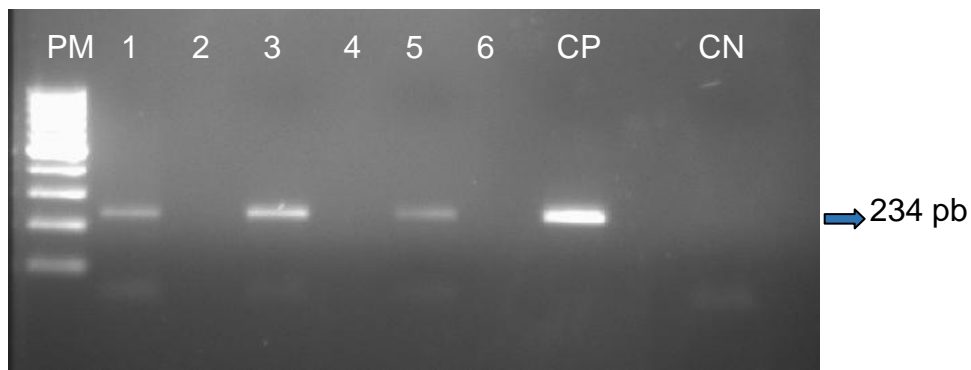
A tipagem para os *Trypanosomas* isolados de dois cães e um gambá na área suburbana foi feita no laboratório de “Biología y Control de Enfermedades infecciosas –BCEI-” da Universidade de Antioquia, usando a técnica de PCR com o alvo que o DNA satélite usando os iniciadores TcZ1 (5' -GCT CTT GCC CAC AMG GGT GC-3') e TcZ2 (5' -CAA GCA GCG GAT AGT TCA GG-3'), que amplificaram uma banda de 188 pb de acordo com as condições descritas por Mosser et al., 1989 (126) e modificada por Cantillo-Barraza et al., 2015 (47) (Figura 5.7).



**Figura 5.8:** Resultados da PCR para *T. cruzi* dos isolados da área suburbana. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR com uso dos primers TcZ1 TcZ2, demonstrando a positividade nas amostras de cultura (canaleta 1,2,3). CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo

### 5.3.2 PCR-Hsp 70 P4 e sequenciamento em amostras clínicas

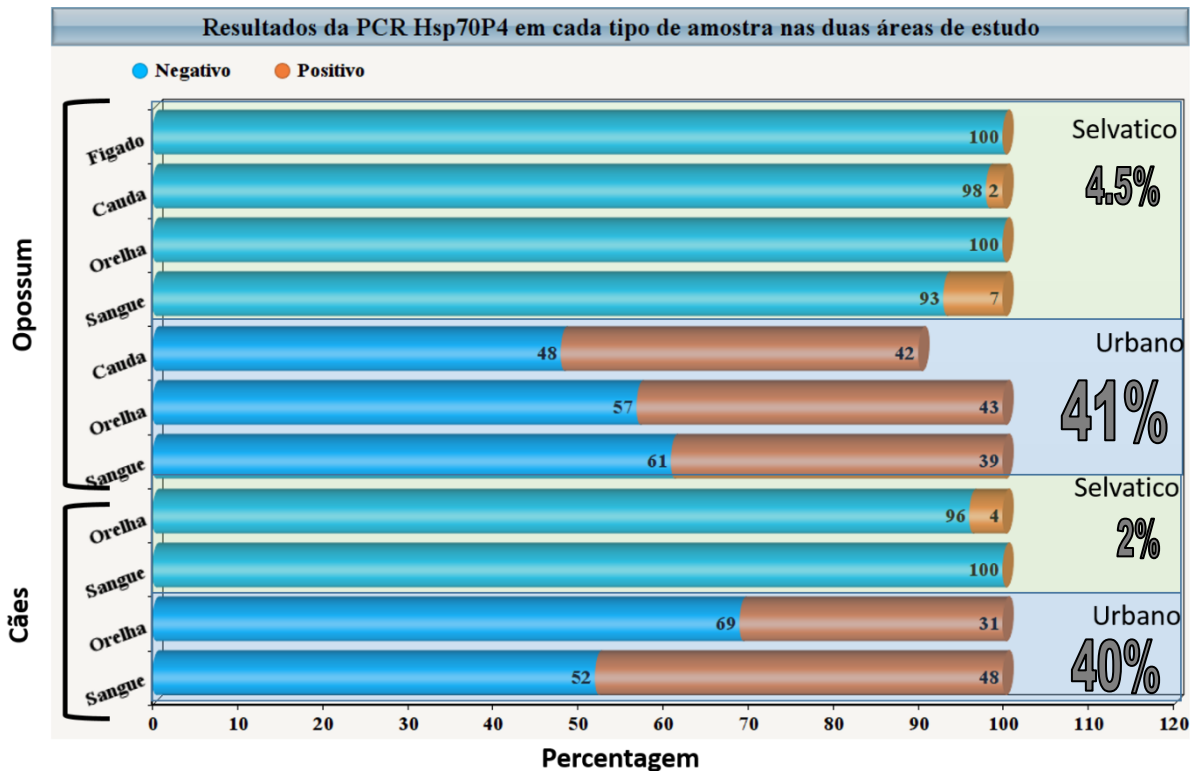
Cada amostra de orelha, sangue, cauda e fígado (no caso dos gambás) foi processada em duplicata com os iniciadores de Hsp70-P4. No caso de ter um resultado incompatível, uma terceira prova foi feita. Do total das 564 amostras processadas, 176 casos tiveram resultados diferentes e, portanto, uma terceira PCR teve que ser feita, para um total de 1304 PCR feitas. A figura 5.8 mostra produtos amplificados correspondentes a PCR Hsp70P4.



**Figura 5.9:** Gel de agarose 2% com produtos amplificados de Hps70 P4 colunas 1,3,5: Amostras positivas. Coluna 2,4,6: Amostra negativas. CP: Controle Positivo. CN: Controle Negativo. PM. Marcador do peso molecular de 1Kb

Na área silvestre, somente uma amostra de orelha de cão foi positiva pela PCR hsp70, do total de 27 amostras de orelha e 48 de sangue. No entanto, em gambás, a positividade foi um pouco maior, sem significância estatística, encontrando cinco amostras positivas, quatro das 57 amostras de sangue e uma das 47 amostras de cauda; nenhuma das 48 amostras de orelha foi positiva.

De maneira contrária, os resultados na área suburbana demonstraram uma alta positividade por esta prova. Nos cães, a positividade foi de 61/128 (48%) em sangue, 27/86 (31%) em orelha. Nos gambás, a positividade foi de 11/28 (39%) em sangue, 13/30 (43%) em orelha e 13/27 (48%) em cauda. Na figura 5.9 estão os resultados em porcentagem por animal e tipo de amostra em cada área de estudo.



**Figura 5.10:** Frequência relativa dos resultados da PCR Hsp70 P4 em cães e gambás das duas áreas de estudo de acordo com o tipo de amostra

As análises estatísticas entre a positividade e os diferentes tipos de amostras com a PCR hsp70 P4 demonstram que a única amostra que teve diferença estatística foi o fígado, com respeito a todas as outras amostras, demonstrando ser a amostra com menor positividade. Não houve diferenças entre a positividade das amostras de sangue, cauda e orelha. Com este tipo de PCR poderiam ser usadas enzimas de restrição para a identificação de espécie, mas os produtos amplificados devem ser visualizados com bandas intensas no gel, para que esses possam ser submetidos à digestão pela enzima *HaeIII*. Como só observamos bandas de fraca intensidade, os produtos foram submetidos ao sequenciamento.

As sequências foram editadas no programa MEGA e foi realizada uma busca no banco de dados do NCBI, utilizando o algoritmo Blast para verificar a identidade entre sequências amplificadas com sequências de espécie depositada no Genbank. As sequências, em sua maioria (80%), deram como resultado uma identidade de mais de 99% com *L. panamensis*. Algumas sequências tiveram o mesmo valor de identidade com *L. panamensis* e com outras espécies de *Leishmania*, como *L. guyanensis* (14% das sequências) e *L. shawi* (6%), espécies bastante relacionadas

## V. RESULTADOS

com *L. panamensis*. Interessantemente, a maioria das amostras que apresentaram dificuldade na diferenciação de espécie foram provenientes de amostras de cães.

### 5.3.2.1 PCR vs IFI

Analisando-se os resultados finais obtidos com soros de cães procedentes da área suburbana, onde houve positividade sorológica tanto para *Leishmania* spp. quanto para *Trypanosoma* spp., e com os resultados da PCR, que identificou *T. cruzi* nos isolados das duas espécies em estudo, fizemos PCR com o gene Hsp70P4 como prova confirmatória com os animais que tiveram anticorpos para ambos microrganismos. Os resultados estão apresentados na tabela 5.7.

**Tabela 5.7:** Resultados da PCR para *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. dos cães positivos por sorologia para ambos parasitas.

Código	Titulação Leishmania	Titulação Trypanosoma	PCR hsp70P4	PCR TcZ1,2	Diagnóstico	Diagnóstico sorológico (tabela 5.5)
47	1/160	1/80	Positivo	Positivo	Coinfecção	Sugestivo reação cruzada (Leishmania)
25	1/80	1/160	Positivo	Positivo	Coinfecção	Sugestivo reação cruzada (Trypanosoma)
57	1/80	1/80	Positivo	Positivo	Coinfecção	Sugestivo de coinfeção
45	1/40	1/160	Positivo	Positivo	Coinfecção	Altamente sugestivo reação cruzada (Trypanosoma)
81	1/40	1/80	Positivo	Positivo	Coinfecção	Sugestivo de coinfeção
26	1/40	1/40	Positivo	Positivo	Coinfecção	Sugestivo de coinfeção
27	1/40	1/40	Positivo	Positivo	Coinfecção	Sugestivo de coinfeção

## V. RESULTADOS

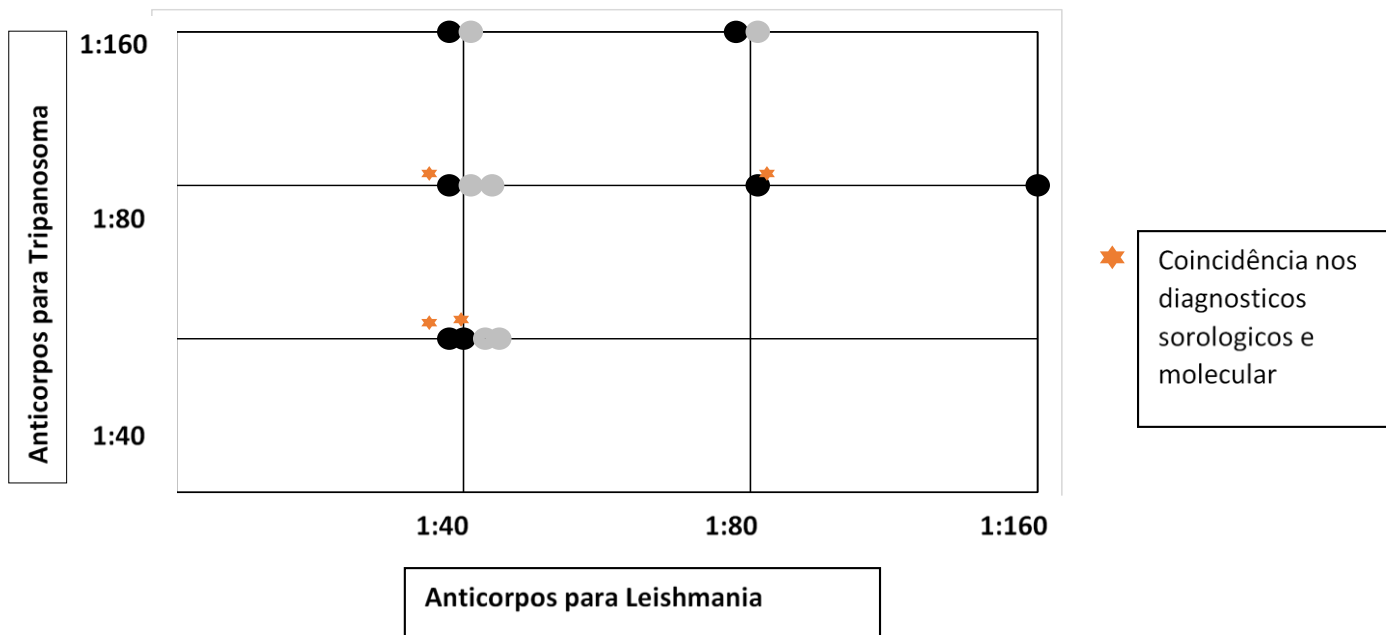
107	1/40	1/40	Negativo	Positivo	Reação cruzada ( <i>Trypanosoma</i> )	Sugestivo de coinfecção
123	1/40	1/40	Negativo	Positivo	Reação cruzada ( <i>Trypanosoma</i> )	Sugestivo de coinfecção
93	1/40	1/80	Negativo	Positivo	Reação cruzada ( <i>Trypanosoma</i> )	Sugestivo de coinfecção
121	1/40	1/80	Negativo	Positivo	Reação cruzada ( <i>Trypanosoma</i> )	Sugestivo de coinfecção
119	1/40	1/160	Negativo	Positivo	Reação cruzada ( <i>Trypanosoma</i> )	Altamente sugestivo reação cruzada ( <i>Trypanosoma</i> )
120	1/80	1/160	Negativo	Positivo	Reação cruzada ( <i>Trypanosoma</i> )	Sugestivo de reação cruzada ( <i>Leishmania</i> )

Dos treze cães da área suburbana que tiveram sorologia positiva tanto para *Leishmania* quanto para *Trypanosoma*, sete foram positivos na PCR para ambos parasitos, confirmando a coinfecção. Os seis restantes foram positivos somente para *Trypanosoma*, sugerindo a reação cruzada.

Observa-se uma baixa concordância (38%) entre os resultados do diagnóstico sorológico (Tabela 5.5) e molecular (Tabela 5.7), o que demonstra que é preciso prova confirmatória da PCR para ter um diagnóstico correto, já que, com os resultados somente da sorologia, não se pode diferenciar certamente se é uma reação cruzada ou uma coinfecção.

Por exemplo, os indivíduos 26, 107 e 123, embora tenham apresentado o mesmo resultado nas sorologias, apresentaram resultado diferente quando confrontado com a PCR; o mesmo aconteceu com as amostras 81 e 93. Na figura 5.10, pode-se observar mais claramente a diferença dos resultados entre reação cruzada e coinfecção, assim como a diferença entre os diagnósticos usando somente a sorologia ou prova de PCR.

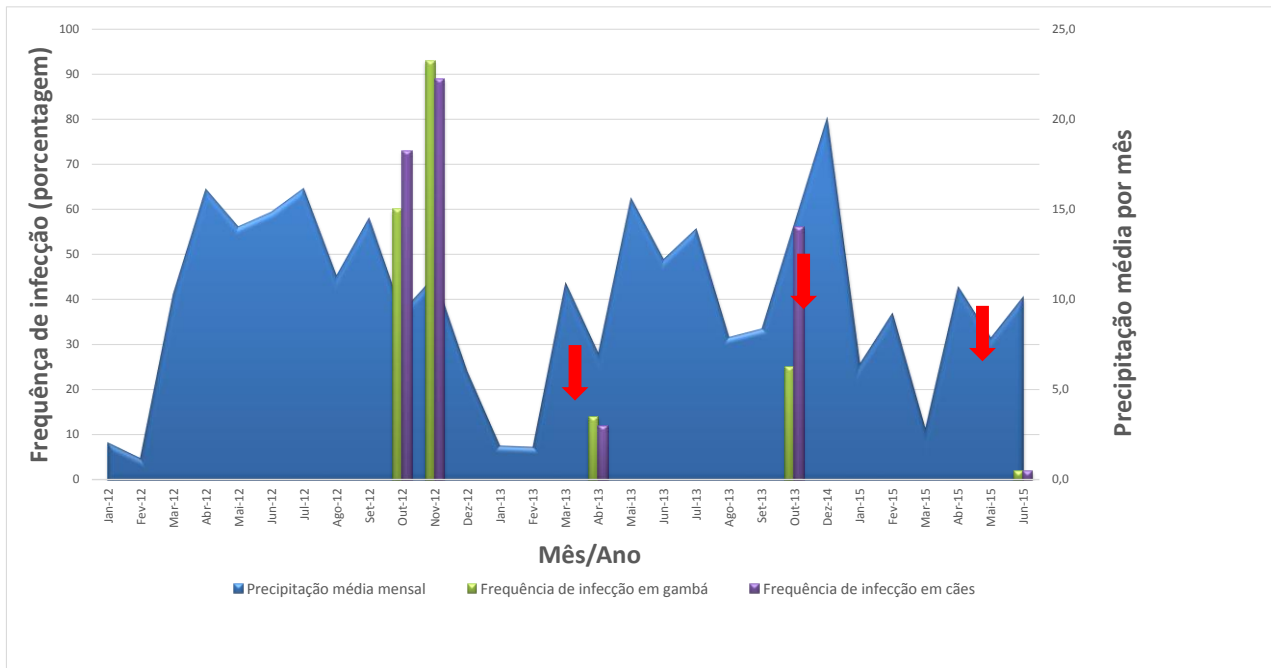




**Figura 5.11:** Relacionamento do diagnóstico das amostras positivas para *Trypanosoma* e *Leishmania* de acordo com títulos de anticorpos e a confirmação por PCR

### 5.3.2.2 Frequência da infecção em cães e gambás avaliada por PCR-*hsp70 P4* e na precipitação

Com os dados climatológicos do IDEAM e dados da frequência de infecção determinado por PCR *hsp70P4*, fez-se um relacionamento durante o tempo das capturas (Figura 5.11). Foram usados os dados só da área suburbana, pois a frequência de infecção medida por PCR na área silvestre foi muito baixa. Os resultados indicam que a frequência de infecção entre a população tanto de cães como de gambás flutuou durante o período, sendo quase de zero em alguns momentos do ano, mostrando que não há persistência da infecção durante todo o ano. A outra situação que pode ser observada no gráfico é que a frequência da infecção flutua de maneira similar entre as duas espécies de animais, gambás e cães. Esta flutuação parece ter um tipo de relação com a precipitação, ou seja, quando a chuva baixa dois ou três meses, encontra-se após uma diminuição da infecção. As setas vermelhas mostram o momento em que diminui a pluviosidade e logo se apresenta a diminuição da frequência de infecção.



**Figura 5.12:** Relação da positividade por PCR em gambás e cães da área suburbana com a pluviosidade durante o tempo de captura.

#### 5.4 Resultados do objetivo 4

*Determinar o grau de infecção através do cálculo da carga parasitária de Leishmania spp. por PCR em tempo real em cães e gambás de duas regiões da Colômbia*

Foram processadas sem importar seu resultado na PCR um total de 573 amostras de cães e de gambás empregando o gene DNAPol, das quais 142 foram positivas e 537 empregando o gene ssRNA sendo positivas 338. A média da carga parasitária por espécie de animal e por tipo de gene, de cada área de estudo, está apresentada na figura 5.12. A principal característica que deve ser ressaltada é a diferença na média do número de parasitas na área silvestre e na área suburbana, em ambas espécies e para os dois genes. Os resultados de sangue são apresentados por microlitro de sangue e de tecido por mg de tecido (orelha e cauda).

No entanto, o cálculo das médias de parasitas é diferente entre os dois genes, assim como sua sensibilidade, como é observado com mais detalhe na tabela 5.8. A maioria das amostras, de ambas as espécies de animais, foi negativa ou apresentou uma carga muito baixa, com menos de 10 parasitas, para os dois genes. Por outro lado, nos intervalos, a carga menor foi de 1 para ambos genes e a carga maior para DNAPol foi 258.241 parasitos, detectada em uma amostra de sangue de *C. familiaris* na área suburbana e a carga maior para o gene ssRNA foi de 684.643 parasitos, detectada em uma amostra de orelha de *C. familiaris* na mesma área.

Na figura 5.13 pode-se ver a diferença entre as médias da densidade parasitária nas duas áreas de estudo, sendo a carga parasitária muito maior na área suburbana avaliada com os dois genes para ambas espécies. Da mesma maneira, os resultados demonstram que a diferença entre os dois genes na área silvestre é menor, tanto que, na área suburbana, esta diferença aumentou significativamente. Na área suburbana, com o gene ssRNA, foi encontrada uma média maior na carga parasitária nos cães; de maneira contrária, usando o gene DNAPol, a carga foi maior nos gambás. Estatisticamente, houve diferenças entre as cargas parasitárias para ambos os genes entre a área silvestre e suburbana, com um OR 7,5 e um IC95%

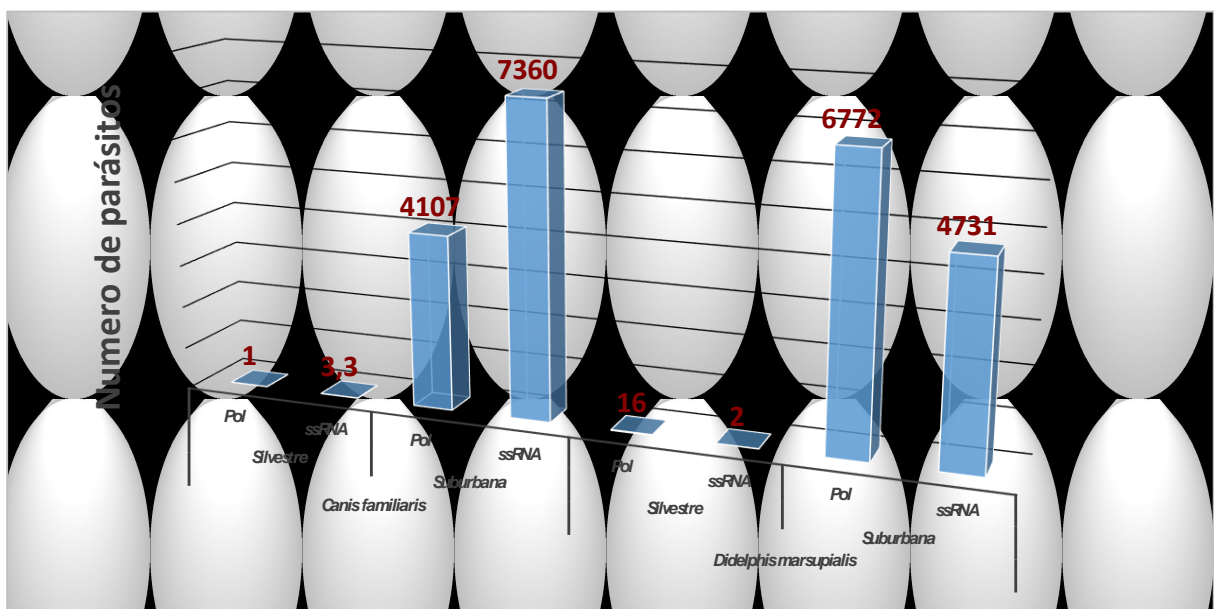
## V. RESULTADOS

(3,7-15,1) para o gene ssRNA e para o gene DNAPol um OR de 54,9 e IC95% (7,5-402,7).

As médias são influenciadas pelos resultados extremos, mas, no caso de ter dados tão dispersos, as análises entre os genes podem ser verificadas com a mediana. Usando a mediana, os resultados entre os genes parecem ser mais congruentes, exceto quando as amostras são da cauda dos gambás da área suburbana, como pode ser observado na tabela 5.8.

Com a intenção de facilitar as interpretações, devido à dispersão dos dados do número de parasitos e a quantidade de variáveis, os dados foram organizados em quatro categorias: (i) Carga muito baixa,  $<10$  parasitas; (ii) baixa,  $\geq 10$  a  $<10^2$ ; (iii) média,  $\geq 10^2$  a  $<10^3$ ; (iv) alta,  $\geq 10^3$  a  $<10^4$ ; (v) muito alta,  $\geq 10^4$ . Nas figuras 5.13-5.15 está apresentada a porcentagem das amostras que estão em cada categoria.

Nas figuras pode-se observar mais claramente que o gene ssRNA é mais sensível para detectar a infecção, pois teve uma positividade maior em comparação a DNAPol. Estatisticamente não houve diferenças entre espécies com o gene ssRNA, mas sim com o gene DNAPol. A maioria dos dados se agrupam nas primeiras categorias, ou seja, com cargas baixas, no entanto, há indivíduos da área suburbana que têm cargas na categoria alta.

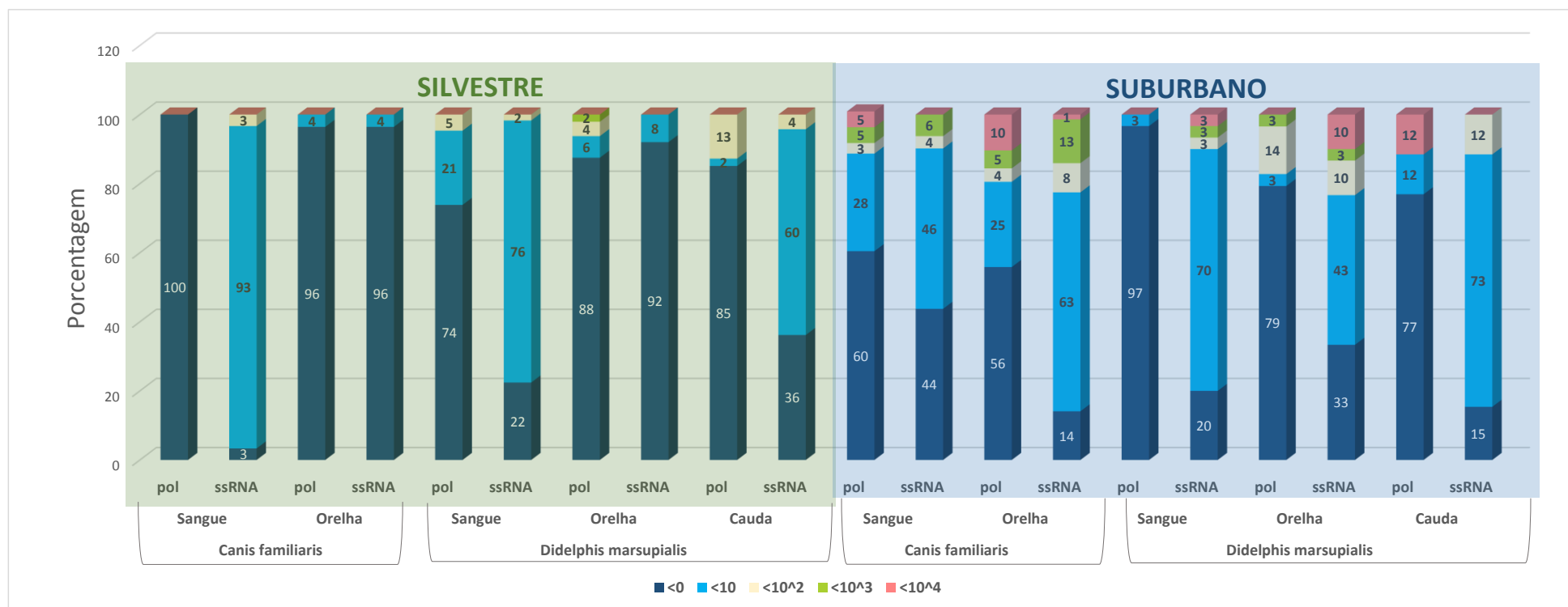


**Figura 5.13:** Médias do número de parasitos em *Canis familiaris* e *Didelphis marsupialis* nas duas áreas de estudo determinada por qPCR, empregando os genes DNAPol e ssRNA

## V. RESULTADOS

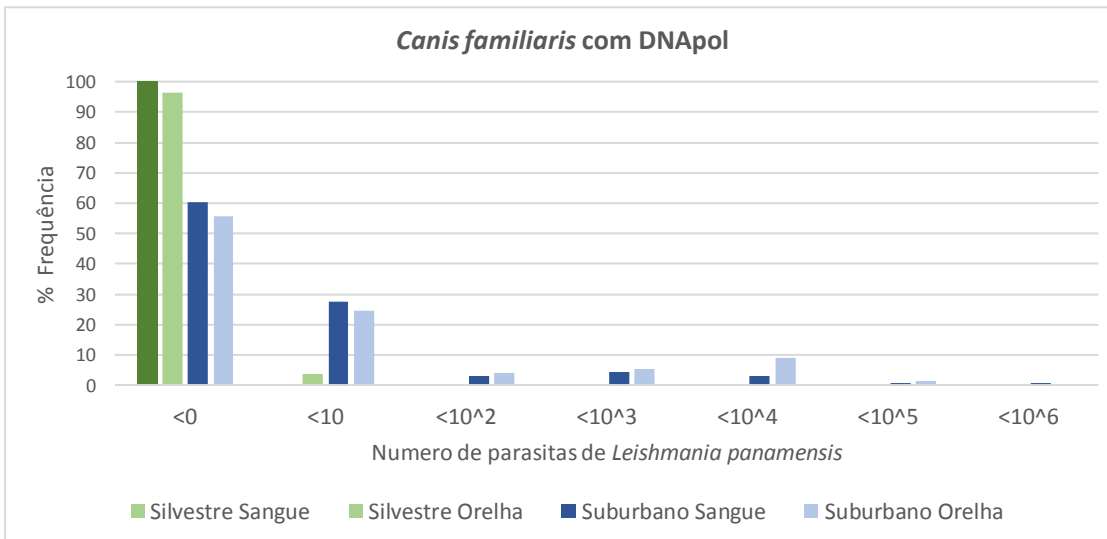
**Tabela 5.8:** Comparação da carga parasitária das amostras dos cães e gambás nas duas áreas de estudo e com os diferentes genes usados.

Especie	Área de estudo	Amostra/gene	n	N° Negativos	Media	Mediana	Intervalo	
<i>Canis familiaris</i>	Silvestre	<b>Sangue</b>						
		DNApol	47	47	0	0	0	
		SSRNA	60	2	3	1	1-91	
		<b>Orelha</b>						
		DNApol	28	27	3	3	3-27	
		SSRNA	28	27	2	2	2-27	
	Suburbano	<b>Sangue</b>						
		DNApol	134	81	5679	9	1-258241	
		ssRNA	112	49	56	2	1-1599	
		<b>Orelha</b>						
DNApol		77	43	1635	6	3-38886		
ssRNA		71	10	14039	1	1-684643		
<i>Didelphis marsupialis</i>	Silvestre	<b>Sangue</b>						
		DNApol	60	32	8	5	2-46	
		ssRNA	58	13	2	1	1-19	
		<b>Orelha</b>						
		DNApol	48	42	27	11	7-11	
		ssRNA	75	69	1	1	3	
		<b>Cauda</b>						
		DNApol	47	40	35	21	9-84	
	ssRNA	47	17	2	1	1-21		
	Suburbano	<b>Sangue</b>						
		DNApol	30	29	6	6	2-11	
		ssRNA	30	6	10982	1	1-263356	
		<b>Orelha</b>						
		DNApol	29	23	41	39	9-104	
ssRNA		30	10	2428	2	1-38556		
<b>Cauda</b>								
DNApol		26	20	8629	1345	1-42779		
ssRNA	26	4	6	1	1-75			

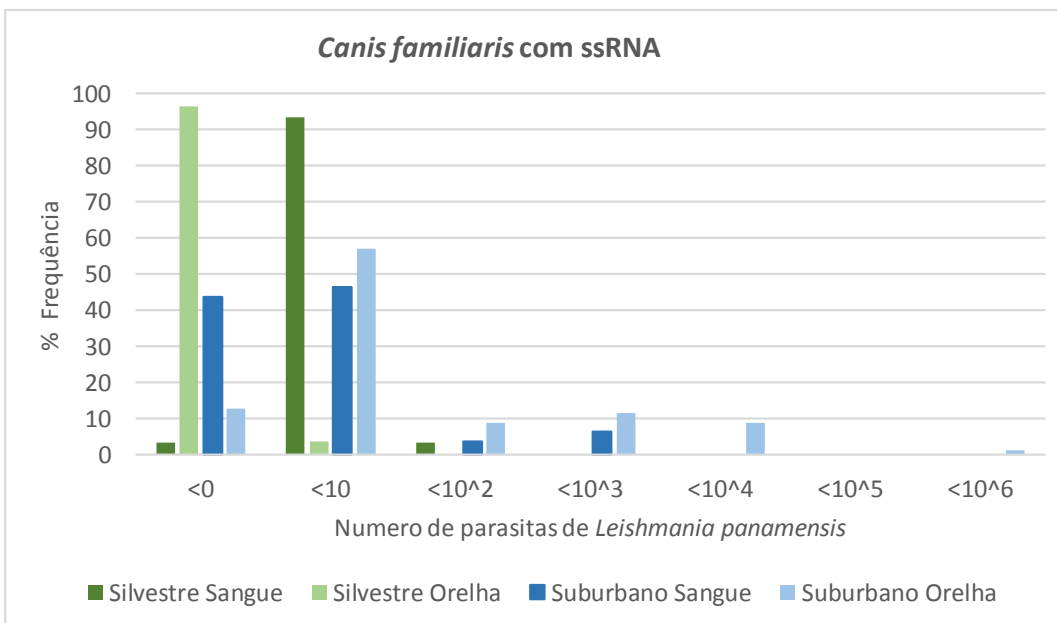


**Figura 5.14:** Frequência relativa da carga parasitária avaliada com dois genes, ssRNA e DNAPol, nas amostras das duas áreas de estudo

A)

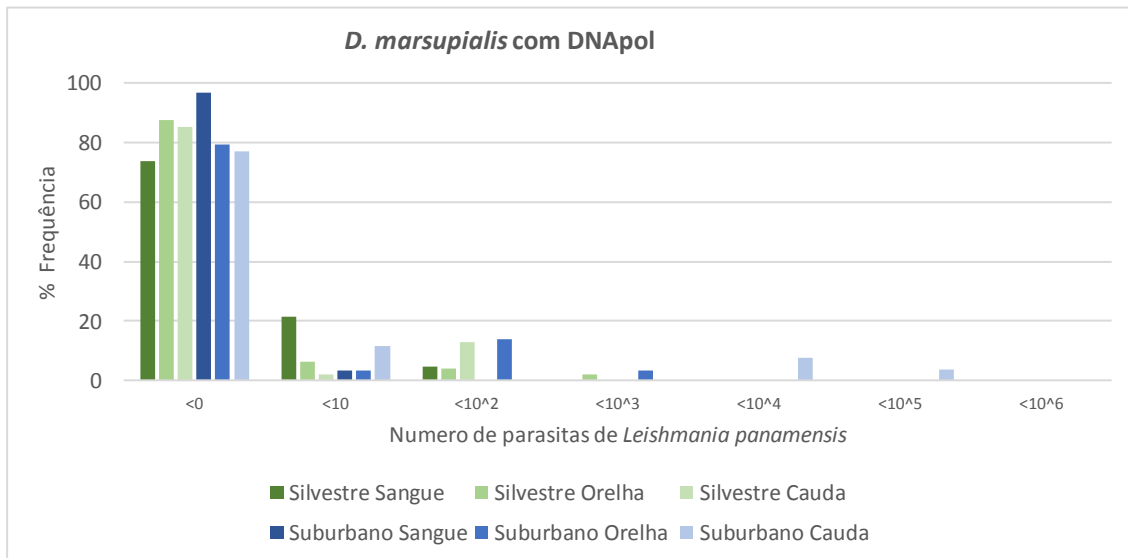


B)

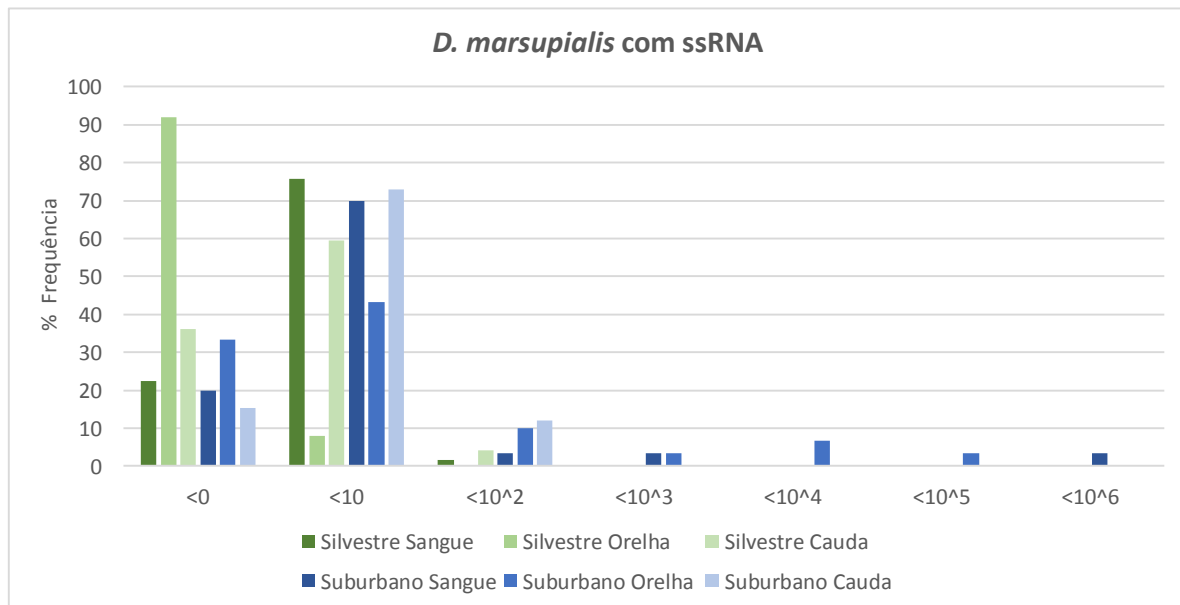


**Figura 5.15:** Distribuição da frequência do número de parasitos de *L. panamensis* em *C. familiaris* determinada por PCR em tempo real: a) com o gene DNAPol; e b) com o gene ssRNA, nas duas áreas de estudo. Os números de parasitas são expressos em ul em sangue (barra mais obscura) e em mg na orelha (barra clara) e em mg em cauda (barra mais clara). As cores verdes pertencem à área silvestre e as azuis à área suburbana.

A)



B)

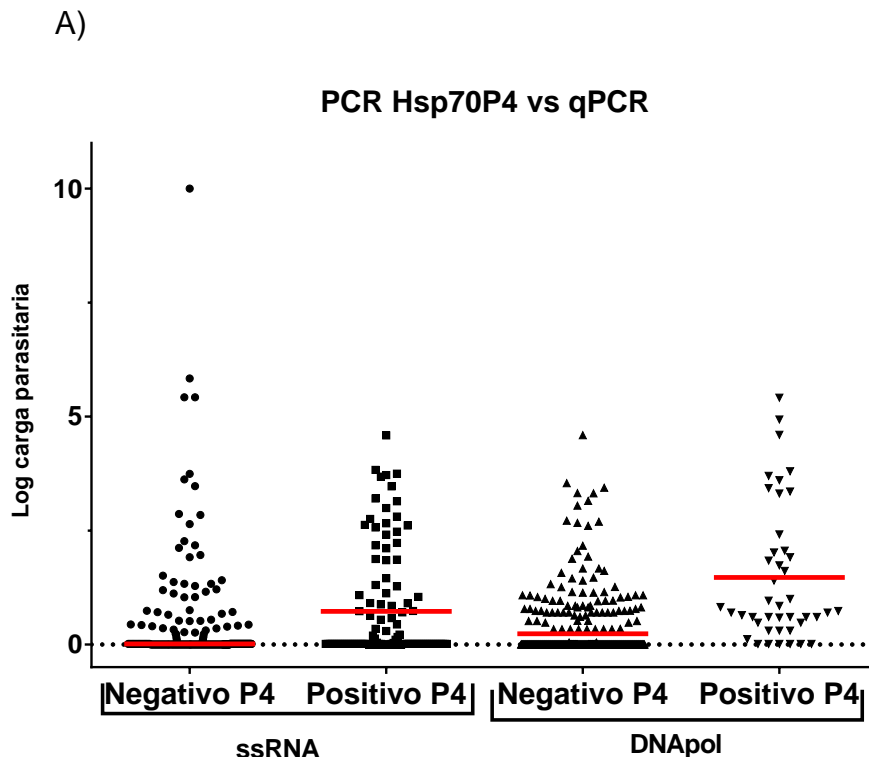




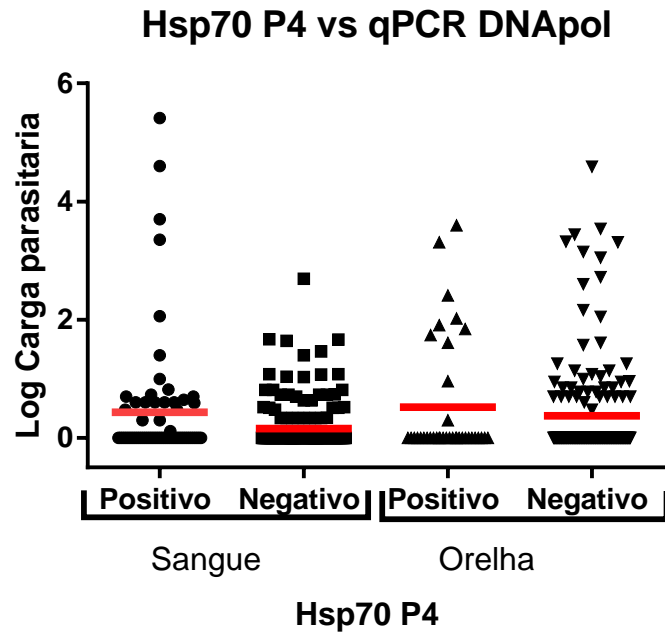
**Figura 5.16:** Distribuição da frequência do número de parasitos de *L. panamensis* em *D. marsupialis* determinada por PCR em tempo real: a) com o gene DNAPol; e b) com o gene ssRNA, nas duas áreas de estudo. O número de parasitos está expresso em ul em sangue (barra mais obscura) e em mg na orelha (barra clara) e em mg em cauda (barra mais clara). As cores verdes pertencem à área silvestre e as azuis à área suburbana.

#### 5.4.1 Relação entre PCR hsp70-P4 e a Carga Parasitária

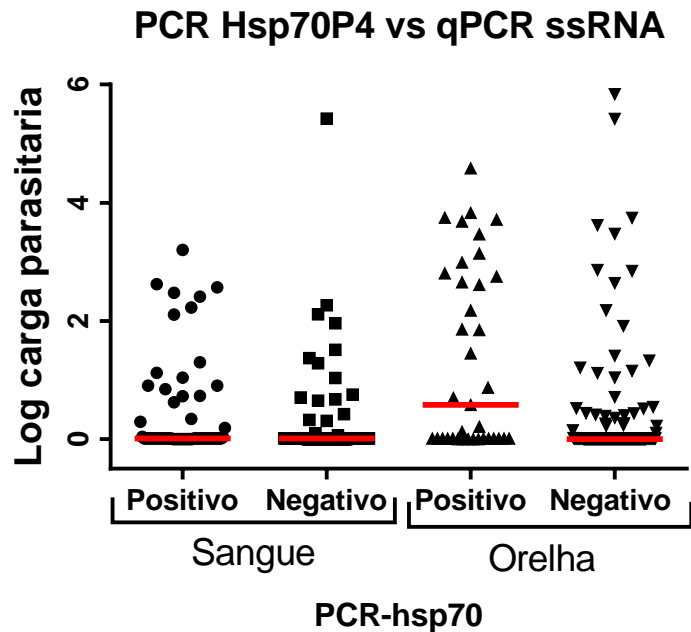
A PCR tem sido descrita em múltiplos ensaios como a técnica que provê maior especificação e sensibilidade; no entanto, a PCR em tempo real (qPCR) é ainda mais sensível que a PCR (127–129). Este trabalho demonstrou que há maior sensibilidade da qPCR que a PCR convencional usando o gene hsp70P4. Contudo, não houve relação entre a positividade ou negatividade da PCR convencional com a carga parasitária. Na figura 5.16 não se pode estabelecer claramente uma relação entre o resultado de PCR-P4 e a carga parasitária, no entanto, as médias da carga parasitária foram maiores nas amostras positivas para hsp70-P4, indicando que essa PCR é dependente do nível de infecção.



B)



C)



**Figura 5.17:** Carga parasitária (em logaritmo) comparada com os resultados da PCRhsp70P4. Os dados negativos em qPCR foram tomados como 0 e os dados de 1 como 0.01. A) Resultados de todos os tecidos. B). Resultados por tipo de tecido com o gene ssRNA. C). Resultados por tipo de tecido com o gene DNAPol.

## V. RESULTADOS

Finalmente não houve diferenças estatísticas entre as amostras de orelha, cauda e sangue, mas sim entre estas amostras e o fígado. Os valores foram: entre orelha e fígado  $P > 0.015$ , entre cauda e fígado  $P > 0.006$ , entre sangue e fígado  $P > 0.0002$ .

## 5.5 Resultados do Objetivo 5

*Avaliar a capacidade de transmissão dos parasitas de cães e gambás aos flebotomíneos através do método de xenodiagnóstico*

O xenodiagnóstico é uma ferramenta útil para estudos epidemiológicos, fornecendo informações sobre a infecciosidade dos animais, medindo a capacidade destes em transmitir o parasito ao vetor. Esta é uma característica fundamental, que deve ser determinada nos estudos de reservatórios (36) .

Nesse estudo, um total de 13 xenodiagnósticos foram realizados na área urbana, em oito cães e em cinco gambás. Nenhum foi positivo por microscopia, mas insetos alimentados em seis cães foram positivos pela PCR-Hsp 70P4.

### 5.5.2 Xenodiagnóstico na área suburbana

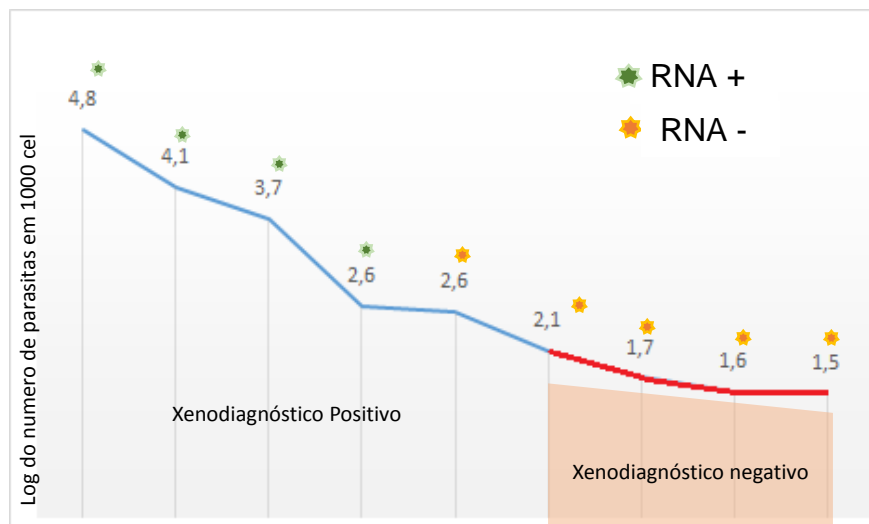
Foram usados seis gambás e oito cães, sendo que em um deles o xenodiagnóstico foi repetido.

Os cães escolhidos para o xenodiagnóstico foram positivos quanto à infecção por *Leishmania* spp. para PCR e IFI. Por outro lado, no momento do xenodiagnóstico, não tínhamos esses resultados para os gambás utilizados. Mas, baseados nas primeiras amostragens, em que a positividade dos gambás foi maior que 50% e, desconhecendo a dinâmica da frequência de infecção que foi descrita no objetivo 2/ itens 5.3.2.2, consideramos que era factível obter gambás positivas. Porém, quando a infecção por *Leishmania* spp. foi avaliada nos gambás, encontramos que, dos seis gambás usados no xenodiagnóstico, cinco foram negativos por PCR em sangue e tecido e o único gambá positivo tinha carga parasitária baixa e o xenodiagnóstico foi negativo.

No caso dos cães, no momento de fazer a prova do xenodiagnóstico, foi feita a coleta de sangue para medição da carga parasitária e detecção de RNA para determinar a sobrevivência do parasito. A carga parasitária, neste caso, teve um protocolo especial, pois não somente foi calculado o número de parasitas em

uma determinada quantidade, senão foi calculada a quantidade de parasitas de acordo com o número de células da amostra. Para poder calcular o número de células na amostra foi feita uma PCR com o gene constitutivo de cão, o Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase (HPRT), como foi explicado na metodologia.

Observamos uma relação entre a carga parasitária e a infecciosidade aos insetos: quando as cargas foram menores a log 2,1 parasitos/1000 cel., o xenodiagnóstico começou a tornar-se negativo. Na figura 5.20 apresentamos a relação entre carga parasitária e os resultados do xenodiagnóstico. Pode-se ver como existe uma relação entre estas variáveis assim como na positividade dos resultados do RNA.



**Figura 5.18:** Relação entre o logaritmo da carga parasitária e o resultado do xenodiagnóstico.

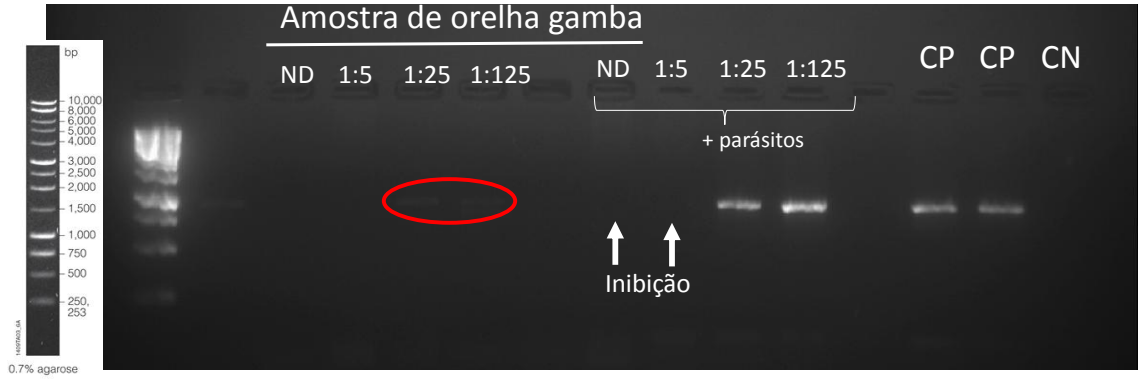
## 5.6 Resultados do objetivo 6

*Avaliação da heterogeneidade genética das populações de L. panamensis em amostras de reservatórios e humanos em duas regiões na Colômbia.*

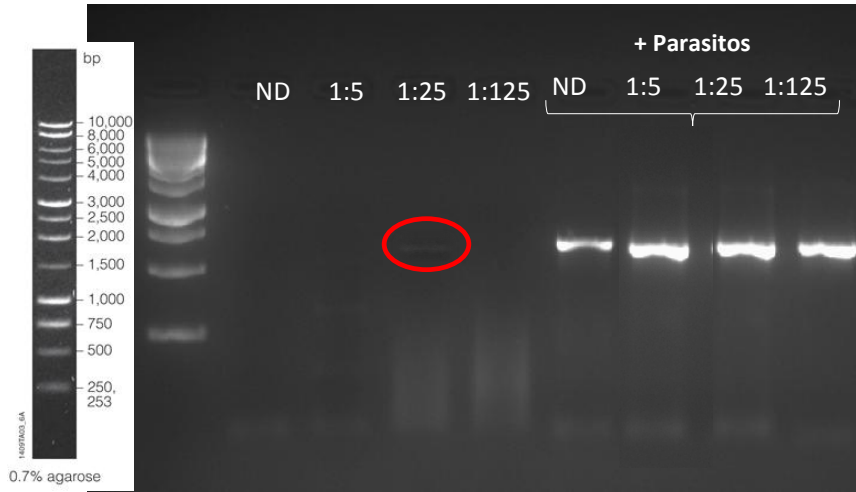
Avaliamos a diversidade genética em todos os isolados de *L. panamensis* de amostras de cães, gambás e humanos, de duas diferentes regiões, com condições epidemiológicas diferentes, utilizando sete marcadores moleculares para as análises por MLSA, assim como análises por um único locus.

O sucesso para se obterem isolados a partir das amostras de animais foi muito baixo. A baixa taxa de isolamento a partir dessas amostras era esperada devido às difíceis condições de trabalho de campo no momento da coleta do material, além da baixa carga parasitária, como apresentado anteriormente. Foi necessário, então, tentar amplificar os sete genes do sistema de MLSA diretamente das amostras clínicas que tinham sido positivas na PCR com o gene Hsp70 P4. Porém, na primeira tentativa, nenhum produto amplificado foi obtido a partir das amostras clínicas. Vários motivos podem dificultar a amplificação dos genes que elegemos para o painel de MLSA, como a baixa carga parasitária e o tamanho dos alvos do MLST (aproximadamente 600 pb). Várias estratégias foram aplicadas na tentativa de superar essas limitações. Concentramos as amostras por rotaevaporação para concentrar o DNA parasitário e logo fazer diluições para ter a maior quantidade do DNA parasitário que pudesse ser detectado e a menor quantidade de inibidores para conseguir neutralizá-los. As diluições em que a PCR funcionou foram de 1:5, 1:25 e 1:125. A cada uma destas mesmas diluições foi adicionada uma quantidade mínima de parasitas e, em seguida, foram amplificados; ao mesmo tempo para confirmar se algum parasita tinha inibição, sendo que, nas diluições com o DNA parasitário que foram negativos, se provaria a inibição. Na figura 5.21 apresentamos os resultados dos experimentos descritos para cada um dos genes.

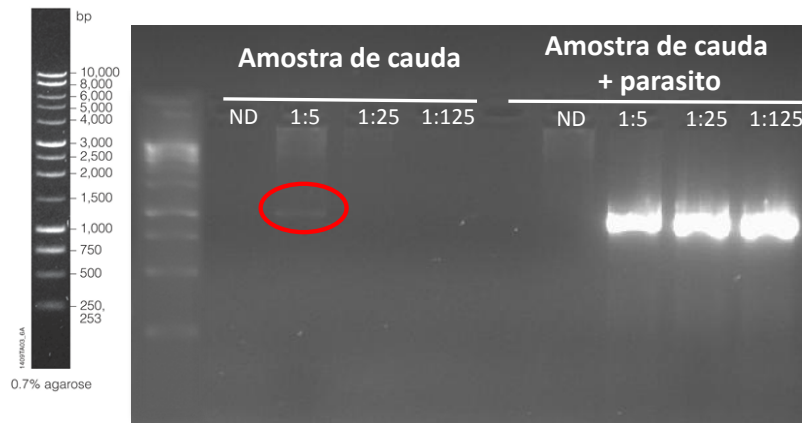
V. RESULTADOS



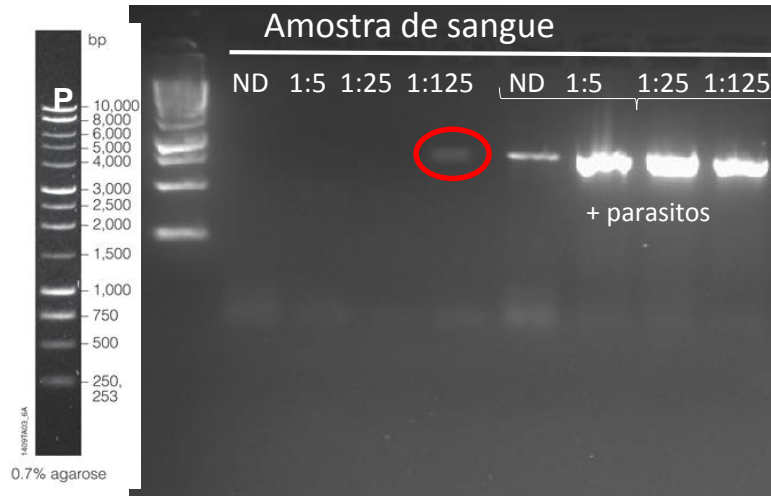
**Gene G6P:** 836 pb; CP: controle positivo; CN: Controle Negativo



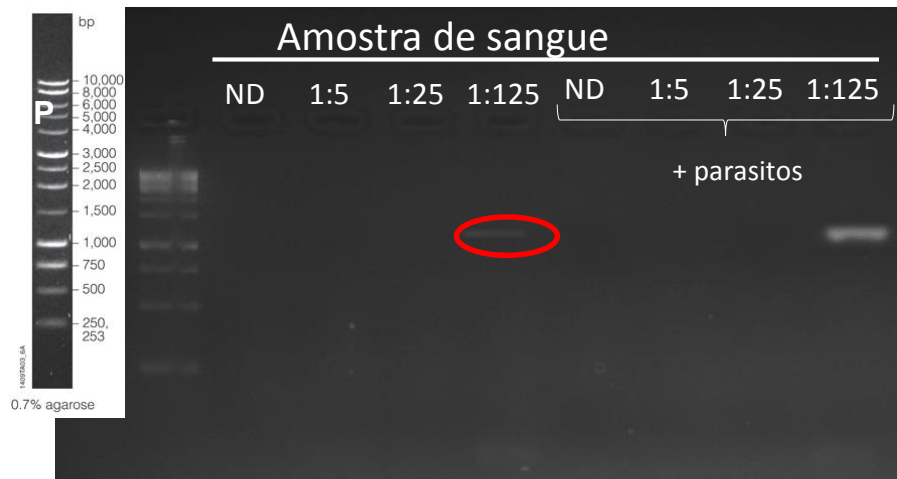
**Gene MPI:** 681 pb



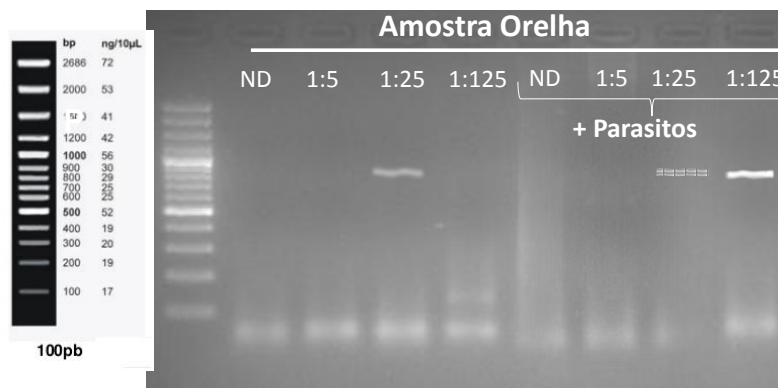
**Gene MDHnc:** 1010



**Gene MDHmt: 821pb**



**Gene ICD: 1022 Pb**



**Gene 6pG: 836 Pb**

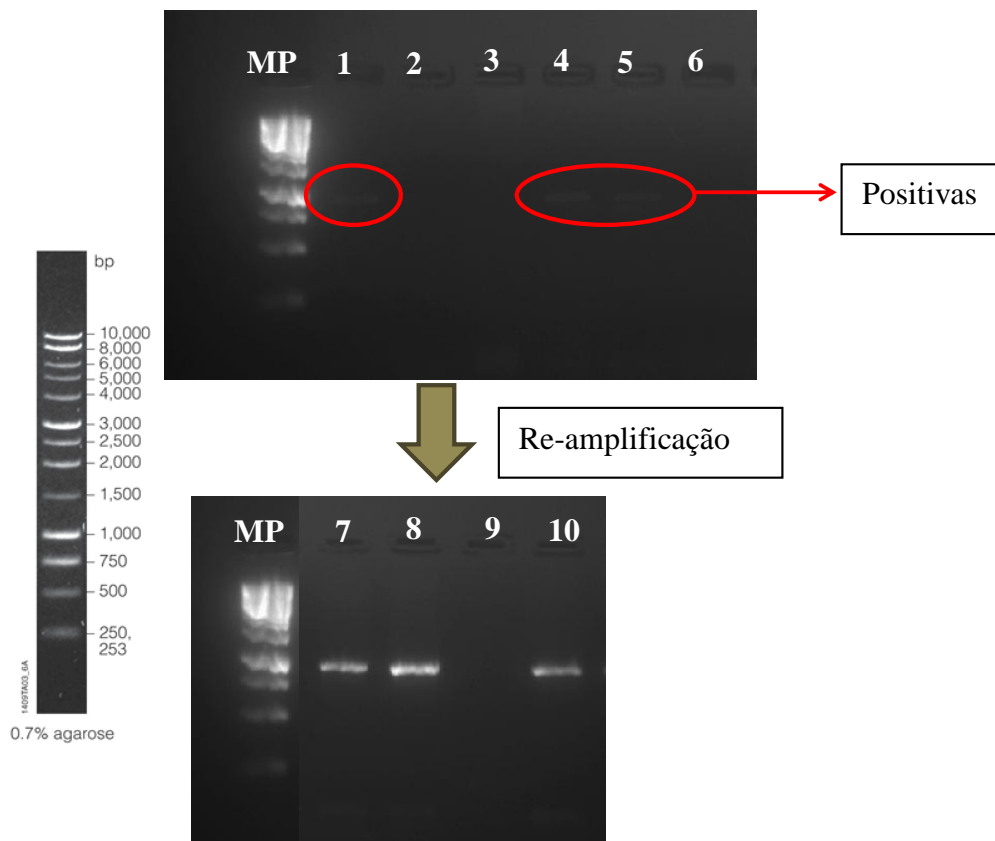


**Figura 5.19:** Produtos amplificados a partir de amostras clínicas, tendo como alvo os diferentes genes do painel de MLSA. Eletroforese em gel de agarose 1.5 % corado com brometo de etídeo. Linhas 1-4 amostras com diluições de 1:5; linhas 5-8 amostras com adição de parasitos; ND: Não diluição; em círculo vermelho as bandas positivas; PM: peso molecular, o padrão do peso molecular está em cada gel.

Conseguimos amplificação para todos os genes a partir das amostras clínicas, mas com pouco sucesso. No total foram 74 amplificações distribuídas da seguinte forma: 6PG 16 (22%), MPI 12 (16%), G6P 8 (11%), MDHnc 16 (22%), Hsp70 14 (19%) e MDHmt 7 (10%).

Na figura 5.21 há alguns exemplos de inibição mostrando que, apesar da concentração do DNA de parasitos, não foi possível observar a banda no momento da amplificação.

A outra estratégia para conseguir amplificar os genes do MLSA a partir das amostras clínicas foi fazer reamplificação do DNA a partir da primeira PCR. Fez-se uma segunda PCR depois de fazer uma purificação do produto da primeira PCR, que limpava o excesso de dNTPs e demais produtos. A taxa de sucesso foi muito baixa: menos de 10%; no entanto, foi uma estratégia feita no caso das amostras onde a estratégia anteriormente descrita não teve resultado positivo. O problema com esta nova estratégia é a acumulação de erros da DNA polimerase e, por esse motivo, foi usada uma polimerase de alta fidelidade (PFU polymerasa Thermo scientific®). Na figura 5.22 pode-se ver um gel que exemplifica a reamplificação de uma amostra.



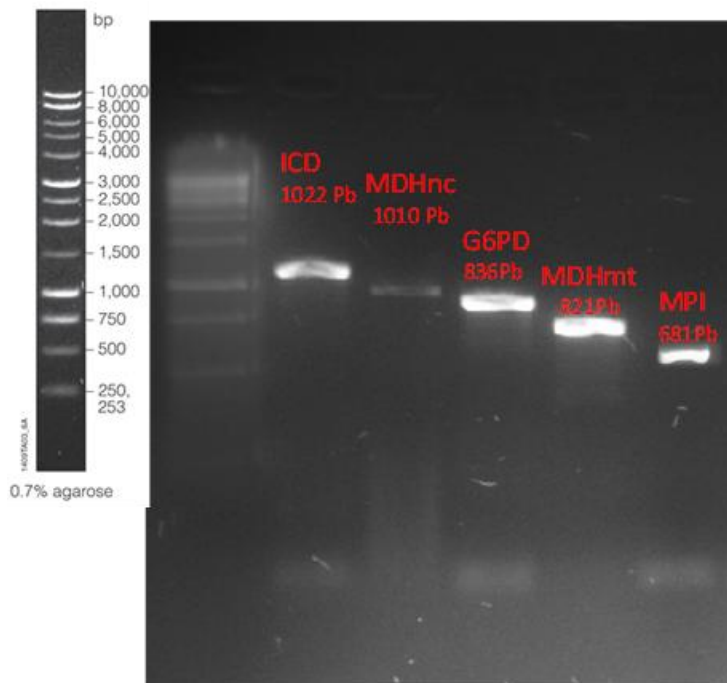
**Figura 5.20:** Exemplo de resultados obtidos através da reamplificação de amostras que foram negativas ou fracamente positivas. Eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo. Linha 1,4-5: amostras fracamente positivas. Linhas 7,8,10: reamplificação positiva das amostras. Linha 9: reamplificação positiva MP: marcador de peso molecular 1Kb

### 5.6.1 MLST em amostras de cultura

As 24 amostras isoladas foram submetidas ao ensaio de isoenzimas (MLEE). Após a confirmação do resultado, os DNAs extraídos dessas amostras foram submetidos às análises moleculares.

## V. RESULTADOS

Mediante a técnica da PCR foram amplificadas com sucesso as 24, isoladas em cultura na amplificação parcial dos genes MPI, Hsp70, MDHmt, MDHnc, ICD, 6PG, G6p, já utilizados para a análise por MLSA para *Leishmania* (Viannia) sp.(88,89). A Figura 5.23 representa os resultados dos géis típicos dos genes amplificados de cada gene a partir dos isolados da cultura de *Leishmania* spp., tanto de pacientes como dos animais.



**Figura 5.21:** Produto amplificado a partir das cepas de *Leishmania* isoladas para cinco genes usados no MLSA. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Linha1: 1022pb para o gene ICD. Linha2: 1010 pb para o gene MDHnc. Lihna 3: 836pb para G6pd. Lihna 4: 821 pb para o gene MDHmt. Lihna 5: 681 pb para o gene MPI. MP: marcador de peso molecular de 1kb.

Empregando a técnica da Análise por Sequências Multilocus (MLSA), foi definido um total de 24 STs, correspondentes a 24 amostras analisadas, sendo, portanto, um ST por isolado. Este primeiro resultado já aponta para a diversidade intraespecífica das amostras estudadas. A análise do tipo alélico realizada no

MLSTest resultou em uma grande variedade para alguns genes, sendo os mais variáveis o gene ICD e Hsp70, com 20 e 18 alelos cada um, respectivamente; o menos variável foi o gene MDHmt, com 2 alelos. Na tabela 5.9 apresentam-se os resultados do tipo alélico para cada um dos genes do painel de MLSA, para cada isolado.

Como parte das análises MLST, submetemos os tipos de alelos encontrados ao algoritmo eBURST (<http://eburst.mlst.net>) com objetivo de determinar a relação entre os alelos e a formação de complexos clonais. Na configuração mais estridente, utilizando os sete marcadores aplicados às amostras deste estudo, nenhum complexo clonal foi gerado.

Uma nova análise foi feita incluindo os alelos das cepas relatadas por Boité et al., (2012) (88) disponíveis no Genbank. Neste caso, apenas quatro marcadores foram utilizados (6PG, G6P, MPI e ICD) e foram detectados seis complexos clonais (Figura 5.24).

**Tabela 5.9:** Tipos alélicos determinados a partir da análise multilocus de cepas de *L. panamensis* isoladas de animais e humanos nas duas áreas de estudo.

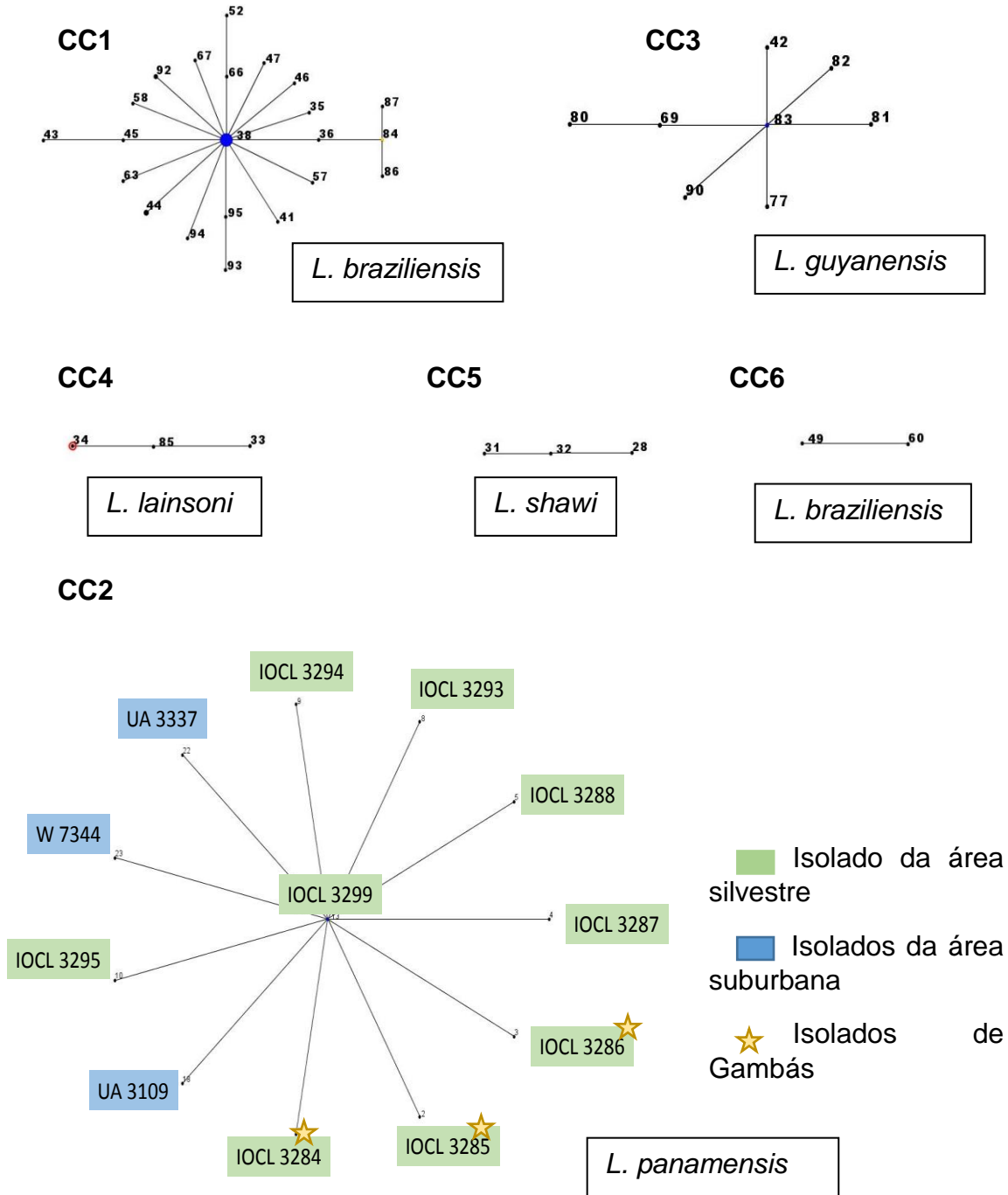
Área	Código cultura	Hospheiro	6PG	G6P	HSP70	ICD	MDHmt	MPI	Tipo de sequência
Selvática	IOCL 3284	<i>D. marsupialis</i>	1	1	1	1	1	1	1
	IOCL 3285	<i>D. marsupialis</i>	1	1	2	2	1	1	2
	IOCL 3286	<i>D. marsupialis</i>	1	1	2	3	1	1	3
	IOCL 3287	Humano	1	2	2	4	1	1	4
	IOCL 3288	Humano	1	1	3	5	1	1	5
	IOCL 3290	Humano	2	1	4	6	1	2	6
	IOCL 3291	Humano	1	1	5	7	1	3	7
	IOCL 3293	Humano	1	1	6	8	1	1	8
	IOCL 3294	Humano	1	1	7	9	1	1	9
	IOCL 3295	Humano	1	1	8	10	1	4	10
	IOCL 3296	Humano	3	1	9	2	1	5	11
	IOCL 3297	Humano	1	1	10	11	1	6	12
	IOCL 3299	Humano	1	1	11	10	1	1	13
	IOCL 3300	Humano	1	1	12	12	1	7	14
	IOCL 3301	Humano	1	1	13	13	1	8	15
IOCL 3302	Humano	4	3	14	14	1	9	16	
Suburbana	UA 3108	Humano	2	1	9	15	1	10	17
	UA 3109	Humano	1	1	15	10	1	11	18
	UA 3214	Humano	1	4	16	16	1	1	19
	UA 3241	Humano	1	1	9	17	1	12	20
	UA 3332	Humano	1	1	17	18	1	13	21
	UA 3337	Humano	1	1	9	19	2	1	22
	UA 3417	Humano	1	1	18	10	1	1	23
W 7344	Humano	1	1	9	20	1	1	24	
Número de alelos			<b>4</b>	<b>4</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>2</b>	<b>13</b>	<b>24</b>
Número de alelos				7	35	59	3	32	236
Poder de discriminação			1	0.3	0.957	0.977	0.157	0.78	

As análises indicam a formação de um complexo clonal - CC2, agrupando somente as cepas de nosso estudo, separando *L. panamensis* de outras espécies próximas, como *L. guyanensis* e *L. shawi*. Das 24 cepas de *L. panamensis* aqui analisadas, 12 foram agrupadas nesse CC, mas sem associação com uma determinada área do estudo. O CC2 reuniu isolados de parasitos da área silvestre e suburbana, sendo a maioria da área silvestre (n=9), incluindo o genótipo fundador, ST 13 - IOCL 3299 (Tabela 5.9). Nesse mesmo CC estão agrupados os três isolados de gambás.

## V. RESULTADOS

As cepas restantes (n=12) não se agrupam em nenhum complexo clonal e cada uma se apresenta como um ST único (singleton). Dentre essas cepas estão quatro da área suburbana e sete da área silvestre, incluindo a cepa isolada do intestino da *Lutzomyia* spp. depois de um xenodiagnóstico.

V. RESULTADOS

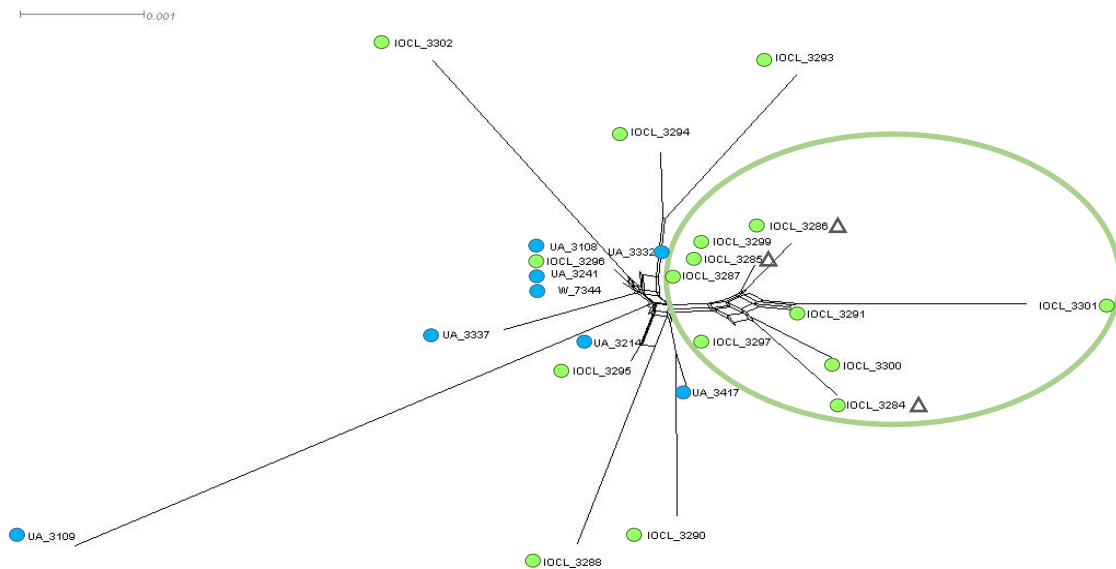


**Figura 5.22:** Representação dos Complexos Clonais usando as sequências de Boité et al. (2012) (88), mediante o eBURST. O número nas figuras corresponde ao número do isolado na tabela do artigo referido.

## V. RESULTADOS

A rede Neighbour-Net foi criada a partir das sequências obtidas para as 24 amostras de *L. panamensis* da Colômbia, das duas áreas de estudo, para os sete loci, que foram concatenados. Na Figura 5.25 pode-se ver um agrupamento com as amostras da área silvestre junto com as cepas dos gambás dessa mesma área. No entanto, nos outros ramos, há mistura de cepas da área suburbana e silvestre. As cepas de animais e de humanos não estão dispersas na rede, sem nenhuma distinção entre elas.

Os dados dos CC e da Neighbour-Net usam informações e análises distintas, por isso são complementares. Enquanto o CC é gerado a partir de tipos de sequências e permite a detecção de genótipos fundadores, o Neighbour-Net utiliza o número de diferenças nucleotídicas presentes ao longo da sequência dos genes alvo. A avaliação conjunta dos resultados dos CC e da Neighbour-Net sugere que as cepas de *L. panamensis* que circulam nas áreas estudadas são resultado de uma expansão clonal, sem estruturação evidente em subgrupos, com o genótipo fundador pertencendo à área silvestre.



**Figura 5.23:** Neighbour-Net construída a partir das sequências concatenadas das amostras de *L. panamensis* das duas áreas de estudo para sete genes analisados.

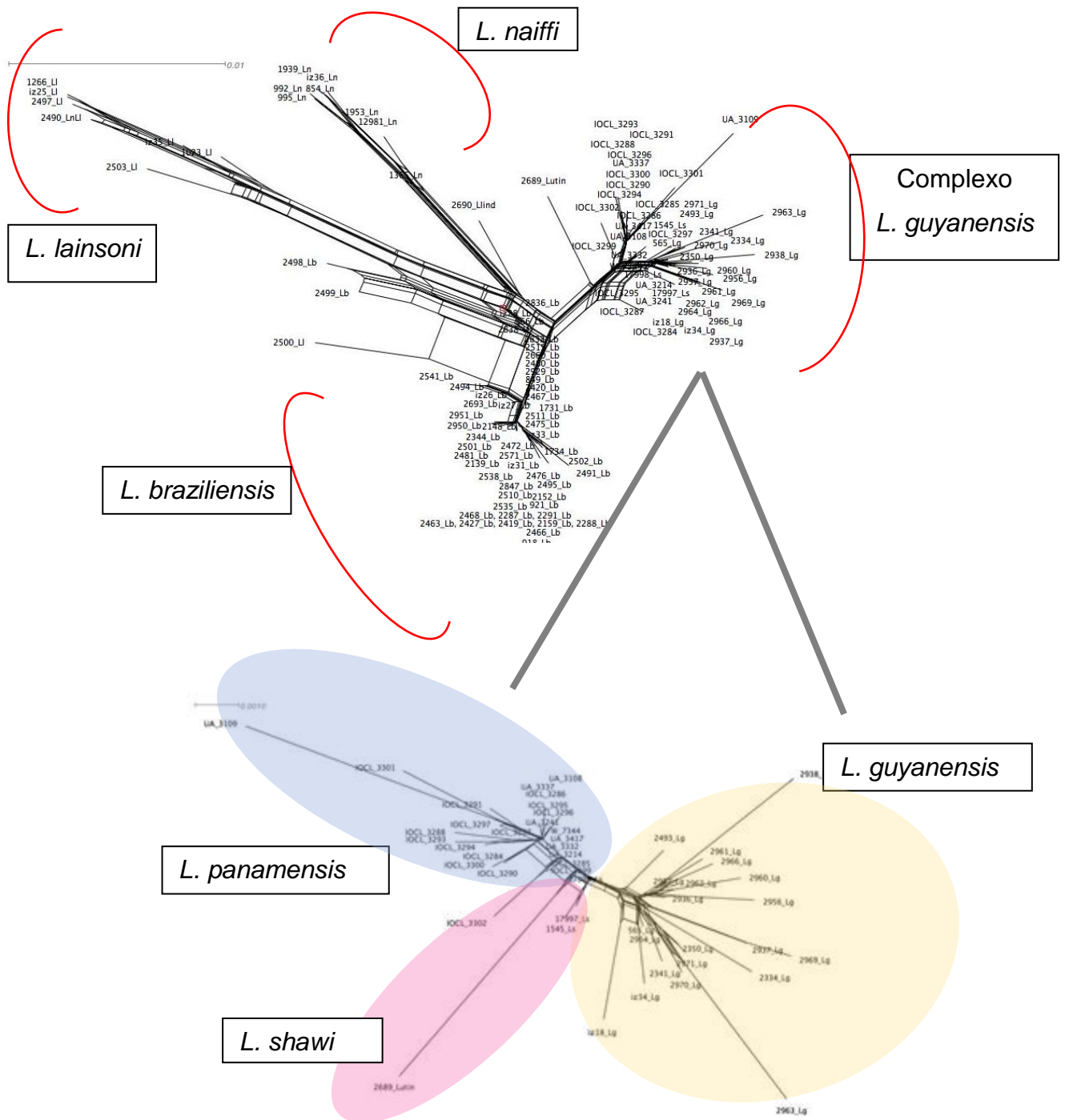


## V. RESULTADOS

Informações de cada cepa estão na tabela 5.9. Em verde, amostras provenientes da área silvestre; em azul, cepas da área suburbana; triângulo, cepas de animais.

Assim como feito para eBurst, uma nova Neighbour-Net foi gerada incluindo também as sequências de Bóite et al., 2012 (88), representando diferentes espécies de *Leishmania*, como *L. braziliensis*, *L. shawi*, *L. guyanensis* (Figura 5.26)

## V. RESULTADOS

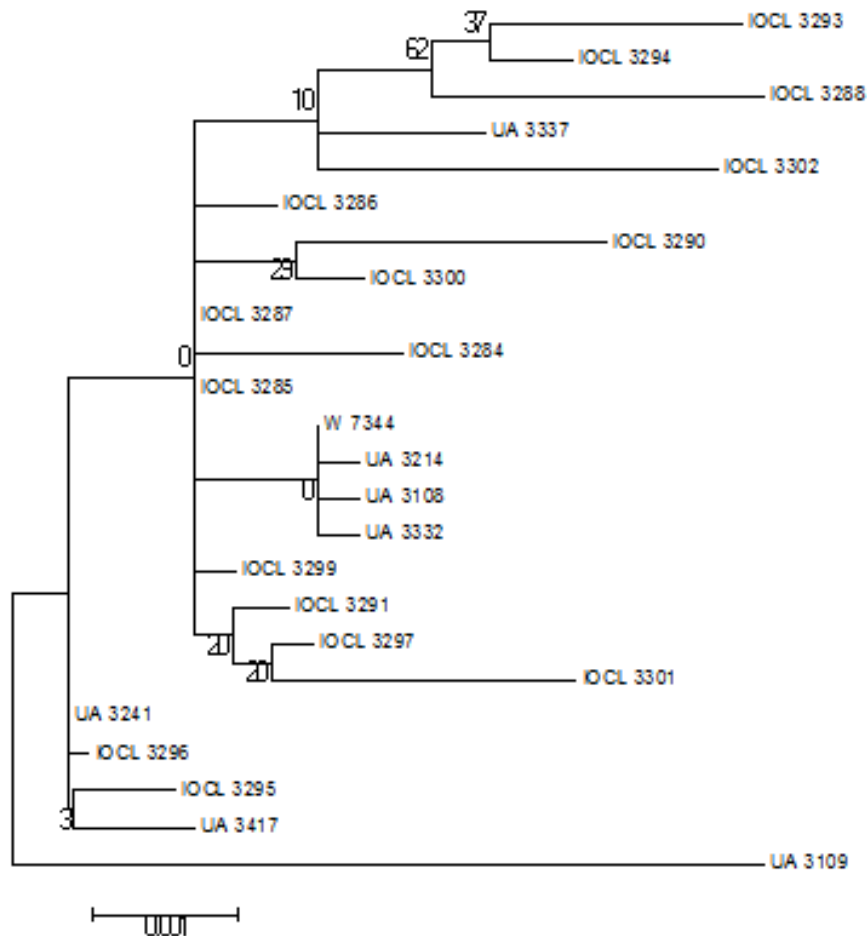


**Figura 5.24:** Neighbour-Net baseada nas seqüências concatenadas dos genes e usando as seqüências de outras espécies obtidas do genbank. O ramo correspondente ao complexo *L. guyanensis* aparece em detalhe para mostrar a inserção das cepas de *L. panamensis* deste estudo.

## V. RESULTADOS

Pode-se ver claramente que os diferentes ramos separam muito bem todas as diferentes espécies de *Leishmania* spp, inclusive as três espécies de nosso interesse e que são filogeneticamente próximas: *L. shawi*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*. Dentro do ramo de *L. panamensis* os isolados se misturam entre os isolados urbanos e silvestres, sem subestruturação clara que possa ser associada à origem geográfica.

A partir das sequências concatenadas foi construída uma árvore filogenética pelo método da Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood-ML-), modelo de Tamura 3 parâmetros gama distributed (Figura 5.27).



**Figura 5.25:** Árvore filogenética com as sequências concatenadas dos genes do MLST gerado em MEGA 7

A construção da árvore concatenada não mostrou a presença de grupos, não foram encontrados grupos informativos que possibilitem agrupamentos ou clados entre sequências como se pode ver com os valores baixos de bootstrap. Esses resultados concordam com as análises de Neighbor-Net, que demonstram uma grande homogeneidade entre os isolados.

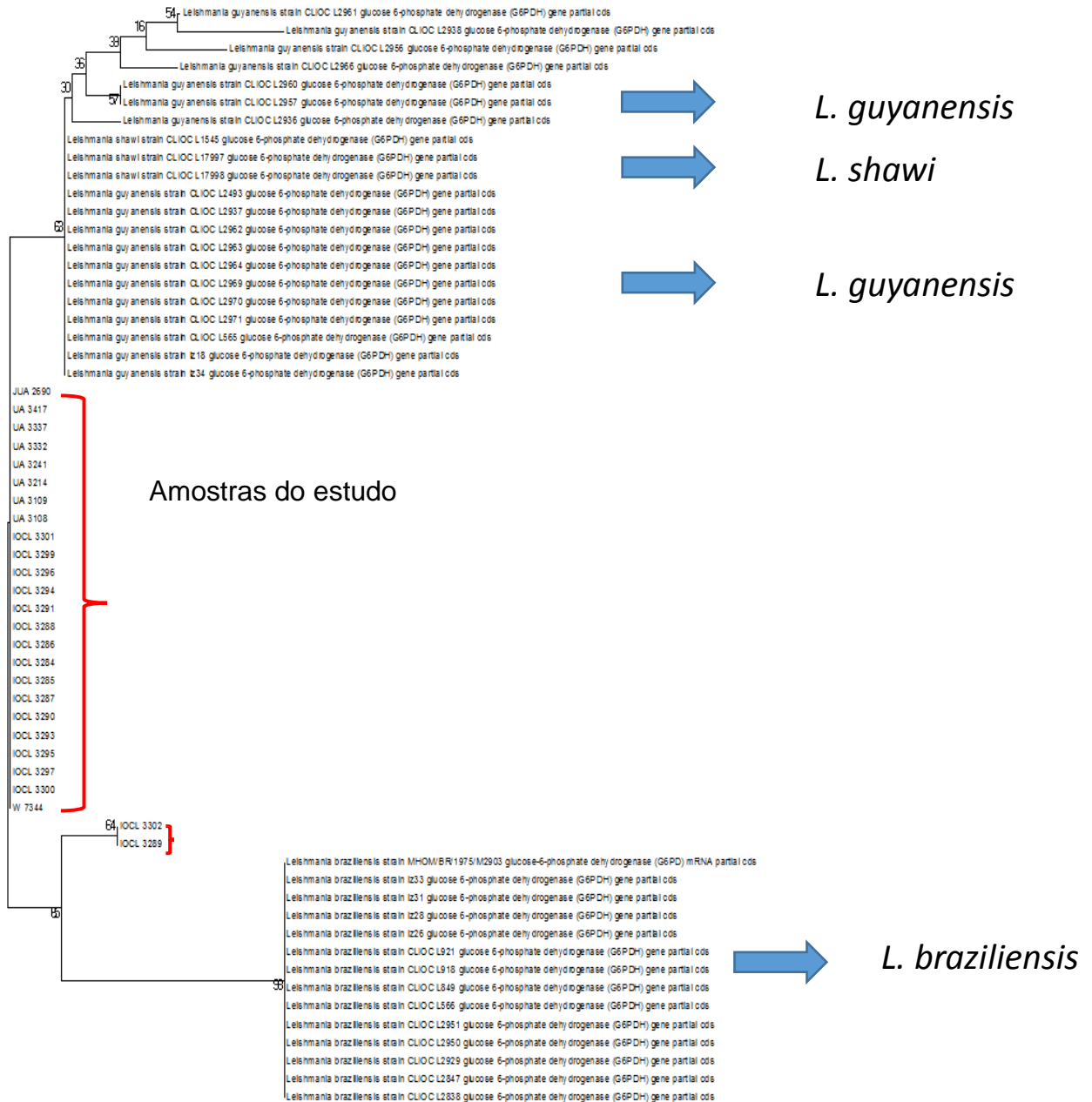
### 5.6.2 Análises de cada locus individualmente (análise Single Locus - SL)

Para as análises SL foram usadas as sequências parciais obtidas para os genes rDNA (ITS), ICD, G6P, HsP70, MDHmt 6PG e MPI com os isolados de cultura, mas também com as ampliações conseguidas das amostras clínicas. Para as árvores de cada gene, foram usadas as sequências obtidas do genbank, exceto para MDHmt que não tem nenhuma sequência relatada.

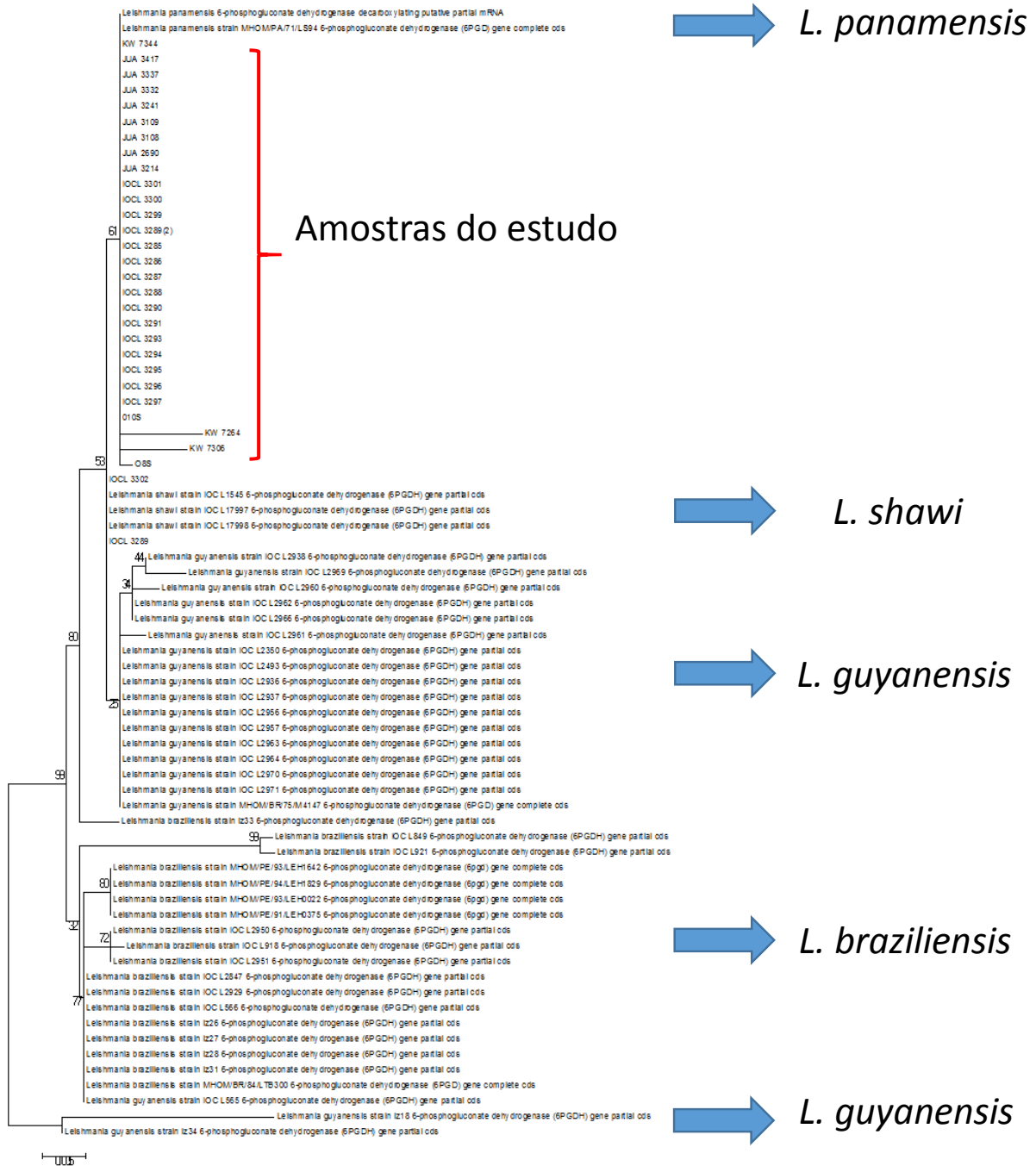
As análises filogenéticas foram feitas pelo método de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood), baseado no modelo Kimura de parâmetros. A porcentagem de associação da taxa é mostrada ao lado dos ramos das árvores. Árvores iniciais foram obtidas através de uma busca heurística, aplicando o método Neighbor-Join e algoritmos BioNJ para uma matriz de distâncias entre pares, usando a abordagem do modelo evolutivo de Maximum Composite Likelihood (MCL); em seguida, uma topologia selecionando a probabilidade de log com um valor superior. A distribuição gama discreta foi usada para modelar diferenças de taxas evolutivas entre posições (5 categorias (+ G, parâmetro = 2,3439)).

Nas árvores construídas com informações de cada gene usados no painel do MLST, individualmente, pode-se observar que todos os marcadores separaram *L. braziliensis*, mas não as espécies *L. guyanensis* e *L. shawi* de *L. panamensis*, que é a espécie correspondente às amostras desse estudo (Figura 5.28).

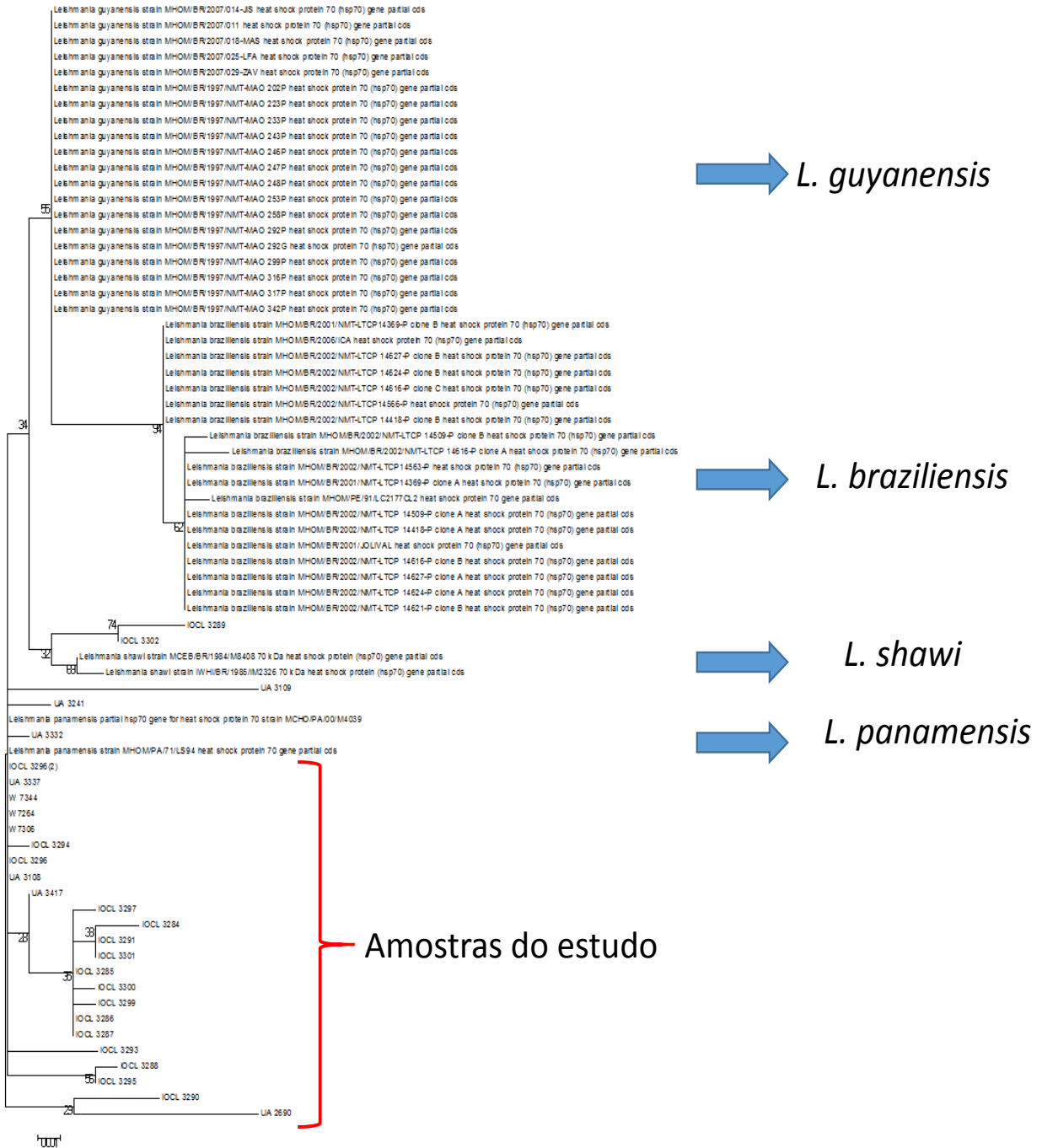
G6P



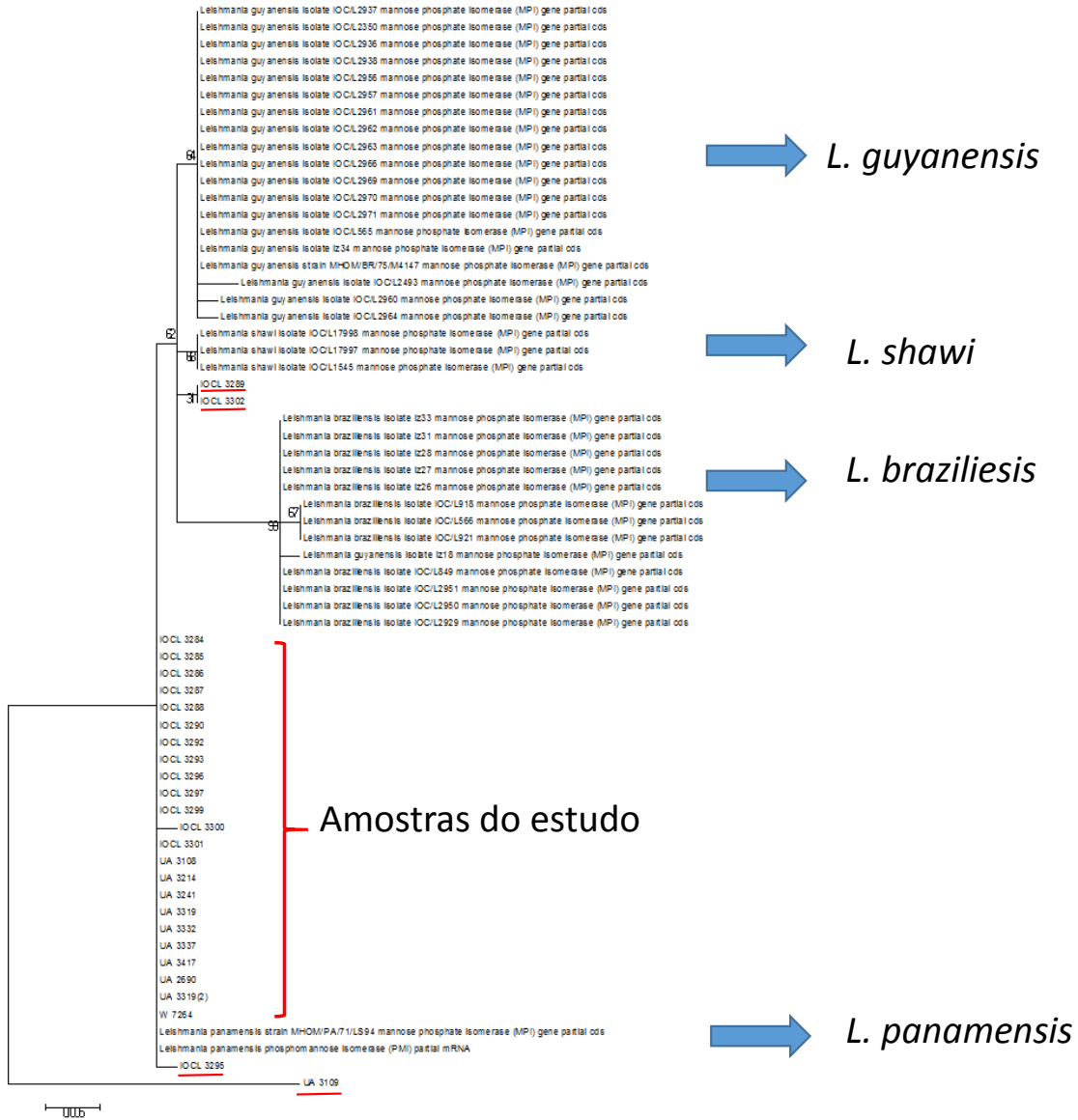
6PG



# Hsp70

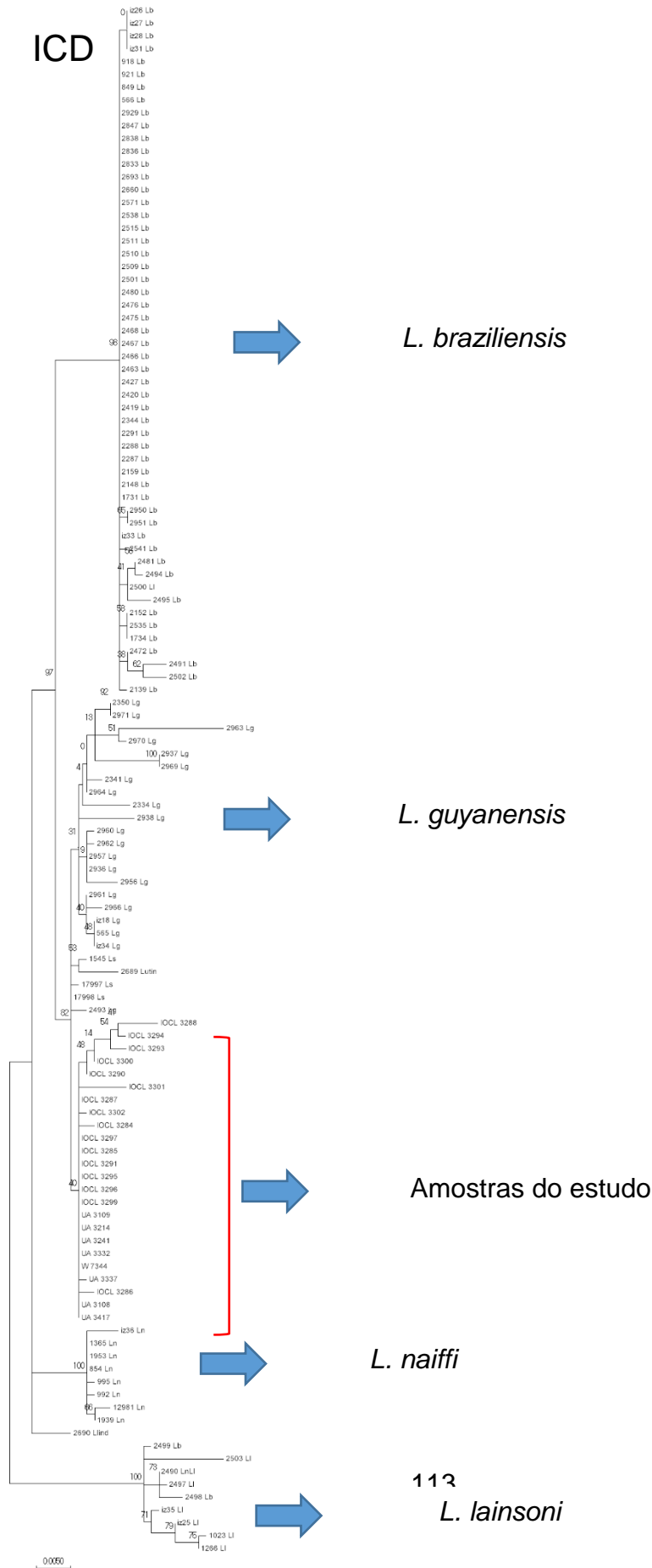


MPI





V. RESULTADOS



*L. braziliensis*

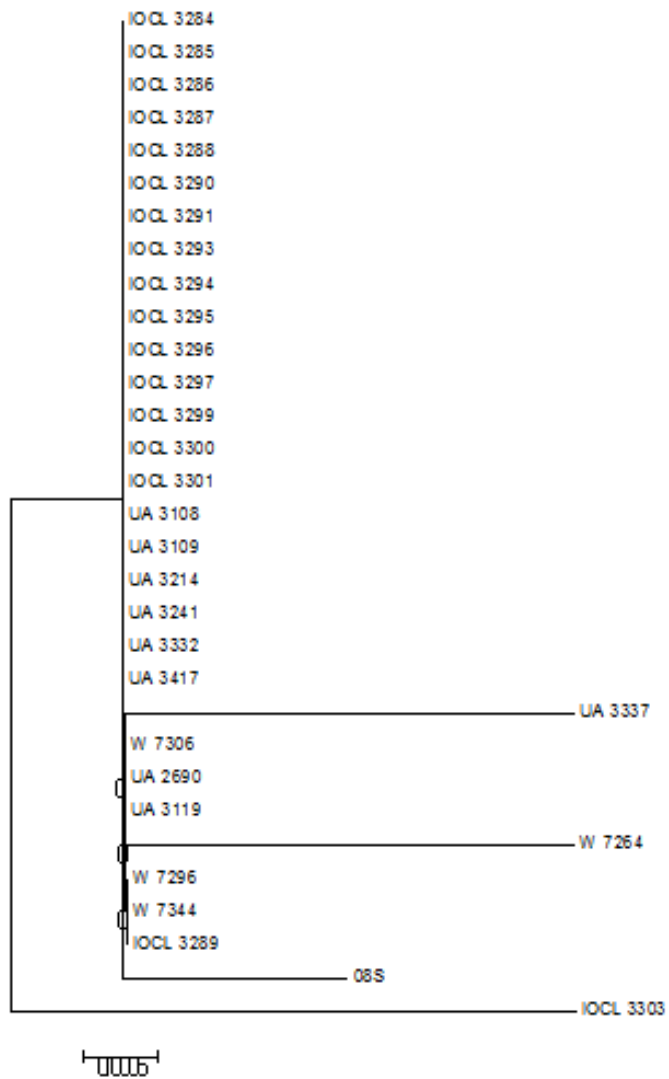
*L. guyanensis*

Amostras do estudo

*L. naiffi*

113  
*L. lainsoni*

## MDHmt

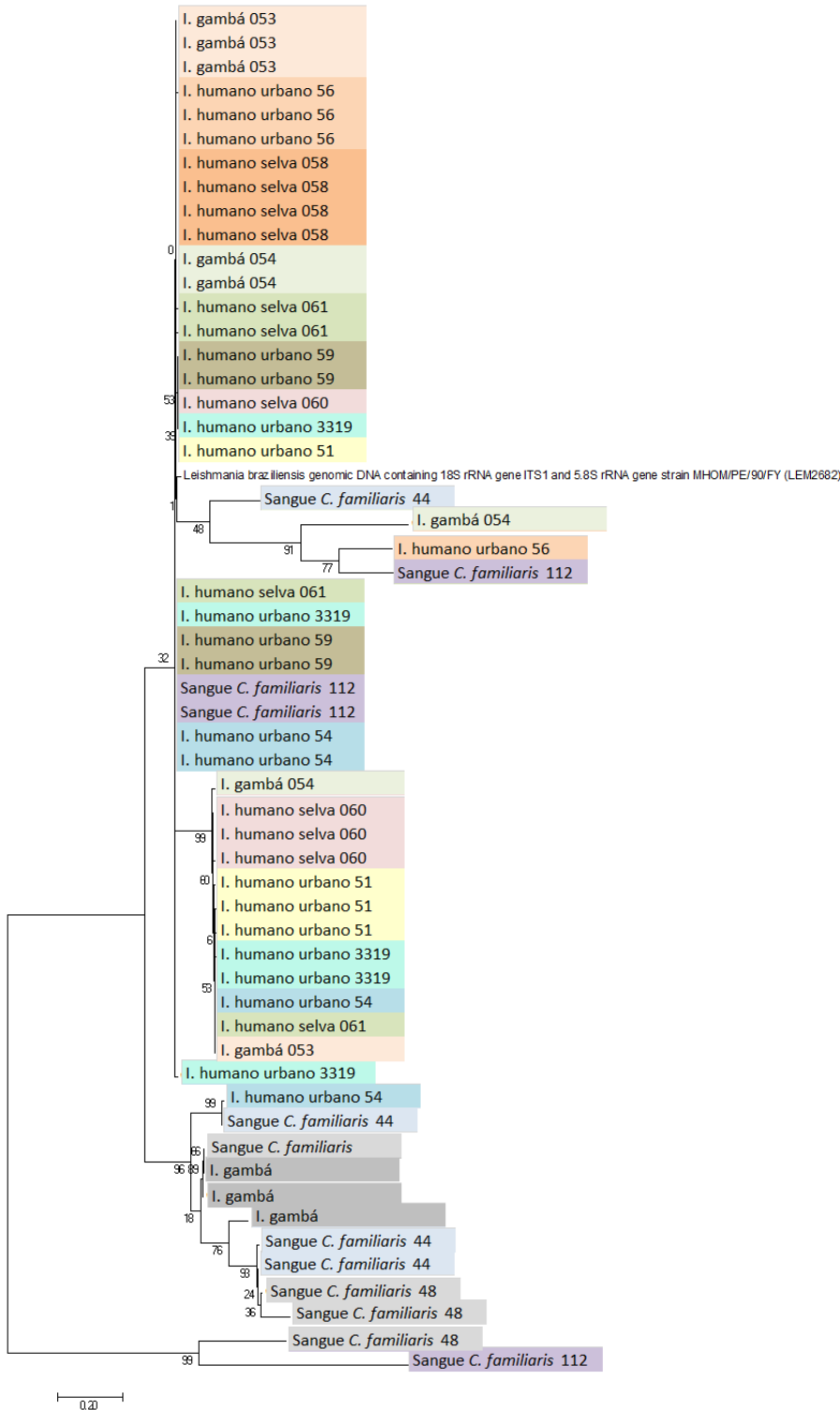


**figura 5.26:** Dendrogramas obtidos para os genes G6P, 6PG, HsP70, MPI ICD e MDHmt. As análises foram conduzidas no MEGA 7 usando o modelo T92 e 1000 replicatas de bootstrap.

### 5.6.3 Análises single locus com ITS

Nas análises de variabilidade genética foram utilizadas as amostras positivas da PCR com a região ITS1 do gene rRNA. 42 amostras foram clonadas e quatro clones de cada amostra foram enviadas para sequenciamento. Porém, do total sequenciado, 14 amostras alinharam e foram utilizadas nas análises, 28 foram excluídas do estudo devido à baixa qualidade nas sequências. A partir do estudo das 57 sequências nucleotídicas com um total de 311 posições na base de dados final, foi gerada uma árvore filogenética, na qual foi possível verificar vários ramos (Figura 5.29).

Clones de uma mesma amostra nem sempre agruparam ou foram idênticos. Isso é esperado em um organismo como a *Leishmania* spp., onde o mosaicismo aneuploide foi descrito. Esse traço em *Leishmania* spp. significa que diferentes alelos, em diferentes proporções, podem estar presentes na amostra de DNA isolada do parasita em cultura. O que ocorreu no presente trabalho pode ser um reflexo desse evento. Com a inclusão da etapa de clonagem gênica, pudemos observar quatro alelos de uma mesma amostra, que não são necessariamente idênticos. É interessante ressaltar que o fato de alelos de amostras distintas se agruparem juntos no mesmo clado reforça a origem comum das cepas.



**Figura 5.27:** Dendrograma das sequencias do ITS1 das amostras clonadas. As analises foram conduzidas no MEGA 7 usando o modelo T92 e 1000 replicatas de bootstrap.

## 5.7 Resultados do objetivo 7

*Identificar a fauna flebotomínica e os possíveis vetores, visando relacionar sua distribuição com a presença e positividade de cães e gambás em área silvestre*

O estudo de vetores na eco-epidemiologia das leishmanioses é relevante, uma vez que a distribuição desses e seu comportamento determinam o risco de infecção, tanto para animais como para pessoas e, portanto, é importante associar os possíveis reservatórios com a possibilidade de contato, tanto em um espaço geográfico, como em um dado tempo.

Esta etapa do estudo só foi realizada na área silvestre. Com relação à área suburbana, os dados podem ser obtidos em um trabalho realizado pelo mesmo grupo de investigação na Colômbia, que apoiou esta investigação (Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales –PECET-). Devido ao fato de que a positividade tanto para cães quanto para gambás é baixa, não foi possível realizar nenhuma análise de associação entre as espécies de flebótomos e os animais. Apesar disso, pudemos ressaltar que, em ambas áreas de estudo, as espécies vetoras foram encontradas domiciliadas e em maior proporção no peridomicílio, o que admite o contato do vetor com as espécies domésticas, como o cão, e sinantrópica de hábitos peri e extradomiciliar, como o gambá.

A seguir, apresentamos uma descrição dos dados entomológicos na área silvestre. Parte desses resultados estão apresentados em um artigo, Apêndice D, submetido à publicação.

### 5.7.1 Resultados da captura entomológica na área silvestre

Obteve-se uma grande variedade de espécies de flebotomíneos, 25 em total, 23 espécies do gênero *Lutzomyia* spp. e 2 de gênero *Brumptomyia* spp., agrupados em 11 subgêneros e 4 grupos taxonômicos da subfamília.

## V. RESULTADOS

Coletou-se um total de 4.303 indivíduos, dos quais 4.132 (96%) pertencem ao gênero *Lutzomyia* spp., sendo 3.224 fêmeas (67%). As três espécies presentes em ordem de abundância foram: *Lu. panamensis* com 37% do total da captura, *Lu. carpenteri* com 14%, *Lu. sp. (Pressatia)* com 13%, (Tabela 5.10).

Com relação à distribuição das espécies de flebotomíneos, em função do método de captura e sua aproximação ao domicílio, observamos que, com armadilha CDC, capturaram-se todas as espécies de *Lutzomyia*, assim como a maioria dos indivíduos (88%). As espécies capturadas em armadilha Shannon foram todas antropofílicas e, por outro lado, as capturas com armadilhas adesivas foram de espécies reconhecidas como não antropofílicas (Tabela 5.10).

Determinou-se a distribuição destas espécies com relação ao grau de contato que existe com populações humanas em áreas domiciliárias, peridomiciliárias e extradomiciliárias na zona de estudo. Em relação ao domicílio, a maioria das capturas foi em peridomicílio; neste lugar também se coletou a maioria das espécies de importância médica: *Lu. panamensis*, *Lu. trapidoi* e *Lu. gomezi*, *Lu. olmeca bicolor*, *Lu. sanguinaria* e *Lu. ylephiletor*.

V. RESULTADOS: Entomología

**Tabela 5.10:** Composição das espécies de flebotomíneos e sua abundância relativa (Pi) na área silvestre

Especie	Método de captura						Localidade captura			Total	Pi [%]
	CDC tramp			Shannon	Reposo	Adesiva	Aguacate	Sardi	San Francisco		
	I	P	E								
<i>Lu. panamensis</i> * + °	181	975	61	335	-	-	472	961	119	1552	37,2
<i>Lu. carpenteri</i>	48	489	39	-	-	-	464	74	38	576	13,8
<i>Lu. sp.</i> [Pressatia]	51	433	31	16	-	-	281	169	81	531	12,7
<i>Lu. trinidadensis</i>	11	303	1	-	66	5	60	65	261	386	7,7
<i>Lu. trapidoi</i> * +	27	206	21	9	-	-	84	169	10	263	6,3
<i>Lu. camposi</i>	16	193	21	7	5	-	142	75	25	242	5,7
<i>Lu. gomezi</i> * + °	25	120	6	10	-	-	118	28	15	161	3,9
<i>Br. Mesai</i>	2	126	-	-	-	-	123	1	4	128	3,1
<i>Lu. olmeca bicolor</i> °	2	96	2	1	-	-	52	37	12	101	2,4
<i>Lu. ovallesi</i> °	1	46	-	-	-	-	-	31	16	47	1,1
<i>Br. Hamata</i>	4	38	1	-	9	-	38	6	8	52	1
<i>Lu. sanguinaria</i> +	1	32	1	1	-	-	12	21	2	35	0,8
<i>Lu. triramula</i>	1	26	2	-	-	-	29	-	-	29	0,7
<i>Lu. sp.</i> [Lutzomyia]	22	39	-	-	-	-	36	13	12	61	0,6
<i>Lu. isovespertilionis</i>	1	19	2	-	4	-	21	5	-	26	0,5
<i>Lu. carrerai thula</i>	3	9	-	2	7	-	-	16	5	21	0,3
<i>Lu. shannoni</i>	1	11	-	1	-	-	7	4	2	13	0,3
<i>Lu. sp.</i> [Micropygomyia]	10	2	-	-	-	-	10	2	-	12	0,3
<i>Br. sp.</i>	-	9	1	-	-	-	8	1	1	10	0,2
<i>Lu. bispinosa</i>	1	5	-	3	2	-	-	11	-	9	0,2
<i>Lu. micropyga</i>	-	9	-	-	-	-	2	1	6	9	0,2
<i>Lu. atroclavata</i>	7	-	-	-	-	-	7	-	-	7	0,2
<i>Lu. sp.</i> [Nyssomyia]	2	4	-	1	-	-	3	4	-	7	0,2

## V. RESULTADOS: Entomología

<i>Lu. cayennensis</i>	4	1	-	-	-	-	3	2	-	5	0,1
<i>Lu. aclydifera</i>	2	3	-	-	-	-	2	-	3	5	0,1
<i>Lu. sp. [Psychodopygus]</i>	1	3	-	-	-	-	-	2	2	4	0,1
<i>Lu. dysponeta</i>	1	2	-	-	-	-	3	-	-	3	0,1
<i>Lu. sp. [Aragaoi]</i>	-	-	2	1	-	-	3	-	-	3	0,1
<i>Lu. aragaoi</i>	2	-	-	-	-	-	2	-	-	2	0,05
<i>Lu. caprina</i>	1	-	-	-	-	-	1	-	-	1	0,02
<i>Lu. rorotaensis</i>	-	1	-	-	-	-	-	1	-	1	0,02
<i>Lu. ylephiletor</i> <sup>†</sup>	-	1	-	-	-	-	1	-	-	1	0,02
<b>Total</b>	<b>428</b>	<b>3201</b>	<b>191</b>	<b>387</b>	<b>93</b>	<b>5</b>	<b>1984</b>	<b>1699</b>	<b>622</b>	<b>4303</b>	<b>100</b>

\* Espécies de *Lutzomyia* incriminadas na transmissão da Leishmanioses na Colômbia (27) • México (130) + Panamá (131), ° Venezuela (132).

† Porcentagem da captura por espécie no I: intradomicílio, P: peridomicílio, E: extradomicílio.

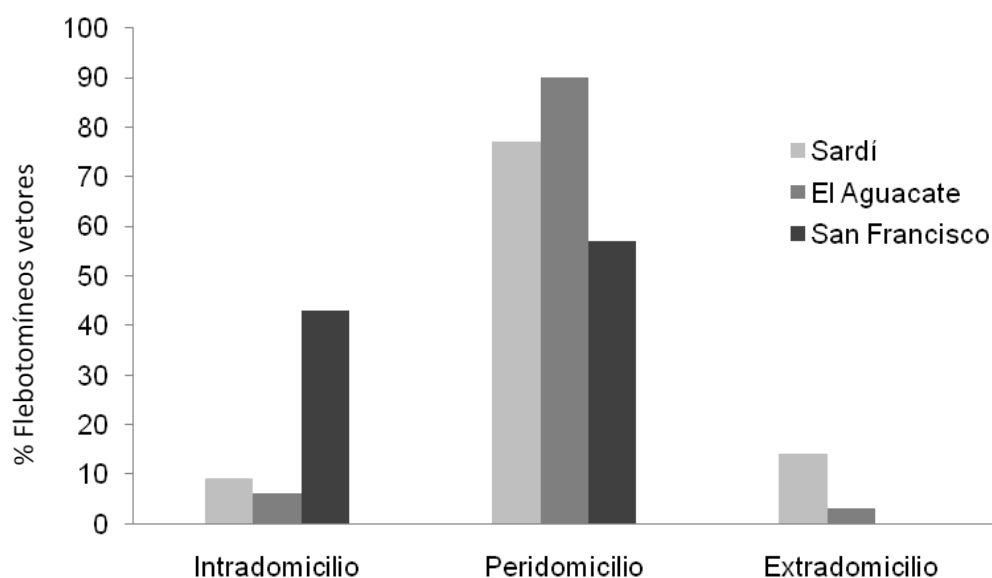


A proporção de captura entre espécies vetoras e não vetoras foi diferente nos três lugares mostrados. Em El Aguacate, esta proporção foi de 1:2 no extradomicílio e iguala-se a 1:1 no peri e intradomicílio. Em Sardí, a proporção foi de 3:1, 2:1 e 1:1 no extra, peri e intradomicílio, respectivamente. Em contraste, em San Francisco houve maior proporção de espécies vetoras no intradomicílio, a uma razão de 2:1, e de 1:3 no peridomicílio.

### 5.7.2 Distribuição das espécies de flebotomíneos segundo o local de captura

A maior abundância de flebotomíneos foi observada em Sardí e El Aguacate, que, em conjunto, somam 70,5% das capturas durante o período de estudo; as demais localidades apresentaram uma baixa porcentagem de insetos.

Na figura 5.30, demonstra-se a porcentagem de indivíduos das espécies vetoras de acordo com o ambiente de captura nas localidades Sardí, El Aguacate, e San Francisco. Dessas três localidades, San Francisco, zona com maior urbanização, foi onde se observou a maior porcentagem de domiciliação de flebotomíneos (intradomicílio).



**Figura 5.28:** Distribuição das espécies *Lutzomyia* spp. de importância médica (*Lu. panamensis*; *Lu. gomezi*; *Lu. trapidoi*) com respeito ao domicílio. Acandi, Choco.

Quanto às capturas das espécies antropofílicas, todas as espécies de importância médica presentes na Colômbia encontraram-se em todas as localidades estudadas. Destas, *Lu. panamensis* foi a espécie predominante, com 79% das capturas, seguidas por *Lu. trapidoi* e *Lu. gomezi*. Por outro lado, observa-se que a localidade Sardí apresentou a maior captura destas duas espécies.

Utilizando o índice de Sorensen, que é um modelo matemático para medir a similaridade das populações, conseguiu-se comparar as semelhanças entre as comunidades de flebotomíneos e os lugares estudados. Considerando as localidades de amostragem - Sardí, San Francisco e El Aguacate - , a semelhança é alta, com valores muito próximos a 1. Há maior afinidade entre Sardí e San Francisco (SSo= 0,848) e Sardí e El Aguacate (SSo= 0,717) (Tabela 5.11).

**Tabela 5.11:** Índice de Sorensen calculado para as espécies de flebotomíneos capturadas em Acandí, Choco.

	San Francisco	El Aguacate	La Mora
Sardí	0,848	0,717	0,689
San Francisco		0,666	0,692
El Aguacate			0,687

### 5.7.3 Importância epidemiológica das espécies de *Lutzomyia* spp.

De todas as espécies coletadas, ressaltam-se algumas que apresentam comportamento antropofílico e antecedentes vetoriais em outros países de América Central e América do Sul, que apresentam importância do ponto de vista epidemiológico por encontrarem-se infectadas naturalmente com algumas espécies de *Leishmania* spp. e estarem envolvidas na transmissão destes parasitas em alguns focos de leishmaniose; estas são: *Lu. panamensis*, *Lu. trapidoi*, *Lu. gomezi*, *Lu. sanguinaria*, *Lu. ylephiletor*, *Lu. olmeca bicolor* e *Lu. ovallesi*. A maior abundância esteve representada por *Lu. panamensis*. No interior das moradias, as espécies mais frequentes e abundantes foram todos os vetores reconhecidos de *Leishmania* no país, ou seja: *Lu. panamensis*, *Lu. trapidoi* e *Lu. gomezi*. A presença e abundância de *Lu. Panamensis*, tanto no peridomicílio como no intradomicílio, na zona de estudo, evidencia o comportamento endofágico desta espécie, definido como o hábito de picada dentro de construções humanas. Isso sugere então que *Lu.*

## V. RESULTADOS: Entomología

*panamensis* é o vetor principal na transmissão da forma endêmica e epidêmica de leishmaniose cutânea, no município de Acandí, Chocó.

## 5.8 Outros Resultados

### 5.8.1 Revisão de Literatura

Na revisão feita para publicação, durante o desenvolvimento deste trabalho, foram sistematizados 108 artigos (Apêndice B). Uma amostragem de 17.137 animais detectou uma positividade de 9% (1.533 espécimes), agrupados em 310 espécies e 12 ordens. As três ordens mais frequentes foram o Rodentia com 157 espécies e 11.372 indivíduos, seguida pela ordem Chiroptera com 53 espécies e 925 indivíduos e Didelphimorphia, com 30 espécies e 2.836 indivíduos. Porém, a porcentagem de positividade foi maior na ordem Didelphimorphia seguida pela Pilosa. Algumas ordens como Testudines, Lagomorpha, Perissodactyla e Squamata tiveram um número muito baixo de espécies amostradas, sendo não representativas.

Do total de 310 espécies monitoradas, 119 (38%) foram positivas, entretanto, 36 (30%) destas tiveram um só indivíduo positivo e 16 espécies tiveram menos de 5 indivíduos amostrados. No caso das espécies que não se encontraram infectadas, 186 no total, 116 (62,3%) tiveram menos de cinco indivíduos estudados.

Nas tabelas 1 e 2 do apêndice B, também pode-se ver que a maioria dos estudos foi realizada nas áreas silvestres antes dos anos 90, quando o uso das técnicas moleculares era ainda restrito. Por outro lado, a espécie *D. marsupialis* é, de todas as espécies mamíferas silvestres ou sinantrópicas, a mais estudada com 36 artigos, mais de 979 animais amostrados e uma positividade total de 6,8%. Ainda sobre os estudos, a maioria limita o conhecimento a determinar a infecção e a espécie infetante.

### 5.8.2 Socialização e educação na saúde

Além da pesquisa científica e, ainda que não tenha sido seu objetivo, para poder realizar o estudo, foi feita uma ampla socialização do projeto em ambas as localidades, aproveitando para fazer, pela primeira vez, um processo de educação em saúde sobre as leishmanioses. Este trabalho é de suma importância, já que as áreas onde realizamos o estudo de campo são áreas de conflito armado, onde atuam diferentes forças políticas e militares, como guerrilha, paramilitares e exército nacional. Contar com a aprovação desses setores e a proteção da comunidade não só garantiram o sucesso do projeto, mas também a segurança dos investigadores.

Devido ao fato de serem áreas marginalizadas e esquecidas pelo Estado, especialmente a área silvestre, o acolhimento foi bem grande. Por outro lado, não só conseguiu-se a aceitação do projeto, a educação de um número massivo de pessoas, mas também conhecer algumas características da enfermidade, como o nome que é dado à doença e as formas de tratamento. Foram identificados os conceitos, atitudes e práticas sobre a leishmanioses em cada área, que resultou em uma publicação na revista: *Cadernos de Saúde*, “Study of knowledge, attitudes, and practices related to leishmaniasis: evidence of government neglect in the Colombian Darién” (Apêndice C).

## DISCUSSÃO

O termo reservatório natural tem sido usado para explicar diferentes situações. Muitos autores têm chamado de reservatório de *Leishmania* spp. qualquer animal (hospedeiro vertebrado) que venha a ser encontrado naturalmente infectado. Por isso, a maioria dos estudos em reservatórios tem sido fragmentados e limitam-se à identificação da detecção de *Leishmania* spp. nos animais, nem sempre indicando infecção e manutenção do parasita.

O florescimento dos estudos em reservatórios nos meados do século 20 demonstra o interesse nesse tema. Mais da metade dos artigos na revisão de reservatórios silvestres (Apêndice A) foram publicados entre as décadas de 60 e 80, mas, comparativamente com outros temas, poucos trabalhos têm sido publicados sobre reservatórios. Por exemplo, quando se faz uma pesquisa na web pelo site do NCBI usando as palavras chaves “leishmania & immunolgy” o número total de artigos encontrados é de 6471. No entanto, a pesquisa com as palavras “leishmania & reservoir” tem como resultado 619 artigos, uma diferença importante. Destacamos que a maioria versa sobre leishmaniose visceral, indicando a escassez de informações sobre o papel de reservatórios na leishmaniose tegumentar. Na maioria dos estudos revisados nesta tese, demonstra-se como eram muitas as espécies de mamíferos amostradas, com muitas tentativas de cultivo dos parasitas e poucos resultados positivos encontrados, o que contribui para a dificuldade na publicação dos resultados. Neste mesmo trabalho, o sucesso de cultura foi muito baixo. As chances de isolamento parasitário estão diretamente relacionadas às condições de coleta e cultivo, a carga parasitária e o tempo de evolução da lesão (133). Esses fatores podem justificar os resultados negativos parasitológicos encontrados nos cães e nos gambás.

A necessidade real de prover soluções às comunidades afetadas pela leishmanioses vem centrando os esforços da investigação no controle vetorial, no desenvolvimento de vacinas e em novas medidas terapêuticas. Até onde sabemos, poucas, e em alguns países nenhuma, ações são centradas no estudo dos reservatórios, fonte originária da enzootia ao longo do continente americano.

Apesar disso, muitos pesquisadores continuam na tarefa de tentar entender a rede complexa do sistema de reservatórios, tal como o define Ashford et al., (2003) (36) e Haydon et al., (2002) (31), que apresentam o reservatório como não sendo simplesmente um mamífero infectado, mas sim um sistema responsável pela

manutenção do parasito, em um tempo e um espaço dado, garantindo assim a perpetuação da espécie de protozoário.

Para o estudo dessas redes complexas pode-se usar diferentes estratégias. Uma delas pode ser o método indutivista, que propõe que para conhecer o todo é preciso conhecer a “parte do todo” (134). Conhecer o papel de duas espécies de mamíferos, *Canis familiaris* e *Didelphis marsupialis*, usando uma metodologia holística em dois distintos cenários epidemiológicos de transmissão, um silvestre e outro suburbano poderá contribuir grandemente no entendimento da dinâmica dos hospedeiros reservatórios na leishmanioses. A suspeita da atuação dos gambás e dos cães nesta complexidade está mais que fundamentada. (4,47,136). No entanto, seu estudo sistemático tem muitos vazios que precisam ser atendidos.

A leishmaniose, uma enzootia primariamente restrita a animais silvestres, transforma-se em uma zoonose com o manejo e colonização de áreas desabitadas ou pouco impactadas, quando homens, animais domésticos e/ou sinantrópicos se integram a cadeia de transmissão. Esse contexto é o que encontramos na área de Chocó, a área silvestre aqui estudada.

A dramática taxa de domiciliação e expansão das leishmanioses a ambientes cada vez mais urbanizados demonstra que os animais domésticos e sinantrópicos podem ter um papel na manutenção da infecção. No entanto, existem algumas discussões acerca desta possibilidade. Nos meados da década de 1980, o isolamento de *L. (V.) braziliensis* de cães e burros em comunidades com focos de leishmaniose humana levaram pesquisadores a sugerir que estes animais domésticos poderiam servir como reservatórios, refutando a ideia que os animais domésticos não eram importantes porque os casos se apresentavam principalmente na floresta onde a existência deles era pouca ou nenhuma, como na área da Amazônia (50).

Estudar os reservatórios no contexto da urbanização é de grande importância, pois as alterações do meio ambiente nos últimos anos são dramáticas. A urbanização é uma das alterações no meio ambiente que mais profundamente impacta a saúde humana (136); várias espécies da fauna silvestre foram desaparecendo devido a este fenômeno. De acordo com McKinney (2006) (137), a urbanização é o principal fator para a extinção de espécies. No entanto, uma considerável parte de animais tem se adaptado a essas mudanças, muitos deles com maior facilidade, pois encontram nos ambientes urbanos, periurbanos ou suburbanos uma alta disponibilidade de alimentos. Infelizmente, grande parte

destas espécies animais, como é o caso de *D. marsupialis*, são hospedeiros de patógenos de importância em saúde pública e veterinária, acrescentando o risco de transmissão de enfermidades já conhecidas e o surgimento de novas. Esta relação relativamente recente de animais silvestres, domésticos e humanos, no contexto da urbanização, é ainda pouco entendida (138).

Na caracterização epidemiológica das áreas de estudo, a divisão dos grupos por idade tinha como intenção separar as crianças e jovens dos grupos de adultos, já que esses apresentam atividades de trabalho, gerando uma interpretação epidemiológica diferente dos resultados. Considerando os positivos do grupo de idade de 0-5 anos, o contato com o parasito foi possivelmente intradomiciliar ou próximo a esse ambiente, pois é o lugar onde eles passam a maior parte do tempo, o que ao mesmo tempo indicaria a domiciliação do vetor nessa área de estudo. Isso também acontece em algumas situações com as mulheres, que são, nesta área avaliada, as responsáveis pelo trabalho doméstico e, neste caso, permanecem mais tempo em casa. Em contrapartida, os adultos, especialmente os que possuem atividade de trabalho fora de casa, poderiam ter adquirido a doença fora do lar, inclusive na floresta, já que muitos deles são madeireiros, agricultores, cocaleiros, entre outros.

O grupo que teve maior positividade em ambas as áreas foi o grupo dos adultos; no entanto, a positividade em crianças menores de cinco anos foi importante na área suburbana, relacionada com as áreas de maior desenvolvimento urbanístico.

Os resultados da prova de Montenegro informados no país são bastante variados. Na área oriental do país recentemente foi informada uma frequência de infecção de 68%; muito mais baixos foram os resultados de estudos em diferentes áreas do departamento de Antioquia, o mesmo departamento da área suburbana do presente trabalho, com uma média de 13%, mas é importante destacar que se trata de um resultado dos anos 80 (125), sem informações mais recentes. Por outro lado, no mesmo território da área silvestre foi realizado um estudo ecoepidemiológico, encontrando uma positividade na prova de Montenegro de 57% na população indígena e 26% na população quilombola, esta última em porcentagem similar ao nosso estudo, sendo esta uma área ainda mais agreste. Na população indígena a porcentagem foi mais alta que a encontrada em nosso estudo, possivelmente pelos hábitos de caça e moradias dentro da mesma floresta que têm esses indivíduos, o que aumenta o risco de maior contato com o vetor infetado (139).



Com respeito aos pacientes humanos suspeitos de leishmanioses, na área silvestre, segundo dados oficiais, a média de pacientes para os últimos cinco anos em todo o Departamento (Estado) de Chocó foi de apenas 302 casos de LT. Interessantemente, na área de estudo, mesmo sendo 20 vezes menor, foram diagnosticadas 16 pessoas com leishmanioses. Isso mostra a alta subnotificação para este departamento, um dos mais pobres e abandonados do país. O sistema de saúde nessa área é precário e pouco desenvolvido, com funcionários com pouco treinamento e recursos para fazer um bom diagnóstico da LTA. Além disso, a comunidade não confia no sistema de saúde e prefere usar tratamentos caseiros ou mágico-religiosos antes que ir ao posto de saúde, que ademais é caro, devido às distâncias tão grandes que têm que ser percorridas para chegar até os centros de atenção (95). A outra evidência de ausência na atenção aos pacientes é o tempo de evolução das lesões que, em média para essa área de estudo, foi de 1,2 anos, um número muito alto, que pode gerar complicações clínicas como superinfecções e que, ainda, favorece a transmissão do parasito. A maioria dos pacientes eram adultos maiores de 15 anos. (Apêndice C)

Os resultados demonstram que as duas áreas aqui estudadas são endêmicas para LTA e que, o contato com o vetor, por sua maior positividade na prova de Montenegro, é maior na área suburbana que na silvestre. No entanto, o número de isolados a partir de lesões de pacientes foi igual e o contato com o vetor tende a ser mais precoce em área silvestre, possivelmente por sua cercania com a floresta e, além disso, a domiciliação do vetor ajuda a aumentar o contato das crianças com o vetor. (15)

Da mesma maneira, as análises dos resultados de acordo com o sexo estão relacionadas à doença, devido o tipo de contato onde possivelmente ocorreu a infecção. Nas mulheres, o contato está relacionado mais com a área domiciliar ou perto dela, já que a maioria tem como ocupação os trabalhos domésticos; embora os homens trabalhem fora, no caso da área silvestre, a ocupação está relacionada com a agricultura, a caça etc., o que facilita o contato com o ciclo natural de transmissão silvestre (15). No entanto, na área suburbana a situação muda, já que muitas mulheres não só fazem os trabalhos domésticos, mas também em outras funções, como em mineradora, principalmente.

Em relação à amostragem animal, o número de espécimes da espécie *D. marsupialis* foi maior na área silvestre enquanto a quantidade de *C. familiaris* foi maior na área suburbana. O esforço de captura dos gambás foi diferente nas áreas

de estudo devido às condições urbanísticas tão diferentes. Conforme foi explicado no capítulo de Metodologia, tal resultado é esperado, pois na área silvestre há melhor oferta alimentícia na mata, melhores condições de vida e, portanto, uma maior densidade. Da mesma forma, é sabido que, nas áreas mais urbanizadas, os cães são usados como mascotes, enquanto na área silvestre são usados mais como animais de trabalho, especialmente para a caça e, desse modo, o número maior de cães na área urbana é também esperado.

O número de amostras foi diferente do número total de animais. Embora o protocolo tenha estipulado a coleta de orelha e sangue em cada animal, no caso dos cães, além de cauda, no caso dos gambás, nem sempre era possível obter todas as amostras em cada animal, por diferentes razões, como: os proprietários dos cães permitiam facilmente a amostragem de sangue, mas não a da orelha, especialmente nos cães usados para caça, pois existe a concepção de que a biopsia afeta a orelha e a capacidade de caçar. Em outros casos, devido à desidratação dos gambás ou seu tamanho, a obtenção do sangue não foi possível.

No presente estudo, a maioria dos animais positivos estudados foram assintomáticos. No entanto, a maioria dos estudos com fauna silvestre demonstram que os animais, ainda que sejam positivos, são assintomáticos ou apresentam sintomas não característicos da doença, tal como despigmentação, alopecia e ressecamento da pele, o que aumenta a possibilidade de que as lesões não sejam detectadas (140). O oposto ocorre na LTA com *L. braziliensis*, onde se encontram uma proporção maior de caninos com lesões suspeitas de LTA, que podem oscilar entre 0% e 31% (141–144).

Os achados com *L. panamensis* em nosso estudo poderiam indicar que esse parasito produz uma infecção mais benigna nesses animais, por causa do baixo número de lesões encontradas, similar ao que relatou Calazada et al., (2015) (145), mostrando que, de 52 cães examinados, nenhum apresentou lesão. Nos estudos de Robledo et al., (2012) (146) de padronização de um modelo para leishmaniose cutânea em Hamster, foi observado que as lesões dos animais inoculados com *L. panamensis* eram menos evidentes e resolveram mais rápido do que as observadas nos animais inoculados com a mesma concentração de parasitos de *L. amazonensis* (comunicação pessoal). Nesse sentido, não é possível dizer se nossos resultados são devido ao fato dos cães serem mais resistentes ou a espécie *L. panamensis* ser menos virulenta que outras espécies de Leishmania.

Diferentes hipóteses podem explicar a ausência de sintomatologia nas espécies estudadas. A primeira é a antiguidade do relacionamento entre as espécies de *Leishmania* e os mamíferos. Parasitas do gênero *Leishmania* teriam se adaptado ou estariam se adaptando a animais existentes em seu habitat primitivo, inclusive os domésticos, e essa adaptação poderia atingir um estado de equilíbrio no qual os hospedeiros passariam a desempenhar a função de reservatório do parasito (147), o que é reforçada pela observação de que, entre animais silvestres, como a gambá, a infecção tende a ser benigna e inaparente, sugestiva de uma relação equilibrada resultante de uma antiga associação entre hospedeiro e parasito (148). No entanto, esta teoria se adaptaria ao relacionamento entre gambás e *L. panamensis*, mas não se adaptaria aos cães, pois este é um relacionamento relativamente recente, já que a doença apareceu em ambientes domésticos há pouco tempo. Tem sido demonstrado, experimentalmente, em camundongos, que a picada de flebotomíneos não infectados pode gerar proteção para uma subsequente infecção (149). Isto pode sugerir que, em áreas endêmicas, as altas taxas de picadas poderiam ser um fator protetor, resultando em cães e gambás infectados assintomáticos. A outra possibilidade é a de que *L. panamensis* seja uma espécie menos virulenta que outras espécies de *Leishmania*, o que explica também a alta porcentagem de Montenegro positivo e o baixo número de casos demonstrados neste estudo e em outros já publicados (15). No mesmo sentido, dados da literatura apontam que a baixa carga parasitária demonstrada neste estudo, assim como a baixa resposta humoral, estão relacionadas com a ausência de manifestações (150).

A participação do cão no ciclo de transmissão das leishmanias é bem complexa. Seu papel enquanto reservatório no ciclo de transmissão do agente da LV está melhor definido, sendo considerado um importante reservatório doméstico (151). Em contrapartida, seu papel na transmissão dos agentes da LTA, até o presente momento, é desconhecido e pouco explorado, apesar dos estudos que demonstram cães naturalmente infectados por espécies de *Leishmania* associadas com a LTA, como a *L. braziliensis*, *L. peruviana* e *L. panamensis* (64,120,153,154)

A espécie *L. panamensis* foi amplamente estudada no Panamá, durante as décadas 60 e 80, demonstrando-se que o principal reservatório desta espécie é a preguiça *Choloepus hoffmani*, não encontrando outras espécies de mamíferos que pudessem cumprir este papel (152). No entanto, as mudanças nos modelos epidemiológicos, como a urbanização da enfermidade e a ausência de reservatórios “conhecidos” do parasito, como *C. hoffmani*, em focos epidêmicos de *L.*

*panamensis*, têm reconsiderado o papel dos animais domésticos, como o cão, e de alguns animais sinantrópicos, como *D. marsupialis*, como possíveis reservatórios (145,153).

Poucos relatos sobre *L. panamensis* em gambás e cães têm sido publicados. Sobre os cães, a maioria têm sido informes de estudos com lesões clínicas (70,152). Recentemente se relatou uma soroprevalência do 47% para *L. panamensis* em cães do Panamá (140). Até onde sabemos, o presente estudo demonstra, pela primeira vez, a detecção *L. panamensis* em pele de cães saudáveis. Em *D. marsupialis* o único informe de *L. panamensis* foi feito por Corredor et al., (1990) (19), em somente um animal e, por isso, consideramos que nosso estudo é o primeiro informe de um estudo sistemático com a principal espécie de Leishmania associada com a LTA na Colômbia.

Quanto aos resultados dos estudos sorológicos, a RIFI frequentemente utilizada nestes inquéritos está sujeita à ocorrência de reações cruzadas com antígenos de *T. cruzi*, como está amplamente descrito na literatura (154,155). Este tipo de reação dá-se especialmente pela proximidade filogenética entre os parasitos e é mais provável que aconteça quando se usam antígenos não purificados, como foi feito nesse estudo. Por essa razão, além da sorologia para Leishmania, foi feita a sorologia para tripanosoma e reconhecimento das reações cruzadas ou possíveis confecções.

Os resultados referentes à frequência de anticorpos anti Leishmania na área suburbana que encontramos foi similar a vários estudos. No estado do Rio de Janeiro, foi relatada uma positividade de 10% em 177 animais analisados (156) e no nordeste da Argentina encontrou-se uma reatividade de 13% com seroconversão de 22.5%, analisando-se 52 animais, (157). São poucos os estudos publicados de sorologia de cães em focos de LC na Colômbia. Alguns artigos relatam casos clínicos de LCC na Região Orinoquia do país (158), assim como outros relatam casos por *L. panamensis* em cães da milícia do país, encontrando uma soroprevalência de 100% dos 37 animais clinicamente doentes (70).

A infecção mista de Leishmania e trypanosoma não era esperada, pois não existem relatos de tripanossomíase, nem de triatomíneos, na área suburbana, indicando a falta de inquéritos tanto sorológicos como entomológicos. Não pode ser desconsiderada a possibilidade de outras formas de transmissão de trypanosomas como a via oral, já apontada por estudos recentes (159) e que já foi apresentada como uma possível hipótese a este resultado (160).

Em muitas localidades da América do Sul, como Colômbia, existem áreas endêmicas concomitantes para leishmaniose e para doença de Chagas. *Leishmania spp.* e *T. cruzi*, agentes causais destas parasitoses, respectivamente, pertencem à família Trypanosomatidae e compartilham vários antígenos que causam reação cruzada no diagnóstico sorológico quando misturas de complexos antigênicos são utilizadas. Portanto, e de acordo com nossos resultados, demonstramos a importância de se fazer medições de anticorpos para ambas parasitoses, nos estudos sorológicos, sem importar para qual as duas doenças se está pesquisando; no caso do encontro de indivíduos com positividade para ambos parasitos, é mais confiável fazer provas confirmatórias, como PCR, para conseguir distinguir entre reação cruzada ou coinfeção. Esta sugestão deve ser aplicada mesmo em regiões onde se supõe que não exista circulação de *T. cruzi*, por falta de descrição da presença de doença de Chagas, ou que não se tem informe sobre o vetor.

Poucos estudos têm sido desenvolvidos usando a sorologia em pequenos roedores e marsupiais, especialmente em *Leishmania*. Santiago et al., (2007) (161) usaram a técnica de ELISA pela primeira vez para medir os anticorpos contra *Leishmania*, analisando 107 *D. marsupiais* em São Paulo, Brasil, encontrando uma frequência de 70%. Numa região diferente, em Belo Horizonte, Schallig et al., (2007) (42) usaram as técnicas de DAT e IFAT em 111 gambás, com frequências de positividade de 8.1% e 21.6%, respectivamente. Devido ao pequeno número de amostras testadas no nosso estudo para a prova sorológica nos gambás, não se pode fazer comparações com resultados de outras pesquisas, porém temos uma ideia do contato dos gambás com ambos parasitos.

Ainda que a resposta humoral na leishmaniose tegumentar americana é muito fraca, por conta da baixa quantidade de anticorpos séricos detectáveis pelos métodos tradicionais (162), o que pode levar a uma subvalorização da frequência da infecção, os dados finais obtidos no presente estudo demonstram que tanto os gambás como os cães estão em alto contato com o parasito, especialmente nos cães de área silvestre, onde a frequência da infecção superou 30%, sendo a grande maioria sem sintomatologia detectável. Não é possível ter um cálculo do tempo da infecção, pois se sabe que para *L. braziliensis* os anticorpos são detectáveis desde os 2 meses até 11 meses após a infecção (163–165).

A maioria dos animais que tiveram anticorpos foram negativos na PCR, o que poderia significar que os animais estiveram em contato com o parasita, mas foram capazes de neutralizá-lo e eliminá-lo, porém seus anticorpos têm a capacidade de

se manter por mais tempo, ainda que a infecção tivesse sido controlada ou que, de fato, nesse momento enessa amostra, não estivesse presente o DNA do parasito. Um comportamento similar foi demonstrado em *D. marsupialis* com *T. cruzi*, onde os títulos de anticorpos permanecem constantes por muito tempo, depois que a infecção é neutralizada (166).

Os resultados da PCR e da qPCR demonstram uma grande diferença na positividade e carga parasitária entre as áreas silvestres e suburbanas, tanto nos gambás como nos cães, sugerindo que seu rol é alterado em relação ao ecotopo. Estudos anteriores mostram que *D. marsupialis* tem uma menor importância na transmissão em floresta virgem, que ainda não sofreu interferência humana. No entanto, esse animal pode ter uma maior significância como reservatório do parasita, onde as atividades do hospedeiro eliminaram os outros reservatórios. Keesing et al., (2010) mencionaram que a diminuição da biodiversidade favorece a transmissão das doenças aos humanos.

Os resultados da qPCR permitiram medir o número de parasitos presentes em cada amostra. Esta medição é importante, considerando que a quantidade de parasitos no animal infectado tem sido relacionada tanto com a intensidade da sintomatologia, quanto com a capacidade de transmissão do parasito aos flebotomíneos em casos de LV (167,168). No entanto, recentemente, Silva et al. (2016) (169) tentaram comparar a quantidade de amastigotas de *L. infantum* no sangue e no plasma com a carga de parasitas medido por qPCR e infecciosidade em xenodiagnósticos, sem encontrar associação entre eles, indicando que a medição por qPCR deve ser cuidadosamente analisada uma vez que mede a quantidade de DNA e não a quantidade de parasitas. Contudo, são poucos os estudos em LC; em humanos tem-se medido a carga parasitária em lesões ativas e tem-se proposto como um método para determinar o prognóstico de cura clínica (150). Um estudo recente com hamsters infetados com *L. panamensis* demonstrou a presença do parasita em pele saudável, por até 53 semanas pós-inoculação, mas com baixa carga parasitária e pouco sucesso no xenodiagnóstico (121).

Na avaliação da carga parasitária entre cães e gambás, as amostras de pele e de sangue não apresentaram diferenças estatísticas. O esperado era encontrar maior positividade em amostras de pele, por ser o órgão que tem maior contato com o vetor. No entanto, considerando que não observamos diferenças entre a positividade do sangue e da pele (orelha e cauda), podemos considerar uma alta sensibilidade desta técnica em qualquer tecido, o que em determinado momento

pode ser uma vantagem devido ao fato de que é muito mais fácil obter amostra de pele que de sangue, principalmente no caso dos cães. No entanto, estes resultados não são concordantes com o estudo de Reis et al., (2006) (170), que demonstraram, pelo método de imuno-histoquímica, que a pele e o baço são os tecidos com detecção do maior número de parasitos no caso de *L. infantum*. Da mesma maneira, Manna et al., 2006 (171) acompanharam a infecção em cães sem sinais clínicos infectados por *L. infantum* e verificaram que o parasitismo na pele destes animais se apresentou maior do que o de linfonodo utilizando a qPCR.

A detecção e quantificação de *Leishmania sp.* em pele saudável de possíveis reservatórios tem sido pouco descrita. No artigo de Silva et al. (2016) (169) está demonstrado que cães com lesões apresentam positividade por qPCR em pele saudável, mas não foi feito o estudo em animais sem sintomatologia alguma. No presente trabalho, nós apresentamos uma alta positividade em pele saudável de animais assintomáticos em uma área endêmica para *L. panamensis*. Embora a maioria dos animais tenham apresentado uma baixa carga parasitária, houve indivíduos com altas cargas que, dependendo da persistência das mesmas e da capacidade de transmissão aos flebotomíneos no tempo, um dado que desconhecemos, poderia estar influenciando de forma importante a cadeia de transmissão do parasita, se relacionando com os casos de LC na área.

Outra prova feita foram os ensaios de xenodiagnóstico. Poucos estudos de xenodiagnóstico, tanto em gambás como em cães, têm sido reportados: 3 de 9 cães infectados com *L. braziliensis* infectaram *Lu. whitmani* quando foram alimentados nas lesões. As taxas de positividade nos xenodiagnósticos de *L. braziliensis* são baixas; de fato a taxa de infecção em insetos alimentados de lesões de cães tem sido menor que as taxas de infecção reportadas em humanos, onde todos os oito pacientes foram infecciosos para insetos alimentados diretamente das lesões, entretanto nenhum dos insetos das espécies *Lu. trapidoi*, *Lu. gomezi*, *Lu. longipalpis*, *Lu. youngi*, alimentados a borda da lesão de dois cães com *L. braziliensis*, foram infectados. (69,73,172).

Nossos resultados positivos nos xenodiagnósticos realizados nos animais na área suburbana foram determinados somente por PCR dos insetos; a validade para medir a infecciosidade em uma prova de xenodiagnóstico precisa de mais ensaios para determinar se os insetos positivos por PCR, depois de se alimentar nos cães, apresentam parasitos competentes para se desenvolver e ainda serem transmitidos. Questiona-se o fato de não encontrar promastigotas ativos no intestino dos insetos

no microscópio, durante os xenodiagnósticos, mas é também conhecido que a técnica é pouco sensível e a limitante do número de insetos sobreviventes no momento da dissecação dificulta sua comprovação.

Nos gambás da mesma área são necessários mais estudos, pois, infelizmente, dos 6 xenodiagnósticos feitos somente um deles foi feito em um animal positivo; as condições logísticas não permitiram confirmar a infecção dos animais antes do xenodiagnóstico.

Em nossos resultados, parece haver uma relação entre a carga parasitária e o xenodiagnóstico positivo nos cães da área suburbana, já que o menor valor do número de parasitas foi o que levou ao xenodiagnóstico negativo e os animais com maior carga parasitária foram positivos nos xenodiagnósticos. Esses dados mostram que a abordagem pode ser de utilidade na hora de avaliar a capacidade de infecção de um hospedeiro infectado, como já sugerido (167).

No entanto, a associação entre a carga parasitária e a capacidade de transmissão aos insetos não tem sido demonstrada com sucesso. Recentemente Silva et al. (2016) (169) tentaram comparar a quantidade de amastigotas de *L. infantum* no sangue e em plasma com a carga de parasitos medidos por qPCR e infecciosidade em xenodiagnóstico, sem encontrar qualquer associação, indicando que a medição por qPCR deve ser cuidadosamente analisada, uma vez que mede a quantidade de DNA e não a quantidade de parasitos. Por outro lado, Andrade et al. (2015) (130) encontraram que a carga parasitária não tem relação com a infecciosidade, pois xenodiagnóstico positivo foi obtido em *Rattus rattus* com baixa carga parasitária; mesmo que sejam dados pontuais, é importante reconhecer que pode haver resultados contraditórios nesta relação.

Os resultados sugerem que, na área silvestre, os gambás possivelmente são mais importantes no ciclo de transmissão da LTA que os cães, e que sua infectividade não está relacionada com a carga parasitária, assim como foi determinado por Andrade et al. (2015) (173), que concluíram que a carga parasitária não tem relação com a infecciosidade, pois *Rattus rattus* com baixa carga parasitária foram positivos no xenodiagnóstico.

Na Colômbia, mais de 60% dos isolados provenientes do LTA é produzido por *L. panamensis* (70,174). A respeito da relevância dessa espécie do parasita no país, poucos estudos relacionados à variabilidade e características das cepas de *L. panamensis* que circulam em diferentes focos foram realizados (175–178). Estes estudos falham pela falta de um painel significativo de isolados provenientes de



focos de LTA localizados em diferentes regiões e biomas da Colômbia. Além de explorarmos esses tópicos no presente trabalho, também trabalhamos com isolados de animais e insetos vetores. Nenhum estudo abordou a metodologia do MLST; a maioria utilizou MLEE como método para as análises (175–177). Em 2013, estudo com *L. panamensis* mostrou um alto polimorfismo usando AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) como metodologia (178) e, mais recentemente, Ramirez et al. (2016) (20) analisaram a diversidade dos parasitas usando o gene do Citocromo B e observaram que *L. panamensis* é a espécie mais diversa geneticamente, entre as sete espécies estudadas.

Nossos resultados demonstraram uma variabilidade nucleotídica em alguns dos alvos empregados, o que gerou alto número de STs entre as amostras. Porém, as análises complementares demonstraram a proximidade filogenética entre as cepas. Um único complexo clonal (CC) foi formado com as cepas de *L. panamensis*, separando das demais espécies próximas, como *L. guyanensis* e *L. shawi*. A árvore também demonstrou uma separação das amostras do presente estudo das demais espécies incluídas para a análise.

A formação de CC contendo metade das amostras, oriundas das duas áreas de coleta, demonstrou a homogeneidade das cepas, sugerindo que a *L. panamensis* que circula nessas regiões é produto de uma expansão clonal. Tanto o resultado do eBURST quanto as análises do Neighbour-Net apontam para o fato de circularem nessas áreas clones bastante próximos filogeneticamente. Com isso, podemos sugerir que os isolados obtidos a partir dos animais são muito similares aos que circulam em humanos.

O Neighbour-Net produzido no software Splitstree foi a melhor representação visual dos dados e permitiu a comparação das cepas de nosso estudo com as cepas dos outros países, agrupando-as em um só ramo.

Este estudo trabalhou inicialmente com a hipótese de que alguma estruturação pudesse ser encontrada utilizando a abordagem molecular escolhida. Estruturação esta que pudesse ser associada às amostras dos reservatórios e dos humanos entre as diferentes áreas geográficas da Colômbia. Porém, nossos resultados não demonstraram tal estruturação usando o conjunto dos sete genes housekeeping descritos. Isso pode ser devido aos seguintes fatores: a) a uma insuficiente quantidade de amostras; b) a uma baixa resolução dos marcadores usados para discriminar as diferenças intraespecíficas em *L. panamensis*; c) as

cepas de *L. panamensis* apresentam uma verdadeira homogeneidade e tal subestruturação não existe.

Para conseguir ter maior certeza das razões dos resultados, esta análise deveria ser feita em um estudo com um painel maior de cepas coletadas em diferentes ecótopos e regiões, pois tanto a quantidade de amostras como as localidades podem resultar em frequências alélicas distintas para um dado locus polimórfico, que podem não ser detectadas caso o número de indivíduos analisados seja reduzido (erro tipo II) (179).

Estudo usando técnicas moleculares para caracterizar populações de *L. (V.) braziliensis* de diferentes regiões mostrou uma relação entre o nível de similaridade entre as populações de parasitas e sua distribuição geográfica, indicando que a considerável variabilidade detectada entre estes parasitas está provavelmente relacionada com a diversidade dos vetores e/ou dos reservatório(s) envolvidos nos ciclos de transmissão (180). Patógenos que produzem muitas variantes genéticas diferentes são mais propensos a infectar vários hospedeiros (181). Esses resultados foram corroborados no Brasil com *L. braziliensis*, em que a maior diversidade genética foi das cepas dos parasitas provenientes da área amazônica, onde há maior diversidade de vetores e de espécies do que na área urbana da costa atlântica do Brasil, onde as cepas de *L. braziliensis* de cães e humanos foram idênticas (182). Por outro lado, outros estudos feitos neste mesmo país, porém com a espécie *L. infantum*, encontraram uma baixa variabilidade genética entre os isolados estudados, incluindo baixa diferença entre as cepas de cães e humanos (183,184). Resultados similares foram relatados na Europa e na Índia (185,186).

De acordo com a hipótese da heterogeneidade genética das espécies *Leishmania*, devido à diversidade de hospedeiros e/ou vetores, os resultados deste estudo com a espécie *L. panamensis* deveriam ter sido heterogêneos pelo menos na área silvestre, que tem alta diversidade de espécies mamíferas, algumas das quais já tendo sido encontradas infectadas, como *Proechymis semispinosus*, *Choloepus hoffmani* e *Metachirus nudicaudatus* (187). Nesta mesma área, encontraram-se sete espécies vetoras, embora uma espécie, *Lu. panamensis*, teve uma alta dominância entre elas (73%), indicando a possibilidade de que a diversidade das espécies vetoras tem maior impacto na diversidade genética dos parasitas do que os hospedeiros vertebrados, possibilidade essa que precisa de muitos mais estudos para que seja provada.

Finalmente, com este estudo também ficou evidenciado que a principal limitante da técnica foi a dificuldade de amplificar os genes das amostras clínicas, sendo necessário o isolamento dos parasitas a fim de conseguir as sequências, que, no caso dos mamíferos e insetos, é muito difícil, como já foi descrito amplamente na literatura (106,188,189). Este fato limitou o uso nas análises de hospedeiro reservatório, sendo necessários novos ensaios com metodologias diferentes para conseguir o sucesso neste sentido. Este é o primeiro trabalho com o método de MLST em amostras da Colômbia e um dos primeiros a utilizar amostras de reservatórios com esta metodologia. Os resultados contribuíram significativamente no avanço desta metodologia, que tem grandes vantagens, já que permite tanto a identificação dos isolados quanto o estudo da diversidade do gênero de *Leishmania*, e que funciona também como ferramenta epidemiológica, assim como é uma técnica na qual diferentes laboratórios poderiam criar um banco de dados de sequências nacional ou internacional para comparação global das cepas de *Leishmania* (78).

Apesar da LTA vir mostrando uma mudança no cenário epidemiológico, passando de um padrão de transmissão eminentemente silvestre para um padrão de transmissão rural e, mais recentemente, um padrão periférico e urbano, neste trabalho não houve diferenças genéticas entre os isolados destes diferentes cenários epidemiológicos. A falta de diferenças genéticas nos parasitas entre áreas de grandes diferenças ecológicas e sociológicas contrariam o argumento de que são dadas por adaptações dos parasitas. No entanto, um número maior de amostras de outras regiões do país deve ser analisado em comparação com amostras de *L. panamensis* de outras regiões endêmicas. Além disso, é importante que análises com marcadores que consigam um maior poder de resolução sejam feitas, para que se possa fazer considerações mais precisas e dar um completo panorama da diversidade genética desta espécie.

Considerando nossos resultados referentes à detecção da infecção por PCR, foi realizada uma análise para avaliar a relação desses resultados com a variabilidade na pluviosidade durante o tempo do estudo. A maioria dos estudos correlaciona pluviosidade e a elevação do número de casos de leishmaniose ou com a densidade de vetores, mas não o impacto que pode ter nos hospedeiros não humanos (190,191). Nossos resultados demonstram que, tanto nos gambás como nos cães, a taxa de infecção é variável durante o ano, sugerindo uma relação entre a frequência de infecção e o índice pluviométrico, pois quando a pluviosidade aumenta, aumenta também a frequência de infecção e, quando baixa a taxa de

infecção, é praticamente zero. Provavelmente nossos resultados são reflexo da densidade dos vetores, pois sabe-se que esse aumento da chuva aumenta a incidência de picadas e a probabilidade de infecção (17). Este é um resultado que demonstra que, nestes animais, há momentos de alta infecção, mas continua a questão se estes momentos correspondem a uma alta infecciosidade.

Outro aspecto que poderia sugerir este resultado, tendo em conta a taxa de flutuação durante o tempo, é que a infecção não é persistente na população canina, sugerindo que o hospedeiro poderia eliminar a infecção e que quiçá os picos de positividade estejam relacionados com o incremento do risco de infecção por aumento na densidade dos vetores.

Este resultado demonstra que, no estudo de possíveis reservatórios, é muito importante o seguimento no tempo, pois amostras pontuais em momentos de maiores ou menores frequências de infecção podem gerar conclusões incorretas.

Finalmente, a alta frequência de infecção em cães poderia ser interpretada de duas maneiras: a primeira é que poderia ser um amplificador da infecção ou que tenha um efeito conhecido inicialmente como “zooprofilaxia” e depois como “efeito de diluição”, no qual a diversidade e quantidade de espécies animais próximos das habitações humanas aumentam as possibilidades de alimentação do vetor em espécies não humanas, e assim, diminuem a infecção em humanos (192–194). Mas para poder ter ideia de qual poderia ser o papel dos cães na transmissão, segundo Miller, usando um modelo matemático simples utilizando-se de duas variáveis, a capacidade de transmissão do hospedeiro e a preferência do vetor, verificou-se que o efeito de diluição ou de amplificação depende da preferência do vetor por um hospedeiro de baixa ou alta transmissão (195).

O presente estudo indica que, aparentemente, os cães não têm muita importância no ciclo de transmissão de *L. panamensis*, já que não existe persistência da infecção; isto foi evidenciado especialmente na área silvestre. Porém, é importante realizar maiores avaliações sobre sua capacidade de transmissão e de atração dos vetores. Por outro lado, o gambá parece ser um bom transmissor do parasito, embora sejam importantes mais ensaios de xenodiagnósticos para que se confirme a hipótese de que esse animal é um bom reservatório de *L. panamensis*.

Finalmente, das 23 espécies coletadas na área silvestre, sete espécies, quase a terceira parte de todas as espécies, apresentaram comportamento antropofílico com antecedentes vetoriais de *Leishmania*. Entre elas, *Lutzomyia* (Lu)

*panamensis*, *Lu. gomezi*, *Lu. trapidoi*, na Colômbia; *Lu. ovallesi*, na Venezuela; *Lu. olmeca* bicolor, no México e *Lu. sanguinaria* e *Lu. ylephiletor* em outros países da América Central. Aproximadamente 50% do total dos exemplares capturados pertenciam a uma dessas espécies(27,132,196,197).

Destaca-se o achado de duas espécies nunca antes registradas para o departamento de Chocó, como são *Lu. atroclavata* e *Lu. Cayenensis*. *Lu atroclavata* foi capturada na localidade de El Aguacate, no interior das moradias, com a armadilha de luz do tipo CDC, ainda que com baixa densidade. *Lu cayennensis* foi capturada com armadilhas de luz do tipo CDC, no intra e peridomicílio.

*Lutzomyia atroclavata*: relatos existentes apontam que esta espécie está presente nos departamentos de Boyacá, Caldas, Cundinamarca, Guajira, Huila, Magdalena, Norte de Santander, Santander, Sucre e Tolima (27,198). Dentro do subgênero *Micropygomyia*, *Lu. atroclavata* é morfologicamente similar a *L. venezuelensis*, porém se diferencia desta pelo número e grossura das setas do gonocoxito e pela forma do parâmero. Do ponto de vista epidemiológico, considera-se esta espécie como um potencial vetor de *L. infantum*, na Ilha Guadalupe, no México (199), embora essa espécie de flebotomíneo não pareça ser antropofílica.

*Lutzomyia cayennensis*: estudos entomológicos prévios desenvolvidos nos departamentos de Córdoba, Tolima e Cundinamarca, reportam a coleta de espécimes de *Lu. cayennensis cayennensis* infectados com promastigotas não identificados (27). Adicionalmente, este inseto foi encontrado portando flagelados, também não identificados, na Venezuela (200). Este flebotomíneo tem uma ampla distribuição na América Central e no norte da América do Sul, coleta-se comumente com *Lu. evansi* ou *Lu. longipalpis* em focos de leishmaniose visceral (201,202). Presume-se que esta espécie se alimente de vertebrados de sangue frio, em especial de lagartos (123). Entretanto, na Colômbia, tem-se observado que *Lu. cayennensis cayennensis*, em altas densidades, ataca o homem e se encontra, com frequência, repousando sobre as paredes do interior das moradias (27). Este último padrão de comportamento se registrou em departamentos da costa Caribe, como Córdoba, Sucre e Bolívar, onde se coletaram indivíduos em repouso no intradomicílio (203). Ademais, em Los Montes de María, é uma das espécies de flebotomíneos mais abundantes dentro do domicílio, depois de *Lu. evansi* (204).

## CONCLUSÕES

1. Objetivo: Conhecer o status epidemiológico da leishmaniose tegumentar na população humana nas duas áreas de estudo por meio da atenção de casos suspeitos e a prova de Intradermoreação de Montenegro

*Conclusão:* A frequência da infecção, observada tanto clinicamente quanto pela positividade do teste de Montenegro, indica que a Leishmaniose Cutânea é endêmica nas duas áreas de estudo, caracterizando-se por uma maior transmissão extradomiciliar. No entanto, nas áreas mais urbanizadas a transmissão torna-se mais intradomiciliar. Medidas de controle devem ser efetivadas nas áreas de estudo, especialmente na área silvestre, visando não somente o controle vetorial, mas também implementando medidas em saúde coletiva, como educação, diagnóstico rápido e acesso ao tratamento.

2. Objetivo: Identificar e descrever as características clínicas da infecção por *Leishmania* e a soroprevalência nas espécies *Canis familiaris* e *Didelphis marsupialis* em duas regiões da Colômbia, uma com ciclo silvestre e outra com ciclo suburbano.

*Conclusão:* Nossos resultados demonstram que a espécie *L. panamensis* não gera sintomatologia na maioria dos gambás e cães infectados, indicando uma efetiva reação imunológica dos animais e/ou que a espécie infetante é pouco virulenta para esses animais. Além disso, observou-se reação cruzada com tripanosoma tanto em cães quanto em gambás, em uma área sem casos de Doença de Chagas ou vetores conhecidos dessa doença, o que ratifica a necessidade do diagnóstico sorológico diferencial entre estes parasitos não somente nas áreas reconhecidas como endêmicas para as duas doenças.

No caso na área silvestre foram detectados anticorpos nos animais, mas não DNA, o que poderia indicar que nesta área a infecção foi anterior a coleta das amostras para o presente estudo; na área suburbana a frequência de detecção de DNA foi alta, o que pode indicar uma infecção recente, com taxas de reinfecção alta ou com uma persistência da infecção maior que na área silvestre

3. Objetivo: Avaliar a infecção natural e identificar as espécies de *Leishmania* de amostras de gambás, cães e humanos que circulam na Colômbia usando PCR e ensaio de isoenzimas

*Conclusão:* Por PCR foi possível detectar e identificar a presença de DNA de *Leishmania panamensis* a partir de DNA extraído de lesões cutâneas, de homem e cães, como de pele saudável de cães e gambás, sugerindo o uso dessa ferramenta em inquéritos epidemiológicos e também no diagnóstico dos animais. Por ensaio isoenzimático foi possível identificar que todas as culturas obtidas correspondiam a *L. panamensis*, mas com a presença de zimodemas distintos.

A associação entre a flutuação da frequência de infecção no tempo e fatores ambientais, tais como pluviosidade, revelam a importância do seguimento prospectivo nos estudos sobre reservatórios.

4. Objetivo: Determinar o grau de infecção através do cálculo da carga parasitária de *Leishmania* spp. por PCR em tempo real em cães e gambás de duas regiões da Colômbia.

*Conclusão:* A técnica de PCR em tempo real usada neste estudo pode ser uma ferramenta útil para o estudo de potenciais reservatórios domésticos e silvestres para espécies de *Leishmania* associadas à leishmaniose cutânea, podendo, inclusive, utilizar amostra de sangue periférico na avaliação dos animais.

O padrão de carga parasitária tem relação com a infectividade dos flebotomíneos, indicando que a PCR em tempo real poderia ser validade para substituir o xenodiagnóstico, como método de triagem e investigação inicial do potencial de espécies animais atuarem como reservatório, sendo esta técnica menos trabalhosa e mais prática, além de poder ser automatizada, permitindo a análise de grande número de amostras em estudos epidemiológicos.

5. Objetivo: Avaliar a capacidade de transmissão dos parasitos de cães e gambás aos flebotomíneos através do método de xenodiagnóstico

*Conclusão:* Devido as limitações nas provas xenodiagnósticas, principalmente relacionada a manutenção da sobrevivência dos insetos, os únicos resultados obtidos foram por PCR em cães da área suburbana. Tentamos usar outras estratégias como a utilização de insetos de campo, no entanto, a probabilidade de

falsos positivos devido a infecção natural poderia invalidar os experimento e por isso os resultados não foram considerados.

É preciso avaliar com novos estudos se existe e qual é a relação entre a positividade da PCR, os resultados do xenodiagnóstico e a capacidade de desenvolvimento do parasito no inseto, até a transmissão.

6. Objetivo: Avaliação da heterogeneidade genética das populações de *L. panamensis* em amostras de reservatórios e humanos em duas regiões na Colômbia.

*Conclusão:* A população de *L. panamensis* estudada, empregando os marcadores descritos, apresentou algum grau de heterogeneidade, mas não houve correlação entre genótipos, dispersão geográfica ou hospedeiro. Este resultado poderia estar relacionado com uma limitação na técnica usada, uma vez que contradiz outros estudos reportados com esta espécie de *Leishmania*. Além disso, o fato de termos encontrados mais do que um zimodema de *L. panamensis* indica que a diversidade desse parasita deve ser melhor investigada e compreendida.

7. Objetivo: Identificar a fauna flebotomínica e os possíveis vetores, visando relacionar sua distribuição com a presença e positividade de cães e gambás em área silvestre

*Conclusão:* Encontrou-se uma alta diversidade de espécies de flebotomíneos nas áreas avaliadas. No entanto, a mais predominante ao longo do tempo foi a espécie vetora *Lutzomyia panamensis*, parecendo ser essa a que se adaptou melhor as mudanças ecológicas na área silvestre, e indicando também uma domiciliação dessa espécie, fatores que devem ser levadas em consideração na implementação de medidas de controle vetorial.

### **Considerações Finais**

De maneira geral este estudo fornece informações importantes sobre a dinâmica de transmissão da espécie *L. panamensis* em cães e gambas em dois diferentes cenários eco epidemiológicos. No primeiro cenário, uma área silvestre, a indicação é de que o cão parece ter um papel de hospedeiro acidental. Entretanto, nesta mesma área, os gambás parecem ter um papel mais preponderante, considerando



principalmente o fato de termos conseguido isolar o parasita de amostras de sangue. Já na área suburbana, as evidências sugerem que as espécies estudadas, cães e gambás, desempenham uma função diferente, tornando-se mais importante na ecoepidemiologia da *L. panamensis* do que no ciclo silvestre

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 15 de fevereiro de 2017;10(1):82.
2. WHO | Control of the leishmaniasis: WHO TRS N°949 [Internet]. WHO. [citado 16 de janeiro de 2017]. Disponível em: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/resources/who\\_trs\\_949/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/resources/who_trs_949/en/)
3. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. setembro de 2004;27(5):305–18.
4. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One*. 2012;7(5):e35671.
5. Lainson R, Shaw JJ. New world leishmaniasis. *Topley Wilsons Microbiol Microb Infect* [Internet]. 2005 [citado 14 de janeiro de 2017]; Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470688618.taw0182/full>
6. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today Pers Ed*. abril de 2000;16(4):142–4.
7. Lainson R. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Rev Para Med*. 1997;11(1):29–40.
8. Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amaz Saúde*. 2010;1(2):13–32.
9. Santos RV, Coimbra Jr CE, Coimbra Jr CEA, Santos RV, Escobar AL. Cenários e tendências da saúde e da epidemiologia dos povos indígenas no Brasil. *Epidemiol E Saúde Povos Indígenas No Bras*. 2003;13–48.
10. Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-Qubati Y, Schwartz RA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. *J Am Acad Dermatol*. dezembro de 2015;73(6):897-908; quiz 909-910.
11. Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. abril de 2010;8(4):419–33.
12. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. maio de 2004;99(3):239–51.

13. Guerra JA de O, Ribeiro JAS, Coelho LI de AR da C, Barbosa M das GV, Paes MG. [Epidemiology of tegumentary leishmaniasis in São João, Manaus, Amazonas, Brazil]. *Cad Saude Publica*. novembro de 2006;22(11):2319–27.
14. Reyes G. Algunos aspectos de la Leishmania observados en el Hospital de San Juan de Dios de Bogotá. *Rev Fac Med*. 1957;25(9–12):371–391.
15. Velez ID, Hendrickx E, Robledo SM, del Pilar Agudelo S. [Gender and cutaneous leishmaniasis in Colombia]. *Cad Saude Publica*. fevereiro de 2001;17(1):171–80.
16. Vigilancia Rutinaria [Internet]. [citado 17 de janeiro de 2017]. Disponível em: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Paginas/vigilancia-rutinaria.aspx>
17. Cardenas R, Sandoval CM, Rodríguez-Morales AJ, Franco-Paredes C. Impact of climate variability in the occurrence of leishmaniasis in northeastern Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. agosto de 2006;75(2):273–7.
18. Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez ID. Presence of *Lutzomyia evansi*, a vector of American visceral leishmaniasis, in an urban area of the Colombian Caribbean coast. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. fevereiro de 2001;95(1):27–8.
19. Corredor A, Kreutzer RD, Tesh RB, Boshell J, Palau MT, Caceres E, et al. Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. março de 1990;42(3):206–14.
20. Ramírez JD, Hernández C, León CM, Ayala MS, Flórez C, González C. Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. *Sci Rep*. 22 de junho de 2016;6:28266.
21. Hernández CZ, Sotelo MA, Oviedo OF, Barraza OC, Toro GR. Cartagena: nuevo foco de leishmaniasis visceral urbana en Colombia. *Cienc EN Desarro*. 2016;7(1):83–91.
22. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol*. janeiro de 1990;4(1):1–24.
23. Sergent E, Sergent E, Parrot L, Donatien A, Lestoquard F. Revue historique du problème de la transmission leishmanioses. *Bull Soc Path Exot Paris*. 1933;26:224–248.
24. Volf P, Hajmova M, Sadlova J, Votypka J. Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *Int J Parasitol*. outubro de 2004;34(11):1221–7.
25. Rogers ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*. maio de 2002;124(Pt 5):495–507.

26. Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol.* 2013;58:227–50.
27. Montoya-Lerma J, Ferro C, Amat G, Andrade MG, Fernández F. Flebótomos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. *Insectos Colomb.* 1999;2:211–45.
28. Bejarano EE, Sierra D, Vélez ID. [New findings on the geographic distribution of the verrucarum group (Diptera: Psychodidae) in Colombia]. *Biomed Rev Inst Nac Salud.* setembro de 2003;23(3):341–50.
29. Hoyos-López R, Bolaños R, Contreras-Gutierrez M, Carrero-Sarmiento D. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in a sub-Andean forest from the Norte de Santander, Colombia. *J Vector Borne Dis.* março de 2016;53(1):70–6.
30. Ashford RW, Bettini S, Peters W, Killick-Kendrick R, others. Ecology and epidemiology: Old World. *Leishmaniasis Biol Med Vol Biol Epidemiol.* 1987;365–424.
31. Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis.* dezembro de 2002;8(12):1468–73.
32. Leirs H, Mills JN, Krebs JW, Childs JE, Akaibe D, Woollen N, et al. Search for the Ebola virus reservoir in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: reflections on a vertebrate collection. *J Infect Dis.* fevereiro de 1999;179 Suppl 1:S155-163.
33. del Ponte E. Consideraciones sobre la epidemiología de la leishmaniasis tegumentaria en la Argentina. *Bol Oficina Sanit Panam.* 1952;32(3):223–231.
34. Viana M, Mancy R, Biek R, Cleaveland S, Cross PC, Lloyd-Smith JO, et al. Assembling evidence for identifying reservoirs of infection. *Trends Ecol Evol.* 2014;29(5):270–279.
35. Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol.* outubro de 1996;14(5):523–32.
36. Ashford RW. When is a reservoir not a reservoir? *Emerg Infect Dis.* novembro de 2003;9(11):1495–6.
37. Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* dezembro de 2014;3(3):251–62.
38. Arias JR, Naiff RD. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* setembro de 1981;76(3):279–86.
39. Dedet JP, Gay F, Chatenay G. Isolation of *Leishmania* species from wild mammals in French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* outubro de 1989;83(5):613–5.

40. Grimaldi Júnior G, Kreutzer RD, Hashiguchi Y, Gomez EA, Mimory T, Tesh RB. Description of *Leishmania equatorensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. Mem Inst Oswaldo Cruz. junho de 1992;87(2):221–8.
41. Scorza JV, Rezzano S, César Márquez J. [Didelphis marsupialis: principal reservoir of *Leishmania* spp. in the city of Trujillo, Venezuela]. Rev Cubana Med Trop. agosto de 1984;36(2):194–200.
42. Schallig HDFH, da Silva ES, van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CMF. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). Vector Borne Zoonotic Dis Larchmt N. 2007;7(3):387–93.
43. Travi BL, Osorio Y, Becerra MT, Adler GH. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. Trans R Soc Trop Med Hyg. junho de 1998;92(3):275–8.
44. Olifiers N, Gentile R, Fiszon JT. Relation between small-mammal species composition and anthropic variables in the Brazilian Atlantic Forest. Braz J Biol Rev Brasleira Biol. agosto de 2005;65(3):495–501.
45. Jansen AM, Leon L, Machado GM, da Silva MH, Souza-Leão SM, Deane MP. *Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphis marsupialis*: parasitological and serological follow-up of the acute infection. Exp Parasitol. outubro de 1991;73(3):249–59.
46. Jiménez M, Sánchez AL, Poveda F, Cadena K, others. Mamíferos terrestres y voladores de Colombia: guía de campo. [Internet]. 2004 [citado 15 de janeiro de 2017]. Disponível em: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=BAC.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expression=mfn=044717>
47. Cantillo-Barraza O, Garcés E, Gómez-Palacio A, Cortés LA, Pereira A, Marcet PL, et al. Eco-epidemiological study of an endemic Chagas disease region in northern Colombia reveals the importance of *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae), dogs and *Didelphis marsupialis* in *Trypanosoma cruzi* maintenance. Parasit Vectors. 22 de setembro de 2015;8:482.
48. Adler GH, Becerra MT, Travi BL. Feeding success of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) experimentally exposed to small mammal hosts in an endemic focus of *Leishmania chagasi* in northern Colombia. Biomed Rev Inst Nac Salud. dezembro de 2003;23(4):396–400.
49. Cutolo AA, Teodoro AKM, Ovallos FG, Allegretti SM, Galati EAB. Sandflies (Diptera: Psychodidae) associated with opossum nests at urban sites in southeastern Brazil: a risk factor for urban and periurban zoonotic *Leishmania* transmission? Mem Inst Oswaldo Cruz. junho de 2014;109(3):391–3.
50. Aguilár CM, Rangel EF, Garcia L, Fernandez E, Momen H, Grimaldi Filho G, et al. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*

associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. março de 1989;84(1):19–28.

51. Brumpt É. Précis de parasitologie. 1. Masson et Cie, ed.; 1936.
52. Mello GB. Verificação da infecção natural do gato (*Felis domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. Bras Méd. 1940;54(12):180.
53. Bonfante-Garrido R, Urdaneta I, Urdaneta R, Alvarado J. Natural infection of cats with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1991;85(1):53.
54. Costa-Durão JF, Rebelo E, Peleteiro MC, Correia JJ, Simões G. Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (Concelho de Sesimbra). Nota preliminar. Rev Port Cienc Vet. 1994;89(511):140–4.
55. Pennisi MG. La leishmaniosi felina dalla A alla Z. Grup Studio Sulla Leishmaniosi Canina Ed Leishmaniosi Canina Ed Vet. 2010;59–64.
56. Soares CSA, Duarte SC, Sousa SR. What do we know about feline leishmaniosis? J Feline Med Surg. junho de 2016;18(6):435–42.
57. Pennisi MG. Leishmaniosis of companion animals in Europe: an update. Vet Parasitol. 28 de fevereiro de 2015;208(1–2):35–47.
58. Simões-Mattos L, Mattos MRF, Teixeira MJ, Oliveira-Lima JW, Bevilaqua CML, Prata-Júnior RC, et al. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. Vet Parasitol. 28 de fevereiro de 2005;127(3–4):199–208.
59. Mancianti F. [Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat?]. Parassitologia. junho de 2004;46(1–2):203–6.
60. Grevot A, Jaussaud Hugues P, Marty P, Pratlong F, Ozon C, Haas P, et al. Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. Parasite Paris Fr. setembro de 2005;12(3):271–5.
61. Mazza S. Leishmaniasis cutánea en el caballo y nueva observación de la misma en el perro. Bol Inst Clin Quir. 1927;3:462–4.
62. Alencar JE. Calazar canino: Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. Fortaleza, Imprensa Oficial. Tese da Universidade Federal do Ceará; 1959.
63. Aguilar CM, Rangel EF, Deane LM. Cutaneous leishmaniasis is frequent in equines from an endemic area in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. dezembro de 1986;81(4):471–2.

64. Falqueto A, Varejão JB, Sessa PA. Cutaneous leishmaniasis in a horse (*Equus caballus*) from endemic area in the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* setembro de 1987;82(3):443.
65. Follador I, Araujo C, Cardoso MA, Tavares-Neto J, Barral A, Miranda JC, et al. [Outbreak of American cutaneous leishmaniasis in Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop.* outubro de 1999;32(5):497–503.
66. Soares IR, Silva SO, Moreira FM, Prado LG, Fantini P, Maranhão R de PA, et al. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol.* 8 de novembro de 2013;197(3–4):665–9.
67. Truppel JH, Otomura F, Teodoro U, Massafera R, da Costa-Ribeiro MCV, Catarino CM, et al. Can equids be a reservoir of *Leishmania braziliensis* in endemic areas? *PLoS One.* 2014;9(4):e93731.
68. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004;57:1–88.
69. Travi BL, Tabares CJ, Cadena H. *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in two Colombian dogs: a note on infectivity for sand flies and response to treatment. *Biomed Rev Inst Nac Salud.* outubro de 2006;26 Suppl 1:249–53.
70. Vélez ID, Carrillo LM, López L, Rodríguez E, Robledo SM. An epidemic outbreak of canine cutaneous leishmaniasis in Colombia caused by *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis*. *Am J Trop Med Hyg.* maio de 2012;86(5):807–11.
71. Bonfante-Garrido R, Morillo N, Torres R. Leishmaniasis cutánea canina en Venezuela. *Bol Sanit Panam.* 1981;91:160–5.
72. Afonso MMDS, Gomes AC, Meneses CRV, Rangel EF. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (N.) intermedia* (Diptera, Psychodidae), vector of cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica.* dezembro de 2005;21(6):1816–20.
73. Hernández D, Rojas E, Scorza JV, Jorquera A. [Dog (*Canis familiaris*) infectivity to *Lutzomyia youngi* in Trujillo, Venezuela]. *Biomed Rev Inst Nac Salud.* outubro de 2006;26 Suppl 1:242–8.
74. Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. *Dermatol Clin.* julho de 2015;33(3):579–93.
75. van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol.* março de 1992;51(1):133–42.
76. Graça GC da, Volpini AC, Romero GAS, Oliveira Neto MP de, Hueb M, Porrozzi R, et al. Development and validation of PCR-based assays for

diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* agosto de 2012;107(5):664–74.

77. Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin J-C, Van der Auwera G. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* julho de 2012;31(7):1453–61.
78. Schönian G, Mauricio I, Gramiccia M, Cañavate C, Boelaert M, Dujardin J-C. Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends Parasitol.* março de 2008;24(3):135–42.
79. Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology.* abril de 2011;138(4):405–25.
80. Grogl M, Kreutzer RD, McHugh CP, Martin RK. Characterization of a *Leishmania* isolate from the rodent host *Neotoma micropus* collected in Texas and comparison with human isolates. *Am J Trop Med Hyg.* dezembro de 1991;45(6):714–22.
81. Mimori T, Grimaldi G, Kreutzer RD, Gomez EA, McMahon-Pratt D, Tesh RB, et al. Identification, using isoenzyme electrophoresis and monoclonal antibodies, of *Leishmania* isolated from humans and wild animals of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg.* fevereiro de 1989;40(2):154–8.
82. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 de março de 1998;95(6):3140–5.
83. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* março de 2000;38(3):1008–15.
84. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.* agosto de 2005;43(8):4178–82.
85. Mauricio IL, Yeo M, Baghaei M, Doto D, Pratlong F, Zemanova E, et al. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *Int J Parasitol.* junho de 2006;36(7):757–69.
86. Zemanová E, Jirků M, Mauricio IL, Horák A, Miles MA, Lukes J. The *Leishmania donovani* complex: genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. *Int J Parasitol.* fevereiro de 2007;37(2):149–60.



87. Tsukayama P, Lucas C, Bacon DJ. Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World *Leishmania*. *Int J Parasitol.* fevereiro de 2009;39(3):355–62.
88. Boité MC, Mauricio IL, Miles MA, Cupolillo E. New insights on taxonomy, phylogeny and population genetics of *Leishmania* (*Viannia*) parasites based on multilocus sequence analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(11):e1888.
89. Marlow MA, Boité MC, Ferreira GEM, Steindel M, Cupolillo E. Multilocus sequence analysis for *Leishmania braziliensis* outbreak investigation. *PLoS Negl Trop Dis.* fevereiro de 2014;8(2):e2695.
90. López LP, Mira AV, Acosta L, Cadena H, Agudelo D, Vélez ID. Descripción de un foco endémico de Leishmaniasis cutánea en Puerto Valdivia, Antioquia, Colombia. *Rev CES Salud Pública.* 2014;5(1):3.
91. Sitio web del municipio Acandí en Chocó [Internet]. [citado 13 de janeiro de 2017]. Disponível em: <http://www.acandi-choco.gov.co/index.shtml>
92. Inicio [Internet]. [citado 14 de janeiro de 2017]. Disponível em: <http://www.dane.gov.co/>
93. Nossa IC. 13. Conflicto armado, criminalidad y violencia en la frontera colombo-panameña: elementos críticos para buscar una transición. En *Colomb.* :221.
94. Álvarez-Salas L, Gálvez-Abadía A. Food Sovereignty in a Socioecological Transformation Context in the Caribbean Darién of Colombia. *Agroecol Sustain Food Syst.* 9 de agosto de 2014;38(7):812–38.
95. Carrillo-Bonilla LM, Trujillo JJ, Alvarez-Salas L, Vélez-Bernal ID. [Study of knowledge, attitudes, and practices related to leishmaniasis: evidence of government neglect in the Colombian Darién]. *Cad Saude Publica.* outubro de 2014;30(10):2134–44.
96. Shochat E, Warren PS, Faeth SH, McIntyre NE, Hope D. From patterns to emerging processes in mechanistic urban ecology. *Trends Ecol Evol.* abril de 2006;21(4):186–91.
97. Walton BC, Shaw JJ, Lainson R, others. Observations on the in vitro cultivation of *Leishmania braziliensis*. *J Parasitol.* 1977;63(6):1118–1119.
98. Ramírez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D, et al. Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: the Sampling Site within Lesions Influences the Sensitivity of Parasitologic Diagnosis. *J Clin Microbiol.* 10 de janeiro de 2000;38(10):3768–73.
99. Sokal JE. Measurement of delayed skin-test responses [Internet]. *Mass Medical Soc*; 1975 [citado 20 de janeiro de 2017]. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM197509042931013>

100. Sanches VQA, Gomes MM de A, Passos F de C, Gracioli G, Ribas AC de A. Home-range and space use by *Didelphis albiventris* (Lund 1840)(Marsupialia, Didelphidae) in Mutum Island, Paraná river, Brazil. *Biota Neotropica*. 2012;12(4):50–55.
101. Fernandez FAS, Pires AS. Perspectivas para a sobrevivência dos marsupiais brasileiros em fragmentos florestais: o que sabemos eo que ainda precisamos aprender. *Os Marsupiais Bras Biol Ecol E Evol NC Cáceres ELA Monteiro-Filho Orgs Ed UFSM Campo Gd*. 2006;191–201.
102. Taniguchi HH. Dinâmica de circulação de *Leishmania* spp no ambiente enzoótico florestal de diferentes regiões do Estado de São Paulo [Internet]. Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Departamento de Epidemiologia; 2010 [citado 15 de janeiro de 2017]. Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=594067&indexSearch=ID>
103. Alexander B, Lozano C, Barker DC, McCann SH, Adler GH. Detection of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. *Acta Trop*. março de 1998;69(1):41–50.
104. Laflamme D (Ralston PC. Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine Pract St Barbara Calif* 1990 USA [Internet]. 1997 [citado 23 de fevereiro de 2017]; Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9742264>
105. Bowdre JH, Campbell JL, Walker DH, Tart DE. American mucocutaneous leishmaniasis. Culture of a *Leishmania* species from peripheral blood leukocytes. *Am J Clin Pathol*. março de 1981;75(3):435–8.
106. Herrer A, Christensen HA, Beumer RJ. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis among Panamanian forest mammals. *Am J Trop Med Hyg*. setembro de 1973;22(5):585–91.
107. Bernal IDV, López S del PA. Manual de procedimientos para el diagnóstico de la leishmaniosis cutánea americana. Editorial Universidad de Antioquia; 1996.
108. Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg*. março de 1994;50(3):296–311.
109. Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H. Discrimination of *Leishmania* isolates using a limited set of enzymatic loci. *Ann Trop Med Parasitol*. fevereiro de 1995;89(1):17–23.
110. Schönián G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. setembro de 2003;47(1):349–58.

111. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* dezembro de 2013;30(12):2725–9.
112. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* julho de 1987;4(4):406–25.
113. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* dezembro de 1980;16(2):111–20.
114. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985;783–791.
115. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol.* março de 2004;186(5):1518–30.
116. Spratt BG, Hanage WP, Li B, Aanensen DM, Feil EJ. Displaying the relatedness among isolates of bacterial species -- the eBURST approach. *FEMS Microbiol Lett.* 15 de dezembro de 2004;241(2):129–34.
117. Bryant D, Moulton V. Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol Biol Evol.* fevereiro de 2004;21(2):255–65.
118. Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol.* fevereiro de 2006;23(2):254–67.
119. Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. Leishmania DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect.* setembro de 2007;9(11):1307–15.
120. Cavalcanti AS, Ribeiro-Alves M, Pereira L de OR, Mestre GL, Ferreira ABR, Morgado FN, et al. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in Leishmania infantum-naturally infected dogs. *PloS One.* 2015;10(4):e0123009.
121. Carrillo-Bonilla LM, Montoya A, Arbeláez N, Cadena H, Ramírez J, Robledo SM. MIGRATION OF Leishmania (Viannia) panamensis AND ITS PERSISTENCE IN HEALTHY SKIN OF HAMSTER. *Rev UDCA Actual Amp Divulg Científica.* dezembro de 2014;17(2):341–50.
122. Maroli M, Feliciangeli MD. Métodos de captura, conservación y montaje de los flebótomos (Diptera: Psychodidae). In: *Metodos de captura, conservacion y montaje de los flebotomos (Diptera: Psychodidae)* [Internet]. OPAS; 1997 [citado 14 de janeiro de 2017]. Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=766542&indexSearch=ID>

123. Young DG, Duran MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae) [Internet]. DTIC Document; 1994 [citado 14 de janeiro de 2017]. Disponível em: <http://oai.dtic.mil/oai/oai?verb=getRecord&metadataPrefix=html&identifier=ADA285737>
124. Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* janeiro de 1996;22(1):1–13.
125. Isaza MR. La reacion de Montenegro en la epidemiologia de la leishmaniasis sudamericana. *Boletin Oficina Sanit Panam.* 1980;89:130–136.
126. Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* julho de 1989;27(7):1477–82.
127. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol.* novembro de 2004;42(11):5249–55.
128. Mortarino M, Franceschi A, Mancianti F, Bazzocchi C, Genchi C, Bandi C. [Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*]. *Parassitologia.* junho de 2004;46(1–2):163–7.
129. Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 30 de abril de 2006;137(3–4):214–21.
130. Young DG, Arias JA. Flebótomos: vectores de leishmaniasis en las Américas, Org. Pan-Amer, Salud. Technical Report; 1992.
131. Christensen HA, Herrer A. Detection of *Leishmania braziliensis* by xenodiagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1972;66(5):798–799.
132. Feliciangeli MD, Rodriguez N, Bravo A, Arias F, Guzman B. Vectors of cutaneous leishmaniasis in north-central Venezuela. *Med Vet Entomol.* 1º de outubro de 1994;8(4):317–24.
133. Madeira Md M de F, Uchôa CMA, Leal CA, Macedo Silva RM, Duarte R, Magalhães CM, et al. [*Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in naturally infected dogs]. *Rev Soc Bras Med Trop.* outubro de 2003;36(5):551–5.
134. Morin E. La epistemología de la complejidad. *Gaz Antropol.* 2004;(20):10.
135. Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Vet Parasitol.* 10 de novembro de 2007;149(3–4):139–46.

136. Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int J Parasitol.* novembro de 2000;30(12–13):1395–405.
137. McKinney ML. Urbanization as a major cause of biotic homogenization. *Biol Conserv.* 2006;127(3):247–260.
138. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Trop.* 23 de fevereiro de 2001;78(2):103–16.
139. Duque P, Vélez ID, Morales M, Sierra D. Sand flies fauna involved in the transmission of cutaneous leishmaniasis in Afro-Colombian and Amerindian Communities of Chocó, Pacific Coast of Colombia. *Neotrop Entomol.* 2004;33(2):255–264.
140. Van Wynsberghe NR, Canto-Lara SB, Sosa-Bibiano EI, Rivero-Cárdenas NA, Andrade-Narváez FJ. Comparison of small mammal prevalence of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in five foci of cutaneous leishmaniasis in the State of Campeche, Mexico. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* abril de 2009;51(2):87–94.
141. Oliveira-Neto MP, Pirmez C, Rangel E, Schubach A, Grimaldi Júnior 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.* dezembro de 1988;83(4):427–35.
142. Uchôa CMA, Serra CMB, Duarte R, Magalhães CM, Silva RM da, Theophilo F, et al. Serological and epidemiological aspects of canine American tegumentary leishmaniasis from Maricá, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001;34(6):563–568.
143. dos Santos GPL, Sanavria A, Marzochi MC de A, dos Santos EGOB, Silva VL, Pacheco R da S, et al. [Prevalence of canine infection from endemic areas of American cutaneous leishmaniasis in Paracambi District, Rio de Janeiro State, between 1992 and 1993]. *Rev Soc Bras Med Trop.* abril de 2005;38(2):161–6.
144. Parrado R, Rojas E, Delgado R, Torrico MC, Reithinger R, Garcia AL. Prevalence of *Leishmania* spp. infection in domestic dogs in Chapare, Bolivia. *Vet Parasitol.* 19 de abril de 2011;177(1–2):171–4.
145. Calzada JE, Saldaña A, González K, Rigg C, Pineda V, Santamaría AM, et al. Cutaneous Leishmaniasis in dogs: is high seroprevalence indicative of a reservoir role? *Parasitology.* agosto de 2015;142(9):1202–14.
146. Robledo SM, Carrillo LM, Daza A, Restrepo AM, Muñoz DL, Tobón J, et al. Cutaneous leishmaniasis in the dorsal skin of hamsters: a useful model for the screening of antileishmanial drugs. *J Vis Exp JoVE.* 21 de abril de 2012;(62).
147. Forattini OP. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1960;2(4):195–203.

148. Lainson R. Evolution, classification and geographical distribution. *Leishmaniasis Biol Med* [Internet]. 1987 [citado 20 de janeiro de 2017]; Disponível em: <http://ci.nii.ac.jp/naid/10016268542/>
149. Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science*. 17 de novembro de 2000;290(5495):1351–4.
150. Mans DRA, Kent AD, Hu RV, Lai A Fat EJ, Schoone GJ, Adams ER, et al. Monitoring the response of patients with cutaneous leishmaniasis to treatment with pentamidine isethionate by quantitative real-time PCR, and identification of *Leishmania* parasites not responding to therapy. *Clin Exp Dermatol*. agosto de 2016;41(6):610–5.
151. Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol*. 2014;6:147–54.
152. Dereure J, Espinel I, Barrera C, Guerrini F, Martini A, Echeverria R, et al. [Leishmaniasis in Ecuador. 4. Natural infestation of the dog by *Leishmania panamensis*]. *Ann Soc Belg Med Trop*. março de 1994;74(1):29–33.
153. Saldaña A, Chaves LF, Rigg CA, Wald C, Smucker JE, Calzada JE. Clinical cutaneous leishmaniasis rates are associated with household *Lutzomyia gomezi*, *L. panamensis*, and *L. trapidoi* abundance in Trinidad de Las Minas, western Panama. *Am J Trop Med Hyg*. março de 2013;88(3):572–4.
154. Camargo ME, Rebonato C. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. *Am J Trop Med Hyg*. julho de 1969;18(4):500–5.
155. Malchiodi EL, Chiamonte MG, Taranto NJ, Zwirner NW, Margni RA. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). *Clin Exp Immunol*. setembro de 1994;97(3):417–23.
156. Figueiredo FB, Bonna ICF, Nascimento LD, Costa T da, Baptista C, Pacheco TMV, et al. [Serological evaluation for detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs and cats in the district of Santa Rita de Cássia, municipality of Barra Mansa, State of Rio de Janeiro]. *Rev Soc Bras Med Trop*. abril de 2009;42(2):141–5.
157. Marco JD, Padilla AM, Diosque P, Fernández MM, Malchiodi EL, Basombrío MA. Force of infection and evolution of lesions of canine tegumentary leishmaniasis in northwestern Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. julho de 2001;96(5):649–52.
158. Vasquez-Trujillo A. Registro de leishmaniasis cutánea en caninos presentes en zonas peri-urbana de Villavicencio, Meta y su importancia en la salud pública. *Orinoquia*. 2006;10(2):79–86.

159. Roque ALR, Xavier SCC, da Rocha MG, Duarte ACM, D'Andrea PS, Jansen AM. Trypanosoma cruzi transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. Am J Trop Med Hyg. novembro de 2008;79(5):742–9.
160. Bedoya C, Carrillo-Bonilla L, Salazar B, Velez A, Triana O, Cantillo O. Caracterización de la transmisión extradoméstica de Trypanosoma cruzi en el corregimiento de Puerto Valdivia, Antioquia. In XVI Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical: Biomedica; 2015. p. 177–8.
161. Santiago MEB, Vasconcelos RO, Fattori KR, Munari DP, Michelin A de F, Lima VMF. An investigation of Leishmania spp. in Didelphis spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). Vet Parasitol. 25 de dezembro de 2007;150(4):283–90.
162. Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. Infect Immun. abril de 2000;68(4):1760–4.
163. Pirmez C, Marzochi MC, Coutinho SG. Experimental canine mucocutaneous leishmaniasis (Leishmania braziliensis braziliensis). Mem Inst Oswaldo Cruz. junho de 1988;83(2):145–51.
164. Genaro O, Carvalho MD, Pinto FA, Dias M. The course of the experimental infections by Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) amazonensis in dogs. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1990;85:S27.
165. Costa CA da, Genaro O, Lana M de, Magalhães PA, Dias M, Michalick MS, et al. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. Rev Soc Bras Med Trop. 1991;24(1):21–25.
166. Legey AP, Pinho AP, Xavier SCC, Marchevsky R, Carreira JC, Leon LL, et al. Trypanosoma cruzi in marsupial didelphids (Philander frenata and Didelphis marsupialis): differences in the humoral immune response in natural and experimental infections. Rev Soc Bras Med Trop. abril de 2003;36(2):241–8.
167. Courtenay O, Carson C, Calvo-Bado L, Garcez LM, Quinnell RJ. Heterogeneities in Leishmania infantum infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(1):e2583.
168. Losada-Barragán M, Cavalcanti A, Umaña-Pérez A, Porrozzi R, Cuervo-Escobar S, Vallejo AF, et al. Detection and quantification of Leishmania infantum in naturally and experimentally infected animal samples. Vet Parasitol. 15 de agosto de 2016;226:57–64.
169. Silva FM de F, Santos EM de S, Torres SM, Yamasak EM, Ramos RAN, Alves LC. Parasite load in intact and ulcerative skin of dogs with leishmaniasis. Rev Bras Parasitol Vet Braz J Vet Parasitol Orgao Of Col Bras Parasitol Vet. março de 2016;25(1):127–30.

170. Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 15 de agosto de 2006;112(3–4):102–16.
171. Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Foglia Manzillo V, Pavone LM, et al. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet Parasitol*. 20 de dezembro de 2006;142(3–4):271–80.
172. Rojas E, Scorza JV. [Xenodiagnosis using *Lutzomyia youngi* in Venezuelan cases of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. março de 1989;84(1):29–34.
173. Andrade MS, Courtenay O, Brito MEF, Carvalho FG, Carvalho AWS, Soares F, et al. Infectiousness of Sylvatic and Synanthropic Small Rodents Implicates a Multi-host Reservoir of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(10):e0004137.
174. Vélez ID, Jiménez A, Vásquez D, Robledo SM. Disseminated Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: Report of 27 Cases. *Case Rep Dermatol*. dezembro de 2015;7(3):275–86.
175. Saravia NG, Holguín AF, McMahon-Pratt D, D'Alessandro A. Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis* subspecies diversity. *Am J Trop Med Hyg*. julho de 1985;34(4):714–20.
176. Saravia NG, Segura I, Holguin AF, Santrich C, Valderrama L, Ocampo C. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. julho de 1998;59(1):86–94.
177. Cuervo P, Cupolillo E, Nehme N, Hernandez V, Saravia N, Fernandes O. *Leishmania (Viannia)*: genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. *Exp Parasitol*. outubro de 2004;108(1–2):59–66.
178. Restrepo CM, De La Guardia C, Sousa OE, Calzada JE, Fernández PL, Leonart R. AFLP polymorphisms allow high resolution genetic analysis of American Tegumentary Leishmaniasis agents circulating in Panama and other members of the *Leishmania* genus. *PloS One*. 2013;8(9):e73177.
179. Hillis DM, Moritz C, Mable BK, Olmstead RG. *Molecular systematics* [Internet]. Vol. 23. Sinauer Associates Sunderland, MA; 1996 [citado 14 de janeiro de 2017]. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Barbara\\_Mable/publication/49252417\\_Molecular\\_Systematics/links/0046351ade87c46b56000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Barbara_Mable/publication/49252417_Molecular_Systematics/links/0046351ade87c46b56000000.pdf)
180. Ishikawa E a. Y, Silveira FT, Magalhães ALP, Guerra júnior RB, Melo MN, Gomes R, et al. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. abril de 2002;96 Suppl 1:S111-121.

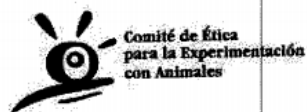


181. Woolhouse ME, Taylor LH, Haydon DT. Population biology of multihost pathogens. *Science*. 11 de maio de 2001;292(5519):1109–12.
182. Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito MEF, Falqueto A, et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol*. julho de 2003;41(7):3126–32.
183. Segatto M, Ribeiro LS, Costa DL, Costa CHN, Oliveira MR de, Carvalho SFG, et al. Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. fevereiro de 2012;107(1):39–47.
184. da Silva TAM, Gomes LI, Oliveira E, Coura-Vital W, Silva L de A, Pais FS-M, et al. Genetic homogeneity among *Leishmania (Leishmania) infantum* isolates from dog and human samples in Belo Horizonte Metropolitan Area (BHMA), Minas Gerais, Brazil. *Parasit Vectors*. 15 de abril de 2015;8:226.
185. Alam MZ, Kuhls K, Schweynoch C, Sundar S, Rijal S, Shamsuzzaman AKM, et al. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetic homogeneity of *Leishmania donovani* strains in the Indian subcontinent. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. janeiro de 2009;9(1):24–31.
186. Chicharro C, Llanes-Acevedo IP, García E, Nieto J, Moreno J, Cruz I. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 25 de julho de 2013;18(30):20545.
187. Carrillo LM, Cadena H, Acosta LA, Mondragón-Shem Karina, Vélez A, Agudelo D, et al. Estudio ecoepidemiológico de la leishmaniosis en el Darién Colombiano. In XX Congreso Latinoamericano de Parasitología. Bogotá, Colombia: Biomedica; 2011. p. 94.
188. Aguilar CM, Fernández E, de Fernández R, Deane LM. Study of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. The role of domestic animals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. junho de 1984;79(2):181–95.
189. Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, da Silva SR, Moura Júnior AJ, Teixeira Neto RG, et al. 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*. outubro de 2011;105(10):579–85.
190. Chaves LF, Calzada JE, Valderrama A, Saldaña A. Cutaneous leishmaniasis and sand fly fluctuations are associated with el niño in Panamá. *PLoS Negl Trop Dis*. outubro de 2014;8(10):e3210.
191. Pérez J, Virgen A, Rojas JC, Rebollar-Téllez EA, Alfredo C, Infante F, et al. Species composition and seasonal abundance of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in coffee agroecosystems. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. fevereiro de 2014;109(1):80–6.
192. Keesing F, Holt RD, Ostfeld RS. Effects of species diversity on disease risk. *Ecol Lett*. abril de 2006;9(4):485–98.

193. Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD, Holt RD, et al. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*. 2 de dezembro de 2010;468(7324):647–52.
194. Johnson PTJ, Thielges DW. Diversity, decoys and the dilution effect: how ecological communities affect disease risk. *J Exp Biol*. 15 de março de 2010;213(6):961–70.
195. Miller E, Huppert A. The effects of host diversity on vector-borne disease: the conditions under which diversity will amplify or dilute the disease risk. *PloS One*. 2013;8(11):e80279.
196. Christensen HA, Herrer A. Detection of *Leishmania braziliensis* by xenodiagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1972;66(5):798–799.
197. Santamaría E, Ponce N, Zipa Y, Ferro C. Presencia en el peridomicilio de vectores infectados con *Leishmania (Viannia) panamensis* en dos focos endémicos en el occidente de Boyacá, piedemonte del valle del Magdalena medio, Colombia. *Biomédica*. 2006;26:82–94.
198. Bejarano EE. Lista actualizada de los psicódidos (diptera: psychodidae) de Colombia. *Folia Entomológica Mex México Num1 Vol45* [Internet]. 12 de fevereiro de 2015 [citado 14 de janeiro de 2017]; Disponível em: <http://repositoriodigital.academica.mx/jspui/handle/987654321/368070>
199. Courmes E, Escudie A, Fauran P, Monnerville A. Premier cas autochtone de leishmaniose viscerale humaine a la Guadeloupe. *Bull Soc Pathol Exot*. 1966;59:217–225.
200. Rodríguez N, Aguilar CM, Barrios MA, Barker DC. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. fevereiro de 1999;93(1):47–9.
201. Ferro C, Morrison AC, Torres M, Pardo R, Wilson ML, Tesh RB. Age structure, blood-feeding behavior, and *Leishmania chagasi* infection in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J Med Entomol*. setembro de 1995;32(5):618–29.
202. Travi BL, Adler GH, Lozano M, Cadena H, Montoya-Lerma J. Impact of habitat degradation on phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forests in Northern Colombia. *J Med Entomol*. maio de 2002;39(3):451–6.
203. Gómez RJV, Gómez EO, Argumedo YA, Torres C, Gutierrez CML, Martínez EEB. Flebotominos adultos e inmaduros (Diptera: Psychodidae): registros para el Caribe colombiano Adult and immature phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae): records for the Caribbean región of Colombia. 2013 [citado 25 de janeiro de 2017]; Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Rafael\\_Vivero/publication/260191156\\_Flebotominos\\_adultos\\_e\\_inmaduros\\_\(Diptera\\_Psychodidae\)\\_registros\\_para\\_el\\_Caribe\\_colombiano/links/55284c770cf29b22c9bc9bf2.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Rafael_Vivero/publication/260191156_Flebotominos_adultos_e_inmaduros_(Diptera_Psychodidae)_registros_para_el_Caribe_colombiano/links/55284c770cf29b22c9bc9bf2.pdf)

204. Le Pape P. Écoépidémiologie de la leishmaniose a *Leishmania infantum*= *L. chagasi* dans la plaine des caraïbes (Colombie): corrélation vecteur et réservoir canin. Montp Fr Univ Montp I. 1992;
205. Herrera a, Christensen H a, Beumer RJ. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis among Panamanian forest mammals. Am J Trop Med Hyg. setembro de 1973;22(5):585–91.

## TAÇÃO COMITÉ DE ÉTICA



Medellín, 6 de mayo de 2013

Investigadora  
**LINA CARRILLO**  
PECET  
Universidad de Antioquia

Protocolo: "Estudio ecoepidemiológico y molecular de posibles hospederos  
reservorios de leishmaniasis cutánea en un foco periurbano de  
Colombia"

Cordial saludo.

Después de ser estudiado el protocolo en referencia y como consta en el acta No. 83 de la reunión realizada el 2 de mayo a las 4:00 pm en la sala de reuniones de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Antioquia, nos permitimos comunicarle que si cumple con los lineamientos establecidos por el **Comité de Ética para la Experimentación con Animales** de la Universidad de Antioquia.

Con toda atención.

**JOSÉ IGNACIO CALLE POSADA**  
Coordinador (e)  
Comité de Ética para la Experimentación con Animales  
Universidad de Antioquia

## **APENDICE B: ARTIGO REVISÃO DE RESERVATORIOS SILVESTRES**

Para subsometer Memorias do Instituto Oswaldo Cruz

### **RESERVOIR OF AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS. A METHANALISYS REVIEW**

Carrillo-Bonilla LM, Bermudez V, Cupolillo E, Velez ID

#### **INTRODUCTION**

Since Plavosky adopted the concept of what has been called the "doctrine of natural nidality of disease", the word "nidality" (ochagavost) being used to express the concept of focal localization, we know the importance of studies in each epidemiological region (Pavlosky, 1966). In the same way, the epidemiological triangle introduced in the 1960s (McNew 1960) suggests that three components are necessary for persistence of infectious disease: host, pathogen and environment. These concepts mean that wild enzootic foci of many diseases, particularly zoonoses, exist in nature independently of man and domestic animals. It applies to the first epidemiological scenario of leishmaniasis, where cases of the disease occurred when the man entered the forest to perform different labors (Velez et al., 2001). However, the increase of human populations and other economic factors are making necessary to colonize uninhabited areas of the world, thus exposing man and his domestic animals to wild pathogens such as *Leishmania* spp. (Abdussalan, 1959; Reinthinger 2007).

Leishmaniasis are still a major worldwide public health problem considering they are endemic in 98 countries or territories, with more than 350 million people at risk (Alvar et al., 2012). The disease displays different clinical manifestations, ranging from asymptomatic or subclinical infection to disfiguring forms of cutaneous (CL) and mucosal leishmaniasis (ML) or potentially fatal visceral disease. (Desjeux P, 2001; Murraw et al., 2005). In the Americas, cases of human leishmaniasis, which may present various infection patterns, are caused by more than 10 species of heteroxenic flagellates of the genus *Leishmania*. These parasites circulate among mammals and , are transmitted by sandflies of the genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae).

Understanding parasites transmission requires knowledge of the ecological conditions that regulate their parasite population dynamics in order to develop effective frameworks of management measures.

#### *Definition of reservoir*

There is evidence dating from the Mesolithic era that reference to the possibility of disease transmission from animals to humans. Thus, to the extent of animal domestication increase, the interest for the study and knowledge about zoonoses (term from greek *zoo* -animals- and *nosis* -diseases-) (Diamond, 2002) has been expanded and new definitions have been created, including the concept of reservoir.

There are many different and often contradictory definitions of reservoirs, since Ponte in 1952 who defined it as animals hosts of the microorganisms. Nevertheless, the concept of reservoir or host reservoir must be analyzed from a different point of view, with holistic approach. The first is the ontological concept of the relationship between two organisms, where there is a coexistence that implies coevolution. Such relationships that besides parasitism include commensalism, inquilinism, phoresy and strict simbiosis, are hardly delimited, or they may even not be steady, *i.e.* the relationship of two microorganisms may start as a commensalism and conclude in a parasitism or visceversa.

Asymptomatic infection was usually considered as an essential attribute to determine whether an animal was a reservoir host. In this way, the relationship host-microorganism seem not circumscribed in a parasitic relationship, because in an initial concept parasitism implied damage to the host. Actually, none of these concepts are true. Neither the reservoirs do not become ill nor the parasitic relationships imply illness. A parasitic relationship means metabolic reliance on the host in at least part of the life cycle (Thrall, 2012). Thereby, the relationship of a host reservoir is circumscribed to a parasitic relationship but the definition of a reservoir is not limited to this kind of relationship. This is the reason why, determining infection is not enough to clasify an animal as a reservoir.

In the same way, other wrong features used for long time to define a reservoir included that infections in reservoir hosts are always nonpathogenic; any natural host is a reservoir host; the reservoir must be a different species; reservoirs are economically unimportant hosts; or reservoirs may be primary or secondary hosts. (Shaw,1988; Henderson,1989; Swinton, 1998 and 2001)

Characteristics to be considered a reservoir host. This is currently not considered as a rule; in fact, it is the transmission strategy of the parasite that is positively selected in a successful host-parasite system, independent of the damage caused by the parasite or health status displayed by the host. Even ancient host-parasite interaction may not necessarily evolve in the direction of less damage or lower virulence, but instead of that, to the maximum transmissibility of the parasite (Giorgio 1995; Woolhouse et al., 2001). According to the concept proposed by McMichael (2004) and Roque and colleagues (2005), maintenance host is the one that retain the infection (where a given parasite persists) while an amplifier host displays an infection course that favors the transmissibility of the parasite.

The reservoir concept should be analyzed from the ecological point of view, the dynamics of zoonotic pathogen transmission between wildlife hosts and humans can be very complex and extremely variable across systems. Ashford in 1997 made one of the first definitions about the reservoir in this context. He defined reservoir (of infection) as the ecological system in which an infectious agent survives persistently and reservoir host, as vertebrate hosts that form an essential part of the system.

Haydon et al. (2002) recently introduced the concept of target population, from which the reservoir should be defined as one or more epidemiologically connected populations or environments in which the pathogen can be permanently maintained and from which infection is transmitted to the defined target population. Nonetheless the complexity of these interactions is likely the most critical barrier for understanding spillover dynamics and managing a potential zoonotic disease

### *Reservoir of Leishmania species in the American Continents*

One of the first reports of infected mammals with ACL was done by Brumpt and Pedroso in 1913 when two individuals of *Dasyprocta* sp. were found with lesions similar to human CL. Then, Medina in 1946, during a study on paracoccidiosis, recorded natural infections in lesions of domestic guinea-pigs (*Cavia porcellus*) with a unique *Leishmania* species in the State of Paraná, Brazil.. Leonidas Deane in 1948 noted the presence of amastigotes in impression smears of spleen and liver from a two-toed sloth, *Choloepus didactylus*, from Pará State, north Brazil, but he was uncertain if they were *Leishmania* or development stages of *Endotrypanum*.

Since then, the Gorgas Memorial Laboratory in Panamá did the first systematic studies leading to find infected wild animals (Herrer et al., 1973). Basically, animal samples presenting lesions or depigmentation in skin, indicating any leishmaniasis infection process, were taken (Herting and Fairchild, 1957; Herting 1959). However, due to experimental infections done in this institute, it was realized as possible that the infected animals do not develop any kind of symptom. A new approach was initiated at the Gorgas in March 1965. Starting from the hypothesis that natural leishmanial infections among animals might occur with no gross skin alterations, wild-caught mammals were investigated using skin smears and biopsy skin-culture technique (205).

At the same time Lainson and Strangways-Dixon established that forest rodents were reservoir hosts of the parasite and frequently showed visible lesions rich in amastigotes on their tails. A volunteer was successfully infected with a parasite isolated from a wild rodent, and a biological and biochemical comparison of the organism with that from cases of ACL showed them to be identical. This represented the first conclusive association of a Neotropical *Leishmania* parasite (i.e. *L. amazonensis*) known to infect man with a sylvatic reservoir (Lainson 1962,1964).

Many studies have been carried out after these early studies in order to know the reservoir in leishmaniosis. But the majority have been limited to the search of infection, and the interest in studying the reservoir have been limited as mentioned above. This could be due to: 1) illiteracy on what a reservoir is, 2) difficulties in the work with wild animals, 3) limitations in sensibility and specificity of diagnostic tests, 4) legal and ethical limitations for work with wildlife, 5) Scarce practical applications derived from the results so far, and 6) to obtain important results is necessary to



guarantee the co-operation of epidemiologists, microbiologists, taxonomists, ecologists and parasitologists.

This review aims to draw an updated picture of leishmania reservoir studies and to point to the wild or synantropic animals more probably involved as potential reservoir used a multivariate statistical technique as Principal component analysis (PCA) and cluster analyse. Then, the role as reservoirs, its distribution in the Americas and the findings that locate them as hosts of other diseases of the ten incriminated species is more deeply discussed.

### **Methodology**

All methods were defined *a priori* in a protocol, which is available from the corresponding author on request.

#### *Ethics Statement*

This was a meta-analysis of published summary data therefore it did not required ethics approval.

#### *Search Strategy*

The two search strategies employed here were designed to examine critically the body of literature indexed in major publication databases exploring the role of reservoir in American Cutaneous Leishmaniasis (ACL). The first strategy was searching identified articles using the key words “American Cutaneous Leishmaniasis & reservoir” and “American Cutaneous Leishmaniasis & wild mammals” in databases such as National Library of Medicine 2014 (MEDLINE), Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) and Education Resources Information Center (ERIC). The selected search terms were combined alternatively using the Boolean logic (AND, OR).

The second strategy was searching in the reference list of retrieved articles and identified eligible studies based on pre-specified inclusion/exclusion criteria.

#### *Inclusion criteria and study Selection*

The eligible studies must meet the following criteria: (1) Designed to find wild animals infected with Leishmania or experimental infection with Leishmania in wild mammals 2) Studies including only Leishmania species from the New World that generate cutaneous lesions. 3) Some studies included domestic animals, in this case only the information about wild animals was taken into account. 4) Availability of the

paper in either English, Spanish or Portuguese. The studies are excluded if reported only by abstracts of conference proceedings without the detailed information.

Reports of partial results were not use in cases were the final report was available, in order to avoid double results. Leishmania species are named without subgenre with the aim of easing the reading.

#### *Data Abstraction*

For eligible studies, two reviewers extracted data bases independently, using Excel spreadsheet. Data extraction was conducted by both authors using the same data extraction template including the following information: author(s), journal, country, and year of publication, mammal species studied, sample size, positive animals, positive frequency, leishmania species, type of samples, and positive samples.

#### *Statistical analysis*

After identifying the outcome variables, it was decided to divide them in two types, by information level and positivity level.

The variables associated with the amount of collected information were: 1) Number of reported papers, 2) number of countries, 3) number of trials, 4) number of samples where the study has been done and presence-absence of xenodiagnosis, isolation (direct, culture or isolation in hamster or both), experimental infection and alternative tests (PCR, Real-time PCR, histopathology, DNA hibridization, direct agglutination). The variables chosen regarding positivity were: 1) number of papers with positive results, 2) number of positive trials 3) number of positive samples 4) number of positive countries, presence-absence of xenodiagnosis, isolation (direct, culture or isolation in hamster or both), experimental infection and alternative tests (PCR, Real-time PCR, histopathology, DNA hibridization, direct agglutination) with positive result.

Since the presence-absence variable is a dichotomous variable and there is a pecking order to quantitatively represent the information, the used procedure was as follows: 1) Both for quantity of information and for positivity, the tests were ordered from higher to lower importance (1-Xenodiagnosis, 2-Isolation, 3-Experimental infection and 4-Alternative tests). Presence was represented as 1 and absence as 0. In this way, a variable in the four-digit binary system was obtained for each species.

By expressing this number in the decimal system, a number from 1 to 15 which expresses the number of tests and the importance of such evidence was obtained.

In order to summarize the five variables in a score for both information quantity and positivity, it was decided to reduce the dimensionality of the problem by a principal component analysis – PCA – assigning PCA1 for information and PCA2 for positivity. This statistical analysis finds linearly uncorrelated variables that summarize the largest possible variance of the data. In this case, the first principal component summarized almost the 70% of the variance, for both information quantity and positivity.

Therefore, it was determined how much information is available about the species and how positive it is, depending on the expressed magnitude as the principal component.

With the previous data, in order to increase the resolution of the results the species were clustered according to the incrimination level, as follows: cluster 1 for low likelihood of being incriminated; Cluster 2 for medium likelihood and cluster 3 for the highest likelihood. For this, the method of Ward was used, taking as a measure the Euclidean distance. The analysis was performed in statgraphics centurión XVI program.

## **Results**

The total number of retrieved articles were 108, the results of the systematic literature review are summarized in the tables 1 and 2. The animal orders and species, reported as positive, are detailed in table 1. The table 2 describes negative species that have been sampled in query of *Leishmania* parasite.

The results indicated a total number of 17137 sampled animals; from those, 9% (1533) were positive, clustered in 310 species and 12 orders. The order with higher number of samples was Rodentia with 157 species and 11.372 individuals, followed by the order Chiroptera with 53 species and 925 individuals, and the next in the ranking was Didelphimorphia with 30 species and 2.836 individuals. However, the percentage of positivity was higher in the order Didelphimorphia followed by the Pilosa. Some orders as Testudines, Lagomorpha, Perissodactyla and Squamata had a very low number of sampled species turning them in not representative. The Table 3 shows the results in detail.

From a total of 310 monitored species, 119 (38%) were positives, however, 36 (30%) from those had only one positive individual in the study and 16 species had less than 5 sampled individuals. In the case of those species that were not found infected (a total of 186), 116 (62.3%) had less than 5 studied individuals. The animal species with the higher number of studies and sampling was *Didelphis marsupialis* with 36 papers and 979 individuals, followed by *Rattus rattus* with 25 papers and 782 individuals. However, *Proechimys semispinosus*, with 1089 sampled individuals, is the one with the biggest sample size.

In Figure 1 it is shown the *Leishmania* species isolated from each of the six most important orders. *Leishmania amazonensis* and *L. braziliensis* were the species isolated from all the orders while some others as *L. enrietti* and *L. hertigi* were isolated only from the order rodentia.

The oldest paper was from 1913, from the beginning of the reservoirs studies, the researchers started to become interested and a boom in the topic started. In the 40's and 50's there were only 4 papers. In the 60's and 70's it became more important, with 12 and 13 papers respectively. But it is in the 80's and 90's with 27 and 20 papers respectively, when the top interest for the study of this topic is reached, with a significant decreased in the decade 2000, only 18 papers, considering that for this decade the number of publications increased exponentially in almost all areas of knowledge. From this date to 2014 there have been 14 papers.

Almost half of the studies (53 from the total of 108 papers) were carried out in Brazil, 11 in Panama, 8 in Venezuela, 7 in Colombia, in the case of Guyana, Mexico and USA each country had 5, for Bolivia, Costa Rica, Ecuador, Honduras and Peru there are 2 papers in the topic per country and only one paper for both Argentina and Trinidad.

Brazil is the country with higher number of papers. Then, is not surprising that the leishmania species with higher report is *L. braziliensis*, which is prevalent in that territory, detected from 37 mammal species, followed by *L. amazonensis* and *L. mexicana*, detected in 25 in 20 mammal species respectively. There is also a wide diversity of leishmania species detected from wild fauna e.g. *L. guyanensis* and *L. panamensis* in 8 species, *L. peruviana* and *L. shawi* in 5 species, *L. pifanoi* in 4, *L. garhami* in 3, *L. equatorensis*, *L. hertigi*, *L. lainsoni*, *L. naiffi* and *L. forattinii* each in 2 species and *L. colombiensis* and *L. enrietti* each in 1 species. The complex or subgenero was identified in 18 cases and for 40 species the leishmania species was

not determined. Most wild mammal species were infected with one leishmania species. For 21 mammal species 2 leishmania species were reported, for 11, 8 and 1 mammal species, 3, 4 and 5 leishmania species respectively and for *D. marsupialis* 8 leishmania species were reported.

In most of the studies the parasite detection is intended by methods as direct, culture or inoculation in hamster. Regardless the novelty of molecular tests, almost the 28% of the studies used molecular methods as PCR, PCR-RFLP and DNA hybridization. Seventeen species have been experimentally infected but five of them were not found naturally infected before, these were used as animal models of infection. One of the most important test for transmissibility detection is the xenodiagnosis, this was done for 21 species.

The results analysis for the main components for information (PC1) and for positivity (PC2) delivered as the highest score to *Didelphis marsupialis* indicating that it is the species most incriminated as reservoir. At the same way *D. marsupialis* was grouped in cluster 3 (highest likelihood to be reservoir) with some other species as *Didelphis albiventris*, *Sigmodon hispidus*, *Oryzomys capito* and *Choloepus hoffmanni* in the Figure N°2 the species from this cluster can be observed and the last columns from table N°1 show the score and the cluster for each mammal species.

The same analysis was performed by Leishmania species but it only had outcomes for the species *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. mexicana*. (Graph 2) The other Leishmania species did not have enough number of incriminated mammal species to enable this analysis. A description of the outcome per Leishmania species is presented below.

*Leishmania amazonensis*: The parasite was detected in 26 species, however, the most incriminated species, with higher PC2 and PC1, included in the cluster 3, are detailed in the list below and the graph 2A in order from the the highest to the lower values:

*Didelphis marsupialis*, *Proechimys cuviere*, *Proechimys guyannensis*, *Oryzomys nitidus*, *Oryzomys acritus*, *Philander opposum*, *Metachirus nudicaudatus*, *Proechimys sp.*, and *Dasyprocta sp.* In the cluster 2 are: *Molossus molossus* (Mo.m), *Artibeus lituratus* (Ar.l), *Glossophaga soricina* (Gl.s), *Myotis nigricans* (My.n), *Platyrrhinus lineatus* (Pl.l), *Molossus rufus* (Mo.r), *Nyctinomops laticaudatus*, *Eumops auripendulus*, *Sturnira lilium*, *Eumops glaucinus* cluster 1: *Cebus apella* (Ce.a), *Marmosa cinérea* (Ma.c), *Sciurus vulgaris* (Sc.v), *Potos flavus* (Pt.f), *Tamandua*

*tetradactyla* (Ta.t), *Micoureus paraguayanus* (Mi.p), *Proechymis iheringi denigrates* (Pr.d),

*Leishmania braziliensis*: only four mammal species were classified in the cluster 3: *Choloepus hoffmanni*, *Didelphis marsupialis*, *Rattus rattus* and *Sigmodon hispidus*. In the cluster 2 i.e. medium incrimination, are included *Nectomys squamipes* (Ne.s), *Akodon arviculoides* (Ak.a), *Proechimys semispinosus* (Pr.s), *Potos flavus* (Pt.f), *Oryzomys capito* (Or.c), *Bolomys lasiurus* (Bo.l), *Bradypus infuscatus* (Br.i), *Thrichomys laurentius* (Th.l), *Agouti paca* (Ag.p), *Diplomys labilis* (Di.l), *Didelphis albiventris* (Di.a), *Bassaricyon gabbii* (Ba.g), *Marmosa sp* (Ma.sp), *Holochilus sciureus* (Ho.s), *Mystromys albicaudatus* (My.a), *Marmosa robinsoni* (Ma.r), *Saguinus geoffroyi* (Sa.g), *Nasua nasua* (Na.n), *Aotus trivirgatus* (Ao.t), *Cebus apella* (Ce.a). In the last cluster, i.e. those with lower incrimination were *Heteromys anomalus*, *Micoureus paraguayanus*, *Tylomys panamensis*, *Thrichomys apereoides*, *Cebus nigrivittatus*, *Rattus norvegicus*, *Proechymis guyanensis*, *Cuniculus paca*, *Dasyprocta rubrata*, *Mus musculus*, *Gracilinanus agilis*, *Necromys lasiurus*, *Glossophaga soricina* and *Molossus molossus*. (Graph 2B)

*Leishmania mexicana*: from the 22 species incriminated in *L. mexicana*, all the species that were classified in the cluster 3 belong to the rodentina order: *Peromyscus yucatanicus*, *Otodylomys phyllotis*, *Oryzomys melanotis*, *Sigmodon hispidus*, *Holochilus venezuelae*. In the cluster 2, the included species were *Neotoma micropus* (Ne.m), *Neotoma floridiana* (Ne.fl), *Marmosa robinsoni* (Ma.r), *Didelphis marsupialis* (Di.m), *Rattus rattus* (Ra.r), *Nyctomys sumichrasti* (Ny.s), *Marmosa mexicana* (Ma.m), *Reithrodontomys gracilis* (Re.g), *Oryzomys capito* (Or.c), *Proechimys semispinosus* (Pr.s), *Caluromys philander* (Ca.p), *Agouti paca* (Ag.p) and *Heteromys desmarestianus* (He.d). Finally, the species included in the cluster 1 were *Heteromys gaumeri*, *Dasyprocta novemcinctus*, *Cebus nigrivittatus*, *Hydrochaeris hydrochaeris*. (Graph 2C)

Due to the low number of papers and mammals reported for other leishmania species the statistic analyse it not possible however a description of the results will be made. The following mammals species were found infected with leishmania:

*Leishmania panamensis*: *Akodon* sp, *Choloepus hoffmanni*, *Coendou* sp, *Didelphis marsupialis*, *Heteromys desmarestianus*, *Metachirus nudicaudatus*, *Proechymis semispinosus*, *Rattus rattus*.

*Leishmania guyanensis*: *Choloepus didactylus*, *Didelphis marsupialis*, *Marmosops incanus*, *Proechimys cuviere*, *Proechimys* sp, *Rattus* spp, *Tamandua tetradactyla*, *Thrichomys apereoides*

In the Figure 2 the illustrations of the animals highly incriminated as possible reservoirs, according to the PCs and cluster analyses. There is also a chart with their features and a list of other pathogens isolated from them.

Referencing the animal species that resulted negative is as important as referencing those that were positive. Table 2 displays the list of species that were sampled in the search for the parasite but were negative. A total of 1854 individuals belonging to 186 species have been sampled by different tests, mostly culture, direct and inoculation in hamster, with negative outcome. More than half of the papers only used these techniques. Even though these tests are very specific, their sensitivity is low. While other more sensitive tests as PCR were used in the 43% of the studies (77 papers). But only 10 of the reported species as negative had more than 20 sampled individuals. All this could explain the big amount of negative species that make impossible determining whether they are not reservoir species

## **Discussion**

From above is clear that many mammals were studied and a significant amount of them were found infected. The wide variety of mammals able to harbor a large number of distinct *Leishmania* species show the adaptability and plasticity of these parasites. However, it is not possible to incriminate an animal as a reservoir based only on its infection. At the same time demonstrated *Leishmania* spp. is a multihost parasite and their study should use concept and dynamics models of the disease are believed to have crossed species barriers to infect humans, domesticated animals, or wildlife populations (Fenton and Pedersen, 2005).

According to Ashford (1996), in order to determine a species as a reservoir host, it is necessary to establish some parameters i.e. correct taxonomic status of the animal; geographical distribution of the host and the parasite; micro-regional distribution of the parasite and the reservoir in various ecosystems in the same biome; prevalence of infection among male, female, adults and young; dynamic of

hosts populations in a period; identification of the effects of a given parasite in the population or the individuals; seasonal fluctuations; infection steadiness (persistences) and transmissibility i.e. whether or not it is infectious for a vector in the case a vector insect is involved in transmission.

To relate the infectious leishmania species among the human and animal population is one of the main requirements in the determination as reservoir of a mammal. However both the identification of the species of leishmania and of the animals can be difficult and even during the passage of the decades has changed the taxonomia in both cases what could generate impressions in the data

The transmissibility feature is key for determining a reservoir, it can be measured by xenodiagnoses. This test determines the transmission capacity from the animal to the insect vector. However, only 16 species out of 119 that were positive for leishmania have been subject to xenodiagnoses. Half of those have been positive.

In the same way, the natural infection can mean an incidental host, and the principal way to differ from a reservoir is the long-term persistence of the infection in the animal. However, to date the host-parasite interactions involved in persistent infections in different leishmania reservoirs are still unknown.

As suggested by Haydon et al. 2012 the detection of incidental hosts it is not minor importance, due a population of “incidental host” has become more important as it can change, according to the cycle type, to the maintenance community and from which infection is transmitted to the defined target population, basic to produce the endemic or epidemic,

Accordingly, it seems that for leishmaniasis when finding a wide variety of infected animal species, many of them in the same region, the concept of reservoir as a set of epidemiologically connected populations that permanently maintain a pathogen and transmit infection to particular target populations, becomes stronger and would be the best-fit theory for the evidence of this review. (Haydon et al, 2002; Viana et al., 2014).

Few studies followed up experimentally infected wild hosts by *Leishmania* species, mostly due to the difficulties of managing wild mammals in captivity.



Seventeen species have been experimentally infected but five of them were not found naturally infected, they were used as potential animal models of infection.

The majority of tested wild animals with positive results did not have evident lesions. This can support the hypothesis that leishmania species in their primitive habitat are adapted or would be becoming adapted to the native animals in an ancient association and, that adaptation could get to an equilibrium state in which hosts turn to be parasite reservoirs (Forattini, 1960; Lainson and Shaw, 1987).

The statistical analyses of the studies set evidence that some species can be considered highly incriminated as leishmaniasis reservoirs. This is the case of *Didelphis marsupialis*, it has the highest score and was found infected with various leishmania species, in diverse environments and in various countries. This species has also been incriminated as reservoir of *Trypanosoma. cruzi*, a parasite belonging to the order Trypanosomatida, family Trypanosomatidae, as the genus Leishmania, then it seems to have permissiveness with this parasites family. The reasons for this species being a good reservoir for leishmania are unknown but this outcome will surely improve our knowledge on the host-parasite relationship in leishmaniasis, which will be key in the understanding and control of the disease.

According to the statistical analysis and as shown in figure 2, it is interesting to see how some species highly incriminated as possible leishmania reservoirs have been involved in other diseases suggesting them as “permissive species” to host various microorganisms. The mechanisms of this permissiveness must be elucidated in future studies.

On the other hand, it is eye-catching the low amount of papers on this topic. For instance, a simple search in the Pubmed database using as key words “leishmaniasis and immunology”, retrieved 8661 indexed articles from 1952 to 2014, while only 671 were retrieved using the key words “leishmaniasis and reservoir” over the same period, including studies on VL reservoirs that are more numerous than those on CL. Another prove that reservoir studies are neglected among the studies of one of the most neglected diseases worldwide.

Finally, it can be concluded that characterizing an animal as a reservoir is a difficult to overcome challenge, especially in the case of *Leishmania spp.*, a multi-host pathogen, with a big amount of species, various vectors, clinical manifestations,

cycles' peculiarities and disinterest from faculty and health authorities for its research.

In spite of this cannot be taken as a pretext that prevents reservoirs research from reaching higher levels, allowing to know further than the rate and kind of infection. The knowledge on the interaction between the parasite and the reservoir must be deepen, using various tools from eco-epidemiology to the analysis of genic relationships between parasite and host, which allow the survival and transmission of the parasite from the reservoir to the vector.

Further studies must be done in the long term to answer unsolved questions on the persistence of the infection, the ecologic relationships among the diverse populations, the capability of transmission to vectors. Regardless the difficulty to achieve this kind of studies, an even more their applicability, forgetting this ring in the leishmaniasis chain would imply the sentence of this tropical disease to its spread and perpetuity.

## Discussão

**Table 1:** Animal species describe as infected by Leishmania and information related to each description”

Orden	Mamal Specie	<i>Leishmania specie(s)</i>	Positive /total	Test	Country	Articles N°	PC info	PC pos	Cluster
Carnivora	<i>Bassaricyon gabbii</i>	<i>L. braziliensis</i>	2/15	1,2,3,8	Panama	3,5,10,11	1,90	2,15	2
	<i>Nasua nasua</i>	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. shawi</i>	2/11	1,2,3,4,5	Brazil; Panama	11,30,98	2,15	2,86	2
	<i>Conepatus chiga rex</i>	<i>L. mexicana complex</i>	2/>3	2,4,6	Bolivia; Peru	40,62,120	1,69	2,31	2
	<i>Potos flavus</i>	<i>L. amazonensis</i> ; <i>L. braziliensis</i> ; <i>Leishmania sp.</i>	7/158	1,2,3,7,8	Brazil; Ecuador;French Guiana; Honduras; Panama	2,3,4,5,10,11,13,20,54,115	5,41	2,38	2
	<i>Cerdocyon thous</i>	<i>Leishmania sp.</i>	7/26	1,2,4,5	Brazil	71,100,125	1,70	1,41	1
	<i>Chrysocyon brachyurus</i>		2/7	5	Brazil	71	0,06	0,75	1
	<i>Neacomys spinosus</i>		1/26	1,2,3,10	Brazil; Peru	53,82	1,77	2,27	2
	<i>Procyon cancrivorus</i>		1/12	1,2,3,4	Brazil; Panama	11,30,100,125	1,96	0,57	1
Total:	8	24/>258							
Cingulata	<i>Dasyopus kappleri</i>	<i>L. naiffi</i>	1/SD	2,3	Brazil	113	0,70	1,56	1
	<i>Dasyopus novemcinctus</i>	<i>L. naiffi</i> ; <i>Leishmania sp.</i>	18/266	1,2,3,4,5,7	Brazil; French Guiana; Ecuador; Honduras; Panama; Venezuela	4,11,13,16,20,54,7,7,99,109,110,113,117,125	6,55	4,21	3
	<i>Dasyopus septemcinctus</i>	<i>Leishmania sp.</i>	1/1	4	Brazil	125	0,05	1,39	1
	Total:	3	21/269						
Chiroptera	<i>Artibeus lituratus</i>	<i>L. amazonensis</i>	6/73	1,2,4,5	Brazil; French Guiana	63,127	2,03	1,17	1
	<i>Eumops auripendulus</i>		1/17	1,2,4,5	Brazil; French Guiana	63,127	1,91	0,73	1
	<i>Eumops glaucinus</i>		1/10	1,2,4,5	Brazil	63	1,44	0,73	1
	<i>Molossus rufus</i>		1/5	1,2,4,5	Brazil	63	1,43	0,73	1
	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>		1/4	1,2,4,5	Brazil	63	1,27	0,57	1
	<i>Myotis nigricans</i>		2/35	1,2,4,5,10	Brazil	57,63	1,91	0,75	1
	<i>Platyrrhinus lineatus</i>		1/59	1,2,4,5	Brazil	63	1,38	0,57	1
	<i>Sturnira lilium</i>	1/12	1,2,4,5	Brazil; French Guiana	63,127	1,74	0,57	1	
	<i>Glossophaga soricina</i>	<i>L. amazonensis</i> ; <i>L.</i>	8/147	1,2,4,5	Brazil; French Guiana	61,63,127	2,29	0,85	1
	<i>Molossus molossus</i>	<i>braziliensis</i> ; <i>L. infantum</i>	10/252	1,2,4,5	Brazil; French Guiana	61,63,127	2,51	1,24	1
Total:	10	31/614							

Discussão

Orden	Mamal Specie	<i>Leishmania specie(s)</i>	Positive /total	Test	Country	Articles Nº	PC info	PC pos	Cluster
Didelphimorphia	<i>Marmosa cinerea</i>	<i>L. amazonensis</i>	2/5	2,3	Brazil; French Guiana	13,77	1,16	1,22	1
	<i>Philander opossum</i>		2/306	1,2,3,4,7	Brazil; Colombia; French Guiana; Panama	11,16,21,27,54,77,101,127	4,92	1,41	2
	<i>Gracilinanus agilis</i>	<i>L. braziliensis</i>	3/4	1,2,4,5	Brazil	67	1,43	0,76	1
	<i>Marmosops incanus</i>	<i>L. guyanensis</i>	1/15	1,2,4,5,10	Brazil	57,67	1,87	0,73	1
	<i>Caluromys philander</i>	<i>L. mexicana</i>	1/50	1,2,3	French Guiana; Trinidad	21,56,77	1,67	1,56	1
	<i>Marmosa mexicana</i>		2/13	1,2,4	Honduras; Mexico	4,59	1,60	1,73	1
	<i>Marmosa (Micoureus) paraguayanus</i>	<i>L. amazonensis</i> ; <i>L. braziliensis</i>	11/95	4,11	Brazil	114	0,55	1,26	1
	<i>Metachirus nudicaudatus</i>	<i>L. amazonensis</i> ; <i>L. panamensis</i>	3/128	1,2,3,4	Brazil; Colombia; French Guiana; Panama; Venezuela	10,11,13,16,18,21,27,74,77,127	4,06	2,17	2
	<i>Marmosa robinsoni</i>	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. mexicana</i>	2/100	1,2,3	Panama	3,10,11	1,43	2,15	2
	<i>Marmosa sp</i>	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. Viannia sp.</i>	3/53	1,2,3,4,5,7	Brazil; Peru	16,40,54,68,89,111	3,96	2,68	2
	<i>Didelphis albiventris</i>	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. infantum</i> ; <i>L. peruviana</i> ; <i>L. Viannia sp.</i> ; <i>Leishmania sp.</i>	145/558	1,2,3,4,5	Brazil; French Guiana; Peru	30,40,58,67,68,77,79,111,114,125	4,88	7,18	3
	<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>L. amazonensis</i> ; <i>L. braziliensis</i> ; <i>L. garhami</i> ; <i>L. guyanensis</i> ; <i>L. infantum</i> ; <i>L. mexicana</i> ; <i>L. panamensis</i> ; <i>L. forattinii</i>	67/979	1,2,3,4,5,6,7,8,9	Brazil; Bolivia; Colombia; Ecuador; French Guiana; Honduras; Mexico; Panama; Trinidad; USA; Venezuela	3,4,5,10,11,13,14,15,16,18,19,20,21,26,27,28,30,32,37,42,45,46,47,54,56,58,62,64,73,74,77,80,107,108,119,126,127,128	12,76	10,43	3
	<i>Melanomys caliginosus</i>	Complex <i>braziliensis</i>	3/26	6	Colombia	37	0,10	0,76	1
	<i>Micoureus demerarae</i>		3/7	2,4,6	Colombia; French Guiana	37,127	1,58	1,12	1

## Discussão

Orden	Mamal Specie	<i>Leishmania specie(s)</i>	Positive /total	Test	Country	Articles Nº	PC info	PC pos	Cluster
Didelphimorphia	<i>Monodelphis domestica</i>	<i>L. Viannia sp</i>	1/9	1,2,3,4	Brazil	68,111	1,55	0,73	1
	<i>Didelphis aurita</i>	<i>Leishmania sp</i>	9/27	1,2,4,5	Brazil	58,101	1,59	2,57	2
	<i>Marmosa fuscata</i>		1/9	1,2,3,4,5	Trinidad	56	1,75	1,56	1
	<i>Marmosa mitis</i>		5/30	1,2,3	Trinidad	56	1,06	1,63	1
	<i>Marmosa murina</i>		1/21	1,2,3,4,10	Brazil; French Guiana	13,21,53,77,127	2,56	2,43	2
	Total: 19			264/2435					
Lagomorpha	<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	<i>Complex braziliensis</i>	1/10	1,2,3,4,6	Brazil;Colombia; Ecuador; Panama	11,20,37,101,111	3,06	0,57	1
Pilosa	<i>Bradypus variegatus infuscatus</i>	<i>L. braziliensis</i>	3/240	2,3	Panama	7,11	1,19	1,81	1
	<i>Bradypus tridactylus</i>	<i>L. shawi</i>	1/42	1,2,3	Brazil; French Guiana	13,16,21,54,77,98	1,99	1,20	1
	<i>Choloepus didactylus</i>	<i>L. guyanensis; L. shawi</i>	22/51	2,3,4,5	Brazil; French Guiana	54,77,98,115,119	2,31	3,23	2
	<i>Tamandua tetradactyla</i>	<i>L. amazonensis; L. guyanensis; Leishmania sp.</i>	3/37	1,2,3,4,7	Brazil; Ecuador; Honduras;Panama; Venezuela	3,4,11,16,19,20,54,125,132	4,82	1,00	2
	<i>Choloepus hoffmanni</i>	<i>L. braziliensis; L. colombiensis; L. ecuatorensis;</i>	90/400	2,3,5,7	Colombia; Panama; Ecuador	3,7,9,11,27,74,96,97	4,64	6,55	3
	<i>Bradypus variegatus</i>	<i>Leishmania sp.</i>	1/4	1,2,3	Ecuador; Colombia	20,27	1,46	1,56	1
	Total: 6		119/784						
Primata	<i>Saguinus geoffroyi</i>	<i>L. braziliensis</i>	1/114	1,2,3	Panama	3,10,11	1,30	1,75	1
	<i>Aotus trivirgatus</i>		1/66	1,2,3	Panama	10,11	1,25	1,92	1
	<i>Chiropotes satanas</i>	<i>L. shawi</i>	4/4	2,3	Brazil	98	0,40	1,25	1
	<i>Cebus olivaceus nigrivittatus</i>	<i>L. braziliensis; L. mexicana; L. pifanoi; L. peruviana</i>	9/12	8	Venezuela	109	0,18	1,03	1
	<i>Sapajus (Cebus) apella</i>	<i>L. amazonensis; L. braziliensis; L. lainsoni; L. shawi</i>	18/23	1,2,3,4,5,8,10	Brazil	54,98,122	1,49	2,9	2
	<i>Aotus azarae</i>	<i>L. Viannia sp.</i>	4/9	4	Argentina	112	0,06	0,78	1
	Total: 6		37/223						

## Discussão

Orden	Mamal Specie	<i>Leishmania specie(s)</i>	Positive /total	Test	Country	Articles Nº	PC info	PC pos	Cluster
Rodentia	<i>Euryoryzomys (Oryzomys) nitidus</i>	<i>L. amazonensis</i>	3/17	2,4	Bolivia	45	0,68	2,30	1
	<i>Hylaeamys (Oryzomys) acritus</i>		3/13	2,4	Bolivia	45	0,67	2,25	1
	<i>Sciurus vulgaris</i>		1/1	2	Ecuador	132	0,23	1,04	1
	<i>Bolomys lasiurus</i>		15/107	1,2,4,6	Brazil	85,111	1,76	2,67	2
	<i>Diplomys labilis</i>	<i>L. braziliensis</i>	2/40	1,2,3	Panama	10,11	0,89	2,15	1
	<i>Mystromys albicaudatus</i>		34/34	8	USA	124	0,00	1,46	1
	<i>Necomys (Bolomys) lasiurus</i>		17/119	1,2,4,6	Brazil	50,68,85,111	0,78	0,58	1
	<i>Rattus norvegicus</i>		9/110	1,2,3,4,5,10	Brazil; Costa Rica; French Guiana	57,77,103,104	3,12	5,31	3
	<i>Thrichomys laurentius</i>		12/12	7	Brazil	76	0,00	0,89	1
	<i>Tylomys panamensis</i>		4/182	1,2,3,8	Panama	3,5,10,11	0,67	0,00	1
	<i>Cavia porcellus</i>		<i>L. enrietti</i>	1/1	2,10	Brazil	94	0,71	0,63
	<i>Rattus sp.</i>	<i>L. guyanensis</i>	1/135	2,6	Venezuela	46	0,93	1,55	1
	<i>Otodylomys phyllotis</i>	<i>L. mexicana</i>	91/511	1,2,4,5	Brazil; Mexico	4,35,38,41,59	3,11	4,71	3
	<i>Neotoma micropus</i>		55/596	1,2,4	USA	43,64,65	2,76	3,29	2
	<i>Handleyomys (Oryzomys) melanotis</i>		49/71	1,2,4,5	Brazil; Mexico	35,38,41,59	2,08	3,10	2
	<i>Heteromys gaumeri</i>		38/127	1,2,4,5	Mexico	35,59	1,70	2,26	2
	<i>Peromyscus yucatanicus</i>		57/133	1,2,4,5,7	Brasil; Mexico	35,38,41,59,64,133	3,66	5,60	3
	<i>Reithrodontomys gracilis</i>		6/18	1,2,4,5	Mexico	35,59	1,41	2,35	2
	<i>Nyctomys sumichrasti</i>		2/39	1,2,4	Hondura; Mexico	4,59	1,38	1,79	1
	<i>Neotoma floridana</i>		1/1	1,4	Mexico-USA	69	0,99	1,55	1
	<i>Phyllotis andium</i>		<i>L. peruviana</i>	7/511	2,4	Peru	40	1,71	1,66
	<i>Proechimys guyannensis</i>	<i>L. amazonensis</i> ; <i>L. braziliensis</i> ; <i>L. pifanoi</i> ; <i>Leishmania sp.</i>	29/253	1,2,3,7,8	Brazil; Trinidad; Venezuela	16,54,56,109	4,14	4,97	3
	<i>Proechimys cuvieri</i>	<i>L. amazonensis</i> ; <i>L. guyanensis</i>	8/14	2,3	Brazil; Trinidad; Venezuela	77	1,20	1,52	1
<i>Proechymis sp</i>	<i>L. amazonensis</i> ; <i>L. guyanensis</i> ; Complex <i>braziliensis</i> ; <i>Leishmania sp.</i>	5/225	1,2,3,4	Brazil; French Guiana; Peru	21,77,82,89	2,86	1,69	1	

Discussão

Orden	Mamal Specie	<i>Leishmania specie(s)</i>	Positive /total	Test	Country	Articles Nº	PC info	PC pos	Cluster
Rodentia	<i>Scirius granatensis</i>	<i>L. ecuatoriensis</i> ; <i>Leishmania sp.</i>	2/37	1,2,3,5	Ecuador; Panama; Trinidad	11,20,56,96	2,66	2,28	2
	<i>Trinomys (Proechymis) iheringi denigratus</i>	<i>L. amazonensis</i> ; <i>L. forattinii</i> ; <i>Complex mexicana</i>	9/31	1,2,3,4,5	Brazil	34,126,131	1,85	2,41	2
	<i>Thrichomys apereoides (Cercomys cunicularius)</i>	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. guyanensis</i> ; <i>L. infantum</i> ; <i>Complex mexicana and donovani</i>	20/140	1,2,3,4,5,6	Brazil	67,85,101,102	0,43	0,08	1
	<i>Holochilus sciureus</i>	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. infantum</i> ; <i>L. Viannia sp</i>	6/36	1,2,3,4	Brazil; French Guiana	68,111,127	1,96	1,93	2
	<i>Rattus rattus (Morphotype Rattus frugivorus)</i>	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. infantum</i> ; <i>L. mexicana</i> ; <i>L. panamensis</i>	69/829	1,2,3,4,5,6,10	Brazil; Colombia; Costa Rica; Ecuador; French Guiana; Peru; Venezuela	11,13,19,20,30,33,37,40,42,50,67,68,74,77,82,85,86,87,101,102,103,110,111,127,125,130	8,52	4,38	3
	<i>Nectomys squamipes</i>	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. infantum</i> ; <i>Leishmania Viannia sp.</i> ; <i>Leishmania sp.</i>	64/454	1,2,3,4,10	Brazil;Trinidad	53,56,57,68,70,86,87,100,102,110,111,129	4,07	4,38	3
	<i>Cuniculus (Agouti) paca</i>	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. lainsoni</i> ; <i>L. mexicana.</i>	6/30	1,2,3,5	Brazil; Ecuador; French Guiana; Panama; Venezuela	10,11,19,20,77,84	3,31	2,86	2
	<i>Coendou sp</i>	<i>L. hertigi</i> ; <i>L. panamensis</i>	11/28	1,2,3,4,7,10	Brazil; Colombia	54,74,95,121	3,59	3,30	2
	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	<i>L. mexicana</i> ; <i>Leishmania sp</i>	2/6	2,3,4,8	Brazil;French Guiana; Venezuela	77,109,125	2,05	0,81	1
	<i>Sigmodon hispidus</i>	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. garhami</i> ; <i>L. mexicana</i>	29/685	1,2,4,5,6,7,8	Brazil; Honduras; Mexico; Panama; Venezuela; USA	3,4,5,11,35,38,41,42,46,59,64,108	7,68	6,58	3
<i>Proechimys semispinosus</i>	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. mexicana</i> ; <i>L. panamensis</i>	50/1089	1,2,3,4,7,8	Colombia; Panama; Venezuela	3,5,10,11,19,27	5,42	5,85	3	

Discussão

Orden	Mamal Specie	<i>Leishmania specie(s)</i>	Positive /total	Test	Country	Articles N°	PC info	PC pos	Cluster
Rodentia	<i>Hylaeamys megacephalus</i> ( <i>Oryzomys capito</i> )	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. mexicana</i> ; <i>Leishmania sp.</i>	151/568	<b>1,2,3,7,10</b>	<b>Brazil; Panama;</b> <b>Trinidad</b>	<b>10,11,13,53,54,</b> <b>56,88</b>	5,02	6,49	3
	<i>Dasyprocta leporina</i> ( <i>rubrata</i> )	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. pifanoi</i> ; <i>Leishmania sp.</i>	3/5	<b>8</b>	Venezuela	109	0,99	0,67	1
	<i>Akodon montensis</i> ( <i>arviculoides</i> )		5/200	<b>1,2,3,4</b>	Brazil	<b>66,70,101,111</b>	2,07	2,48	2
	<i>Cuniculus paca</i>	<i>L. braziliensis</i> ; <i>Leishmania</i> <i>sp.</i>	2/73	<b>1,2,3,7,8</b>	<b>Brazil; Venezuela</b>	<b>4,27,54,100,108</b>	3,60	2,37	2
	<i>Heteromys anomalus</i>		2/31	<b>1,2,3,</b>	<b>Trinidad; Venezuela</b>	<b>19,55,56</b>	1,53	1,70	1
	<i>Mus musculus</i>		4/250	<b>1,2,3,4,5,1</b> 0	<b>Brazil; Costa Rica;</b> <b>French Guiana; Peru</b>	<b>40,50,57,86,101,</b> <b>102,127</b>	4,08	1,96	2
	<i>Coendou quichua</i> ( <i>rothschildi</i> )	<i>L. hertigi</i> ; <i>Leptomonas</i>	92/104	<b>2,3,7</b>	Panama	11	2,04	4,30	2
	<i>Coendou prehensilis</i>	<i>L. hertigi</i> ; <i>Leishmania sp.</i>	4/28	<b>1,2,3,10</b>	<b>Brazil; French Guiana;</b> <b>Trinidad</b>	<b>56,77,118,121</b>	2,51	2,6	2
	<i>Holochilus venezuelae</i>	<i>L. mexicana</i> ; <i>L. garhami</i>	2/15	<b>3,7,8</b>	Venezuela	108	2,08	2,78	2
	<i>Heteromys</i> <i>desmarestianus</i>	<i>L. mexicana</i> ; <i>L. panamensis</i>	22/213	<b>1,2,3,4</b>	<b>Costa Rica; Honduras;</b> <b>Mexico; Panama</b>	<b>4,11,12,59</b>	3,13	2,78	2
	<i>Akodon sp.</i>	<i>L. panamensis</i> ; <i>L. peruviana</i>	6/232	<b>2,3,4</b>	<b>Colombia; Peru</b>	<b>40,74</b>	1,95	2,28	2
	<i>Microryzomys minutus</i>	<i>Complex braziliensis</i>	1/2	<b>4,6</b>	Colombia	37	0,19	0,92	1
	<i>Akodon hispidus</i>	<i>Complex L. mexicana</i>	1/14	<b>4,6</b>	Bolivia	62	0,28	0,99	1
	<i>Oligorizomys sp.</i>		2/8	<b>4,6</b>	Bolivia	62	0,00	0,74	1
	<i>Cerradomys (Oryzomys)</i> <i>subflavus</i>	<i>L. Viannia sp.</i>	2/43	<b>2,3,4,6</b>	Brazil	<b>68,70,85,101,111</b>	1,04	0,63	1



## Discussão

Orden	Mamal Specie	<i>Leishmania specie(s)</i>	Positive /total	Test	Country	Articles N°	PC info	PC pos	Cluster
Rodentia	<i>Cavia aperea</i>	<i>L. amazonensis</i> ; <i>Leishmania sp.</i>	1/151	1,2,3,4	Brazil	100,101,125	1,86	0,63	1
	<i>Dasyprocta azarae</i>		1/23	1,2	Brazil	100	0,64	1,46	1
	<i>Dasyprocta sp.</i>		3/10	1,2,3,7	<b>Brazil; Panama</b>	16,54,90	2,82	1,5	1
	<i>Heteromys sp.</i>		3/45	1,2,3	Hoduras	105	1,00	1,85	1
	<i>Kannabateomys amblyony</i>		1/4	1,2	Brazil	100	0,60	1,46	1
	<i>Oecomys (Oryzomys) concolor</i>		2/14	1,2,3,10	<b>Brazil; Trinidad</b>	53,56	0,88	2,52	2
	<i>Oligoryzomys (Oryzomys) eliurus</i>		5/83	1,2,3,10	Brazil	57,86,87,101	0,90	0,24	1
	<i>Oligoryzomys (Oryzomys) nigripes</i>		1/92	2,3	Brazil	70,86	0,00	0,21	1
	<i>Oryzomys sp.</i>		45/407	1,2,3,8,10	<b>Brazil; Honduras; Panama; Venezuela</b>	3,4,11,16,19,53,70,89,110	3,36	2,84	3
	<i>Ototylomys sp.</i>		6/13	1,2,3	Honduras	105	0,00	0,97	1
	<i>Peromyscus sp.</i>		1/7	1,2,3	Honduras	105	0,00	0,9	1
	<i>Trinomys (Proechimys) dimidiatus</i>		2/105	1,3,10	Brazil	57	0,00	1,09	2
	<i>Coendou (Sphiggurus) spinosus</i>		1/5	4	Brazil	125	0,00	0	1
	<i>Zygodontomys brevicauda microtinus</i>		1/59	1,2,3	<b>Panama; Venezuela</b>	11,106	0,00	0,00	1
Total:	65		1045/9190						
Testudines	<i>Chelonoidis (Testudo) carbonaria</i>	<i>L. pifanoi</i>	1/2	8	Venezuela	109	0,00	0,72	1

1=Smear; 2=Culture; 3=Hamster inoculation; 4=PCR; 5= Serologic; 6=DNA Hibridation; 7=xenodiagnostic; 8=experimental Infection; 9=DAT; 10=Histological studio 11=Real Time PCR. The Test, Country, N° of the article in bold type are positive

\*In bold the Positive Test, Country and Article N°

**Table 2:** Animal species negative for Leishmania and their characteristics.

Orden	Specie	Total samples	Lab test	Country	Article Nº
Artiodactyla	<i>Mazama sp.</i>	1	1,2,3	Brazil	54
	<i>Tayassu sp.</i>	3	2,3	Brazil	16
	<i>total</i>	4			
Carnivora	<i>Canepatus rex</i>	1	2,4	Peru	40
	<i>Conepatus semistriatus</i>	1	2,3	Panama	11
	<i>Eira barbara</i>	1	2,3	Panama	11
	<i>Felis concolor</i>	1	1,2	Honduras	4
	<i>Felis weildii</i>	1	1,2,3	Panama	54
	<i>Felis yagouaroundi</i>	2	1,2	Panama	11
	<i>Galictis allamandi</i>	2	1,2,3	Panama	11
	<i>Herpestes aurupunctatus</i>	84	1,2,3	Brazil	56
	<i>Herpestes sp</i>	3	5	Costa Rica	103
	<i>Lycalopex vetulus</i>	2	5	Brazil	71
	<i>Nasua narica</i>	4	1,2	Honduras	4
	<i>Nasua sp.</i>	6	1,2,3	Brazil	54
	<i>Procyon cancrivorus</i>	9	1,2,3	Panama; Brazil	11,30,100
	<i>Procyon lotor</i>	4	8	Honduras	4
	<i>Speothos venaticus</i>	3	1,2,3	Brazil	110
	<i>Spilogale angustifrons</i>	2	1,2,3	Honduras	4
	<i>Tayra barbara</i>	4	1,2	Honduras; Brazil	4,100
	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	15	1,2,8	Honduras	4
<i>total</i>	145				
Chiroptera	<i>Artibeus cinereus</i>	8	2,4	French Guinea	127
	<i>Artibeus concolor</i>	1	2,4	French Guinea	127
	<i>Artibeus fimbriatus</i>	3	1,2,4,5	Brazil	63
	<i>Artibeus gnomus</i>	2	2,4	French Guinea	127
	<i>Artibeus obscurus</i>	10	2,4	French Guinea	127
	<i>Artibeus planirostris</i>	26	1,2,4,5	Brazil	63,127
	<i>Artibeus sp.</i>	1	1,2,4,5	Brazil	63
	<i>Carollia perspicillata</i>	56	1,2,3,4,10	Brazil, French Guinea	57, 61,127
	<i>Chiroderma villosum</i>	1	2,4	French Guinea	127
	<i>Cormura brevirostris</i>	4	2,4	French Guinea	127
	<i>Desmodus rotundus</i>	6	1,2,4,5	Brazil,French Guinea	63,127
	<i>Diclidurus scutatus</i>	1	1,2,4,5	Brazil	63
	<i>Eptesicus braziliensis</i>	1	1,2,4,5	Brazil	63
	<i>Eptesicus diminutus</i>	4	1,2,4,5	Brazil	63
	<i>Eptesicus furinalis</i>	4	1,2,4,5	Brazil	63
	<i>Eptesicus sp.</i>	1	1,2,4,5	Brazil	63
	<i>Eumops bonariensis</i>	1	1,2,4,5	Brazil	63
	<i>Eumops perotis</i>	2	1,2,4,5	Brazil	63
	<i>Lasiurus blossevillii</i>	2	1,2,4,5	Brazil	63
	<i>Micronycteris megalotis</i>	1	1,2,4,5	Brazil	63
	<i>Molossops neglectus</i>	4	1,2,4,5	Brazil	63
	<i>Molossus sp</i>	2	4.5	Brazil	63
	<i>Myotis rubber</i>	1	1,2,4,5	Brazil	63
<i>Myotis sp.</i>	2	1,2,4,5	Brazil	63	

Orden	Specie	Total samples	Lab test	Country	Article Nº
Chiroptera	<i>Nyctinomops macrotis</i>	63	1,2,4,5	Brazil	61,63
	<i>Phylloderma stenops</i>	1	2,4	French Guinea	127
	<i>Phyllostomus discolor</i>	1	2,4	French Guinea	127
	<i>Phyllostomus elongatus</i>	4	2,4	French Guinea	127
	<i>Phyllostomus hastatus</i>	2	2,4	French Guinea	127
	<i>Platyrrhinus helleri</i>	2	2,4	French Guinea	127
	<i>Promops nasutus</i>	19	1,2,4,5	Brazil	63
	<i>Pygoderma bilabiatum</i>	1	1,2,4,5	Brazil	63
	<i>Rhinophylla pumilio</i>	6	2,4	French Guinea	127
	<i>Saccopteryx bilineata</i>	2	2,4	French Guinea	127
	<i>Saccopteryx leptura</i>	2	2,4	French Guinea	127
	<i>Sturnira tildae</i>	9	2,4	French Guinea	127
	<i>Tadarida Braziliensis</i>	5	1,2,4,5	Brazil	63
	<i>Tonatia bidens</i>	2	2,4	French Guinea	127
	<i>Tonatia silvicola</i>	3	2,4	French Guinea	127
	<i>Trinycteris nicefori</i>	5	2,4	French Guinea	127
	<i>Uroderma bilobatum</i>	6	2,4	French Guinea	127
	<i>Vampyressa brocki</i>	1	2,4	French Guinea	127
	<i>Vesperstilionidae</i>	1	1,2,4,5	Brazil	63
	<i>total</i>	279			
Cingulata	<i>Cabassous hispidus</i>	1	1,2,3	Brazil	101
	<i>Euphractus setosus</i>	1	1,2,3	Brazil	101
	<i>Euphractus sexcintus</i>	6	1,2,3,4	Brazil	110,125
	<i>Tolypentes sp</i>	2	1,2,3	Brazil	110
	<i>total</i>	10			
Didelphimorphia	<i>Caluromys derbianus</i>	95	2,3,5	Panama	3,5,10,11
	<i>Caluromys sp</i>	17	1,2,3	Brazil	16,89
	<i>Chironectes minimus</i>	2	2,3	Panama	11
	<i>Chironectes sp.</i>	2	1,2,3,7	Brazil	54
	<i>Didelphis sp</i>	7	1,2,3	Brazil	89
	<i>Lutreolina crassicaudata</i>	1	1,2,3	Brazil	30
	<i>Marmosa microtarsus</i>	6	1,2	Brazil	86
	<i>Marmosa parvidens</i>	1	2,3	Brazil	13
	<i>Marmosops ocellatus</i>	3	2,4	Bolivia	45
	<i>Marmosops parvidens</i>	1	2,4	French Guinea	127
	<i>Metachirops sp</i>	2	1,2,3	Brazil	89
	<i>total</i>	137			
Perissodactyla	<i>Tapirus sp.</i>	1	1,2,3	Brazil	54
Pilosa	<i>Bradypus variegatus</i>	3	2,3	Colombia	27
	<i>Cyclopes didactylus</i>	40	2,3	Panama.Brazil	11,54
	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	8	2,3,4	Brazil, Guyana, Panama	11,77,125
	<i>Tamandua mexicana</i>	1	2,3	Colombia	27
	<i>Tamandua longicaudata</i>	6	1,2,3	Guyana	77
	<i>total</i>	58			
Primata	<i>Alouata sp.</i>	1	1,2,3,7	Brazil	54
	<i>Alouata villosa</i>	3	1,2,3	Panama	11
	<i>Ateles fusciceps</i>	5	1,2,3	Panama	11
	<i>Ateles geoffroyi</i>	2	1,2	Honduras	4
	<i>Cebus apella</i>	5	1,2,3,4,5	Brazil	54,98
	<i>Cebus capusinus</i>	10	2,3	Panama	11
	<i>Cebus nigritus</i>	7	1,2	Brazil	100
	<i>Saimiri sciureus</i>	20	1,2,3	Brazil	54
<i>total</i>	53				

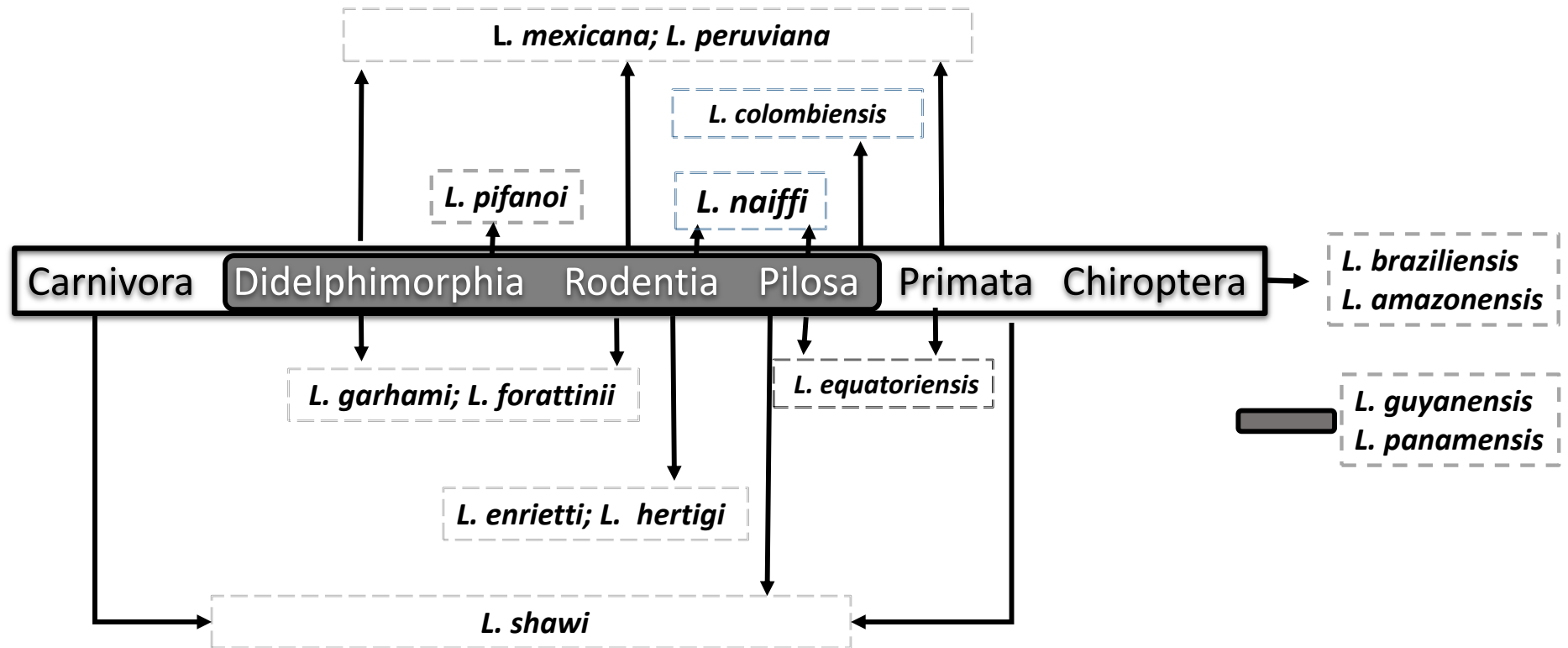
Orden	Specie	Total samples	Lab test	Country	Article Nº
Rodentina	<i>Abrothrix sp</i>	15	1,2	Brazil	86
	<i>Akodon cursor</i>	48	1	Brazil	87
	<i>Akodon dayi</i>	26	4	Bolivia	45
	<i>Akodon nigrita</i>	15	1,2	Brazil	86,87
	<i>Akodon urichi</i>	15	1,2,3	Brazil	56
	<i>Balomys lasiurus</i>	8	1,3	Brazil	30
	<i>Cavia fulgida</i>	6	1,3,10	Brazil	57
	<i>Cercomys cunicularius</i>	58	1,2,3	Brazil	101,102
	<i>Clyomys laticeps</i>	2	2,3	Brazil	70
	<i>Clyomys sp.</i>	1	2,3	Brazil	70
	<i>Coendou bicolor</i>	2	2,3	Ecuador	20
	<i>Coendou insidiosus</i>	1	1,3,10	Brazil	57
	<i>Coendou mexicanum</i>	8	1,2,8	Honduras	4
	<i>Coendou spinosus</i>	3	1,2,3	Brazil	101
	<i>Dasyprocta aguti</i>	7	1,2,3	Venezuela, Guyana	19,77
	<i>Dasyprocta fuliginosa</i>	4	1,2,3	Brazil	110
	<i>Dasyprocta punctata</i>	46	1,2,3,8	Panama Ecuador Honduras	4,5,11,20
	<i>Delomys collinus</i>	3	1	Brazil	87
	<i>Echimys armatus</i>	8	1,2,3	Guyana, Trinidad	21,56
	<i>Echimys semivellousus</i>	1	1,2	Venezuela	19
	<i>Echimys sp</i>	4	2,3	Guyana	77
	<i>Euryoryzomys nitidus</i>	20	4	Peru	82
	<i>Euryoryzomys nitidus</i>	1	1,2,3	Brazil	101
	<i>Galea spixii</i>	7	2,3,4,6	Brazil	68,85
	<i>Holochilus braziliensis</i>	3	1,2,3	Brazil	54
	<i>Hoplomys australis</i>	1	2,3	Colombia	27
	<i>Hoplomys gymnurus</i>	52	2,3	Panama, Colombia	3,11,27
	<i>Hoplomys sp</i>	37	2	Panama	93
	<i>Hylaeamys perenensis</i>	34	4	Peru	82
	<i>Juscelinomys huanchaca</i>	1	2,4	Bolivia	45
	<i>Kunsia tomentosus</i>	3	2,4	Bolivia	45
	<i>Liomys adspersus</i>	44	2	Panama	11
	<i>Mesomys hispidus</i>	4	2,4	Bolivia, Brazil, French Guinea	13,45,127
	<i>Monodelphis americana</i>	1	1,3,10	Brazil	57
	<i>Monodelphis americana</i>	1	2,3	Brazil	15
	<i>Monodelphis brevicaudata</i>	1	2,4	French Guinea	127
	<i>Monodelphis sp</i>	5	1,2,3	Brazil	16, 54
	<i>Mus brevirostris</i>	3	1	Brazil	87
	<i>Myocastor caypus</i>	1	4	Brazil	125
	<i>Myocastor sp.</i>	2	1,2,3	Brazil	54
<i>Myoprocta acouchi</i>	1	2	Brazil	13	
<i>Myotis riparius</i>	2	2,4	French Guinea	127	
<i>Neacomys guianae</i>	10	1,2,3	Brazil	54	
<i>Necromys lasiurus</i>	8	2,3,4	Brazil	68	
<i>Necromys lenguarum</i>	24	2,4	Bolivia; Peru	45,82	
<i>Nectomys alfari</i>	4	2,3	Panama	10,11	
<i>Nectomys apicalis</i>	1	4	Peru	82	

Orden	Specie	Total samples	Lab test	Country	Article Nº
Rodentina	<i>Nectomys melanius</i>	1	2,4	French Guinea	127
	<i>Nectomys sp.</i>	23	1,2,3,7	Brazil	54,7
	<i>Nyctomys sp</i>	8	1,2,3	Brazil	89
	<i>Oecomys auyantepui</i>	1	2,4	French Guinea	127
	<i>Oecomys bicolor</i>	6	1,2,3,4	Panama; Bolivia; Peru	10,45,82
	<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	1	2,4	French Guinea	127
	<i>Oligoryzomys microtis</i>	90	2,4	Bolivia; Peru	45,82
	<i>Orthogeomys grandis</i>	9	1,2	Honduras	4
	<i>Oryzomys albigularis</i>	2	2,3	Panama	11
	<i>Oryzomys alfaroi</i>	16	1,2,3,4	Panama; Mexico; Hondura	4,10,11,59
	<i>Oryzomys bombicinus</i>	3	2,3	Colombia	27
	<i>Oryzomys caliginosus</i>	44	2,3	Panama	10,11
	<i>Oryzomys couesi</i>	2	2,4	Mexico; Honduras	4,59
	<i>Oryzomys flaviscens</i>	2	1,2	Brazil	86
	<i>Oryzomys lamia</i>	27	1,2,3,4,10	Brazil	57, 111
	<i>Oryzomys megacephalus</i>	1	2,4	French Guinea	127
	<i>Oximycterus sp</i>	23	1,2	Brazil	86,100
	<i>Oximycterus hispidus</i>	7	1,2,3	Brazil	101
	<i>Oximycterus inca</i>	1	4	Peru	82
	<i>Oximycterus quaestor</i>	6	1,3,10	Brazil	57,87
	<i>Peramys domesticus</i>	39	2	Brazil	102
	<i>Peromyscus leucopus</i>	2	2,4	USA-Mexico	64
	<i>Peromyscus nudipes</i>	1	2,3	Panama	11
	<i>Phyllomys braziliensis</i>	3	1,3,10	Brazil	57
	<i>Phyllomys medius</i>	1	1,2	Brazil	100
	<i>Phyllostomidae</i>	9	1,2,3	Venezuela	19
	<i>Proechimys albispinus</i>	19	1,2,3	Brazil	101
	<i>Proechimys cayennensis</i>	4	2,4	French Guinea	127
	<i>Proechimys longicauda</i>	17	2,4	Bolivia	45
	<i>Rattus espinosus</i>	6	2,3	Ecuador	20
	<i>Rattus frugivorus</i>	47	1,2,3	Brazil	87,101
	<i>Rhipidomys couesi</i>	16	1,2,3	Trinidad	56
	<i>Rhipidomys latimanus</i>	4	10	Colombia	37
	<i>Rhipidomys leucodactylus</i>	6	2,3,4,6	Bolivia; Brazil	16,62
	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	3	1,3,10	Brazil	57
	<i>Sciurus variegalooides</i>	6	2,3	Panama	11
	<i>Sciurus aureogaster hypopyrrhus</i>	3	1,2,3,7	Honduras	4
	<i>Sciurus deppei</i>	39	1,2,3,8	Honduras	4
	<i>Sciurus ingrami</i>	3	1,2,3,10	Brazil	57,1
	<i>Tylomys nudicaudatus</i>	55	1,2,4	Mexico; Honduras	4,59
	<i>Wiedomys pyrrhorhinos</i>	1	4,6	Brazil	85
	<i>Zygodontomys brevicauda</i>	5	1,2,3,7	Trinidad; Colombia	44,56
	<i>Zygodontomys cherriei</i>	3	2	Panama	3
	<i>Zygodontomys lasiurus</i>	1	1,2	Brazil	86
	<i>Zygodontomys pixana</i>	39	2	Brazil	102
	<i>Zygodontomys sp</i>	4	2,3	Brazil	70
	<i>total</i>	1161			
Squamata	<i>Tupinambis sp</i>	6	1,2,3	Brazil	30

**Table 3:** Total of species and individuals per order of mammals studied in query of leishmania

Order	Species			Individuals		
	Total	Pos/Neg	Post %	Total	Pos/Neg	Post %
Artiodactyla	2	0/2	0	4	0/4	
Carnivora	26	8/18	31	427	24/403	3,7
Chiroptera	53	10/43	23	925	32/893	3,2
Cingulata	8	4/4	50	298	20/278	0
Didelphimorphia	30	19/11	63	2836	264/2572	10,3
Lagomorpha	1	1/0	100	1	1/0	0
Perissodactyla	1	0/1	0	1	0/1	0
Pilosa	11	6/5	55	951	119/832	6,5
Primata	14	6/8	43	313	37/276	13,4
Rodentina	157	64/93	40	11372	1034/10340	10
Squamata	6	0/6	0	6	0/6	0
Testudines	1	1/0	100	2	2/0	0
<b>Total</b>	<b>310</b>	<b>119/191</b>	<b>38</b>	<b>17137</b>	<b>1533/15605</b>	<b>9</b>

Figure 1. Leishmania species isolated from mammal orders

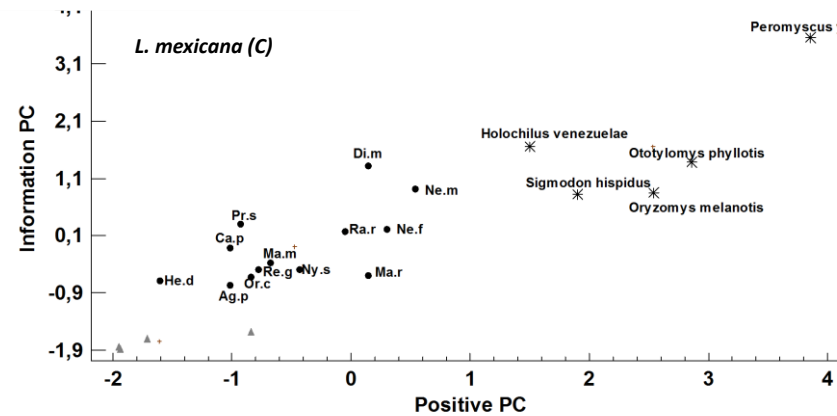
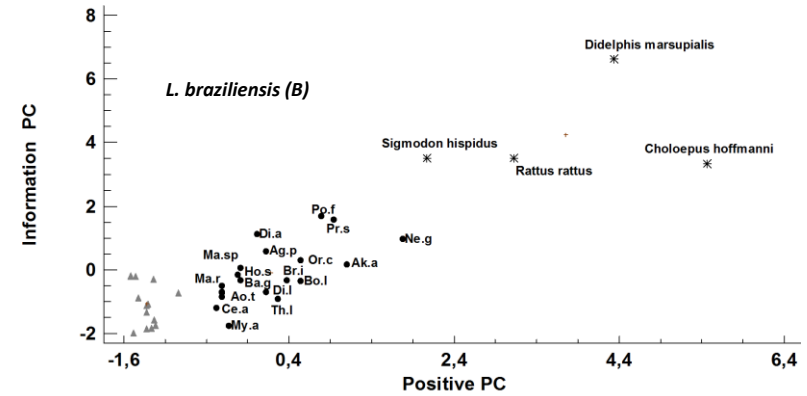
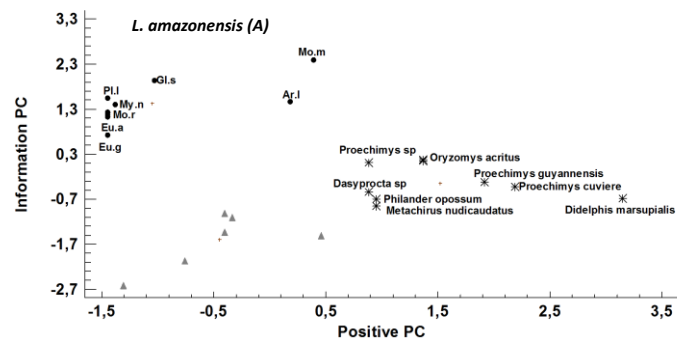






## Discussão

Figure 2: PC1 and PC2 score plot and clusters (strong, medium, weak) for Leishmania species: (A) *L. amazonensis*; (B) *L. braziliensis*; (C) *L. mexicana*



**Figure 2:** The animals highly incriminated as possible reservoirs. There is also a chart with their features and a list of other pathogens isolated from them

*Didelphis marsupialis*



**Characteristics:** This species is found from Tamaulipas, Mexico and in Cozumel and the Yucatan, south to Peru, Bolivia, Paraguay and northeastern Argentina, including Trinidad and the Lesser Antilles. (IUNC, 2015). Their dorsal pelage is often dark, typically blackish or grayish, their ventral fur is yellow or cream. (ADW, 2015)

**Involved in other diseases:**

*Trypanosoma cruzi* (Cantillo-Barraza et al., 2015; )

*Sarcocystis neurona* (Dangoudoubiyam S et al., 2011)

*Sarcocystis falcatula*, *Sarcocystis speeri* (Rosenthal et al., 2001)

*Besnoitia darling* (Smith et al., 1984)

*Leptospira interrogans* (Hidalgo et al., 1984)

*Arboledas virus* (Tesh et al., 1986)

Stomatitis vesicular (Trujillo et al., 2010)

## Discussão

*Rattus rattus*



**Caracteristics:** Originally an Indomalayan species, was widely introduced across the globe as a result of human activities. Subspecies in Mexico and Central and South America. (IUNC,2015). Medium sized rat with relatively large ears and a tail that is nearly always longer than the body. (ADW, 2015)

**Involved in other diseases:**

*Rickettsia felis* (Panti et al., 2014)

*Yersinia Pestis* (Tollenaere et al., 2010)

*Bartonella sp.* (Ellis et al., 1999)

*Fasciola hepática (Experimental)* (Valero et al., 1998)

*Hantavirus* (Calderon et al., 1999; Aleman et al., 2006)

*Leptospira sp.* (Bharti et al., 2003)

*Taenia taeniaeformis, Trypanosoma evansi*  
(Singla et al., 2008)

*Hepatitis E Virus* (Hirano et al., 2003)

*Sigmodon hispidus*



**Caracteristics:** The southern range reaches northern South America in Peru, Ecuador, Colombia, Venezuela, Guyana, French Guiana, and Brazil. The range extends northward through Central America and Mexico. In the United States, they are found as far north as Nebraska in the west and coastal and central Virginia to the east. (IUNC, 2015). The color of both sexes consists of a mixture of tan, brown, and black fur on their dorsal parts, giving them a coarse, or "hispid," appearance. (ADW, 2015)

**Involved in other diseases:**

*Isolation of black creek canal virus (New hantavirus)* (Rollin et al., 1995; Ravkov et al., 1995)

*Borrelia burgdorferi* (Oliver et al., 1995)

*Estomatitis vesicular* (Jimenez et al., 1996)

*Trichinella spiralis* (Holliman et al., 1980)

*Trypanosoma cruzi* (Salazar-Schettino et al., 1997)

*Leptospira* sp. (Brown et al., 1960)

*Oryzomys capito*



**Caracteristics:** This species occurs in lowland tropical rainforests of eastern Amazonia—eastern and southern Venezuela, Guianas, northern and central Brazil, and eastern Paraguay; including Trinidad; western limits indeterminate. (IUNC, 2015)

**Involved in other diseases:**

*Hantavirus* (Bharadwa et al., 1997)

*Arenavirus* (Cajimat et al., 2007)

*Trypanosoma cruzi* (Funayama et al., 1969)

*Choloepus hoffmanni*



**Caractheristics:** The northern most population ranges from Nicaragua south into western Venezuela. The southern population is found from north-central Peru through extreme western Brazil (south-western Amazonas and probably Acre states) to central Bolivia. Species in this genus are easily identified by the presence of two claws on the forelimb (IUNC, 2015). The coloration of body hair in adults is a mosaic of tan, blonde, and light brown. (ADW, 2015)

**Involved in other diseases:**

*Endotrypanum* (Franco et al., 1999)

## Discussão

*Proechimys semispinosus*



**Characteristics:** This species occurs in Brazil, Venezuela, Guyana, Suriname and French Guiana. (IUNC, 2015)

**Involved in other diseases:**

*Venezuelan Equine Encephalitis Viruses*  
(Barrerea et al., 2002)

*Otodylomys phyllotis*



**Characteristics:** This species occurs in central Costa Rica north to the Yucatán Peninsula, south Tabasco, and north Chiapas, Mexico. (IUNC, 2015)

The body is bicolored, with a gray/brown coloration dorsally and a white/gray coloration ventrally. Hands and feet are pale. (ADW, 2015)

**Involved in other diseases:**

*Leptospira interrogans* (Espinosa et al., 2015)



*Didelphis albiventris*



**Characteristics:**

*This species occurs from northeast Brazil to central Argentina. They have a triangular skull; the fur on their face has a dusty-whitish hue, with a dark gray medial stripe between the ears. The darkness of the facial stripe depends on the range of the population, populations limited to southern regions are more likely to have a lighter colored facial stripe; southern populations are more likely to have black spots on their ears. (IUNC, 2015)*

**Involved in other diseases:**

*Toxoplasma gondii* (Fornazari et al., 2011)

*Leptospira borgpetersenii* (Jorge et al., 2012)

*Sarcocystis neurona* (Dubey et al., 2001)

*Mycobacterium bovis* (Abdala et al., 2015)

*Trypanosoma cruzi* (Alvarado-Otegui et al., 2012; Tenório et al., 2014)

## BIBLIOGRAPHY

1. Pavlovsky EN. Natural Nidality of Transmissible Diseases with Special Reference to the Landscape Epidemiology of Zoonthroponoses. N. D. Levine:University of Illinois Press;1966.
2. McNew GL. The nature, origin, and evolution of parasitism. In: Horsfall JG, Dimond AE, editors. *Plant Pathology: An Advanced Treatise*. New York: Academic Press;1960; 2. P. 19–69.
3. Vélez ID, E Hendrickx, Robledo SM, Agudelo S. Gender and cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Cad. Saúde. Pública*. 2001;17(1):171-180.
4. Abdussalan M. Significance of ecological studies of wild animal reservoir of zoonoses. *Bull World Health Organ*. 1959;21:179–186.
5. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(9):581-96.
6. Alvar J, Vélez ID, 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*. 2012;7(5):e35671.
7. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001;95:239-43.
8. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366:1561-77
9. Diamond J. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*. 2002;8(418):700-7
10. Ponte E. Consideraciones sobre la epidemiología de la leishmaniasis tegumentária de la Argentina. *Boletín de la oficina sanitaria pan-americana*. pp 223-241
11. Thrall PH, Hochberg ME, Burdon JJ, Bever JD. Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *Trends Ecol Evol*. 2007 Mar;22(3):120-6. Epub 2006 Nov 29.
12. Shaw JJ. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1988;83(1):486-90.

13. Henderson IF, Henderson WD. Henderson's dictionary of biological terms. London: Longman Scientific & Technical; 1989.
14. Swinton J, Harwood J, Grenfell BT, Gilligan CA. Persistence thresholds for phocine distemper virus infection in harbour seal *Phoca vitulina* metapopulations. *Journal of Animal Ecology* 1998;67:54–68.
15. Swinton J, Woolhouse MEJ, Begon ME, Dobson AP, Ferroglio E, Grenfell BT, et al. Microparasite transmission and persistence. In: Hudson PJ, editor. *The ecology of wildlife diseases*. Oxford: Oxford University Press; 2001.
16. Giorgio S (1995) Moderna visão da evolução da virulência. *Rev Saude Publica* 29: 398–402.
17. Woolhouse ME, Taylor LH, Haydon DT (2001) Population biology of multihost pathogens. *Science* 292: 1109–1112.
18. Woolhouse ME, Taylor LH, Haydon DT (2001) Population biology of multihost pathogens. *Science* 292: 1109–1112.
19. McMichael AJ (2004) Environmental and social influences on emerging infectious diseases: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359: 1049–1058.
20. Roque ALR, D'Andrea PS, de Andrade GB, Jansen AM (2005) *Trypanosoma cruzi*: distinct patterns of infection in the sibling caviomorph rodent species *Thrichomys apereoides laurentius* and *Thrichomys pachyurus* (Rodentia, Echimyidae). *Exp Parasitol* 111: 37–46.
21. Ashford RW. What it takes to be a reservoir host. *Belgian Journal of Zoology*. 1997;127:85–90
22. Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurensen MK. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis*. 2002 Dec;8(12):1468-73.
23. Brumpt E, Pedroso A. Pesquisa epidemiologica sobre a leishmaniose americana das florestas no Estado de Sao Paulo. *Ann Paul Med Cir*. 1913;1:97–136.

24. Medina HSG 1946. Estudos sobre leishmaniose. I. Primeiros casos de leishmaniose espontânea observados em cobaias. Arq Biol Tecnol (Curitiba) 1: 39-74.
25. Deane LM. The relationship of the haemoflagellates. In: Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Congress of Tropical Medicine and Malaria. Washintong D.C. 10-18 May, 1948,2,1117.
26. Fenton A, Pedersen AB. Community epidemiology framework for /classifying disease threats. Emerg Infect Dis. 2005 Dec;11(12):1815-21.
27. Viana M, Mancy R, Biek R, Cleaveland S, Cross PC, Lloyd-Smith JO, Haydon DT. Assembling evidence for identifying reservoirs of infection. Trends Ecol Evol. 2014 May;29(5):270-9
28. The IUNC Red List of threatened Species.2015. <http://www.iucnredlist.org/>. Accesed julio, 2015.
29. Animal Diversity Web ADW 2015. <http://animaldiversity.org/>. Accesed julio, 2015
30. Cantillo-Barraza O, Garcés E, Gómez-Palacio A, Cortés LA, Pereira A, Marcet PL, Jansen AM, Triana-Chávez O. Eco-epidemiological study of an endemic Chagas disease region in northern Colombia reveals the importance of *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae), dogs and *Didelphis marsupialis* in *Trypanosoma cruzi* maintenance. Parasit Vectors. 2015 Sep 22;8:482.
31. Dangoudoubiyam S, Oliveira J. B, Viquez C, Gomez-Garcia A, Gonzalez, O, Romero J.J, Howe D. K, et al. Detection of antibodies against *Sarcocystis neurona*, *Neospora* spp., and *Toxoplasma gondii* in horses from Costa Rica. Journal of Parasitology. 2011; 97(3): 522-24.
32. Rosenthal B. M, Lindsay D. S, Dubey J. P, et al. Relationships among *Sarcocystis* species transmitted by New World opossums (*Didelphis* spp.). Veterinary Parasitology. 2001; 95(2): 133-142.
33. Smith D. D, Frenkel J. K, et al. *Besnoitia darlingi* (Apicomplexa, Sarcocystidae, Toxoplasmatinae): Transmission between Opossums and Cats. The Journal of protozoology. 1984; 31(4): 584-87.

34. Hidalgo de J. L, Sulzer K. R, et al. Six new leptospiral serovars isolated from wild animals in Peru. *Journal of clinical microbiology*. 1984; 19(6): 944-45.
35. Tesh R. B, Boshell J, Young D.G, Morales A, Corredor A, Modi G. B, Gaitan, M.O, et al. Biology of Arboledas virus, a new phlebotomus fever serogroup virus (Bunyaviridae: Phlebovirus) isolated from sand flies in Colombia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1986; 35(6): 1310-316.
36. Trujillo CM, Rodriguez L, Rodas JD, Arboleda JJ. Experimental infection of *Didelphis marsupialis* with vesicular stomatitis New Jersey virus. *J Wildl Dis*. 2010 Jan;46(1):209-17.
37. Panti-May J. A, Torres-Castro M, Hernández-Betancourt S, Dzul-Rosado K, Zavala-Castro J, López-Avila K, Tello-Martín R, et al. Detection of *Rickettsia felis* in Wild Mammals from Three Municipalities in Yucatan, Mexico. *EcoHealth*. 2014:1-5.
38. Tollenaere C, Rahalison L, Ranjalahy M, Duplantier J. M, Rahelinirina S, Telfer S, & Brouat C, et al. Susceptibility to *Yersinia pestis* experimental infection in wild *Rattus rattus*, reservoir of plague in Madagascar. *EcoHealth*. 2010, 7(2): 242-47.
39. Ellis B. A, Regnery R. L, Beati L, Bacellar F, Rood M, Glass G. G, Childs J.E, et al. Rats of the genus *Rattus* are reservoir hosts for pathogenic *Bartonella* species: an Old World origin for a New World disease?. *Journal of Infectious Diseases*. 1999, 180(1): 220-24.
40. Valero M.A, Marcos M.D, Fons R, Mas-Coma S, et al. *Fasciola hepatica* development in the experimentally infected black rat *Rattus rattus*. *Parasitology research*. 1998; 84(3): 188-194
41. Calderón G, Pini N, Bolpe J, Levis S, Mills J, Segura E, Enria D, et al. Hantavirus reservoir hosts associated with peridomestic habitats in Argentina. *Emerging Infectious Diseases*. 1999; 5(6): 792.
42. Alemán A, Iguarán H, Puerta H, Cantillo C, Mills J, Ariz W, Mattar S, et al. First serological evidence of Hantavirus infection in rodents in Colombia. *Revista de Salud Pública*. 2006; 8: 1-12.

43. Bharti A.R, Nally J.E, Ricaldi J.N, Matthias M.A, Diaz M. M, Lovett M. A, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet infectious diseases*. 2003; 3(12): 757-71.
44. Singla L. D, Singla N, Parshad V. R, Juyal P. D, Sood N. K, et al. Rodents as reservoirs of parasites in India. *Integrative zoology*. 2008; 3(1): 21-26.
45. Hirano M, Ding X, Li TC, Takeda N, Kawabata H, Koizumi N, Abe K, et al. Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatology research*. 2003; 27(1):1-5.
46. Rollin P. E, Ksiazek T.G, Elliott L.H, Ravkov E.V, Martin M.L, Morzunov, S, Peters C.J, et al. Isolation of Black Creek Canal virus, a new hantavirus from *Sigmodon hispidus* in Florida. *Journal of medical virology*. 1995; 46(1): 35-39.
47. Ravkov E. V, Rollin P. E, Ksiazek T.G, Peters C.J, Nichol S.T, et al. Genetic and serologic analysis of Black Creek Canal virus and its association with human disease and *Sigmodon hispidus* infection. *Virology*. 1995; 210(2): 482-89.
48. Oliver Jr JH, Chandler Jr FW, James AM, Sanders Jr FH, Hutcheson HJ, Huey LO, Lane RS, et al. Natural occurrence and characterization of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in cotton rats (*Sigmodon hispidus*) from Georgia and Florida. *The Journal of parasitology*. 1995: 30-36.
49. Jiménez A. E, Jiménez C, Castro L, Rodríguez L. et al. Serological survey of small mammals in a vesicular stomatitis virus enzootic area. *Journal of wildlife diseases*. 1996, 32(2): 274-279.
50. Holliman R. B, Meade B, et al. Native trichinosis in wild rodents in Henrico County, Virginia. *Journal of wildlife diseases*. 1980, 16(2): 205-08.
51. Salazar-Schettino, P. M., Bucio, M. I., Cabrera, M., & Bautista, J, et al. First case of natural infection in pigs: review of *Trypanosoma cruzi* reservoirs in Mexico. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1997; 92: 499-502.

52. Brown R. Z, Gorman G.W, et al. The occurrence of leptospiral infections in feral rodents in southwestern Georgia. *American Journal of Public Health and the Nations Health*. 1960; 50(5): 682-88.
53. Bharadwaj M, Botten J, Torrez-Martinez N, Hjelle B, et al. Rio Mamore Virus: Genetic characterization of a newly recognized Hantavirus of the pygmy rice rat, *Oligoryzomys microtis*, from Bolivia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1997; 57(3): 368-374.
54. Cajimat M.N.B, Milazzo M.L, Hess B.D, Rood M.P, Fulhorst C.F, et al. Principal host relationships and evolutionary history of the North American arenaviruses. *Virology*. 2007; 367(2): 235–243.
55. Funayama G.K., Barretto M.P, et al. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXIV–Infecção natural do rato, *Oryzomys capito laticeps* (Lund, 1841) pelo *T. cruzi* *Rev. bras. Biol.* 1969, 29: 163-173.
56. Franco AMR, Grimaldi Jr G, et al. Characterization of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a unique parasite infecting the neotropical tree sloths (Edentata). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999; 94(2): 261-68.
57. Barrera R, Ferro C, Navarro J.C, Freier J, Liria J, Salas R, Weaver S. C, et al. Contrasting sylvatic foci of Venezuelan equine encephalitis virus in northern South America. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2002; 67(3): 324-334.
58. Espinosa D, Sánchez D, Leon L, Rios C, Berzunza M, Becker I. New wildlife hosts of *Leptospira interrogans* in campeche, Mexico. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2015; 57(2):181-183.
59. Fornazari F, Teixeira C, da Silva R, Leiva M, de Almeida C, Langoni H, et al. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* among Brazilian white-eared opossums (*Didelphis albiventris*). *Veterinary parasitology*. 2011; 179(1):238-241.
60. Jorge S, Hartleben C, Seixas F, Coimbra M, Stark C, Larrondo G, Brod, C. et al. *Leptospira borgpetersenii* from free-living white-eared opossum

- (*Didelphis albiventris*): first isolation in Brazil. *Acta tropica*. 2012: 124(2), 147-151.
61. Dubey J, Lindsay D, Kerber C, Kasai N, Pena H, Gennari S, Rosenthal B. First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2001:95(2), 295-304.
62. Abdala A, Garbaccio S, Zumárraga M, Tarabla H. *Mycobacterium bovis* en fauna silvestre de la cuenca lechera de Santa Fe, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 2015: 47(3), 174-182.
63. Alvarado-Otegui J, Ceballos L, Orozco M, Enriquez G, Cardinal M, Cura C, Gürtler R. The sylvatic transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* in a rural area in the humid Chaco of Argentina. *Acta tropica*. 2012: 124(1), 79-86.
64. Tenório M. S, e Sousa L. O, Alves-Martin M. F, Paixão M. S, Rodrigues M. V, Starke-Buzetti W.A, Lucheis S. B, et al. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. *Veterinary parasitology*. 2014; 203(1): 203-06



## BIBLIOGRAPHY (of table)

2. Thatcher VE, Eisenmann C, Hertig M. A natural infection of *Leishmania* in Kinkajou, *Potos flavus*, in Panamá. *J Parasitol.* 1965;51:1022-3.
3. Herrer A, Thatcher VE, Johnson CM 1966. Natural infections of *Leishmania* and trypanosomes demonstrated by skin culture. *J Parasitol*; 52: 954-7.
4. Lainson R, Strangways-dixon J. The epidemiology of dermal Leishmaniasis in British Honduras: II. Reservoir-host of *Leishmania Mexicana* among the forest rodents. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*1964;58:136-53.
5. Thatcher VE, Eisenmann C, Hertig M. Experimental inoculation of Panamanian mammals with *Leishmania braziliensis*. *J Parasitol.* 1965;51:842-4.
7. Herrer A, Telford SR Jr. *Leishmania braziliensis* isolated from Sloths in Panama. *Science.* 1969;164(3886):1419-20.
8. Herrer A, Telford S., Christensen HA. Enzootic cutaneous Leishmaniasis in eastern Panamá. I. Investigation of infections among forest mammals. *Ann Trop Med Parasitol.* 1971;65(3):349-58.
9. Christensen HA, Herrer A. Detection of *Leishmania braziliensis* by xenodiagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1972;66(5):798-9.
10. Telford SR Jr, Herrer A, Christensen HA. Enzootic cutaneous Leishmaniasis in eastern Panamá. III. Ecological factors relating to the mammalian host. *Ann Trop Med Parasitol.* 1972;66(2):173-9.
11. Herrer A, Christensen HA, Beumer RJ. Reservoir Host of cutaneous Leishmaniasis among Panamanian forest mammals. *Am J Trop Med Hyg.* 1973;22(5):585-91.
12. Zeledón R, McPherson B, Ponce C. Isolation of *Leishmania braziliensis* from a wild rodent in Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg.* 1977;26(5 Pt 1):1044-5
13. Arias JF, Naiff RD. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1979;75(4):537-41.

14. Arias JR, Naiff RD. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1981;76(3): 279-86.

16. Lainson R, Shaw JJ, Ready PD, Miles MA, Póvoa M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Para State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". Trans R Soc Trop Med Hyg. 1981;75(4):530-6.

18. Scorza JV, Rezzano S, César Márquez J. *Didelphis marsupialis*: principal reservoir of *Leishmania* spp. in the city of Trujillo, Venezuela. Rev Cubana Med Trop. 1984;36(2):194-200.

19. Aguilar M, Fernandez E, De Fernandez R, Deane L. Study of an outbreak of cutaneous Leishmaniasis in Venezuela. The role of domestic animals. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984;79(2):181-195.

20. Hashiguchi Y, Gomez EA, de Coronel VV, Mimori T, Kawabata M. *Leishmania* isolated of wild mammals caught in endemic areas of leishmaniasis in Ecuador. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1985;79(1):120-1

21. Dedet JP, Pajot FX, Desjeux P, Goyot P, Chippaux JP, Geoffroy B. Natural hosts of *Leishmania mexicana amazonensis* Lainson and Shaw, 1972 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in French Guiana. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1985;79(3):302-5.

26. Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Júnior G. Experimental infection of the opossum *Didelphis Albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988;83(1):141.

27. Loyola EG, Alzate A, Sánchez A, González A. Epidemiology of a natural focus of *Leishmania braziliensis* in the Pacific lowlands of Colombia. III. Natural infections in wild mammals. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1988;82(3):406-7.

28. Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Peláez D, Diaz A, Montilla M, Paláu MT. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania*

donovani chagasi in Colombia, South America. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1988;83(2):195.

30. Yoshida EL, Correa FM, Marques SA, Stolf HO, Dillon NL, Momen H, Grimaldi G Jr. Human and equine (*Equus caballus*) Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* (= *L. braziliensis braziliensis*) in the south west region of Sao Paulo state, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1990;85(1):133-134.

32. Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Goncalves A, Velez ID. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1994;50(5):557-65.

33. Vasconcelos IA, Vasconcelos AW, Fe Filho NM, Queiroz RG, Santana EW, Bozza M, Sallenave SM, Valim C, David JR, Lopes UG. The identity of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate host in a major focus of cutaneous Leishmaniasis in Baturite, northeastern Brazil. Am J. Trop. Med. Hyg. 1994;50(2):158-164.

34. Rosa AC, Cuba CC, Vexenat A, Barreto AC, Marsden PD. Predominance of *Leishmania braziliensis braziliensis* in the regions of Tres bracos and Corte de pedra, Bahia, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1988;82(3):409-10.

35. Chable-Santos J, Van Winserghe N, Canto-Lara S, Andrade-Narvaez F. Isolation of *Leishmania* (*L.*) *mexicana* From wild rodents and their possible role in the transmission of localized cutaneous leishmaniasis in the state of Campeche, Mexico. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1995;53(2):141-145.

37. Alexander B, Lozano C, Barker DC, McCann SH, Adler GH. Detection of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. Acta Trop. 1998;69(1):41-50.

38. Canto-Lara SB, Van Wynsberghe NR, Vargas-González A, Ojeda-Farfán FF, Andrade-Narvaez FJ. Use of monoclonal antibodies for the identification of *Leishmania* spp. Isolated from humans and wild rodents in the State of Campeche, Mexico. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(3):305-9.

40. Llanos-Cuentas EA, Roncal N, Villaseca P, Paz L, Ogasaku E, Pérez JE, Cáceres A, Davies CR. Natural infections of *Leishmania peruviana* in animals in the Peruvian Andes. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93(1):15-20

41. Van Wynsberghe NR, Canto-Lara S, Damián-Centeno A, Itzá-Ortiz M, Andrade-Narvaez F. Retention of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in naturally infected rodents from the State of Campeche, Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95 (5). 595-600.

42. De Lima H, De Guglielmo Z, Rodríguez, Convit J, Rodríguez N. Cotton Rats (*Sigmodon hispidus*) and Black Rats (*Rattus rattus*) as possible Reservoirs of *Leishmania* spp. In Lara State, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(2): 169 – 174.

43. Russell W Raymond, Mc Hugh, Witt L, Kerr S. Temporal and spacial distribution of *Leishmania mexicana* infections in a population of *Neotoma micropus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(2):171-180.

45. Kerr SF, Emmons LH, Melby PC, Liu C, Perez LE, Villegas M, Miranda R.. *Leishmania amazonensis* infections in *Oryzomys acritus* and *Oryzomys nitidus* in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(6):1069-73

46. de Lima H, Carrero J, Rodríguez A, de Guglielmo Z, Rodríguez N. Trypanosomatidae of public health importance occurring in wild and synanthropic animals of rural Venezuela. *Biomedica.* 2006;26(1):42-50.

47. Schallig HD, da Silva ES, van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CM. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007;7(3):387-93.

50. de Freitas TP, D'Andrea PS, de Paula DA, Nakazato L, Dutra V, Bonvicino CR, de Almeida Ado B, Boa-Sorte Eda C, Sousa VR. Natural infections of *Leishmania (viannia) braziliensis* in *Mus musculus* captured in Mato Grosso, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012 Jan;12(1):81-3.

53. Lainson R, Shawn JJ. Leishmaniasis in Brazil: V. Studies on the epidemiology of cutaneous Leishmaniasis in Mato Grosso State, and observations of two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1970;64(5):654-67.

54. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent Leishmaniasis-incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin. Trans R Soc Trop Med Hyg.1968; 62(3):385-95

55. Torrealba J., Gomez-Nuñez JC, Ulloa G. Isolation of *Leishmania braziliensis* by intraperitoneal inoculation of blood from a reservoir host into hamsters. Trans R Soc Trop Med Hyg.1971;66(2):361.

56. Tikasingh ES., 1974. Enzootic rodent leishmaniasis in Trinidad, West Indies. Bull Pan Am Health Organ;8(3):232-42

58. Santiago ME, Vasconcelos RO, Fattori KR, Munari DP, Michelin Ade F, Lima VM. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). Vet Parasitol. 2007 Dec 25;150(4):283-90.

59. Van Wynsberghe NR, Canto-Lara SB, Sosa-Bibiano EI, Rivero-Cárdenas NA, Andrade-Narváez FJ. Comparison of small mammal prevalence of *Leishmania (leishmania) mexicana* in five foci of cutaneous leishmaniasis in the state of Campeche, Mexico. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 2009;51(2):87-94.

60. Amaro da Silva A, Madeira M, Lima Barbosa Filho C.J, Paheco Schubach E.Y, Da Silva Barros J.H, Borges Figueiredo F 2013. *Leishmania (Leishmania) hertigi* in a porcupine (*Coendou* sp.) found in Brasília, Federal District, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 22(2): 297-299

61. Shapiro JT, da Costa Lima Junior MS, Dorval ME, de Oliveira França A, Cepa Matos Mde F, Bordignon MO. First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. Acta Tropica. 2013;128:171– 174.

62 Telleria J, Bosseno MF, Tarifa T, Buitrago R, Martinez E, Torrez M, Le Pont F, Brenière SF. Putative reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a sub-andean focus of Bolivia identified by kDNA-polymerase chain reaction. Mem Inst Oswaldo Cruz.1999;94(1):5-6.

63. Mouriz Savani E, Fernandes de Almeida M, Gibrail de Oliveira Camargo MC, Nicoletti D'Auria SR, Martos Sodre Silva M, de Oliveira M,

Sacramento D. Detection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Brazilian bats Veterinary Parasitology. 2010;168: 5–10

64. Kerr SE, Mchugh C, Dronen NO. Leishmaniasis in Texas: prevalence and seasonal transmission of *Leishmania mexicana* in *neotoma micropus* Am. J. Trop. Med. Hyg.1995;53(1):73-77.

65. McHugh C, Grogl M, Kerr SF. Isolation of *Leishmania mexicana* from *Neotoma micropus* Collected in Texas. J. Parasitol. 1990;76(5):741-742

66. Rocha NM, Melo MN, Babá EH, Dias M, Michalick MS, Da Costa CA, Williams P, Mayrink W. *Leishmania braziliensis braziliensis* isolated from *Akodon arviculoides* captured in Caratinga Minas Gerais, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1988;82(1):68.

67. Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, da Silva SR, Moura Júnior AJ, Teixeira Neto RG, Madeira FM, Carvalho MB, Paglia AP, Melo MN, Gontijo CM. 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. 2011 Oct;105(10):579-85

68. Lima BS, Dantas-Torres F, de Carvalho MR, Marinho-Junior JF, de Almeida EL, Brito ME, Gomes F, Brandão-Filho SP. Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in north-eastern Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2013; 107: 592–597

69. McHugh CP, Thies ML, Melby PC, Yantis LD Jr, Raymond RW, Villegas MD, Kerr SF. Short report: a disseminated infection of *Leishmania mexicana* in an eastern woodrat, *Neotoma floridana*, collected in Texas. Am J Trop Med Hyg. 2003;69(5):470-2.

70. Forattini OP, Pattoli DB, Rabello EX, Ferreira AO. Natural infections of wild mammals in an endemic area of tegmental leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. Rev Saude Publica.1972;6(3):255-61.

71. De Almeida Curi NH, Miranda I, Talamoni SA Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2006;101(1): 99-101.

73. Yoshida EL, Corrêa FM, Pacheco RS, Momen H, Grimaldi Júnior G. *Leishmania mexicana* in *Didelphis marsupialis aurita* in São Paulo State, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1985;27(4):172.
74. Corredor A, Kreutzer RD, Tesh RB. Et al. Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1990 Mar;42(3):206-14
75. Corredor A, Kreutzer RD, Tesh RB, Boshell J, Palau MT, Caceres E, Duque S, Pelaez D, Rodriguez G, Nichols S, et al. Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1990 Mar;42(3):206-14
76. Roque AL, Cupolillo E, Marchevsky RS, Jansen AM. *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: patterns of experimental infection. PLoS Negl Trop Dis. 2010 Feb 2;4(2):e589.
77. Dedet JP, Gay F, Chatenay G. Isolation of *Leishmania* species from wild mammals in French Guiana. Transactions of the Royal Society of tropical medicine and hygiene. 1989;83:613-615.
- 79 Voltarelli EM, Arraes SMAA, Perles TF, Lonardoni MVC, Teodoro U, Silveira TGV. Serological survey for *Leishmania* sp. infection in wild animals from the municipality of Maringá, Paraná state, Brazil. J. venom. anim. toxins incl. trop. Dis. 2009; 15(4): 732-744.
80. Guerra JO, Paes MG, Coelho LIAR. Estudo de dois anos com animais reservatórios em área de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana humana em bairro de urbanização antiga na cidade de Manaus-AM, Brasil Acta amaz. 2007; 37(1): 133-137.
- 81 Travi BL, Arteaga LT, Leon AP, Adler GH. Susceptibility of Spiny Rats (*Proechimys semispinosus*) to *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* . Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002 Sep;97(6):887-92.
- 82 Shender LA, De Los Santos M, Montgomery JM, Conrad PA, Gherzi BM, Razuri H, Lescano AG, Mazet JA. Native rodent species are unlikely sources of infection for *Leishmania (Viannia) braziliensis* along the Transoceanic Highway in Madre de Dios, Peru. PLoS One. 2014 Jul 25;9(7):e103358.

84. Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EE, Souza AA. Cutaneous leishmaniasis in Amazonia: isolation of *Leishmania (Viannia) lainsoni* from the rodent Agouti paca (Rodentia: Dasyproctidae), in the state of Pará, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1991 Jan-Feb;33(1):18-22.

85. Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. Vet. Parasitol. 2005;129:219–227.

86. Gomes Ade C, Coutinho SG, Paim GV, de Oliveira SM, Galati EA, Nunes MP, Capinzaiki AN, Yamamoto YI, Rotter P. Ecological aspects of American tegumentary leishmaniasis: 8. Evaluation of the enzootic activity of *Leishmania (Viannia) braziliensis*, in forest and peridomestic environments of the Ribeira Valley region, São Paulo State, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1990 Mar-Apr;32(2):105-15.

87 Frederico Sim ões Barbosa, D alva A- Mello e J. Rodrigues Coivra  
Nota sôbre a infecção natural de roedores por *Leishmania* sp. nos limites  
69 dos municípios Teresópolis-Nova Friburgo, Estado do Rio de Janeiro Rev.  
Soc. Bras. Med. Trop. vol.4 no.2 Uberaba Mar./Apr. 1970

88. Forattini OP, Pattoli DB, Rabello EX, Ferreira OA. Notes on natural infection of *Oryzomys capito* laticeps in an euzootic focus of cutaneous leishmaniasis in the Estado de São Paulo, Brazil. Rev Saude Publica. 1973 Jun;7(2):181-4.

89. Guimarães FN, Azevedo M, Damasceno R. Tegumentar leishmaniosis. Zoonosis of wild rodents in Amazonia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1968;66(2):151-68.

90. Brumpt E, Pedroso A. Pesquisa epidemiologica sobre a leishmaniose americana das florestas no Estado de Sao Paulo. Ann Paul Med Cir. 1913;1:97–136.

92. Herting M, Fairchild GB, Johnson CM. Gorgas Memorial Laboratory — Leishmaniasis transmission — reservoir project. Ann. Rep. Gorgas. Lab. 1957:7-11, 1957.



93. Herting M, Fairchild GB, Johnson CM, Johnson PT, McConnell E, Hanson WJ. Gorgas Memorial Laboratory — Leishmaniasis transmission — reservoir project. Ann. Rep. Gorgas. Lab. 1959:5-11.
94. Medina HSG. Estudos sobre leishmaniose. I. Primeiros casos de leishmaniose espontânea observados em cobaias. Arq Biol Tecnol (Curitiba). 1946;1: 39-74
95. Silva DA, Madeira Mde F, Barbosa Filho CJ, Schubach EY, Barros JH, Figueiredo FB. *Leishmania (Leishmania) hertigi* in a porcupine (*Coendou* sp.) found in Brasília, Federal District, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2013 Apr-Jun;22(2):297-9.
96. Grimaldi Júnior G, Kreutzer RD, Hashiguchi Y, Gomez EA, Mimory T, Tesh RB. Description of *Leishmania equatorensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992 Apr-Jun;87(2):221-8
97. Kreutzer RD, Corredor A, Grimaldi G Jr, Grogl M, Rowton ED, Young DG, Morales A, McMahan-Pratt D, Guzman H, Tesh RB. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. Am J Trop Med Hyg. 1991 Jun;44(6):662-75.
98. Lainson R, Braga RR, De Souza AA, Pôvoa MM, Ishikawa EA, Silveira FT. *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. Ann Parasitol Hum Comp. 1989;64(3):200-7.
99. Lainson R, Shaw JJ. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. Ann Parasitol Hum Comp. 1989;64(1):3-9.
100. Forattini OP. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 1960;2:195-203.
101. Dias M, Mayrink W, Deane LM, da Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Batista SM, Araujo FG, Coelho MV, Williams P. [Epidemiology of mucocutaneous leishmaniasis Americana. I. Study of reservoirs in an endemic

region of the State of Minas Gerais]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1977 Nov-Dec;19(6):403-10. [Article in Portuguese]

102. De Alencar JE, De Pihno EP, Ferreira ZF. infeccao natural de *Rattus rattus alexandrinus* por leishmania (provavelmente *L. braziliensis*) em zona endemica de leishmaniose tegumentar do Estado do Ceara, Brasil Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo. 1960;2(6):347-348.

103. Johnson RN, Young DG, Butler JF, Bogaert-Diaz H. Possible determination of the vector and reservoir of leishmaniasis in the Dominican Republic. Am J Trop Med Hyg. 1992 Mar;46(3):282-7.

104. Marcelino AP, Ferreira EC, Avendanha JS, Costa CF, Chiarelli D, Almeida G, Moreira EC, Leite RC, dos Reis JK, Gontijo CM. Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil. Vet Parasitol. 2011 Dec 29;183(1-2):54-8.

105. Lainson R, Strangways-Dixon J. Dermal leishmaniasis in British Honduras: some host-reservoirs of *L. braziliensis mexicana*. Br Med J. 1962 Jun 9;1(5292):1596-8.

106. Kerdel-Vegas F, Essensfeld-Yahr E. American leishmaniasis in a field rodent. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1966;60:563.

107. Guerra JA, Ribeiro JA, Coelho LI, Barbosa Md, Paes MG. [Epidemiology of tegumentary leishmaniasis in São João, Manaus, Amazonas, Brazil. Cad. Saude Publica. 2006 Nov;22(11):2319-27

108. Yarbuh AL, Scorza JV. Methodological assay for research of reservoirs of *Leishmania* ssp. in the Venezuelan Andes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1982 Oct-Dec;77(4):367-84.

109. Medina, R. Leishmaniasis experimental en animales silvestres. Dermatología Venezolana. Dermatología Venezolana. 1966; 5: 91-119.

110. Nunes VL, Oshiro ET, Dorval ME, Espindola MA, Cristaldo G, Rocha HC, Nunes AB, Pires RC, Garcia WB. Estudos epidemiologicos sobre leishmaniose tegumentar (LT) e mal de cadeiras no municipio de corguinho, Mato grosso do sul-Estudo de reservatorios, 1992-1994. Rev.Bras.Parasitol.Vet. 1994;3(1):29-35.

111. Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003 May-Jun;97(3):291-6.

112. Acardi SA, Rago MV, Liotta DJ, Fernandez-Duque E, Salomón OD. *Leishmania (Viannia)* DNA detection by PCR-RFLP and sequencing in free-ranging owl monkeys (*Aotus azarai azarai*) from Formosa, Argentina. *Vet Parasitol.* 2013 Mar 31;193(1-3):256-9.

113. Naiff RD, Freitas RA, Naiff MF, Arias JR, Barrett TV, Momen H, Grimaldi Júnior G Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991 Jul-Sep;86(3):317-21

114. Quintal AP, Ribeiro Ede S, Rodrigues FP, Rocha FS, Floeter-Winter LM, Nunes CM. *Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brazil. *Vet Parasitol.* 2011 Mar 10;176(2-3):112-9.

115. Pajot FX, Le Pont F, Gentile B, Besnard R. Epidemiology of leishmaniasis in French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1982;76(1):112-3.

117. Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Ready PD, Naiff RD. Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasyus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1979;73(2):239-42.

118. Deane LM, da Silva JE, de Figueiredo PZ. Leishmaniae in the viscera of porcupines from the state of Piauí, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1974 Mar;16(2):68-9.

119. Desjeux P, Dedet JP. Isoenzyme characterization of 112 *Leishmania* isolates from French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989 Sep-Oct;83(5):610-2.

120. Buitrago R, Cupolillo E, Bastrenta B, Le Pont F, Martinez E, Barnabé C, Brenière SF. PCR-RFLP of ribosomal internal transcribed spacers

highlights inter and intra-species variation among *Leishmania* strains native to La Paz, Bolivia. *Infect Genet Evol.* 2011 Apr;11(3):557-63.

121. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis of neotropical porcupines: *Leishmania hertigi deanei* nov. Subsp. *Acta Amaz.* 1977; 7(1): 51-57.

122. Silveira FT, Moraes MA, Lainson R, Shaw JJ. Experimental cutaneous leishmaniasis. III. Histopathological aspects of the developmental behavior of the cutaneous lesion induced in *Cebus apella* (Primates: Cebidae) by *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*, L. (V.) *braziliensis* and L. (*Leishmania*) *amazonensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1990 Nov-Dec;32(6):387-94.

123. Machado MI, Milder RV, Pacheco RS, Silva M, Braga RR, Lainson R. Naturally acquired infections with *Leishmania enriettii* Muniz and Medina 1948 in guinea-pigs from São Paulo, Brazil. *Parasitology.* 1994 Aug;109 ( Pt 2):135-8.

124. McKinney LA, Hendricks LD. Experimental infection of *Myiostomys albicaudatus* with *Leishmania braziliensis*: pathology. *Am J Trop Med Hyg.* 1980 Sep;29(5):753-60.

125. Richini-Pereira VB, Marson PM, Hayasaka EY, Victoria C, da Silva RC, Langoni H. Molecular detection of *Leishmania* spp. in road-killed wild mammals in the Central Western area of the State of São Paulo, Brazil. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2014 Jun 16;20:27

126. Yoshida ELA, Cuba CA, Pacheco RS, Cupolillo E, Tavares CC, Machado GMC. Description of *Leishmania* (*Leishmania*) *forattinii* sp. n., a new parasite infecting opossums and rodents in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1993;88(3):397-406.

127. Rotureau B, Catzefflis F, Carme B. Absence of leishmania in Guianan bats. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Feb;74(2):318-21.

128. de Castro EA, Luz E, Telles FQ, Pandey A, Biseto A, Dinaiski M, Sbalqueiro I, Soccol VT. Eco-epidemiological survey of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. *Acta Trop.* 2005 Feb;93(2):141-9.

129. Peterson NE, Vexemat JA, Rosa ACOC, Lago PRL. Isolation of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from the rodent *Nectomys squamipes* captured in Bahia, Brazil Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1988;83(S1):28.

130. Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Lopes UG, Santos Jr ANM, Abreu RMR, Lima JWO, Alencar JE. Reservoir host of *L. braziliensis* in a peculiar and coastal-sited focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará state Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987;82:200.

131. Barretto AC, Vexemat JA, Peterson NE. The susceptibility of wild caught sand flies to infection by a subspecies of *Leishmania mexicana* isolated from *Proechimys iheringi denigratus* (Rodentia, Echimyidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986 Apr-Jun;81(2):235-6.

132. Mimori T, Grimaldi GJr., Kreutzer RD, Gomez EA, Mahon-Pratt D, Tesh RB, et al., Identification, using isoenzyme electrophoresis and monoclonal antibodies, of *Leishmania* isolated from humans and wild animals of Ecuador. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1989;40:154–158

## APÊNDICE C: ARTIGO ASPETOS SOCIAIS NA AREA SILVESTRE

134 ARTIGO ARTICLE

### Estudio de los conocimientos, actitudes y prácticas de la leishmaniasis: evidencias del olvido estatal en el Darién Colombiano

Study of knowledge, attitudes, and practices related to leishmaniasis: evidence of government neglect in the Colombian Darién

Estudo dos conhecimentos, atitudes e práticas da leishmaniose: evidências da negligência do Estado no Darién colombiano

Lina María Carrillo-Bontilla <sup>1,2</sup>  
 Juan José Trujillo <sup>1</sup>  
 Lizeth Álvarez-Salas <sup>3</sup>  
 Iván Darío Vélez-Bernal <sup>1</sup>

#### Abstract

*American cutaneous leishmaniasis (ACL) is considered a public health problem worldwide, and incidence in Colombia is 12,000 cases per year. Colombia has implemented control programs for years which have often overlooked the social, economic, and demographic characteristics of the regions where the disease occurs. As part of an epidemiological study, this article presents the results of a survey on knowledge, attitudes, and practices (KAP) related to leishmaniasis in rural populations in Acandí in the Colombian Darién. Qualitative and quantitative tools were used (ethnography and surveys, respectively). The results show scarce knowledge among the population on basic aspects such as recognition of the sand fly vector. There were also differences in KAP according to gender and type of population, rather than by geographic area. The study points to government neglect as a critical factor in the persistence of the disease.*

*Cutaneous Leishmaniasis; Health Knowledge, Attitudes, Practice; Neglected Diseases*

#### Resumen

*La leishmaniasis cutánea americana (LCA) es considerada un problema de salud pública a nivel mundial, y su incidencia en Colombia es de 12 mil casos por año. Durante años se han implementado programas de control, que frecuentemente ignoran características sociales, económicas y demográficas de las regiones afectadas. Como parte de un estudio de tipo epidemiológico, en este artículo se presentarán los resultados de un estudio sobre los conocimientos, actitudes y prácticas (CAP) frente a la leishmaniasis, que tienen las poblaciones de las zonas rurales del municipio de Acandí, en el Darién Colombiano. Para el estudio se utilizaron herramientas cualitativas como la etnografía y cuantitativas, como las encuestas dirigidas. Los resultados ponen en manifiesto el desconocimiento de la población en aspectos fundamentales como el reconocimiento del vector. Además, existen diferencias en las CAP por género y por tipo de población, pero no por su distribución geográfica. Se evidenció el abandono estatal como factor determinante en la perpetuación de la enfermedad.*

*Leishmaniasis Cutánea; Conocimientos, Actitudes y Práctica en Salud; Enfermedades Desatendidas*

<sup>1</sup> Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

<sup>3</sup> Grupo Medio Ambiente y Sociedad, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Correspondencia  
 L. M. Carrillo-Bontilla  
 Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia,  
 Calle 70 No 52-21, Medellín,  
 Medellín - 05001, Colombia.  
 linacarrillo@gmail.com

## Introducción

Los desafíos planteados por las enfermedades tropicales son enormes, tan grandes como sus devastadoras consecuencias: 655 mil muertos por malaria y 2 millones de enfermos por leishmaniasis para el año 2012 son algunos de los datos que lo demuestran <sup>1</sup>. La leishmaniasis americana es causada por parásitos del género *Leishmania* y transmitida por flebótomos del género *Lutzomyia*. Tiene tres formas clínicas, visceral (LV), cutánea (LC) y mucocutánea (LMC). La forma cutánea, que es la más prevalente en Colombia, se caracteriza por la presencia de úlceras dolorosas en el sitio de la picadura del insecto vector, que pueden permanecer de manera crónica durante años <sup>2</sup>. En este país la enfermedad se distribuye por todo el territorio, y aunque se acepta un considerable subregistro, hay un claro aumento de su incidencia, pasando de tener en promedio 6 mil casos por año en la década de los 90, a más de 12 mil aproximadamente en la última década <sup>3</sup>.

Este aumento en el número de casos, no sólo en leishmaniasis, sino en otras enfermedades tropicales como la malaria y dengue, demuestra el fracaso en los programas para su control. Tal vez, una razón para este fenómeno es la forma como han sido concebidas las enfermedades tropicales y analizadas desde sólo su dimensión biológica, cuyas investigaciones epidemiológicas tienen un enfoque exclusivo sobre los factores de riesgo a nivel individual dentro de la población, denominado el paradigma de la caja negra en la epidemiología <sup>4</sup>. El estudio de las enfermedades tropicales como la leishmaniasis ha sido en muchos casos reduccionista y ha particularizando el riesgo de enfermar. Se ha desconocido el fuerte componente socioeconómico y cultural que determina su presencia y dispersión. A su vez, los estudios de la enfermedad no han dimensionado los efectos que las políticas públicas podrían generar en lugares con escasa presencia estatal. Es posible inferir que aún se desconoce el complejo entramado que facilita la presentación y distribución de estas dolencias, que podrían ser develadas si las investigaciones tuvieran una visión holística del fenómeno.

La inclusión de un enfoque metodológico interdisciplinar, que permita la participación de diferentes áreas del conocimiento para el abordaje del estudio de estas enfermedades, es fundamental. Esto implica integrar de manera sistemática el componente cualitativo a los estudios epidemiológicos, ya sea desde la sociología y/o la antropología <sup>5</sup>. Esta conjunción ha venido dándose en América Latina de forma aislada desde principios del siglo XX, y un poco más

organizada después de los años 60, sin embargo falta mucho por construir <sup>6</sup>. Dentro del estudio de los factores sociales determinantes en salud, está el estudio de los conocimientos, actitudes y prácticas (CAP). En ellas se incluye el sistema de creencias acerca de las causas y el significado de la enfermedad, los sistemas médicos, esto es los procedimientos para diagnosticarla, tratarla y prevenirla.

El presente artículo presenta los resultados de un estudio cualitativo y cuantitativo sobre los CAP, frente a la leishmaniasis que tienen algunas poblaciones del municipio de Acandí (Chocó), Colombia, realizado en el marco del proyecto *Estudio Ecoepidemiológico para la Prevención y el Control de la Leishmaniasis en Acandí, Chocó*.

## Situación actual del Chocó

Durante la conquista española en América, la reducción en el número de indígenas, obligó a los españoles a importar esclavos africanos para trabajar en las minas del Chocó. Con el tiempo los esclavos pasaron a ser el grupo más abundante en la región. Desde el comienzo, las duras condiciones climatológicas de la zona, clima caliente y húmedo, donde prosperaban las enfermedades tropicales marcaban su desarrollo social. La población chocoana se encontraba dispersa, y geográficamente aislada, con propietarios ausentes, predominio de la economía basada en un solo producto: el oro. Posteriormente, el aislamiento geográfico, la escasa presencia del estado, la fragilidad institucional y la explotación sin control de los recursos naturales, han provocado un bajo nivel de desarrollo en la región. Este fenómeno es evidente en los bajos niveles de escolaridad, baja cobertura en salud y altos índices de pobreza <sup>7</sup>.

El Chocó tiene el nivel más bajo de kilómetros de carretera pavimentada por cada mil habitantes. El porcentaje de analfabetismo es el doble del promedio nacional. De acuerdo a la base de datos de Scopus, mientras para el país se produjeron 4.859 manuscritos científicos en el año 2010, sólo seis tuvieron filiación con instituciones del departamento del Chocó <sup>8,9</sup>.

Las cifras en salud son menos esperanzadoras. El 30% de la población no se encuentra afiliado en ningún régimen de salud contributivo o subsidiado. Los servicios como conducciones de agua y alcantarillado, que tienen una influencia directa sobre las condiciones de salud, sólo alcanzan coberturas del 22 al 25% respectivamente <sup>10</sup>. Según la Secretaría de Salud Departamental del Chocó, para el año 2008 se presentaron 2.511 casos de desnutrición infantil y cada mes mueren al menos 17 niños por esta causa <sup>10</sup>.

Las altas tasas de morbilidad y mortalidad de enfermedades infecciosas se encuentran estrechamente ligadas a la pobreza. La leishmaniasis, de hecho, ha sido relacionada con los bajos ingresos económicos (de hasta menos de 1 dólar por día en algunos países), pues la pobreza a su vez se encuentra asociada a factores sociales, políticos y económicos que aumentan el riesgo de la enfermedad, tales como mala disposición de excretas, deficientes condiciones de vivienda, malnutrición, pobres esquemas de control vectorial, etc. <sup>11</sup>. Se ha evidenciado, por ejemplo, que una baja ingesta de proteínas aumenta el riesgo de adquirir LV <sup>12</sup>.

No es de extrañar que una de las regiones más abandonadas de un país subdesarrollado, y que además presenta todas las condiciones necesarias para que proliferen los vectores y se mantenga la transmisión, presente altos índices de incidencia de enfermedades como malaria y leishmaniasis. Sin embargo, para el año 2008 el sistema de vigilancia epidemiológica nacional (Sistema de Vigilancia en Salud Pública – SIVIGILA) reportó para el departamento del Chocó tan solo 18 casos de LC, equivalente al 0,54% de los casos informados para el país en ese año, lo que tampoco debe extrañar, pues la deficiencia en las coberturas de salud se acompañan de altísimos subregistros <sup>13</sup>.

### Metodología

Este trabajo se llevó a cabo durante un año entre noviembre del 2008 al 2009 en el municipio de Acaandí del departamento de Chocó, Colombia, en los corregimientos de San Francisco de Asís, Triganá y Capurganá (veredas El Aguacate y La Mora), localizadas en la zona costera. Y en Santa Cruz de Chugandí, localizado en estribaciones de la serranía de Tripoquí.

San Francisco es el área con mayor desarrollo urbano, y junto a Triganá y Capurganá, son zonas turísticas, mientras Chugandí es una zona con actividad económica basada en la ganadería y la agricultura de pan coger. Por su aislamiento de la zona costera y centros urbanos importantes, es la localidad más deprimida.

En estas localidades se encuentran asentados cuatro grupos humanos con diferentes orígenes migratorios:

- Población afrodescendiente: originaria de los departamentos de Bolívar, Córdoba y la región del alto Atrato. Esta población está organizada en concejos comunitarios y son poseedores de títulos colectivos de tenencia de tierras localizadas en la serranía del Darién.

- Chitlapos: nombre con que se conocen todos aquellos campesinos mestizos, procedentes de los departamentos de Córdoba y Sucre, que migraron de sus tierras para dedicarse a la agricultura <sup>14</sup>.

- Paisas: individuos provenientes de diferentes regiones del país, principalmente del departamento de Antioquia.

- Amerindios: Embera y Embera katio, con una muy baja representatividad y ocupando zonas de resguardos que no fueron incluidos en este estudio.

Los criterios principales para la selección de la zona y la población fueron el número de casos detectados de leishmaniasis y la presencia del vector. Por otro lado, se estudió si las CAP que ha elaborado la comunidad con respecto a la enfermedad son propias y se relacionan con su aislamiento geográfico o, si por el contrario, fueron adquiridas desde afuera y adoptadas por la comunidad.

### Estudio de conocimientos, actitudes y prácticas

Con el fin de identificar las CAP, se implementó una investigación con metodologías tanto cualitativas, como cuantitativas. La etnográfica fue el método cualitativo básico utilizado; en ella se aplicaron las técnicas de observación participante que requiere la convivencia del investigador con la comunidad, donde se posibilitó aprender sobre las costumbres, las formas de ser y las formas de relación con su realidad, las cuales fueron registradas día a día en un diario de campo; posteriormente, los hallazgos fueron analizados y cotejados bibliográficamente. Se realizaron reuniones con la comunidad para confrontar la información entre ellos mismos; se registraron entrevistas semiestructuradas y entrevistas en profundidad con interlocutores claves, los cuales fueron divididos en tres grupos: (1) personas que sufrieron la enfermedad, cuyo acceso a la vivienda fuera posible; (2) personas como curanderos, médicos y enfermeras a los cuales acuden los enfermos y (3) líderes reconocidos de la comunidad: personal de salud local, madres comunitarias, coordinadores de Juntas de Acción Comunal (grupos de agremiación civil) y personal docente de las escuelas y los colegios.

Teniendo en cuenta la información recogida en el trabajo de campo etnográfico, se diseñó una encuesta de 11 preguntas cerradas (Figura 1) sobre los conocimientos, por ejemplo, si conoce la forma de transmisión de la enfermedad, los síntomas y estrategias de curación, las actitudes y las prácticas como estrategias de control, formas locales de tratamiento de la enfermedad entre



Figure 1

Encuesta realizada a la comunidad en la zona de estudio.

<p>1. ¿Qué conoce usted como pito?</p> <p>A. Una enfermedad en forma de llagas</p> <p>B. Un animal (gusano o insecto)</p> <p>C. Una enfermedad transmitida por un mosquito</p> <p>D. No sabe/No responde</p> <p>E. Otro. ¿Cuál? _____</p>	<p>7. ¿Cómo se trata la enfermedad?</p> <p>A. Quemadura con cuchara u otro metal caliente</p> <p>B. Plantas: ¿cuál? _____</p> <p>C. Sustancias químicas: ¿cuál? _____</p> <p>D. Pomadas</p> <p>E. Inyecciones</p>
<p>2. ¿Con cuál otro nombre conoce al pito?</p> <p>A. Yateví</p> <p>B. Bejuco</p> <p>C. Maltevo</p> <p>D. Leishmaniasis</p>	<p>8. ¿Dónde se contrae la enfermedad?</p> <p>A. En el bosque</p> <p>B. En la playa</p> <p>C. En la casa</p> <p>D. En la selva</p> <p>E. Otro. ¿Cuál? _____</p>
<p>3. ¿Qué conoce usted como bejuco?</p> <p>A. Una planta</p> <p>B. Una enfermedad</p> <p>C. Un mosquito</p> <p>D. Un chincho</p>	<p>9. ¿Cómo se puede prevenir?</p> <p>A. Usando ropas largas</p> <p>B. Usando toidillos</p> <p>C. Con repelentes</p> <p>D. Eliminando los mosquitos</p> <p>E. Gritando yateví</p> <p>F. No se puede prevenir</p> <p>G. No sabe/No responde</p>
<p>4. ¿Cómo se transmite la enfermedad?</p> <p>A. Por la picadura de un mosquito</p> <p>B. Por un bejuco</p> <p>C. Por la picadura de una conchilla</p> <p>D. No sabe/No responde</p> <p>E. Otro. ¿Cuál? _____</p>	<p>10. ¿A quién acude cuando está enfermo?</p> <p>A. Yerbatero</p> <p>B. Hospital</p> <p>C. Mayores de edad</p> <p>D. Usted mismo se trata</p> <p>E. Otro. ¿Cuál? _____</p>
<p>5. En caso de que la respuesta anterior sea un mosquito, ¿cómo llama al mosquito?</p> <p>A. Chitra</p> <p>B. Aluz</p> <p>C. Aludo</p> <p>D. Jejín</p> <p>E. Palomilla</p> <p>F. No tiene nombre</p> <p>G. Otro. ¿Cuál? _____</p>	<p>11. Cuando algún miembro de la familia se enferma ¿quién se encarga de buscar atención?</p> <p>A. El papá</p> <p>B. La mamá</p> <p>C. El abuelo</p> <p>D. La abuela</p> <p>E. El hermano mayor</p> <p>F. La hermana mayor</p> <p>G. Otro. ¿Cuál? _____</p>
<p>6. ¿Cómo sabe usted que alguien tiene pito? (cómo se presenta la enfermedad)</p> <p>A. Ampolla</p> <p>B. Grano</p> <p>C. Callo o veruga</p> <p>D. Herida/Llaga</p> <p>E. Roncha</p> <p>F. No tiene nombre</p> <p>G. Otro. ¿Cuál? _____</p>	

otras. Las encuestas se realizaron casa a casa en toda la zona de estudio, previo aviso a líderes y a la comunidad en general. Se encuestó a las personas mayores de 15 años que se encontraban en la residencia en el momento de hacer la visita. Se explicó a las personas de qué se trataba la encuesta y se formulaban las preguntas de forma individual para que los hombres adultos no influenciaran con sus respuestas a las mujeres y a los jóvenes. También se indagó por los papeles que desempeñan hombres y mujeres frente a la enfermedad, con el fin de tener una aproximación cuantitativa sobre las CAP en la región.

La información de campo fue sistematizada y organizada en las categorías de análisis y, posteriormente, fueron procesadas con el programa SPSS 18.0 (IBM Corp., Armonk, Estados Unidos) para identificar asociaciones entre las diferentes categorías de respuestas de las variables sexo y procedencia. Se aplicó la prueba de significancia estadística  $\chi^2$  y se consideró como significativo un valor de  $p < 0,05$ .

#### **Comité de ética**

El proyecto *Estudio Ecoepidemiológico para la Prevención y el Control de la Leishmaniasis en Acañal, Chocó* contó con el aval de la Secretaría de Salud de Chocó (convenio del 16 de marzo de 2009). También fue aprobado por el comité científico de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquia, y fue avalado por el comité de ética animal (acta nº 38/2007) de la misma universidad. Adicionalmente, el Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET), cuenta con habilitación ante la Dirección de Salud de Antioquia (DSA) para la prestación de servicios de atención en salud y certificación ISO 9001 para la atención de pacientes desde el año 2011.

#### **Resultados y discusión**

Se encuestaron en total 252 personas, 130 hombres y 122 mujeres, todas mayores de 15 años, previo consentimiento de los padres en el caso de los menores de edad (Figura 2).

Las veredas cuentan con una población aproximada de 300 familias (1.500 personas), con un alto porcentaje de niños menores de 10 años. Según los datos oficiales del municipio, hay entre cuatro a cinco niños por familia y el 15% de la población es menor de cinco años<sup>10</sup>.

En general, cada vereda está conformada por dos o tres parentelas que tienen presencia desde su fundación. Además, cohabitan un número significativo de población llegada desde interior

del país (zona andina), especialmente desde el departamento de Antioquia y se han mantenido en procesos de migración discontinuos desde hace 40 años. Los primeros colonos llegaron motivados por la posibilidad de acceder a las tierras baldías (son baldíos, y en tal concepto "*pertenecen al Estado, los terrenos situados dentro de los límites del territorio nacional que carecen de otro dueño*" Art 44, Ley de Tierras 1939), lo que incentivó la migración de más población, que querían adquirir tierras baratas donde asentarse y cultivar en ellas frutales, maderables y productos de pan coger.

La agricultura, la pesca y, en menor medida, la ganadería eran hasta hace poco la base del sustento económico. Sin embargo, la acogida que ha tenido el turismo y especialmente el ecoturismo y el turismo de aventura de bajo costo, influenció hasta mediados de la década del 2000 la transformación de la economía del lugar.

En una investigación reciente<sup>15</sup>, se indican las nuevas transformaciones de carácter social y económico que ocurrieron en el último lustro por la presencia permanente de grupos al margen de la ley que ha llevado a un detrimento aún más significativo de la agricultura local, que es ejercida de forma permanente por sólo seis de las 300 familias. Asimismo, se constata la alta tasa de deforestación por la explotación ilegal de la madera, los cultivos ilícitos y la expansión de la ganadería; el deterioro de los recursos marino-costeros que ha generado a su vez la disminución en la pesca y en el consumo de productos marinos; la reducción significativa en la demanda hotelera y la alta dependencia del mercado externo de alimentos y materiales para la construcción, provenientes desde el margen oriental del golfo de Urabá, específicamente desde el Municipio de Turbo (Antioquia). Finalmente, se observa un evidente crecimiento de la población por el efecto de las nuevas migraciones y, por lo tanto, una mayor presión sobre los recursos naturales<sup>16</sup>.

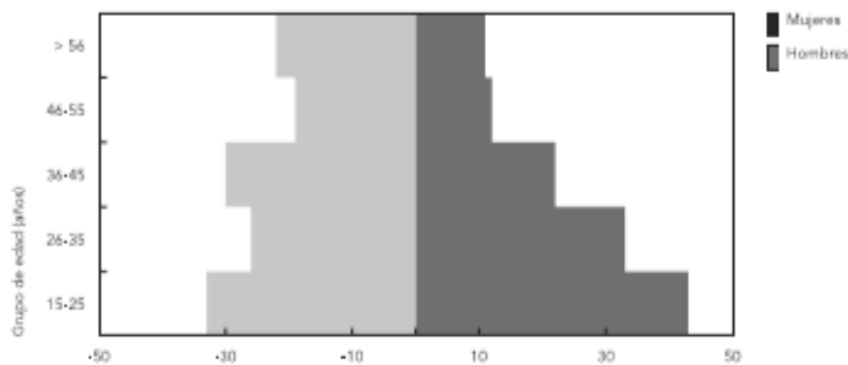
#### **Sobre la enfermedad**

La leishmaniasis es una enfermedad conocida en la región desde hace unos 30 años con el nombre de "pito" o "maltevo" y algunas personas la reconocen como "leishmaniasis". Los más viejos de la comunidad conservan en su memoria otras formas de nombrar este padecimiento como "bejuco" o "yateví", el primero más usado entre los hombres y el segundo entre las mujeres, en una proporción de 13 a 1.

En cuanto a las denominaciones por vereda, se encontró diferencia significativa para Chugandí, en donde predomina el nombre de "Bejuco" y "Maltevo", pero no "Yateví". En Trigáná y San

Figure 2

Distribución porcentual por edades y sexo de la población encuestada en la zona de estudio.



Francisco no relacionan el nombre de "ptto" con leishmaniasis. Estos apelativos, que se han encontrado en la costa pacífica colombiana de este Departamento<sup>17</sup>, son representaciones elaboradas a partir del imaginario colectivo para relacionarse con un fenómeno que es desconocido, pero que se pretende hacerlo familiar a partir de creencias y prácticas de la comunidad con respecto a la misma.

*"Vos vas caminando en el monte, vas andando y hay una planta que es una especie de palmita que se empieza a mover, el resto está quieto y la matita se está moviendo, le parece a uno casual y sigue caminando y vuelve y aparece, uno se empieza a intrigar como estoy dando vueltas en círculo, cambia su rumbo, cambia el camino y lo hace perder, si le dice 'yateví' se queda quieto y no jode más. Es un espíritu burlón de la selva"* (Hombre de 50 años edad, residente en Chugandí).

Umberto Eco se refiere al significado de un término como una unidad que culturalmente está definida y distinguida como entidad por todo el colectivo. Entender estas unidades culturales equivale a entender el lenguaje como un fenómeno social<sup>18</sup>. Es así como la comunidad hace referencia a dos tipos de lesiones que nombran y les dan un significado, según la manifestación clínica de la enfermedad, "ptto macho" o "ptto hembra", al cual le adjudican significados que en su forma simbólica hacen referencia a la manera en que conciben a los géneros y al rol que desempeñan tanto el hombre, como la mujer, dentro de la sociedad (Figura 3).

Son varias las formas de caracterizar la lesión que denominan como "ptto hembra": *"El que llo-*

*ra es la hembra y no duele. Él va creciendo, creciendo. Eso se van formando como unas téticas y coméndole a uno, es por medio de esas téticas..., cuando uno alcanza a matar esas téticas [la enfermedad] no come más". "Como sale a los dos días empieza a comer a comer de una vez. La hembra no se profundiza va por encima y se va regando. La hembra es más fácil de curar que el macho, es la que come y hace pozo rapidito".* Mientras al "ptto macho" los describen de la siguiente manera: *"El sale un puntito ahí y como no se moleste el demora en comer, no crece. El macho no come, él come pero para dentro, pero muy lento. Se queda como un callo, no abre la boca como la otra. No sale una bombita, sino un puntito negrito, y ahí se va creciendo. Es muy difícil de curar"*, así lo describió un hombre de 28 años habitante de Trigana quien tuvo la enfermedad.

El género se constituye y expresa a través de las relaciones sociales, roles y expectativas, ligados a las atribuciones femeninas y masculinas, que no son fijas y cambian según la cultura y a lo largo de la historia<sup>19</sup>. El apelativo de macho se refiere a que es una lesión muy fuerte, más agresiva, más difícil de curar. El ptto hembra se refiere a una lesión débil, menos agresiva y que responde mejor al tratamiento, así como a su capacidad de reproducción, porque *se va regando*.

Se denota en esta forma de referenciar la enfermedad la concepción patriarcal arraigada en el país y, en especial en este departamento. Aunque hay una larga tradición entre las comunidades rurales de privilegiar la educación en los hijos varones<sup>20</sup>, al parecer son estas las que mejor manejan el concepto de la enfermedad,

Figura 3

Manifestación clínica del "pito hembra" (izquierda) y del "pito macho" (derecha). Municipio de Acandí, Departamento de Chocó, Colombia, 2008.



Fotógrafo: Andrés Vélez Mira.

relacionan ampliamente el pito con leishmaniasis, saben que el mecanismo de transmisión es por la picadura de un mosquito, que su tratamiento es con inyecciones, reconocen el sitio de infección en el bosque y no en la casa, y que la forma de prevenirlo es usando ropas largas. Por otra parte, los hombres reconocen el vector dentro de sus casas y al toldillo como un factor de protección.

Desde el punto de vista clínico, encontramos que la importancia que se le da a la enfermedad tiene que ver con el tipo de lesión que presentan, el lugar del cuerpo donde se manifiesta la lesión y el tiempo que lleven con ella. Si bien manifiestan cierta preocupación por el proceso físico de la lesión, existe tranquilidad ante una enfermedad que no les causa la muerte y les permite seguir trabajando.

Se encontraron diferentes conocimientos, actitudes y prácticas de acuerdo al origen de la población. Es así como los denominados pasas llegan como habitantes de la selva, pues son los sectores alejados de la cabecera de los corregimientos y zonas medianamente pobladas

los preferidos por esta población para asentarse. Establecerse en un lugar hostil, como lo es el Darién para la mayoría de los ciudadanos, denota sacrificios y fortalezas de carácter físico y emocional para asumir el trabajo y la profunda soledad que experimentan los nuevos habitantes de estas zonas.

En este contexto, la picadura del vector, el desarrollo de la enfermedad, la cura y la subsecuente cicatriz, es un proceso con una fuerte carga simbólica. La cicatriz en la piel, es para algunos de estos migrantes una señal inequívoca de aceptación del espíritu de la naturaleza presente en ese lugar. Por esta razón, la leishmaniasis no tiene el carácter incapacitante, por el contrario, es un permiso metafísico de permanencia, llamado el *"sello de la selva"*.

Contrariamente, para los afrodescendientes y la población "Chilapa", es una enfermedad incapacitante y desfigurante. Por esta y otras razones, estos grupos no son visitantes y mucho menos habitantes del bosque y prefieren vivir en la zona urbana de los corregimientos.

### Sobre el vector

El 80% de los encuestados relaciona la enfermedad con la picadura de un mosquito, pero no sabe o no le proporcionan nombre. En algunas zonas como San Francisco y Triganá lo llaman "Chitra". También se conoce con el nombre de "Alus" o "Palomilla" y "Aludo". Nadie reconoce el mosquito transmisor como "lejen".

### Sobre el sistema de salud

Las condiciones del sistema de salud son precarias, el hospital de Acandí sólo cuenta con dos médicos rurales el año, quienes no tienen claro que es la leishmaniasis, ni su esquema de tratamiento. Adicionalmente, el costo del desplazamiento desde el lugar de residencia hasta el hospital oscila entre los US\$ 15 y US\$ 20, lo que supera la capacidad económica de algunos habitantes. En los corregimientos o veredas del estudio los centros de salud están abandonados, sólo en San Francisco hay una promotora de salud, y su puesto de salud sólo tiene capacidad para atender emergencias menores.

Hay una alta desconfianza por el sistema de salud, especialmente del que ofrece el hospital de Acandí en el diagnóstico de la leishmaniasis. Por esta razón, quienes tienen mayores recursos económicos en el sector, prefieren salir hasta Turbo para tener un diagnóstico acertado. Otros grupos económicamente menos favorecidos prefieren curarse empíricamente con la medicina tradicional antes que ir al Hospital del municipio. Toda esta suma de factores ayudan a que en la comunidad se fortalezca más la idea sobre la conveniencia de utilizar plantas u otras prácticas para cerrar las úlceras. Su pragmatismo los lleva, como último recurso, a buscar una cicatrización de la herida sin importar los medios para lograr este fin.

A pesar de lo mencionado en las encuestas, el 66% dice que acudiría al hospital si se enfermara. Sin embargo, es de resaltar que por cada hombre que se trata con un tratamiento convencional (inyecciones de antimonio de meglumine) hay 13 mujeres que lo hace de forma casera con plantas, pomadas o quemando la lesión con cuchara u otro metal caliente). De la misma manera, esta relación se mantiene en la decisión de recurrir al conocimiento de una persona mayor, en lugar de ir al hospital en caso de enfermarse.

Tanto los hombres, como las mujeres, están en riesgo de enfermarse, debido a la domiciliación del vector. Esto se demuestra por la inexistencia de diferencias estadísticamente significativas en la encuesta de intradermorreacción de Montenegro, que establece la prevalencia de

infección (datos no mostrados) en la región. Sin embargo, las mujeres siguen sin acceder a los servicios de salud, en este caso, por su propia percepción de los sistemas de salud, como los describió Vélez et al. <sup>21</sup>.

### Sobre la prevención

Relacionan la enfermedad con ciertas prácticas que implican el acceso al bosque, como la caza o el aserrío. A la pregunta: ¿dónde cree que se adquiere la enfermedad? El 63% afirmó que en el bosque o en la selva. Esta respuesta tuvo diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres. Por cada 15 mujeres, sólo un hombre reconoce el riesgo de contraer la enfermedad en la selva. Los hombres por sus labores son la población más vulnerable en este tipo de ambiente, por lo tanto al no reconocer el riesgo en la selva, no tendrán medidas de prevención para evitar la infección en este lugar.

En contraposición sólo el 12% afirma que en la casa se puede adquirir la enfermedad. Por cada mujer hay trece hombres que afirman que la leishmaniasis es posible contraerla en el interior de la vivienda. De la misma manera que el caso anterior, en donde parecen estar trastocados los saberes, deberían ser las mujeres quienes reconocieran este riesgo, pues son ellas las encargadas de las labores y cuidados de la familia. Al no reconocerlo como tal, se produce descuido en las medidas de prevención y control de las enfermedades vectoriales, como el uso del toldillo, las fumigaciones, entre otras. Esto puede ser un factor importante en el aumento de la prevalencia e incidencia de la enfermedad, especialmente en los niños. Por ejemplo, en San Francisco se encontró una positividad en la prueba de Montenegro en niños menores de cinco años de un 33%.

Otro factor importante es la creencia de las personas en su capacidad de controlar lo que les pasa, o si por el contrario piensan que lo que les sucede es obra de fuerzas superiores a ellos, obra de la suerte o de una especie de dios que le pone pruebas a su fe <sup>22</sup>.

Este tipo de reflexiones lleva a tomar una actitud pasiva y de contemplación, con respecto a las medidas de prevención y control de la enfermedad. Si las personas creen que independiente de lo que hagan van a contraer la enfermedad, no se hará ningún esfuerzo en tomar medidas para prevenirla. Este razonamiento es reforzado y propagado por la iglesia evangélica de corte pentecostal que de algunos años para acá, más o menos siete, no sólo se ha establecido, si no que se ha propagado en la zona <sup>18</sup>.

Uno de nuestros interlocutores evangélicos, una mujer de 43 años argumentó: "A veces Dios

social y cultural, circunscrito sólo en la dimensión biológica y médica, lleva al fracaso en los programas de prevención y control de la enfermedad. Este tipo de proyectos y la nueva política en ciencia y tecnología en el país, busca favorecer los estudios interdisciplinarios, ayudando a abordar los problemas de investigación en forma holística.

Finalmente, el desconocimiento de la población en cuanto a las formas de transmisión, prevención y control de la enfermedad, la dificultad del acceso a la atención médica y al tratamiento evidente en la cronicidad de lesiones (de hasta tres años), así como el alto subregistro, demuestran cómo a través de una enfermedad como la leishmaniasis se desnuda el abandono del estado en esta región del país.

## Resumo

*A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é considerada um problema de saúde pública em todo o mundo, e sua incidência na Colômbia é de 12 mil casos por ano. Os programas de controle implementados muitas vezes falham, provavelmente, por ignorarem as características sociais, econômicas e demográficas das regiões onde a doença ocorre. Como parte de um estudo de tipo ecoepidemiológico, neste artigo apresentamos os resultados de um estudo sobre os Conhecimentos, Atitudes e Práticas (CAP) sobre a leishmaniose em populações rurais do município de Acandí, na região do Darién colombiano. Para o estudo foram utilizadas ferramentas qualitativas como a etnografia e quantitativas como levantamentos. Os resultados indicam que a população desconhece aspectos fundamentais da LTA, como por exemplo, o vetor. Além disso, existem diferenças nos CAP por sexo e tipo de população, mas não pela área geográfica. Desta forma, a nossa abordagem evidencia a negligência dos entes públicos de saúde, encabeçados pelo governo do estado. Esta negligência é um fator determinante na perpetuação da doença.*

*Leishmaniose Cutânea; Conhecimentos, Atitudes e Prática em Saúde; Doenças Negligenciadas*

## Colaboradores

L. M. Carrillo-Bonilla realizó la investigación epidemiológica y el análisis de los datos cuantitativos en la investigación y elaboró del texto para su publicación. J. J. Trujillo realizó el trabajo de campo etnográfico, donde obtuvo los datos cualitativos y contribuyó en la elaboración del artículo. L. Álvarez-Salas participó en la construcción del artículo y la consolidación de los datos cualitativos a partir de hallazgos etnográficos recientes. L. D. Vélez-Bernal participó en el diseño de la investigación y en la supervisión del desarrollo de la misma; revisó y corrigió el artículo.

## Agradecimientos

A COLCIENCIAS por la financiación de este proyecto *Estudio Ecoepidemiológico para la Prevención y el Control de la Leishmaniosis en Acandí, Chocó* (código 11540820520). A los investigadores Luz A. Acosta, Karina Mondragón-Shem, Andrés Vélez, Juan E. Pérez, Daniel Agudelo y Honacio Cadena del PECET por su colaboración en el trabajo de campo. A Erika T. Loatza por el análisis estadístico. A el Grupo Biogenesis Sostenibilidad Universidad de Antioquia 2013-2014. Finalmente, agradecemos a la comunidad de Acandí su aceptación y apoyo en el desarrollo de este proyecto.

## Conflicto de interés

Todos los autores declaran que no existe conflicto de interés.

## Referencias

- World Health Organization. World health statistics 2012. [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/EN\\_WHS2012\\_Full.pdf](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2012_Full.pdf) (accedido el 10/Abr/2013).
- World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization; 2010. (WHO Technical Report Series, 949).
- Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Sistema de Vigilancia en Salud Pública – SIVIGILA. Vigilancia rutinaria, 2011. <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/SubdireccionVigilancia/sivigila/Paginas/vigilancia-rutinaria.aspx> (accedido el 20/Dic/2012).
- Susser M, Susser E. Choosing a future for epidemiology: II. From black box to chinese boxes and eco-epidemiology. *Am J Public Health* 1996; 86:674-7.
- Ariza EY, Lopez CM, Martínez O, Arias SA. Ecoepidemiología: el futuro posible de la epidemiología. *Rev Fac Nac Salud Pública* 2004; 22:139-45.
- Briceno-León R. Endemic, epidemic and fashions: the sociology of health in Latin America. *Revista Española de Sociología* 2003; 3:69-85.
- Bonet J. ¿Por qué es pobre el Chocó? *Revista del Banco de la República* 2007; 80:18-61.
- Alta Consejería para la Reintegración, Presidencia de la República. Diagnóstico socioeconómico del Departamento del Chocó. Bogotá: Presidencia de la República; 2008.
- Observatorio Colombiano de Ciencia y Tecnología. Indicadores departamentales de ciencia, tecnología e innovación, 2010. Chocó. <http://www.ocyte.org.co/html/boletines/choco.pdf> (accedido el 10/Nov/2012).
- Organización Panamericana de la Salud. Indicadores básicos en salud. Chocó 2008. [http://new.paho.org/col/index.php?option=com\\_content&view=article&id=770:indicadores-basicos-en-salud-choco-2008&catid=687&Itemid=361](http://new.paho.org/col/index.php?option=com_content&view=article&id=770:indicadores-basicos-en-salud-choco-2008&catid=687&Itemid=361) (accedido el 04/Dic/2012).
- Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 2006; 22:552-7.
- Malafaia G. Protein-energy malnutrition as a risk factor for visceral leishmaniasis: a review. *Parasite Immunol* 2009; 31:587-96.
- Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Sistema de Vigilancia en Salud Pública – SIVIGILA. Vigilancia rutinaria, 2008. <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Estadisticas%20SIVIGILA/Semana%2049%20de%202008.pdf> (accedido el 20/Feb/2013).
- Salazar J. San Pacho: una tierra para la libertad. Experiencia ecológica en el Darién Caribe Colombiano. Madrid: Editorial Académica Española; 2012.
- Álvarez L, Gálvez A. Food sovereignty in a socioecological transformation context in the Caribbean Darién of Colombia. *Agroecology and Sustainable Food Systems* 2014; 38:812-38.
- Gálvez A, Salazar J, Ramírez L. Evangelical churches and conservation in San Pacho (Darién, Colombian caribbean). *Universitas Humanística* 2009; 68:49-67.
- Isaza DM, Restrepo BN, Arboleda M. La leishmaniasis: conocimientos y prácticas en pobladores de la Costa del Pacífico de Colombia. *Rev Panam Salud Pública* 1999; 6:177-84.
- Eco U. La estructura ausente, introducción a la semiótica. 3a Ed. Barcelona: Editorial Lumen; 1986.
- Scott JW. Gender and the politics of history. New York: Columbia University Press; 1988.
- Instituto Interamericano de Cooperación a la Agricultura. La situación de la mujer rural colombiana. In: Foro: Mujer Rural en Colombia: Retos y Compromisos. <http://www.iica.int/Esp/regiones/andina/colombia/Documentos%20de%20la%20Oficina/docs/ia/memorias-foro-mujer-rural-2010.pdf> (accedido el 28/Jul/2013).
- Vélez ID, Hendrickx E, Robledo SM, Agudelo SP. Leishmaniasis cutánea en Colombia y género. *Cad Saúde Pública* 2001; 17:171-80.
- Briceno-León R. La casa enferma: sociología de la enfermedad de Chagas. Caracas: Fondo Editorial Acta Científica Venezolana/Universidad de Texas; 1990.
- Lainson R, Shaw JJ, Ready PD, Miles MA, Póvoa M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild animals and man in north Para state, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of "pian bois". *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75:530-6.
- López I, Robayo M, Vargas M, Vélez ID. Thermotherapy. An alternative for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Trials* 2012; 13:58.
- Den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J. Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:1471-7.
- Marín-Leonett M. Aspectos ambientales, económicos, culturales y de comportamiento que favorecen la transmisión, y medidas de control, en la leishmaniasis tegumentaria. *Rev Soc Méd-Quir Hosp Emerg Pérez de León* 2007; 38:34-8.

Recibido el 30/Jun/2013

Versión final presentada el 22/Ene/2014

Aprobado el 18/Mar/2014

## APÉNDICE D: ARTIGO ENTOMOLOGIA

Artigo para se submeter a Vector Borne and Disease

### **Leishmania vectors, urbanization and clinical aspects in the Colombian Darien Forest region**

Lina Carrillo-Bonilla<sup>1,2,3</sup>, Luz Adriana Acosta<sup>1</sup>, Carolina Torres-Gutierrez<sup>1</sup>,  
María Angélica Contreras-Gutierrez<sup>1</sup>, Horacio Cadena<sup>1</sup> Rafael José Vivero<sup>1</sup>  
Karina Mondragon-Shem<sup>1,4</sup>, Andrés Felipe Vélez<sup>1</sup>, Liliana Lopez<sup>1</sup>, Iván Darío  
Vélez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> PECET (Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales),  
Universidad de Antioquia.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Antioquia. Carrera 75 N<sup>o</sup>  
65-87. Medellín, Colombia.

<sup>3</sup> PhD student. Postgraduate Tropical Medicine. Instituto Oswaldo Cruz,  
Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>4</sup> Current address: Department of Parasitology. Liverpool School of  
Tropical Medicine. England, UK. L3 5QA.

\*Corresponding author Email: linacarrillo@pecet-colombia.org

#### **Abstract**

**Background:** In 2007, an alarming increase in cutaneous leishmaniasis cases was documented in the region of Darien, located in the Northwest Colombia. The high incidence of leishmaniasis represents risks for both the health of the local population and the development of this region, which has recently become a focus of touristic interest. Entomological surveys and clinical studies have been conducted in some localities of this region. **Methods:** This study was developed between 2008 and 2009 and comprised several field trips to the municipality of Acandí, Chocó. We conducted an entomological and an epidemiological study in the field. Adult phlebotomine sandflies were collected using CDC light traps and Shannon traps. An epidemiological survey of the



local population was conducted using Montenegro skin tests and parasitological diagnosis on patients with suspicious skin lesions. Additionally, the parasite strain was determined for each case. Insect collection data were compared with eco-epidemiological data, such as positivity for Montenegro skin tests, human urbanization patterns and weather conditions such as precipitation. **Results:** A total of 4,177 adult phlebotomines belonging to 25 phlebotomine species, 23 of which belonged to the genus *Lutzomyia* (*Lu.*) were collected. Of these sandfly species, the following three have been incriminated in leishmaniasis transmission: *Lutzomyia panamensis*, *Lu. trapidoi* and *Lu. gomezi*. Moreover, the peridomicile and intradomicile presence, abundance and the constant frequency of *Lu. panamensis* suggest its role as the main vector. Although there was a higher abundance of phlebotomine species in the rural area, the semi-urban environment had a higher recorded intradomicile density of vector species. Most of the positive Montenegro skin tests in young children (less than 5 years of age) were also found in the semi-urban environment, where vector species had a significant proportion of the overall insect collections. The presence of *Lu cayennensis cayennensis* stands out as a new record for Chocó. **Conclusions:** Although most of the cases of leishmaniasis are considered to be the outcome of extra-domiciliary transmission, it is important to highlight the presence of intradomicile vectors, which were found to be related to the annual rainy seasons. The presence of *Lu cayennensis* stands out as a new record for Chocó. It is possible to infer that leishmaniasis has three distinct epidemiological transmission cycles for the Chocó region as described here, and the disease cycles are affected by the levels of urbanization as one of the main factors identified in this study.

**Key words:**

Chocó, phlebotomine sandflies, *Lutzomyia panamensis*, Eco-epidemiology, epidemiological risk, leishmaniasis transmission, urbanization

## Background

The subfamily Phlebotominae is represented in America by the following three genera: *Brumptomyia* França and Parrot, 1921, *Warileya* Hertig, 1948 and *Lutzomyia* França, 1924 [1]. Genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) plays a fundamental role in the epidemiological cycle of leishmaniasis, as it comprises some species that are vectors of the *Leishmania* parasites (Protozoa: Trypanosomatidae).

Leishmaniasis is a spectrum of diseases with a worldwide distribution in 99 countries caused by some species of protozoans of the genus *Leishmania*, subgenus *Leishmania* and *Viannia*, which affect the skin, the mucosal tissue and the internal organs [2, 3].

Humans develop a *Leishmania* infection when they are bitten by phlebotomine sandflies that are infected with the parasite. The sandfly vector becomes infected by feeding on the blood of an infected individual (anthroponotic cycle) or an animal reservoir host (zoonotic cycle). When an infected sandfly feeds on a host, its proboscis pierces the skin, the saliva containing an anti-coagulant is injected into the wound to prevent the blood from clotting, and the *Leishmania* promastigotes are transferred to the host along with the saliva. Promastigotes transform into amastigotes, and the latter multiply in cells of various tissues and infect other cells [2, 3].

The ecology of leishmaniasis vectors in tropical countries was originally documented in sylvatic environments, where they fulfill their biological cycle [4-7]. However, the impact of man on the natural environment and sylvatic ecosystems due to deforestation and land-use modifications has generated a notorious increase in human-vector contact as well as changes in the behavior of these insects [8, 9]. The presence of vectors inside houses is an example of a behavior modification, documented for some species of phlebotomines, which is due to the alteration of the wild environments, which favors the incidence of transmission of leishmaniasis [10, 11]. The urbanization process, landscape modification for agricultural expansion and vector adaptation to peridomestic environments have often been proposed as important factors increasing the probability of urban and peri-urban leishmaniasis transmission in South America [12, 13]. Consequently, there is a need to further study such risk factors in the epidemiology of leishmaniasis, especially in regard to its most frequent clinical manifestation, which is cutaneous leishmaniasis [14, 15].

In Colombia, leishmaniasis is endemic, and it affects mainly human populations that inhabit rural and sylvatic areas [16]. In the sylvatic regions of Colombia, economic and social conditions are precarious, and health services are scarce or nonexistent. In such circumstances, poor human populations rarely have the opportunity to be diagnosed or treated when suffering from leishmaniasis. This underdiagnosis leads to under-reported statistics of the disease incidence to such a great extent that in some rural areas, approximately only one out of ten cases is diagnosed, and thus a very small portion of cutaneous leishmaniasis (CL) is treated [Vélez ID, personal communication]. CL is recognized as the most common clinical form of the disease in Colombia with 14000 cases recorded annually (on average) by the National Institute of Health, between 2006 and 2015 [17]. In the province of Chocó, populations live in great biodiversity but in extreme poverty and alarming social conditions; local ecological factors, such as vegetation, altitude, geomorphology and weather, favor the abundance of fauna and flora, which in turn, determine the presence of parasites, vectors and reservoirs [18]. Therefore, in such environments, the local transmission of tropical diseases such as leishmaniasis is expected. Despite this natural richness, this region has a poor health service coverage [19], with an extremely low official report of *Leishmania* cases (18 cases in 2009) [20].

In tropical areas where leishmaniasis is endemic, studies on vector species that address their distribution, ecology, and behavior as well as their association with human environments, which are factors that determine the epidemiological risk, are needed. The present study aimed to determine the composition and geographical and seasonal distributions of phlebotomine species within one region characterized by distinct urbanization patterns and to correlate these factors with epidemiological data.

## **Materials and Methods**

### **Area of study**

The study was developed in the municipality of Acandí (8°53' N, 77°23' W) located in the extreme north of the province of Chocó, on the border with Panamá in an area between the Caribbean Sea and the Pacific Ocean (Figure 1). This area presents on average 2.926 mm of rain each year, an average temperature of 28°C, 90% of RH and is located at 20 m.a.s.l. where a dry period is expected to occur from December to March and the annual rainy season is expected from April to November. Due to the geographical

conditions, Acandí is influenced by the global phenomena of El Niño and La Niña, which directly determine the inter-annual variation of rainfall patterns in the Colombian Darien region [21, 22].

The municipality has a total area of 1551 Km<sup>2</sup> and a population of 9,000 habitants of whom 4,500 live in the rural area. Acandí belongs to the ecoregion called Darien on the Caribbean coast [23]. Within the municipality of Acandí, the villages of El Aguacate, Sardí-Trigana and San Francisco were selected as the areas of this study. 1) El Aguacate is an area that extends from the seashore to the middle parts of the mountains, connected to an area greater than 200 hectares of preserved forest fragment with different species. Houses are built mainly with wood and are separated from one another by forest patches, thus fragmenting the sylvatic environment. Such houses are in the middle of the forest where settlers established their living with an estimated population of 100 inhabitants. The region is mainly touristic and will be termed "sylvatic". 2) Sardí-Trigana is 1,200 meters from the shoreline and is similar to a rural area, with food crops in the peridomicile, and houses built of brick and wood. The local economy in this part of the region is primarily agricultural. This area will be termed "rural", where settlers and Afro-descendants live with 350 inhabitants as the estimated population. 3) San Francisco has houses built of brick, close to one another and grouped in blocks divided by streets, with water, electricity and telephone utilities. A third of the aforementioned area is mostly urbanized. This area, termed "semi-urban", has 1280 inhabitants mainly formed by settlers and Afro-descendants. The detailed description of this particular area and its human population can be found in Álvarez-Salas and Gálvez-Abadía [24].

### **Entomological monitoring**

The field work of this study took place between September 2008 and November 2009 with bimonthly entomological surveys. A total of 54 houses were sampled, 18 houses in each of the sampled localities (sylvatic, rural and semi-urban), all of which were selected according to the presence of active or previous leishmaniasis cases diagnosed by our research team or by the health authorities of the area.

On three consecutive nights, 15 CDC light traps were distributed in three houses in each of the sampled localities, one in the intradomicile and four in the peridomicile, between 18:00 h and 06:00h. Similarly, 1-4 CDC traps were placed in the extra-domiciliary of each household depending on the type of extradomicile area. Additionally, Shannon traps were set in extradomicile areas between 18:00 h and 22:00h. The peridomicile is the

space located in the immediate surroundings of houses where communities usually have survival gardens, domestic animals and their social activities related to entertaining and leisure. The extradomicile is the wild area (not completely modified by the communities) around or close to the houses where there is local vegetation or wild landscape. A total of 8.100 hours of CDC intra- and peridomicile trapping were conducted.

With the aim of comparing the entomological results between localities, we used the CDC intra- and peridomicile results of vector species, as *Lu. panamensis*, *Lu. gomezi*, *Lu. trapidoi*, expressed as vectors/trap/night.

All specimens were preserved in 70% alcohol, and the samples were transported to the medical entomology laboratory of PECET (Program for the Study and Control of Tropical Diseases), University of Antioquia. The samples were processed and identified following the taxonomic keys of Young and Duncan [25]. The vouchers were deposited in the Vectors and Host Intermediate Collection of Tropical Disease (VHET) of PECET, Medellin, Colombia.

### **Study of clinical aspects**

In each of the sampled localities (sylvatic, rural, and semi-urban), an epidemiological survey was conducted using the Montenegro skin test (MST) [26]. The antigen was prepared by the Program for the Study and Control of Tropical Diseases (PECET) previously described by Ramirez JA et al. 2000 [27] from a pool of autoclaved *Leishmania (Viannia) panamensis* (reference strain Mhom/PA/71/LS94), obtaining a final concentration of  $2 \times 10^6$  promastigotes/ml. The antigen was stored at 40°C until use. A dose of 0.1 ml of antigen and a control solution (physiological saline containing 0.5% of phenol) were administered intradermally in the forearms. Delayed-type hypersensitivity reactions were read after 48 hours, using the ball-point pen method to define the area of induration [28]. The test was considered as positive when induration sizes were  $\geq 5$  mm [29]. The aim of the is to determine the prevalence of the infection by *Leishmania* spp. and to identify the population group with the highest risk of infection. Additionally, an active patient search was performed, seeking out skin lesions suspected as leishmaniasis. For the diagnostics, smear samples were taken, which were cultured in an NNN medium, and Polymerase Chain Reaction (PCR) was then performed; the detection of parasites was performed using the PCR primers Jw11 and Jw12 [30]. The confirmation of parasite species was performed by isoenzyme techniques in the “Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose” (Rio de

Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz) as described by Cupolillo et al. [31]. Moreover, we conducted PCR amplification and posterior sequencing of a fragment of the Hs70 gene, using primers previously described by Graça et al. [32].

### Statistical analysis

The relative abundance ( $P_i$ ) of all collected species in each sampled locality was calculated as follows:  $P_i = N_i/N$ , where  $N$  is the total sum of individuals of all the species and  $N_i$  is the number of individuals of one species. Sampling effort was calculated as the number of phlebotomines collected per CDC light trap per night per locality. The Sorensen similarity index [ $C_s = 2j/[a+b]$ ] was applied to demonstrate similarities between populations of phlebotomines and sampling sites (localities), where  $j$  is the number of species found in both strata;  $a$  is the number of species found in locality A; and  $b$  is the number of species found in locality B. When the indexes are equal to one, there is perfect similarity between the strata, and if the indexes of the area are equal to zero, there is a perfect dissimilarity [33].

For the analysis of the relationship between precipitation and the abundance of vector species (according to capture effort), monthly rainfall data from the last ten years were used (1999-2009) obtained from the weather stations of Titumate (a small town located approximately 9 Km away from the study area and Acandí and daily precipitation records from the station of Acandí for the years 2008-2009 as reported by the Institute of Hydrology, Meteorology and Environmental Studies (IDEAM, Colombia) [34]. Data were tabulated, and the 25th, 50th and 75th percentiles were calculated using a box and whisker plot to categorize the degree of pluviosity as high (>443 mm), medium (143-442 mm) or low (1-142 mm) intensity. With these categories, a chi-square test was performed to determine differences between the degree of pluviosity and the total numbers of vector and non-vector phlebotomines using the SPSS15.0 software. This same methodology was used to determine the significant differences between the positivity of the Montenegro skin test with groups of age and gender.

The analysis considered the Oceanic Niño Index (ONI) of the Equatorial Pacific supplied by the Climate Prediction Center of the NOAA. Through this index, an episode of El Niño–Southern Oscillation (ENSO) or La Niña were defined as an anomaly of the surface temperature of the East Equatorial Pacific that lasts at least five consecutive months with a value superior to  $0.5^\circ\text{C}$  [35].

The D factor was calculated with the following formula:  $D = \frac{[\text{SUM } [\text{DCPi}] - \text{SUM}[\text{Ni}]]}{\text{SUM}[\text{Ni}]}$ , where DC*Pi* is the total number of consecutive days without precipitation each month; *i* is the chosen period of days; and *Ni* is the frequency of days with no precipitation [36]. The persistence in days with no precipitation was recorded manually for a period from 2008 to 2009. The D factor allowed us to know if the rain was well distributed  $0.0 < D < 1.0$  and if there is no soil moisture deficit; Conversely,  $D > 1.0$  indicates predominantly dry days, with the possibility of a drought. The results were compared with sandfly abundance and total monthly precipitation.

## Results

### Entomological study

Twenty-five species of phlebotomine sandflies were captured, of which 23 belonged to the genus *Lutzomyia* and two to the genus *Brumptomyia*, grouped in 11 subgenera and four taxonomic groups of the Phlebotominae subfamily (Table 1).

A total 4.177 individuals were collected, with 96% from the *Lutzomyia* genus and a 2:1 female-to-male ratio. The following seven of the 23 species exhibit anthropophilic behavior and have been incriminated as vector species: *Lutzomyia panamensis*, *Lu. gomezi*, *Lu. trapidoi*, *Lu. ovallesi*, *Lu. olmeca bicolor*, *Lu. sanguinaria* and *Lu. ylephiletor* [37-41]. Fifty percent of the collected specimens were vector species. The most abundant species were *Lu. panamensis* (37%) and *Lu. carpenteri* (14%) (Figure 5). We found that the area with the highest vector abundance, estimated according to the collection effort, was the rural area (6.9 vector sandflies/trap/night), followed by the sylvatic area (3.1 vector sandflies/trap/night), and finally the semi-urban area (0.95 vector sandflies/trap/night). However, the vector abundance in the intradomicile was higher in the semi-urban area (1.36 vector sandflies/trap/night) than in the sylvatic area (0.76 vector sandflies/trap/night). Additionally, the species composition is presented on the graph 1 and 6 for each one of the study areas. The sylvatic environment has 19 *Lutzomyias* species, but this number decreased in the rural area (n=16), with the lowest composition observed in the semi-urban environment (n=13). Most of the species that were not in the semi-urban area were not vector species. Moreover, when comparing the number of vector species collected in the three different study areas, the proportion of intra- and peridomicile vector species vs.

non-vector species was 2:1 in the urban area, whereas in the sylvatic environment, this value was the opposite (1:2).

#### Distribution of phlebotomine species with relation to the collecting method and their proximity to the domicile

Most individuals (88%) were captured with CDC traps, including all of the *Lutzomyia* species. The majority of the species captured in Shannon traps have been reported to exhibit anthropophilic habits (Table 1).

Regarding proximity to dwellings, the most captures were made in the peridomicile (85%), where most species of medical importance were also collected as follows: *Lu. panamensis*, *Lu. trapidoi*, *Lu. gomezi*, *Lu. olmeca bicolor*, *Lu. sanguinaria* and *Lu. ylephiletor*. Figure 2 shows the abundance of individuals of vector species collected with CDC traps in the intra- and peridomicile, according to the site of capture in the semi-urban, sylvatic and rural areas. We can observe that in the rural and sylvatic areas, there is a higher vector abundance in the peridomicile than in the intradomicile. The opposite is observed in the semi-urban area, where there is a higher abundance of vector species in the intradomicile.

Using the Sorensen index, it was possible to find similarities between phlebotomine communities and the study sites. According to the results, the similarity is higher between sampling sites in the rural and the semi-urban areas (SSo = 0.848), and rural and sylvatic areas (SSo = 0.717).

#### Association between precipitation and the abundance of *Lutzomyia* species

According to the values of precipitation over the last ten years (accumulated precipitation) reported by IDEAM for the area of study, Acandí exhibits medium-to-high rainfall for most of the year and only one dry period from January to March. In Figure 3, the accumulated monthly rainfall is presented for the years 2008 and 2009 as well as the number of vectors/trap/night/month of capture. The monthly variation in vector abundance related to rainfall showed the highest peaks during the rainy periods, for example in Nov 2008 and Sep 2009. According to the National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) and the Oceanic Niño Index (ONI), the period between June and December of 2009 corresponded to the El Niño phenomenon. However, the decrease in rainfall for this



region was evident until November 2009, when the lowest percentage of phlebotomine collections were recorded.

No statistically significant ( $p < 0.001$ ) differences were found for the capture abundance between vector and non-vector species in terms of rainfall intensity.

#### Association between capture of vector sandflies of the *Lutzomyia* genus and positivity of the Montenegro skin test

Of the 230 MST applied, 29% were positive. The positivity rate was significantly higher for men (35%) than women (22%) ( $p < 0.04$ ). Eight of the 44 children under the age of five (18%) tested positive, with the highest positivity for children occurring in the semi-urban area (Table 2). There was no statistically significant association between the prevalence of *Leishmania* infection with indoor collections of sandflies. However, there was a significant positive association between the MST and age groups ( $p = 0.006$ ) and between the MST in children under the age of five and vector domiciliation, and a negative association between MST in adults and vector domiciliation (Figure 4). When MST results are compared across age groups and localities, a significant result is observed for only the rural area ( $p = 0.03$ ).

The MST was repeated one year later in the semi-urban and sylvatic areas on people with previously negative results, and MST conversion was found to be 22% in the semi-urban area and 33% in the sylvatic area.

#### **Human cases**

Thirty-six people with active lesions were evaluated, of which 16 had proven leishmaniasis diagnosis: 13 from culture and three from smear tests. The type of skin lesion that predominated was frank ulceration with regional lymphadenopathy, localized on the inferior and superior limbs for CL and compromised the nasal anterior septum for MCL in one case. Most of the leishmaniasis cases occurred in the semi-urban locality, 10 cases; four cases were found in the rural locality; and two more cases were found in the sylvatic locality.

Considering the 16 cases found in this study, 10 cases were recorded in the semi-urban environment, which means that 0.7% of the total population for this specific locality

was positive. In the rural environment, the 1.42% (5 individuals) of the population was diagnosed with leishmaniasis, and in the sylvatic area, only 1% (1 individual) of the population tested positive for the disease.

All of the 13 isolated strains were identified as *L. panamensis*, and 16 positive patients were successfully treated with a Miltefosine® dosage according to the official recommendation by the National Ministry of Health [42].

## Discussion

The geographical position of the municipality of Acandí, with the tropical forest and the specific characteristics of its weather, maintains an ecological environment that has allowed the establishment of several animal species, showing a high level of heterogeneity in biotic communities [43]. The region is endemic for *L. panamensis*; however, no eco-epidemiological studies have been performed in this region to understand the transmission dynamics. This study found a high abundance and diversity of phlebotomine species as follows: in a sampling area of less than 30Km<sup>2</sup>, 23 species were found, representing 16% of the total sandfly diversity in Colombia [44] and nearly all of the number of species reported for El Salvador, Nicaragua and Guatemala [45]. Even in leishmaniasis-endemic countries in which extensive sandfly sampling has been performed, such as Brazil, the diversity in an area analogous in size to the one in this study does not reach such high values [46, 47]. Additionally, within the same region of Chocó, in a different locality, a study by Duque et al. [48] documented 40 species of phlebotomines, which shows the high diversity of phlebotomines in this region. Such information on species diversity is consistent with the ranking of Colombia as one of the few mega-diverse countries around the globe and one of the countries with the highest diversity of *Leishmania* species [25,49].

Chocó is an area of considerable leishmaniasis transmission risk that presents very high underreporting, with an average of 18 CL cases in 2008 for the whole province [20], whereas in this study alone, we confirmed sixteen cases. All patients were diagnosed with *L. panamensis*, a species with previous records of causing cutaneous and mucosal lesions in human infections [48]. According to the MST results, the highest positivity was found in the sylvatic area (El Aguacate), where more than half of the people surveyed older than 16 years of age were positive for the test. In contrast, in the semi-urban area

(San Francisco), one of the areas highest in vector domiciliation (Figure 4), we found the greatest MST positivity in children younger than five years of age. This fact is indicative of intradomicile transmission given that small children spend most of their time inside houses or close to their homes. The records of people with positive MST confirmed that the communities of El Aguacate, Sardi and San Francisco localities with a high risk of leishmaniasis. This risk may be associated with the geographic location, agricultural activities and a high presence of wild and synanthropic reservoirs and sandflies that are part of the wildlife of the ecoregion of Darien.

The highest rate of CL prevalence in children occurs when human–vector contact takes place in the intradomiciliary environment. This has been previously described in studies conducted by PECET around the country, where *Lu. panamensis* was found as a vector with the highest biting activity between 18:00 h and 21:00h, a time when children are bitten inside their homes [50]. In Figure 4, it is possible to observe how with increasing urbanization, a higher domiciliation of vectors and the proportion of vector/non-vector species and prevalence of positive MST in children occur. The adaptability of vector species to new environments should be noted.

Similar to the findings of this study, other regions of Brazil and Colombia have reported the adaptation of vectors to urban areas for species, such as *Lu. longipalpis*, *Lu. evansi*, *Lu. whitmani*, and *Lu. intermedia*, which were originally associated with sylvatic areas, but now appear adapted to the domestic environments of urban and peri-urban foci of cutaneous and visceral leishmaniasis [47, 51-54].

The most frequent and abundant species inside houses were *Lu. panamensis*, *Lu. trapidoi* and *Lu. gomezi*, which correspond to the most important species in terms of vectorial capacity in Colombia [40, 54]. Several facts regarding the species *Lu. panamensis* should be highlighted, such as its presence and abundance in peridomicile and intradomicile environments; its high frequency during all captures; and its well-known vectorial capacity to transmit *L. panamensis* in Colombia and Panama [37, 40, 53]. All of these facts suggest that *Lu. panamensis* adapts more easily to disturbed areas than other phlebotomine species captured in this study.

The dominance of *Lu. panamensis* in this area has been previously reported by Vivero et al. [55], contrasting results by Duque et al. [48], who reported *Lu. reburra* as the predominant phlebotomine in the same province on the Pacific Coast side, which is a natural reserve; however, the latter species is not recognized as a leishmaniasis vector. Acandí is a place with high levels of deforestation due to indiscriminate forest exploitation, and where population growth has led to the increased construction of villages and housing accommodations. It is interesting to note how the natural phlebotomine composition decreases when the wild environments become semi-urban or even urban and sandfly species with vectorial competence such as *Lu. panamensis* appear to be the ones with a higher ability to adapt to these anthropic changes as it can be clearly seen in figure 6.

We report *Lu. cayennensis*, captured with CDC light traps in the intradomicile and peridomicile, as a new record for the province of Chocó. This species has a wide distribution in Central America and Northern South America and has been found sharing habitats with *Lu. evansi* [56] and *Lu. longipalpis* in visceral leishmaniasis foci [57]. In Sucre County, Colombia, Cochero et al. [58] documented the natural infection of this species with an unidentified flagellate parasite.

In regards to the rainfall records and phlebotomine abundance, we found a tendency showing that the El Niño phenomenon caused a decrease in the abundance of vector sandflies. This is notable when looking at the collection success rate of November 2008 compared to that of November 2009, where there is a dramatic decrease in 2009 when El Niño was recorded. However, further studies are needed to verify the association between this phenomenon to sandfly density and the number of leishmaniasis cases in the study areas. This contrasts with data found by Cardenas et al. [59] who registered an increase in leishmaniasis cases during El Niño in the eastern region of Colombia. This study reports a wholly different conclusion when compared to our data, considering that a decrease in the number of vector species would also bring a decrease in the number of cases.

Chocó county should not predict its number of cases according to months or weeks, as is usually performed by local health authorities, but according to rainfall patterns, which becomes more important in the context of the current climate change phenomenon. For example, Acandí increased from an average of 2,211 mm in rainfall in 1999 to 2,783 mm in

2009 [34]. Other authors have also highlighted the abundance of phlebotomine species during rainfall cycles in the Caribbean coast of Venezuela [60].

With the evidence presented in this study, it is possible to infer that leishmaniasis has three distinct epidemiological transmission cycles occurring in the study area, Acandí. This area shares the known biogeographical conditions for the ecoregion of Darien, and regarding the phlebotomine diversity, our study showed similar species abundance and composition among the sampling localities as showed with the Sorensen index values. However, the proportion of vector species vs. non-vector species differs in these three epidemiological cycles, being notoriously higher in intradomiciliary spaces in the urban area, thus suggesting a higher risk for such an environment.

Our findings show that the disease cycles are affected by the levels of urbanization as one of the main factors identified in this survey.

In the sylvatic area of El Aguacate, an extra-domiciliary transmission cycle predominated, affecting mainly adult men, and therefore, prevention and control measures in such areas should include promoting the use of repellents and appropriate clothing when working in or visiting these environments. In contrast, in Sardi-Triganá (rural) and San Francisco (semi-urban), the transmission cycle occurred predominantly in the peridomicile and the intradomicile, and populations at risk included women and children due to the endophagic and endophilic habits of the main vector, *Lu. panamensis*. However, in the rural area (Sardi-Trigana), where the highest vector abundance was recorded, prevention measures should be directed at vector control, such as insecticide spraying inside the house and the use of insecticide impregnated bednets.

Other authors have previously described the adaptation of phlebotomine sandflies to environmental changes, such as the contributions of Kamhawi et al. [61], Boussaa et al. [62] and Abou-El-Naga [15]. These authors found that the demolition and reconstruction of human habitation decreased sandfly populations initially, but later, sandfly populations recovered and expanded beyond pre-construction levels. Moreover, In Israel, Orshan [63] recorded a sharp increase of phlebotomines among sites of a sewer pipe system construction. In this study, the author described how in the same biogeographic area, at the same period of time, a number of species were coexisting with drastic differences in

behavior according to differences in the urban conditions of the environment. They also highlighted the fact that vector species were found to adapt faster to urban spaces.

Our study sheds light on the effect of urbanization on the entomological parameters of the transmission and the composition of the vector system. These results describe three cycles of disease transmission mainly related to transformed ecosystems and a potential process of domiciliation of vector species and their substantial differences, which should be taken into consideration when implementing vector control measures.

### **Abbreviations**

In the text.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank to community of Acandí, Chocó and the “Secretaria de Salud” of Chocó. We thank Juvenal, Juan E Perez and Daniel Agudelo for your contribution during collection of samples. This work was supported by grants from COLCIENCIAS, Colombia.

### **Funding**

This study was supported by COLCIENCIAS Code: 11540820520

### **Availability of data and material**

The datasets during and/or analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request

### **Authors' contributions**

LCB. Research Formulation, Proposal elaboration and Coordination, collection of samples. LAA. Collection of samples, taxonomic identification. CTG. Research formulation and proposal elaboration, taxonomic identification. MCG-. Taxonomic identification.

HC. Collection of samples, taxonomic identification. RV. Taxonomic identification. KM-Collection of samples. AV. Collection of samples. LL. Statistical analysis. IDV. General direction. All authors wrote, read and approved the final version of the manuscript.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Consent for publication**

Not applicable.

**Ethics approval and consent to participate**

These studies received ethical approval from Animal Ethics Committee at the University of Antioquia record No. 38 of August 9, 2007. Cooperation agreement between the Social Department of Health and Safety of Chocó and Program of Study and Control of Tropical Diseases (PECET spanish acronym,) at the University of Antioquia.

## REFERENCES

1. Lewis DJ, Young DG, Fairchild GB, Minter DM. Proposals for a Stable Classification of the Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae). *Syst Entomol.* 1977;2:319-32.
2. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27(5):305-18.
3. Lainson R, Shaw JJ. New world leishmaniasis. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D, editors. *Microbiology and microbial infections, parasitology.* London: Auckland; 2005. p. 313-49.
4. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol.* 1990;4(1):1-24.
5. Memmott J. Patterns of sandfly distribution in tropical forest: a casual hypothesis. *Med Vet Entomol.* 1992;6:188-194.
6. Ferro C, Cárdenas E, Corredor D, Morales A, Munstermann LE. Life cycle and fecundity analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93(2):195-99.
7. Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad Saude Publica,* 2000;16(4):925-950.
8. Travi BL, Adler GH, Lozano M, Cadena H, Montoya-Lerma J. Impact of habitat degradation on phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forests in Northern Colombia. *J Med Entomol.* 2002;39:451-56.
9. Chaves LF. Phlebotomine sand fly species co-occurrence at the local scale: Differences between agricultural and forested areas. *B Malariol Salud Amb.* 2011;51(1):35-39.
10. Duque P, Vélez ID, Morales M, Sierra D. Sand flies fauna involved in the transmission of cutaneous leishmaniasis in Afro-Colombian and Amerindian communities of Chocó, Pacific coast of Colombia. *Neotrop Entomol.* 2004;33:255-64.
11. Yadon ZE, Rodríguez LC, Davies CR, Quigley MA. Indoor and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis in northwestern Argentina: A retrospective case control study. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68(5):519-26.
12. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001 May-Jun;95(3):239-43
13. Shaw JJ, De Faria DL, Basano SA, Corbett CE, Rodrigues CJ, Ishikawa EA, Camargo LM. The aetiological agents of American cutaneous leishmaniasis in the municipality of Monte Negro, Rondônia state, western Amazonia, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol.* 2007;101(8):681-8.



14. Ferro C, López M, Fuya P, Lugo L, Cordovez JM, González C. Spatial Distribution of Sand Fly Vectors and Eco-Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis Transmission in Colombia. *PLoS One*. 2015;doi:10.1371/journal.pone.0139391.
15. Abou-El-Naga IF. Demographic, socioeconomic and environmental changes affecting circulation of neglected tropical diseases in Egypt. *Asian Pac J Trop Med*. 2015;8(11):881-8.
16. Vélez ID, Carrillo LM, López L, Rodríguez E, Robledo SM. An epidemic outbreak of canine cutaneous leishmaniasis in Colombia caused by *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86(5):807-11.
17. INS - Instituto Nacional de Salud: Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. SISTEMA DE VIGILANCIA EN SALUD PÚBLICA – SIVIGILA. Vigilancia rutinaria. Bogotá D.C. 2015. <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Leishmaniasis%20viceral/01%20protocolo%20Leishmaniasis.pdf>. Accessed 23 Mar 2016.
18. Travi BL, Montoya J, Solarte Y, Lozano L, Jaramillo C. Leishmaniasis in Colombia. I. Studies on the phlebotomine fauna associated with endemic foci in the Pacific Coast region. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;39: 261-6.
19. Martínez JA. Monitoreo al sistema de salud en el departamento del Chocó: 1998-2004. Ensayos Sobre Economía Regional. Centro Regional de Estudios Económicos CREE Medellín, Colombia. Banco de la República. 2005(33);1-24.
20. INS - Instituto Nacional de Salud:Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. SISTEMA DE VIGILANCIA EN SALUD PÚBLICA – SIVIGILA. Vigilancia rutinaria. Bogotá D.C. 2009. <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Paginas/vigilancia-rutinaria.aspx>. Accessed 28 Mar 2016.
21. Guarín Giraldo GW, Poveda G. Variabilidad Espacial y Temporal del Almacenamiento de Agua en el Suelo en Colombia. *Rev Acad Col Cien*. 2013;37:89-114.
22. Rueda OA, Poveda G. Variabilidad espacial y temporal del chorro del "Chocó" y su efecto en la hidroclimatología de la región del pacifico Colombiano. *Meteor Col*. 2006;10:132-45.
23. DANE - Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Censo General. Colombia. 2005.<http://www.dane.gov.co/censo/files/libroCenso2005nacional.pdf>. Accessed 15 Apr 2016.
24. Álvarez-Salas L, Gálvez-Abadía A. Food sovereignty in a socioecological transformation context in the Caribbean Darién of Colombia. *Agroecol Sust Food*. 2014;38(7):812-38.

25. Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). 1st ed. Mem Am Entomol Inst.1994.
26. Montenegro JA. Cutis reacao na leishmaniose. Ann Fac Med Sao Paulo. 1926;1:323-30.
27. Ramirez JR, S Agudelo, C Muskus, JF Alzate, C Berberich, D Barker, and ID Velez. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. J. Clin. Microbiol. 2000;38:3768-377
28. Sokal JE. Editorial: Measurement of delayed skin-test responses. N Engl J Med. 1975;293(10):501-2
29. WHO - World Organization of health Control of the Leishmaniasis. Title of subordinate document. In: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. WHO Technical Report Series. 2010. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf). Accessed 23 Apr 2016.
30. Nicolas L, Milon G, Prima E. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by Light Cycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. J Microbiol Methods. 2002;51:295-99.
31. Cupolillo E, Grimaldi GJr, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. Am J Trop Med Hyg. 1994;50:296-311.
32. Graça GC, Volpini AC, Romero GA, Oliveira Neto MP, Hueb M, Porrozzi R, et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107(5):664-74.
33. Magurran A. Ecological diversity and its measurement. 1st ed. Princeton University Press: Croom Helm;1988.
34. IDEAM - Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Sistema de Información Nacional Ambiental. Colombia. 2010. <http://institucional.ideam.gov.co>. Accessed 2 Apr 2016.
35. NOAA – National oceanic and atmospheric administration Camp Springs, Maryland: National Weather Service. National Centers for Environmental Prediction Climate Prediction Center. Climate Prediction Center Internet Team. US Camp Springs, Meryland. 2016.

[http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis\\_monitoring/ensostuff/ensoyears.shtml](http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis_monitoring/ensostuff/ensoyears.shtml).

Accessed 14 Apr 2016.

36. Panofsky HA, Brier GW. Some applications of statistics to meteorology. 1st ed. Earth and Mineral Sciences Continuing Education, College of Earth and Mineral Sciences; 1968.
37. Christensen HA, Fairchild GB, Herrer A, Johnson CM, Young DG, Vásquez AN. The ecology of cutaneous leishmaniasis in the Republic of Panama. *J Med Entomol.* 1983;20(5):463-84.
38. Young D, Arias R. Flebotomos: vectores de Leishmaniosis en las Américas. Organización Panamericana de la Salud (OPS): Cuaderno técnico, Washington. 1992;3(33):1-26.
39. Montoya-Lerma J, Ferro C. Flebótomos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. In: Amat G, Andrade MG, Fernández F, editors. *Insectos de Colombia*. Vol II, Colección Jorge Álvarez Lleras N°13. Santafé de Bogotá: Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; 1999. p. 211-45.
40. Santamaría E, Ponce N, Zipa Y, Ferro C. Presencia en el peridomicilio de vectores infectados con *Leishmania (Viannia) panamensis* en dos focos endémicos en el occidente de Boyacá, piedemonte del valle del Magdalena medio, Colombia. *Biomedica.* 2006;26(1):82-94.
41. Feliciangeli MD, Rodríguez N, Bravo A, Arias F, Guzmán B. Vectors of cutaneous leishmaniasis in north-central Venezuela. *Med Vet Entomol.* 1994;8:317-24.
42. MPS - Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional Salud. 2010. República de Colombia. Guía de Atención Integral de Leishmaniasis. <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Leishmaniasis%20viceral/02%20Clinica%20Leishmaniasis.pdf>. Accessed 28 Mar 2016
43. Condit R, Hubbell SP, Foster RB. Changes in a tropical forest with a shifting climate: results from a 50 ha permanent census plot in Panamá. *J Trop Ecol.* 1996;12:231-256.
44. Bejarano EE. Lista actualizada de Psicódidos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. *Folia Entomol Mex.* 2006;45(1):47-56.
45. Balard Y, Bermúdez H, Dedet JP, Façao AL, Feliciangeli D, Ferro C, et al. CIPA group, Computer-aided Identification of Phlebotomine sand flies of America. 1999. <http://cipa.snv.jussieu.fr>. Accessed 7 Apr 2016.
46. Filho JD, Brazil RP. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of Alagoas State, Northeast of Brazil. *Neotrop Entomol.* 2009;38(5):688-90.

47. Balbino VQ, Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Marques da Silva W, Marcondes CB. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Atlantic forest in Recife, Pernambuco state, Brazil: the species coming to human bait, and their seasonal and monthly variations over a 2-year period. *Ann Trop Med Parasitol.* 2005;99(7):683-93.
48. Duque P, Velez I, Morales M, Sierra D. Sand flies fauna involved in the transmission of cutaneous leishmaniasis in Afro-Colombian and Amerindian communities of Chocó, Pacific Coast of Colombia. *Neotropical Entomology* 2004;33: 263-264.
49. Olson, David M, et al. Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth A new global map of terrestrial ecoregions provides an innovative tool for conserving biodiversity." *BioScience.* 2001;51(11): 933-938.
50. Vélez ID, Hendrickx E, Robledo SM, Agudelo S. Leishmaniasis cutánea en Colombia y género. *Cad Saúde Pública.* 2001;17(1):171-80.
51. Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez ID. Presence of *Lutzomyia evansi*, a vector of American visceral leishmaniasis, in an urban area of the Colombian Caribbean coast. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001a;95:27-8.
52. Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez ID. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban Leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:645-7.
53. Sandoval CM, Angulo VM, Gutiérrez R, Muñoz G, Ferro C. Especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) posibles vectores de leishmaniasis en la ciudad de Bucaramanga, Santander, Colombia. *Biomedica.* 1998;18(2):161-68.
54. Vélez ID, Ospina S, Henao G, Le pape P, Correa M, Wolff M. Epidemiología de la Leishmaniasis cutánea en San Roque, Antioquia. *Bol Epidemiol Antioquia.* 1987;12(4):354-59.
55. Vivero R, Muskus C, Torres C. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) en Acandí (Chocó, Colombia). *Acta Biol Colom.* 2011;16(1):209- 18.
56. Travi BL, Adler GH, Lozano M, Cadena H, Montoya-Lerma J. Impact of habitat degradation on phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forests in Northern Colombia. *J Med Entomol.* 2002;39(3):451-6.
57. Ferro C, Morrison AC, Torres M, Pardo R, Wilson ML, Tesh RB. Species composition and relative abundance of sand flies of the genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus

58. Cochero S, Anaya Y, Díaz Y, Paternina M, Luna A, Paternina LE, et al. Infección natural de *Lutzomyia cayennensis cayennensis* con parásitos tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en Los Montes de María, Colombia. Rev Cubana Med Trop. 2007;59(1):35-39.
59. Cardenas R, Sandoval CM, Rodríguez-Morales AJ, Franco-Paredes C. Impact of climate variability in the occurrence of leishmaniasis in northeastern Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2006;75(2):273-7.
60. Gonzalez R, De Sousa L, Devera R, Jorquera A, Ledezma E. Seasonal and nocturnal domiciliary human landing/biting behaviour of *Lutzomyia (Lutzomyia) evansi* and *Lutzomyia (Psychodopygus) panamensis* (Diptera; Psychodidae) in a periurban area of a city on the Caribbean coast of eastern Venezuela (Barcelona; Anzoátegui State). Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999;93(4):361-4.
61. Kamhawi S, Abdel-Hafez SK, Molyneux DH. Urbanization--how does it affect the behaviour of sandflies? Parasitologia. 1991;33 Suppl:299-306.
62. Boussaa S, Pesson B, Boumezzough A. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of Marrakech city, Morocco. Ann Trop Med Parasitol. 2007;101(8):715-24.
63. Orshan L. A sharp increase in the natural abundance of sand flies in Kfar Adummim, Israel. J Vector Ecol. 2011 Mar;36 Suppl 1:S128-31.

**Table 1. Sandfly species and their relative abundance [Pi] insylvatic, rural and semi-urban areas in the municipality of Acandí, Chocó [2008-2009]**

Code	Species	Capture method				Capture locality			Total Sand flies	Pi [%]
		CDC			Shannon	Sylvatic	Rural	Semiur		
		I	P	E						
s1	<i>Br. hamata</i>	4	38	1	-	35	3	5	43	1.0
s2	<i>Br. mesai</i>	2	126	-	-	123	1	4	128	3.1
s3	<i>Lu. aclydifera</i>	2	3	-	-	2	-	3	5	0.1
s4	<i>Lu. aragaoi</i>	2	-	-	-	2	-	-	2	0.05
s5	<i>Lu. atroclavata</i>	7	-	-	-	7	-	-	7	0.2
s6	<i>Lu. camposi</i>	16	193	21	7	137	75	25	237	5.7
s7	<i>Lu. caprina</i>	1	-	-	-	1	-	-	1	0.02
s8	<i>Lu. carpenteri</i>	48	489	39	-	465	74	38	576	13.8
s9	<i>Lu. cayennensis</i>	4	1	-	-	3	2	-	5	0.1
s10	<i>Lu. dysponeta</i>	1	2	-	-	3	-	-	3	0.1
s11	<i>Lu. gomezi</i> * + °	25	120	6	10	118	28	15	161	3.9
s12	<i>Lu. isovespertilionis</i>	1	19	2	-	19	3	-	22	0.5
s13	<i>Lu. micropyga</i>	-	9	-	-	2	1	6	9	0.2
s14	<i>Lu. olmeca bicolor</i> °	2	96	2	1	52	37	12	101	2.4
s15	<i>Lu. panamensis</i> * + °	181	975	61	335	472	961	119	1552	37.2
s16	<i>Lu. sanguinaria</i> +	1	32	1	1	12	21	2	35	0.8
s17	<i>Lu. shannoni</i>	1	11	-	1	7	4	2	13	0.3
s18	<i>Lu. trapidoi</i> * +	27	206	21	9	84	169	10	263	6.3
s19	<i>Lu. trinidadensis</i>	11	303	1	-	38	43	239	315	7.7

s20	<i>Lu. triramula</i>	1	26	2	-	29	-	-	29	0.7
s21	<i>Lu. ylephiletor</i> <sup>+</sup>	-	1	-	-	1	-	-	1	0.02
s22	<i>Lu. carrerai thula</i>	3	9	-	2	-	12	2	14	0.3
s23	<i>Lu. ovallesi</i> <sup>°</sup>	1	46	-	-	-	31	16	47	1.1
s24	<i>Lu. bispinosa</i>	1	5	-	3	-	9	-	9	0.2
s25	<i>Lu. rorotaensis</i>	-	1	-	-	-	1	-	1	0.02
s26	<i>Lu. sp.</i> [Pressatia]	51	433	31	16	281	169	81	531	12.7
s27	<i>Lu. sp.</i> [Lutzomyia]	6	19	-	-	36	13	12	25	0.6
s28	<i>Lu. sp.</i> [Micropygomyia]	10	2	-	-	10	2	-	12	0.3
s29	<i>Br. sp.</i>	-	9	1	-	8	1	1	10	0.2
s30	<i>Lu. sp.</i> [Nyssomyia]	2	4	-	1	3	4	-	7	0.2
s31	<i>Lu. sp.</i> [Psychodopygus]	1	3	-	-	-	2	2	4	0.1
s32	<i>Lu. sp.</i> [Aragaoi]	-	-	2	1	3	-	-	3	0.1
<b>Total</b>		<b>412</b>	<b>3181</b>	<b>191</b>	<b>387</b>	<b>1953</b>	<b>1666</b>	<b>594</b>	<b>4171</b>	

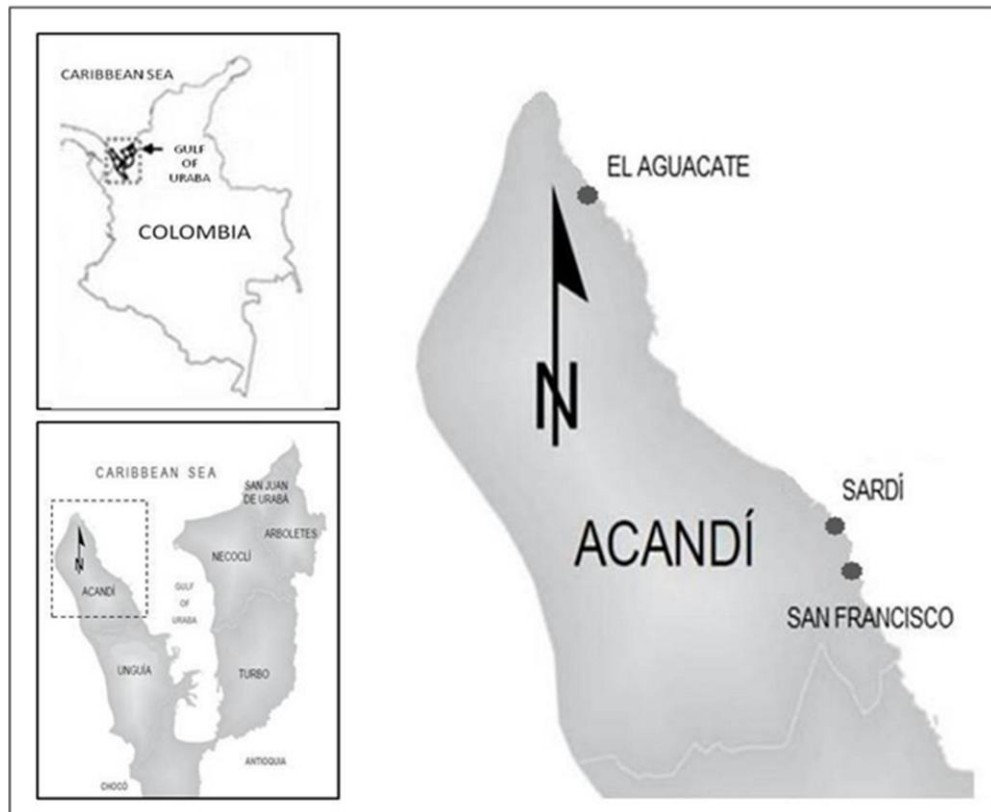
\* Species of *Lutzomyia* incriminated in the transmission of leishmaniasis in Colombia [Montoya-Lerma & Ferro 1999; Santamaría et al. 2006], ° Mexico [Young & Arias 1992], + Panama [Christensen & Herrero 1973], and ° Venezuela [Felicangeli et al. 1994, Rodriguez et al. 1999]. I: Intradomicile, P: Peridomicile, E: Extradomicile.

**Table 2. Result of the Montenegro skin test per locality, gender and age group**

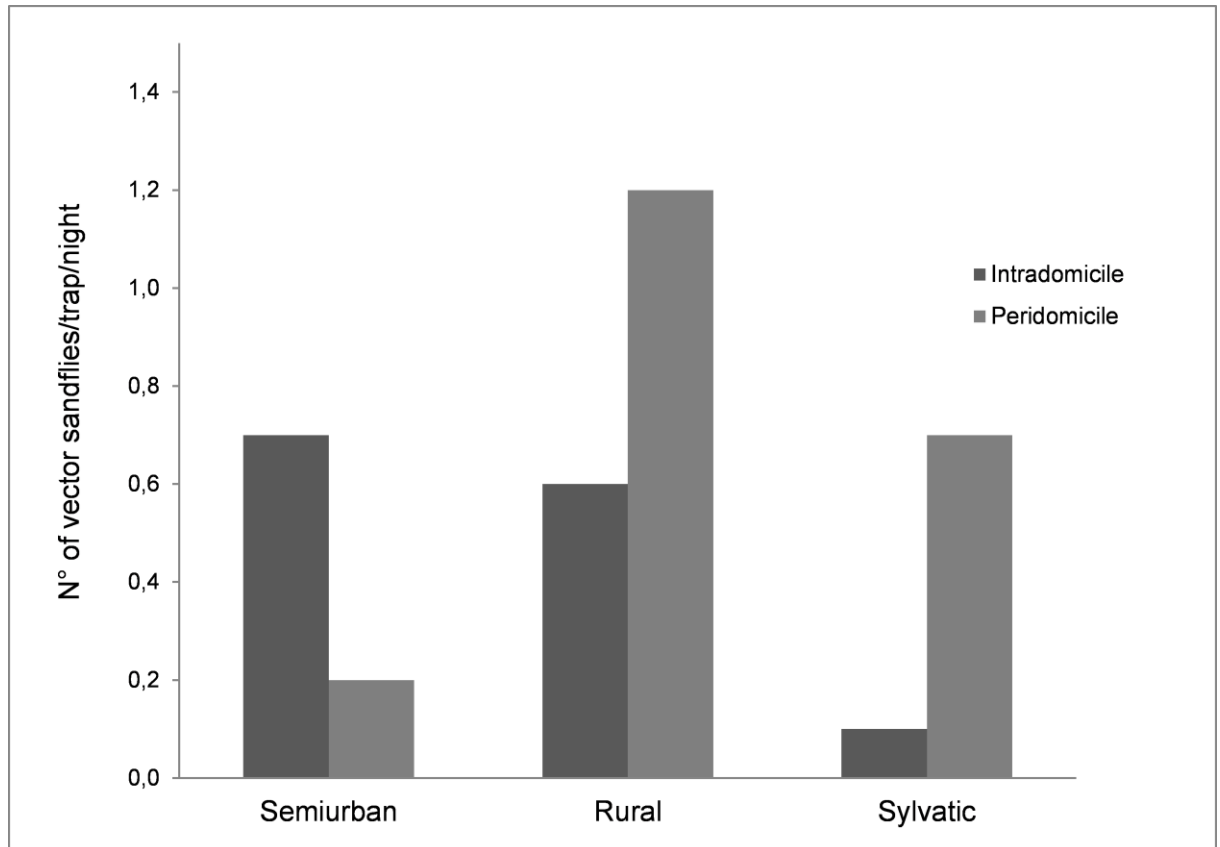
Age	+/Total (%)											
	Sylvatic				Rural				Semi-urban			
	Male		Female		Male		Female		Male		Female	
0-5	0/2	(0%)	0/3	(0%)	2/11	(18%)	1/13	(8%)	3/10	(30%)	2/5	(40%)
6-15	0/2	(0%)	0/1	(0%)	4/22	(18%)	3/20	(15%)	5/15	(33%)	4/21	(19%)
16-60	12/20	(60%)	5/11	(46%)	12/27	(44%)	6/25	(24%)	3/12	(25%)	3/10	(30%)
>60	0	(0%)	0	(0%)	2/3	(67%)	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)
Total	12/24	(50%)	5/15	(33%)	20/63	(38%)	10/58	(17%)	11/37	(30%)	9/36	(25%)
	<b>17/39 (43.5%)</b>				<b>30/121 (25%)</b>				<b>20/73 (27%)</b>			



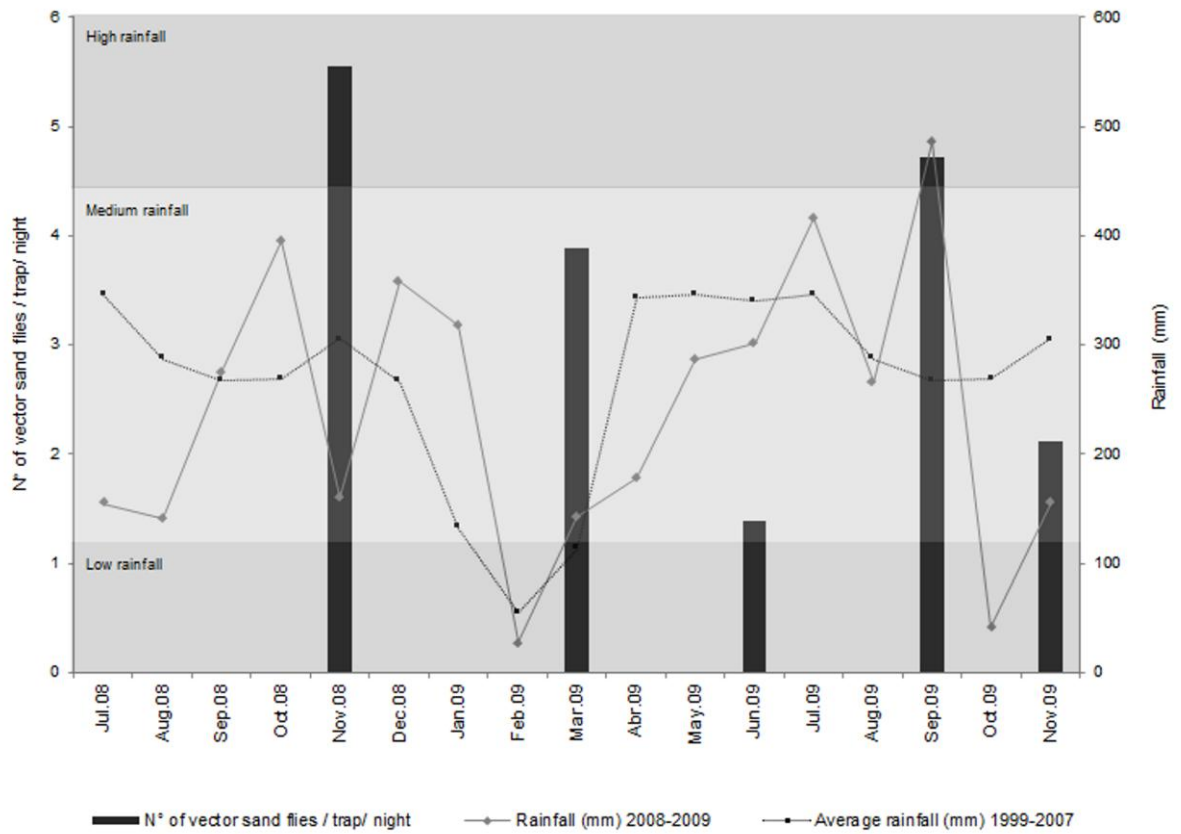
**Figure 1. Map of the study area.** Location of the villages included in the study of the municipality of Acandí in the department of Chocó. Map modified from García-Valencia, C. (Ed). 2007



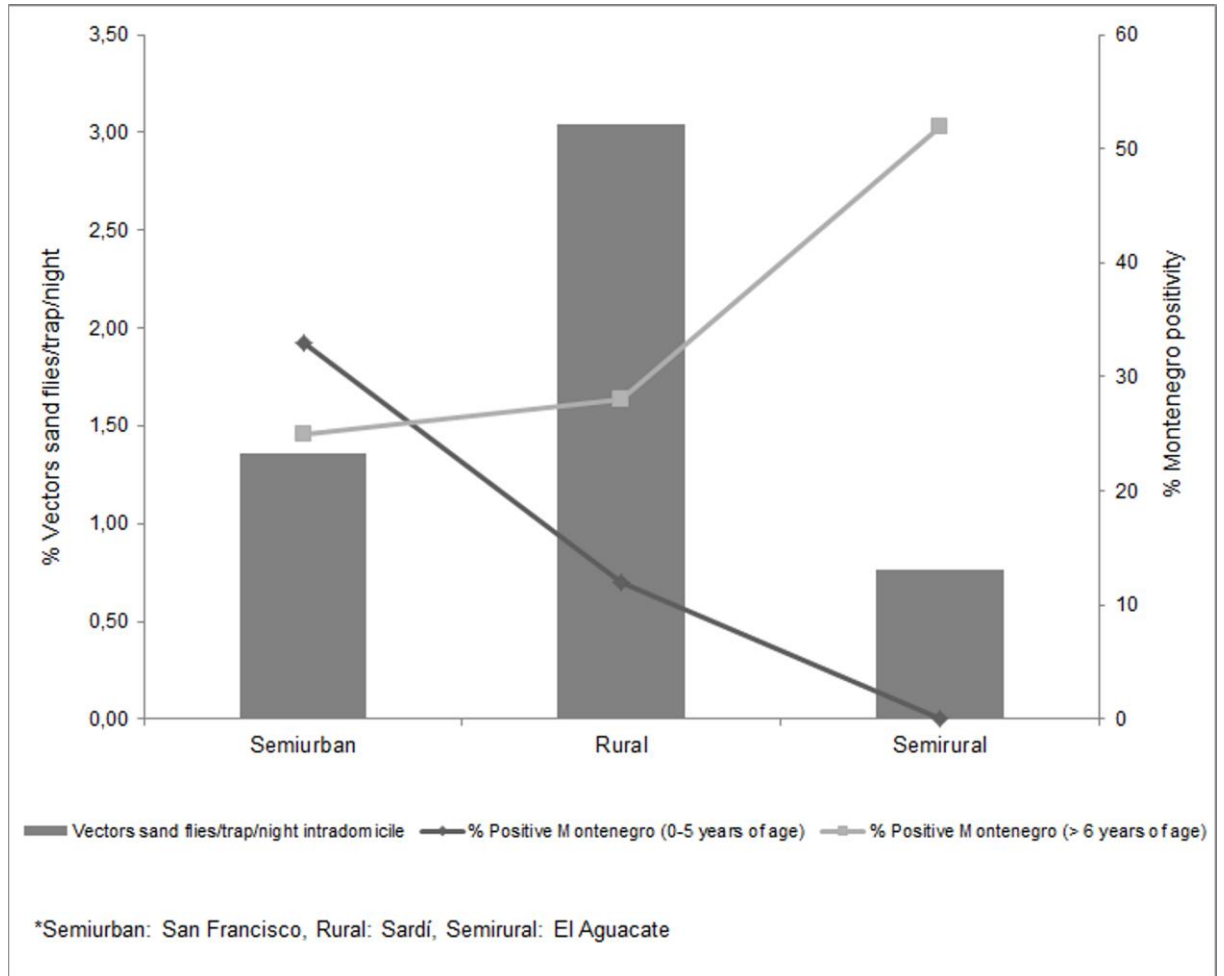
**Figure 2. Domiciliation.** Distribution of sandflies of medical importance by domicile in Acandí. Semi-urban: San Francisco, Rural: Sardí, Sylvatic: El Aguacate



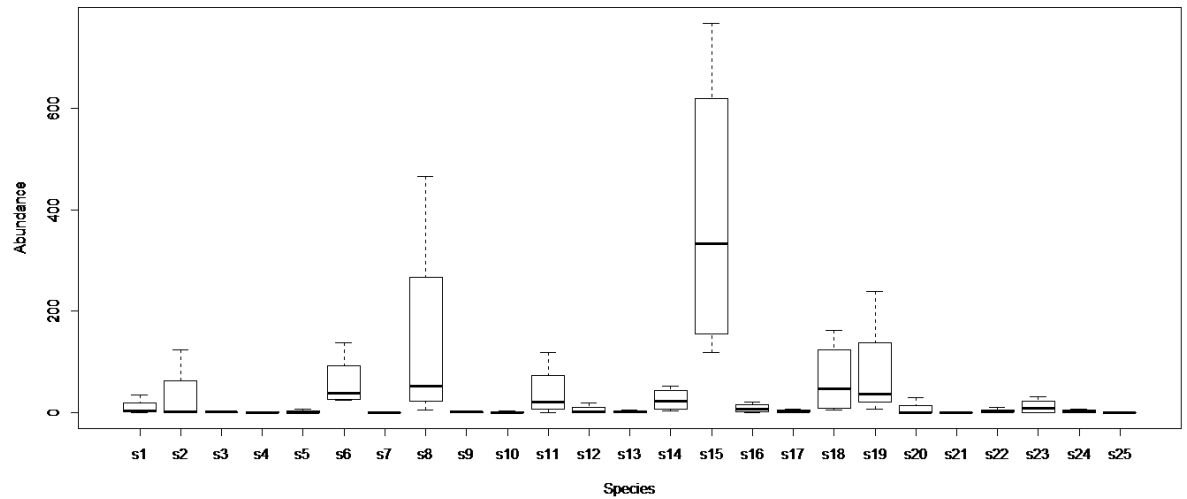
**Figure 3. Relationship among vectors sandflies and climate.** Association between the distribution of vector sandflies and rainfall during the study period.



**Figure 4. Domiciliation vs Montenegro:** Association between Vector sandflies and positivity of the Montenegro skin test in Acandí, Chocó (2008-2009), by domicile category.



**Figure 5.Total abundance:** Average and standard deviation of abundance for each species in the three areas of study (sylvatic, rural and semiurban) using R. (names of species in table 1)



**Figure 6. Abundance per area:** Average and standard deviation of abundance for each specie on the three area of study: A. Sylvatic; B. Rural; C. semiurban) using R. (The name of species is in the table 1)

