

SANDRA REGINA DIAS MONTEIRO

**PARTICIPAÇÃO DOS GAMBÁS NA EPIDEMIOLOGIA DA
LEISHMANIOSE NA MATA ATLÂNTICA DO ESTADO DE
PERNAMBUCO, BRASIL**

RECIFE
2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

SANDRA REGINA DIAS MONTEIRO

**PARTICIPAÇÃO DOS GAMBÁS NA EPIDEMIOLOGIA DA
LEISHMANIOSE NA MATA ATLÂNTICA DO ESTADO DE
PERNAMBUCO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de
Pernambuco – UFRPE, como parte dos requisitos para Obtenção
do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva
Co-Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE
2010

Ficha catalográfica

M775o Monteiro, Sandra Regina Dias
Participação dos gambás na Epidemiologia da Leishmaniose na Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil / Sandra Regina Dias Monteiro. -- 2010.
61 f.

Orientador: Jean Carlos Ramos da Silva.
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2010.
Referências.

1. Veterinária preventiva 2. Leishmaniose
3. Zoonose 4. Pernambuco (BR) 5. Brasil, Nordeste
6. Diagnóstico sorológico 7. Doença parasitária I. Silva, Jean Carlos Ramos da, orientador II. Título

CDD 636.089444

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**PARTICIPAÇÃO DOS GAMBÁS NA EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE NA
MATA ATLÂNTICA DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL**

Dissertação de Mestrado elaborada por

SANDRA REGINA DIAS MONTEIRO

Aprovada em 25 / 02 / 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. JEAN CARLOS RAMOS DA SILVA

Orientador - Departamento de Méd. Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. LEUCIO CÂMARA ALVES

Co-Orientador - Departamento de Méd. Veterinária da UFRPE

Prof^a Dr^a. MARIA APARECIDA DA GLORIA FAUSTINO

Departamento de Méd. Veterinária da UFRPE

Prof^a Dr^a. MARIA FERNANDA VIANNA MARVULO
Instituto Brasileiro para Medicina da Conservação – Tríade

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu: Tempo para nascer e tempo para morrer; tempo de plantar e tempo de colher; Tempo de matar e tempo de curar; Tempo de derrubar e tempo de edificar; Tempo de chorar e tempo de sorrir; tempo de abraçar e tempo de afastar-se; Tempo de buscar e tempo de perder; Tempo de calar-se e tempo de falar; Tempo de amar e tempo de aborrecer; tempo de guerra e tempo de paz

(Eclesiastes 3: 1-8)

“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado”.

Albert Einstein

*Dedico,
Aos meus pais, Edvaldo e Socorro por todo amor dedicado a nossa
família, pela perseverança e determinação em tornar possíveis os meus
sonhos. Amo vocês.*

Ao meu esposo Claudécí, por ser a fonte de minha energia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida, por me confortar nas horas difíceis, pela saúde, pela família, pelos amigos e principalmente pelas graças recebidas. Obrigada, meu Deus!

Ao meu orientador, Professor Dr. Jean Carlos Ramos da Silva, pela confiança demonstrada me aceitando como sua orientada, por sua competência, ensinamentos e pelo exemplo de profissional. Jamais irei esquecer suas palavras otimistas no decorrer dos trabalhos. Muito obrigada.

Ao meu Co-Orientador Professor Dr. Leucio Câmara Alves, por sua amizade, pelos ensinamentos, por tirar as minhas dúvidas durante os trabalhos de campo e redação da dissertação, sempre com simplicidade.

A Professora Dr^a. Maria Aparecida da Gloria Faustino, minha Tia Cida, exemplo de pessoa, generosidade e profissionalismo, serei sempre grata por suas palavras de estímulo para que tudo desse certo, muito obrigada.

A Dr^a. Maria Fernanda Vianna Marvulo, pela competência, ajuda e dicas para melhor desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos, Daniel, Felipe, Tatiana, Rafael, Márcio, Roberto, Ricardo, Mariana, Palloma, Paulo, Diogo, Vanessa, pela ajuda nas coletas e processamento das amostras, pelos momentos descontraídos durante as missões, dos almoços deliciosos, sem vocês não seria possível a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Ivana, Isabelle, Danillo, Rafael, Nadja, Alessandra, Andréa, Carlos, Márcia Paula, Marilene, Edenilze, Whaubtyfran, Elizete, Maria Auxiliadora, Marco Granja, Rita, Mariana, Marília, Ludmylla, Eduardo, Gilsan, pelo convívio saudável e amizade.

Aos amigos do Laboratório de bacteriose da UFRPE, Pedro Paulo, André Santos, Orestes, Andreey Teles, Eduardo, pelos ensinamentos na Técnica da RIFI, pela competência e paciência.

A minha grande amiga Dr^a. Glenda Holanda, por estar presente em todas as horas em que precisei de um ombro amigo e pelas palavras de otimismo. Obrigada, amiga!

Ao Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo, em especial a Maria Cecília Gibrail de Oliveira Camargo, pela atenção, gentileza, profissionalismo e por proporcionar a realização dos testes sorológicos.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, em especial a Carlos Ramos, por seus ensinamentos e na realização das técnicas moleculares.

Aos responsáveis pela coordenação dos locais onde foram executados os trabalhos de campo para colheita das amostras deste experimento - Estação Ecológica de Tapacurá, São Lourenço da Mata; Parque Estadual de Dois Irmãos, Recife; Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti, Paudalho; Parque Ecológico São José, Igarassu; Estação Ecológica de Caetés, Abreu e Lima e Reserva Biológica de Saltinho, Tamandaré - pelo apoio logístico dispensado à pesquisa, pela cordialidade e receptividade com todos da equipe.

A Ana Katarina, funcionária do COMUT, da Biblioteca Central da UFRPE, por toda atenção e gentileza nas pesquisas dos periódicos.

À FACEPE, pela bolsa de mestrado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da UFRPE, pelo apoio acadêmico; aos Professores, pela dedicação, por dividirem seus conhecimentos profissionais, e aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária dessa instituição.

RESUMO

A ocorrência da leishmaniose vem se expandindo geograficamente no Brasil, ao longo dos últimos anos, devido principalmente às modificações sócio-ambientais. Em virtude da íntima associação com moradias humanas, espécies de marsupiais infectadas adquirem um importante papel na ecoepidemiologia da leishmaniose, especialmente pela manutenção do parasita na enzootia silvestre. O objetivo desta pesquisa foi analisar o papel dos gambás *Didelphis* sp, provenientes da Região Metropolitana do Recife e da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, como hospedeiros da leishmaniose. Amostras de sangue e medula óssea foram colhidas de 100 gambás do gênero *Didelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae), sendo 74 gambás-de-orelha-branca *D. albiventris* (36 machos e 38 fêmeas) e 26 gambás-de-orelha-preta *D. aurita* (10 machos e 16 fêmeas). Os animais foram provenientes de sete áreas de Mata Atlântica (Estação Ecológica de Tapacurá, São Lourenço da Mata; Parque Estadual de Dois Irmãos, Recife; Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti, Paudalho; Parque Ecológico São José, Igarassu; Aldeia, Camaragibe; Estação Ecológica de Caetés, Abreu e Lima e Reserva Biológica de Saltinho, Tamandaré) e das cidades de Abreu e Lima, Camaragibe, Jaboatão dos Guararapes e Recife. Os gambás foram capturados em armadilhas do tipo *Live trap Tomahawk* e *Sherman*, dispostas na forma de *Grid* e em trilhas pré-existentes. Cada captura teve duração de seis dias e cinco noites e foi realizada a cada 15 dias, em média, totalizando um esforço de captura de 25.231 armadilhas/noite, no período de janeiro de 2008 a fevereiro de 2009. Foram colhidas amostras de sangue, dos 100 gambás capturados, para realização da Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI e realizada biópsia de medula óssea para pesquisa das formas amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* pelo exame parasitológico direto. Também foi extraído o DNA de 29 amostras de medula óssea, sendo 22 animais da espécie *D. albiventris* (10 machos e 12 fêmeas) e sete de *D. aurita* (um macho e seis fêmeas). No exame parasitológico, todos os animais foram negativos para a presença das formas amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*. Quanto aos resultados sorológicos, 1,0% (1/100) *D. albiventris* foi soropositivo para *Leishmania (L.) chagasi* procedente da Cidade de Abreu e Lima Região Metropolitana do Recife e 1,0% (1/100) *D. aurita* foi soropositivo para *Leishmania (L.) amazonensis* procedente do Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti, Paudalho. Na PCR todos os marsupiais *Didelphis* foram negativos. Apesar da baixa ocorrência, observada nestes dois achados, relata-se o primeiro resultado soropositivo de *Leishmania (L.) amazonensis*, em *Didelphis aurita*, no Estado de Pernambuco. Ressalta-se a importância destes gambás como possíveis hospedeiros das leishmanioses. Contudo, serão necessários novos estudos em busca da elucidação do papel dos gambás na cadeia epidemiológica das leishmanioses na Região Metropolitana do Recife e Mata Atlântica do Estado de Pernambuco.

Palavras-chave: Leishmaniose, marsupiais, Nordeste Brasil.

ABSTRACT

The occurrence of leishmaniasis has been expanding geographically in Brazil in recent years due mainly to socio-environmental changes. Due to their close association with human residences, infected marsupial species play an important role in the eco-epidemiology of leishmaniasis, especially regarding the maintenance of the parasite in the wild. The aim of the present study was to analyze the role of opossums (*Didelphis* sp) in metropolitan Recife and the Atlantic Forest of the state of Pernambuco, Brazil, as hosts for leishmaniasis. Blood and bone marrow samples were collected from 100 opossums from the genus *Didelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae) – 74 white-eared opossum *D. albiventris* (36 males and 38 females) and black-eared opossum 26 *D. aurita* (10 males and 16 females). The animals were from seven sites of the Atlantic Forest (Estação Ecológica do Tapacurá, São Lourenço da Mata; Parque Estadual Dois Irmãos, Recife; Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti, Paudalho; Parque Ecológico São José, Igarassu; Aldeia, Camaragibe; Estação Ecológica de Caetés, Abreu e Lima; and Reserva Biológica de Saltinho, Tamandaré) as well as the cities of Abreu e Lima, Camaragibe, Jaboatão dos Guararapes and Recife. The opossums were captured using Tomahawk and Sherman live traps arranged in a grid pattern on pre-existing trails. Each capture lasted six days and five nights and was carried out, on average, every two weeks, for a total catch effort of 25,231 traps/nights from January 2008 to February 2009. Blood samples were taken for the Indirect Immunofluorescence Test and a bone marrow biopsy was performed for the investigation of amastigote forms of *Leishmania (L.) chagasi* through a direct parasitological exam. DNA was also extracted from 29 bone marrow samples – 22 from *D. albiventris* (10 males and 12 females) and seven from *D. aurita* (1 male and 6 females). In the parasitological exam, all animals tested negative for the amastigote forms of *Leishmania (L.) chagasi*. The serologic exams revealed that, among the 100 opossums analyzed, only one (1%) *D. albiventris* (from the city of Abreu e Lima in metropolitan Recife) was positive for *Leishmania (L.) chagasi* and one (1%) *D. aurita* (from Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti, Paudalho) was positive for *Leishmania (L.) amazonensis*. In the PCR, all opossums tested negative. Despite the low occurrence, this is the first report of *Leishmania (L.) amazonensis* in *Didelphis aurita* in the state of Pernambuco, which stresses the importance of these opossums as host for leishmaniasis in metropolitan region of Recife. Further studies are needed to clarify the role of opossums in the epidemiological chain of leishmaniasis in metropolitan Recife and the Atlantic Forest in Pernambuco, Brazil.

Keywords: Leishmaniasis, marsupials, Northeastern Brazil.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Objetivos	15
1.1.1 Objetivo Geral.....	15
1.1.2 Objetivos Específicos.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Leishmaniose	17
2.2 Agente Etiológico	17
2.3 Vetor	18
2.4 Distribuição Geográfica da Leishmaniose	19
2.5 Métodos Diagnósticos	20
2.6 Reservatórios Urbanos	22
2.7 Reservatórios Silvestres	22
2.7.1 Gambás do gênero <i>Didelphis</i> como Hospedeiros da leishmaniose	23
2.8 Referências	25
3 ARTIGOS CIENTÍFICOS	
3.1 Ocorrência de <i>Leishmania (L.) chagasi</i> em gambás (<i>Didelphis</i> sp) na Mata Atlântica, de Pernambuco, Brasil	36
3.2 Ocorrência de anticorpos anti-<i>Leishmania (L.) amazonensis</i> em gambá-de-orelha-preta (<i>Didelphis aurita</i>) na Mata Atlântica de Pernambuco, Brasil	53
4 CONCLUSÕES	61

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma parasitose de caráter zoonótico, com ampla distribuição geográfica e ocorrência em 88 países (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994; ASHFORD, 2000; ALVES e FAUSTINO, 2005) Estima-se que 350 milhões de pessoas vivam em áreas de risco, com 12 milhões de indivíduos infectados e que aproximadamente 1,5 milhões de novos casos por ano sejam de leishmaniose cutânea e 500.000 novos casos registrados anualmente da forma visceral (WHO, 2002), destes mais de 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Nepal, Índia, Sudão e Brasil (SOUSA et al., 2001; BONATES, 2003; ALVES e BEVILACQUA, 2004; WHO, 2002).

Os animais silvestres são considerados importantes reservatórios e/ou hospedeiros naturais da leishmaniose, dentre os quais citam-se: a raposa ou cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), raposa ou raposinha-do-campo (*Lycalopex vetulus*), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), ratos silvestres (*Proechimys canicollis* e *P. guyannensis*), rato-d'água (*Nectomys squamipes*), tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), preguiça (*Choloepus didactylus*) gambá-de-orelha-preta (*Didelphis marsupialis*) e gambá-de-orelha-branca (*D. albiventris*) (DEANE, 1956; CORREDOR et al., 1989; LAINSON et al., 1990; TRAVI et al., 1998; ZULUETA et al., 1999; SILVA et al., 2000; CARVALHO, 2005; BRASIL, 2007; CURY et al., 2006).

Considerando os marsupiais na cadeia epidemiológica da Leishmaniose Visceral (LV), o gambá-de-orelha-branca (*D. albiventris*) foi encontrado naturalmente infectado no Brasil nos Estados da Bahia (SHERLOCK et al., 1984) e Pernambuco (CARVALHO, 2005). O gambá-de-orelha-preta (*D. marsupialis*) foi referido como importante reservatório em países como Brasil, Colômbia e Venezuela (CORREDOR et al., 1989; TRAVI et al., 1994; ZULUETA et al., 1999; CABRERA et al., 2003). Atualmente, a ordem Marsupialia foi designada para Didelphimorphia (MALTA e LUPPI, 2006). Todavia, para fins didáticos nesta dissertação será utilizado o termo “marsupial”.

Na forma de Leishmaniose tegumentar os marsupiais foram relatados no Estado do Amazonas com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* nos gambás-de-orelha-preta (*D. marsupialis*) capturados em mata virgem de um campo de instrução do exército e em uma reserva biológica (ARIAS et al., 1981). Ao Norte do Pará, Lainson et al. (1981) isolaram *L. (L.) amazonensis* na pele e *L. (V.) guyanensis* em vísceras de um gambá-de-orelha-preta (*D. marsupialis*).

Estas duas espécies de gambás possuem enorme capacidade de adaptação, resistem bem às agressões sofridas em seu meio ambiente, podendo tornar-se sinantrópicos ou viverem em fragmentos de matas (MALTA e LUPPI, 2006). Apresentam hábitos solitários e noturnos, deslocam-se basicamente pelo solo, porém o *habitat* arbóreo também pode ser utilizado, principalmente à procura de alimento (MOTTA, 1988; MALTA e LUPPI, 2006).

Com relação ao comportamento dos gambás e seu papel na cadeia epidemiológica da leishmaniose, estes marsupiais alimentam-se comumente de lixos e resíduos domésticos nos limites de florestas e fragmentos de mata próximos as residências humanas, possuem uma alta reprodução e são abundantes em áreas endêmicas. Isto permite uma constante circulação destes animais entre o meio florestal e urbano e uma possível infecção com o agente, pois eles podem servir de fonte de alimentação para os flebótomos ali presentes. Dessa forma, pode-se estabelecer um elo destes marsupiais sinantrópicos entre o ciclo silvestre e o peridomiciliar da leishmaniose (LAINSON, 1985; CORREDOR et al., 1989; GUERRA et al., 2006).

Em estudos realizados na Zona da Mata Norte de Pernambuco, os animais silvestres *D. albiventris* (gambá-de orelha-branca) e *N. squamipes* (rato-d'água) foram positivos para *L. (L.) chagasi*, sugerindo a existência de um ciclo enzoótico silvestre, podendo estes animais serem reservatórios da LV nesta região (CARVALHO, 2005). Nesta mesma região, a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* já foi identificada em roedores sinantrópicos e silvestres (*Bolomys lasiurus*, *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus*) (BRANDÃO-FILHO et al., 2003).

Diante do exposto, a grande presença de gambás em áreas urbanas e sua adaptação aos locais alterados pelo homem convivendo muito próximo ao homem e ao cão, tornaram os *Didelphis* sp possíveis mantenedores da endemia urbana da leishmaniose. Dessa forma, torna-se de suma importância o desenvolvimento de novas pesquisas para esclarecer a participação deste marsupial no ciclo epidemiológico da leishmaniose.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

- a) Analisar o papel do gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) e do gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) provenientes da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco na epidemiologia da Leishmaniose.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar a ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania (L.) chagasi* e anti-*Leishmania (L.) amazonensis* em gambás do gênero *Didelphis*.
- b) Realizar a pesquisa de amastigotas de *Leishmania* spp em medula óssea pelo exame parasitológico direto.
- c) Realizar a pesquisa de *Leishmania (L.) chagasi* na medula óssea por meio da Reação em Cadeia da Polimerase.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma zoonose própria de canídeos e outros mamíferos silvestres (DEANE, 1956; MARZOCHI et al., 1985; MARZOCHI e MARZOCHI, 1994; LAINSON et al., 2002), sendo transmitida ao homem e outros animais por intermédio de insetos vetores (MARZOCHI, 1992; LAINSON e RANGEL, 2005).

Esta doença vem se expandindo geograficamente ao longo dos últimos 20 anos, passando de uma doença de ambiente silvestre e rural, que acometia as pessoas que adentravam em ambientes florestais, onde se encontravam os animais silvestres e os flebotomíneos, para doença de ambiente urbano (WHO, 2002). Devem ser destacados os desmatamentos constantes em áreas florestais importantes como o exemplo da Mata Atlântica, os quais ocasionam sérios problemas de desequilíbrio ambiental provocando, por exemplo, a redução da disponibilidade de animais silvestres que serviam de fonte de alimentação para o inseto transmissor (GOMES, 1992). Por outro lado, com o processo de urbanização, o cão e o homem são colocados como alternativas acessíveis para alimento dos insetos transmissores. Assim, o processo migratório trouxe a LV para a periferia das cidades (REBÊLO et al., 2000; REY, 2001; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Deve-se considerar ainda, dentre os fatores facilitadores para a ocorrência desta zoonose, o baixo poder aquisitivo econômico da população, habitações humanas precárias, com deficiência nas estruturas básicas de saneamento, promiscuidade na criação de animais domésticos e condições culturais (MONTEIRO et al., 2005).

Apesar dos vários conhecimentos sobre os diversos elementos que compõem a cadeia de transmissão da leishmaniose, as medidas de prevenção e controle ainda são pouco efetivas e estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos em humanos, redução da população de flebotomíneos, conhecimento dos reservatórios e eliminação do reservatório doméstico e atividades de Educação e Promoção em Saúde (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994; BRASIL, 2006).

2.2 Agente Etiológico

A leishmaniose é causada por protozoários digenéticos pertencentes ao sub-reino Protozoa, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994), apresentando duas formas ou fases evolutivas: “promastigota” de forma alongada, móvel, com flagelo livre, normalmente na luz do trato

digestório do hospedeiro invertebrado (vetor) (NOLI, 1999; LUVIZOTTO, 2005) e a forma “amastigota”, de forma ovóide, sem flagelo que vive e se multiplica no interior de células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado (NOLI, 1999).

Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida, da resposta imune do hospedeiro e de outros fatores ainda não determinados, a leishmaniose, nas Américas, apresenta-se sob duas formas clínicas distintas: a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) e a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (REY, 2001).

A Leishmaniose Visceral (LV), também denominada calazar, é causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi*, a qual se encontra inserida no complexo *Leishmania donovani* (FEITOSA et al., 2000; SOUSA et al., 2001), sendo a espécie *Leishmania (L.) chagasi* considerada sinonímia de *Leishmania (L.) infantum* que ocorre no Mediterrâneo, com base em estudos bioquímicos e moleculares (MAURÍCIO et al., 2000).

Em relação a LTA, no Brasil, já foram identificadas sete espécies de *Leishmania* dermatrópicas, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania* (BRASIL, 2007). Dentre as espécies de *Leishmania* que ocorrem no Brasil, a *Leishmania (L.) amazonensis* é uma das mais prevalentes, com distribuição geográfica em florestas primárias e secundárias da Amazônia, especialmente em áreas de igapó e de floresta tipo “várzea”. Sua presença amplia-se para o Nordeste, Sudoeste e Centro-Oeste (MARZOCHI, 1992; BRASIL, 2007).

2.3 Vetor

A doença é transmitida por insetos hematófagos, comumente denominados flebotomíneos, pertencente à Ordem Diptera, Família Psychodidae, Sub-família Phlebotominae, Gênero *Lutzomyia* (GALATI, et al., 1997; MATTOS Jr. et al., 2004; BRASIL, 2007).

Os flebotomíneos desenvolvem-se em ambientes úmidos e ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa. Eram originalmente encontrados em mata e passou ao ambiente rural. Mais recentemente também estão sendo encontrados em ambientes urbanos e nas periferias dos grandes centros urbanos. As fêmeas são hematófagas obrigatórias, especialmente durante seu período reprodutivo, o que possibilita a maturação dos ovários, e suprimento protéico para a produção de ovos (BRASIL, 2006). Quando presentes em domicílio e peridomicílio podem alimentar-se do sangue do homem, cão, galinha, equídeos, suínos, caprinos e gambás (SHERLOCK e GUITTON, 1969; MISSAWA et al., 2008). No interior de florestas podem, realizar seu repasto sanguíneo em diversos mamíferos silvestres

como canídeos (DEANE e DEANE, 1954; LAINSON et al., 1990) e marsupiais (CORREDOR et al., 1989, TRAVI et al., 1996).

No Brasil, duas espécies estão relacionadas com a transmissão da doença, a *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (GALATI et al., 1997; SANTOS et al. 1998). Sendo a primeira considerada a principal espécie transmissora no Brasil e a segunda incriminada como vetora principal no Estado do Mato Grosso Sul (BRASIL, 2006; FRANÇA-SILVA et al., 2005). As principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermédia*, *L. wellcome* e *L. migonei* (BRASIL, 2007).

2.4 Distribuição Geográfica da Leishmaniose

Atualmente a leishmaniose apresenta ampla distribuição geográfica, sendo registrada em áreas consideradas previamente como não endêmicas. A doença, que inicialmente tinha um caráter eminentemente rural e/ou silvestre, hoje vem se expandindo para as áreas urbanas e periurbanas (WHO, 2002). Essas mudanças ocorreram devido a circunstâncias epidemiológicas favoráveis, associadas às condições sócio-econômicas e higiênico-sanitárias precárias, aliada a pobreza e promiscuidade de animais. Além como degradações ambientais que proporcionam a aproximação entre homens, vetores, reservatórios silvestres e cães, possibilitando a introdução do agente etiológico em áreas consideradas não endêmicas (MARZOCHI et al., 1985; SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; SILVA et al., 2005).

A incidência maior da LV ocorre no nordeste com 77% dos casos notificados, seguido das regiões sudeste, norte e centro-oeste (BRASIL, 2006). A primeira epidemia de LV em área urbana ocorreu em Teresina - PI em 1981 (COSTA et al., 1990). Duas décadas depois o processo de urbanização se intensificou com a ocorrência de importantes epidemias em várias cidades das regiões nordeste: Teresina - PI, Natal - RN, São Luís - MA, Fortaleza - CE e Camaçari - BA; norte: Santarém - PA; sudeste: Rio de Janeiro - RJ, Belo Horizonte - MG e Araçatuba - SP; e Centro Oeste: Corumbá - MS, Três Lagoas - MS, Campo Grande - MS e Palmas - TO (BRASIL, 2006).

Dentre os estados brasileiros, a Bahia tem apresentado o maior número de novos casos de LV humana, com uma média de 1.500 casos por ano e um acelerado processo de expansão da área endêmica nas últimas décadas (FRANKE, et al. 2002; BRASIL, 2006).

Em Pernambuco, entre 1990 e 2000 foi descrita a evolução da distribuição geográfica da Leishmaniose (BRANDÃO-FILHO et al., 1999; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-

FILHO, 2005). Nesse período, 119 municípios registraram casos da doença, indicando a presença da LV em praticamente todo território pernambucano. Além da histórica concentração de casos no Sertão (PEREIRA et al., 1985) observa-se o registro de 1.190 casos no Agreste e na Região Metropolitana de Recife (DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2005).

Em relação à infecção no cão, no Estado do Maranhão a prevalência de LVC, foi de 46,66% no município de Imperatriz e 36,84% São José do Ribamar (BRAGA, 2007; DIAS et al., 2008). Em Pernambuco, a prevalência foi nos municípios de São Vicente Férrer 12,3% e Itamaracá 4,5% (SANTOS, 2006; SILVA e BRAGA, 2008). Na Paraíba, no município de Campina Grande a soroprevalência foi de 3,0% (VIDAL, 2008). Em Alagoas, no município de Maceió 1,9% dos cães foram soropositivos (MARTINS, 2008). No Rio Grande do Norte, no município de Mossoró a prevalência foi de 50% em cães da zona rural e 43% da zona urbana (AMÓRA et al., 2006). No Ceará, no município de Fortaleza a soroprevalência em cães domésticos foi de 26,2% e de cães errantes 21,4% (RONDON et al., 2008).

Em 2003, a LTA foi confirmada em todos os Estados brasileiros, sendo a maioria dos casos registrados na região norte com 47% dos casos, seguidos das regiões centro-oeste, nordeste, sudeste e sul (BRASIL, 2007).

Pernambuco vem apresentando nos últimos 10 anos incidência acentuada de LTA em todas as regiões do Estado, sendo a maioria dos casos registrados na região da Zona da Mata, que representa 64,2% dos casos (BRANDÃO-FILHO et al., 1999). Um estudo sobre a infecção natural em animais silvestres e domésticos, realizado entre 1991 e 1992 e entre 1996 e 2000, apresentou alguns roedores sinantrópicos e silvestres infectados por *Leishmania* (formas amastigotas características presentes em *imprints* de baço) e foram isoladas sete amostras do parasito (cinco amostras em *Bolomys lasiurus*, uma em *Nectomys squamipes* e uma em *R. rattus* todas identificadas como *L. (V.) braziliensis* com perfis isoenzimáticos variantes. Os cães apresentavam aspecto físico normal, embora 19,67% (12/61) e 13,8% (8/58) cavalos foram positivos na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (BRANDÃO-FILHO et al., 1999; BRANDÃO-FILHO et al., 2003).

2.5 Métodos diagnósticos

Nos animais, diagnóstico clínico é difícil de ser confirmado e estabelecido, devido a uma grande variedade de sinais clínicos apresentados e à forma assintomática da doença (FEITOSA et al., 2000; GONTIJO e MELO, 2004). Neste sentido, exames laboratoriais

foram desenvolvidos para o diagnóstico da leishmaniose Testes sorológicos como Teste de Aglutinação Direta (DAT), Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA); além de técnicas de biologia molecular por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (GÁLLEGO, 2004; BRASIL, 2006; IKEDA-GARCIA e FEITOSA, 2006).

Outro exame diagnóstico utilizado é o parasitológico direto no qual se pesquisam as formas amastigotas livres ou dentro do citoplasma de macrófagos do hospedeiro, obtidos por meio de aspiração de linfonodos, baço e medula óssea (CIARAMELLA e CORONA, 2003), além de biopsia hepática (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997), raspados de lesões cutâneas de pele íntegra e lesionada (ALVES e FAUSTINO, 2005). Em alguns casos, a técnica de imunohistoquímica pode ser aplicada para aumentar a sensibilidade e especificidade para a detecção do antígeno em tecidos e biopsias de linfonodos (FERRER, 1999).

Outra técnica realizada como método parasitológico é o isolamento do agente em meio de cultura *in vitro* mediante a diluição do material aspirado de medula óssea, baço, e fígado em solução salina e inoculado no meio Novy, Mc Neal e Nicolle (NNN) e *Liver Infusion Tryptofane* (LTI) obtendo-se o crescimento de formas promastigotas, assim como a inoculação experimental em estudos com animais de laboratório, mais comumente *hamsters* (*Mesocricetus auratus*) (ARIAS et al., 1981; SANTA-ROSA e OLIVEIRA, 1997; IKEDA-GARCIA e FEITOSA, 2006; GOMES et al., 2008).

Apesar dos exames parasitológicos possuírem uma especificidade elevada, aproximadamente 100%, a sua sensibilidade vai depender do grau de parasitemia, do local de onde foi realizada a colheita e do período de evolução da doença, gerando em torno de 50 a 83% para amostras de medula óssea e 30 a 85% para a citologia dos linfonodos (IKEDA-GARCIA e FEITOSA, 2006).

Entre os métodos sorológicos de detecção de anticorpos circulantes, a RIFI é a mais utilizada em inquéritos sorológicos, com sensibilidade de 90 a 100% e especificidade de 80% para cães domésticos (ALVES e BEVILACQUA, 2004; LUVIZOTTO, 2005; IKEDA-GARCIA e FEITOSA, 2006).

Com relação aos testes sorológicos, o DAT permite o reconhecimento dos antígenos presentes em promastigotas na microplaca de poliestireno de fundo em V pelos anticorpos e na aglutinação, formando um produto visual que permite a leitura. Sensibilidade e especificidade superiores a 90% para cães domésticos, reações cruzadas podem ocorrer, mas em geral são fracas (EL-HARITH et al., 1988; SUNDAR e RAI, 2002).

O teste ELISA é rápido, de fácil execução e leitura; apresenta maior sensibilidade do que a RIFI, porém é menos específico e permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos (GONTIJO e MELO, 2004).

Dentre os métodos moleculares, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permite identificar e ampliar sequências de DNA do parasita que podem ser encontrados em uma variedade de tecidos como: medula óssea, aspirados de linfonodos, biópsias cutâneas, sangue, cortes histológicos de tecidos parafinados (MELO, 2004).

Com relação ao diagnóstico de LV realizados em gambás os testes mais comumente utilizados foram: o método parasitológico direto, no qual foi realizado esfregaço de medula óssea para a visualização das formas amastigotas do parasito (CARVALHO, 2005; SANTIAGO, 2007), o isolamento do agente em meio de cultura *in vitro* (SHERLOCK et al., 1984; CORREDOR et al., 1989), inoculação em animais de laboratório (*hamsters*) (SHERLOCK et al., 1984; CORREDOR et al., 1989; CABRERA et al., 2003; CARVALHO, 2005); 2) Sorológicos - RIFI (CABRERA et al., 2003) e o ELISA (GOMES NETO, 2006; SANTIAGO, 2007); 3) Técnica molecular - PCR (ZULUETA et al., 1999; CARVALHO, 2005; GOMES NETO, 2006; SANTIAGO, 2007).

2.6 Reservatórios Urbanos

Os cães domésticos representam os principais reservatórios da doença em ambiente urbano, sendo possivelmente os únicos responsáveis pela manutenção do ciclo da LV (DEANE e DEANE, 1962; MARZOCHI et al., 1985; SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; MILES et al., 1999; TAFURI et al., 2001).

Do ponto de vista epidemiológico, na LV, a enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem (BRENER e PELLEGRINO 1958; MOURA et al., 1999).

São numerosos os casos de infecção por LTA em animais domésticos. Entretanto, não é comprovado o papel destes animais como reservatórios das espécies de *Leishmania*, sendo então considerados hospedeiros acidentais da doença (BRASIL, 2007).

2.7 Reservatórios Silvestres

Em ambiente silvestre, os reservatórios da leishmaniose são carnívoros da família Canidae (DEANE, 1956; LAINSON et al., 1990; SILVA et al., 2000; CURY et al., 2006), roedores da família Echimyidae, Bunyaviridae e Muridae (LAINSON et al., 2002;

BRANDÃO-FILHO et al., 2003), xenartrás da família Bradypodidae e Megalonychidae (BRASIL, 2007) e marsupiais da família Didelphidae (ARIAS et al., 1981; LAINSON et al., 1981; CORREDOR et al., 1989; TRAVI et al., 1998; ZULUETA et al., 1999; CARVALHO, 2005). Por outro lado, no ambiente domiciliar, os cães domésticos são considerados os principais reservatórios da leishmaniose visceral tendo um papel relevante na manutenção do ciclo da doença, podendo ser ainda a principal fonte de infecção (DEANE e DEANE, 1962; MARZOCHI et al., 1985; SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; MILES et al., 1999; TAFURI et al., 2001).

Na forma cutânea a importância dos cães como reservatórios ainda não está completamente elucidada, sendo considerado atualmente hospedeiro acidental, mantendo o vetor no ambiente e conseqüentemente o ciclo de transmissão (ALMEIDA, 2009)

A existência de reservatórios silvestres ajuda na perpetuação do parasito numa região endêmica, tendo em vista que seus hábitos sinantrópicos podem propiciar um elo entre os ciclos silvestre e doméstico (SILVA et al., 2005).

Na Venezuela, as raposas (*Cerdocyon thous*, *Lycalopex vetulus*), têm sido incriminadas como reservatórios silvestres da LV (ZULUETA et al., 1999), como também os roedores (*Proechimys canicollis*) na Colômbia (CORREDOR et al., 1989).

No Brasil, os reservatórios silvestres da *L. (L.) chagasi* também conhecidos são as raposas, os marsupiais e roedores silvestres. Espécies de raposas naturalmente infectadas foram descritas no Ceará (*Lycalopex vetulus*) (DEANE, 1956), no Pará e Minas Gerais (*Cerdocyon thous*) (LAINSON et al., 1990; SILVA et al., 2000; CURY et al., 2006) e lobo guará em Minas Gerais (*Chrysocyon brachyurus*) (CURY et al., 2006). E o roedor (*Proechimys guyanensis*) foi também encontrado naturalmente infectado no Pará (LAINSON et al., 2002). Considerando os roedores, na Zona da Mata de Pernambuco foi registrado o primeiro caso de infecção natural por *L. (L.) chagasi* em rato-d'água (*Nectomys squamipes*) (CARVALHO, 2005).

Na forma cutânea já foram descritos como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais alguns roedores, marsupiais, xenartrás e canídeos silvestres (BRASIL, 2007). Dentre eles os roedores *Bolomys lasiurus*, *Nectomys squamipes* e *R. rattus* todas identificadas como *L. (V.) braziliensis* na Zona da Mata de Pernambuco (BRANDÃO-FILHO et al., 1999). Considerando-se os marsupiais, foi relatada infecção natural por *L. (L.) amazonensis* em *Philander opossum* e *Metachirus nudicaudatus*, e por *L. (V.) guyanensis* em Xenarthras (*Tamandua tetradactyla*) (LAINSON et al., 1981) no Pará.

2. 7.1 Gambás do gênero *Didelphis* como Hospedeiros da leishmaniose

Dentre os marsupiais, foram encontrados gambás-de-orelha-branca (*D. albiventris*) infectados por *L. (L.) chagasi* em Jacobina, na Bahia (SHERLOCK et al., 1984; SHERLOCK, 1996; GOMES NETO, 2006) e em Pernambuco (CARVALHO, 2005) e gambás-de-orelha-preta (*D. marsupialis*) no Rio de Janeiro (CABRERA et al., 2003).

Utilizando as técnicas de isolamento do agente em meio de cultura *in vitro* e inoculação em animais de laboratórios (*hamster*), foram examinados em uma área endêmica da Colômbia 37 animais da espécie *D. marsupialis* encontrando 32,4% (12/37) infectados e nenhum dos gambás apresentou sinais clínicos da doença (CORREDOR et al., 1989).

Cabrera et al. (2003) pesquisando uma região litorânea da cidade do Rio de Janeiro onde a LV é endêmica, encontrou 29% (9/31) de *D. marsupialis* soropositivos pela RIFI.

Carvalho (2005), em estudo na Zona da Mata Norte, PE, colheu fragmentos de baço e pele de 17 animais (*D. albiventris*), para realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), destes 1,7% (1/17) das amostras de baço foi positiva. Contudo, as amostras de pele foram negativas. Gomes Neto (2006) pesquisou pelo exame de ELISA 15 exemplares de *D. albiventris* proveniente de Camaçari, BA, encontrando 26,7% (4/15) soropositivos, e pela técnica da PCR foram utilizados 17 animais, sendo 64,7% (11/17) positivos. Santiago (2007) em área urbana do município de Bauru, SP, capturou 112 espécimes de gambás, sendo 102 da espécie *D. albiventris* e 10 da espécie *D. aurita*, dos quais 71,02% (76/107) dos animais foram soropositivos pela técnica de ELISA e 91,56% (103/112) positivos na PCR.

D. albiventris foram infectados experimentalmente mostrando-se suscetíveis a LV, desenvolvendo a forma sistêmica, sendo observado, hepatomegalia, lesões no fígado e baço, abundantes formas amastigotas, derme com infiltrado, no entanto não foi associado ao parasito. Todos os gambás infectados apresentaram doença subclínica (SHERLOCK et al., 1988).

No Estado do Amazonas foi relatada *L. (L.) amazonensis* em 25% (2/8) dos gambás-de-orelha-preta (*D. marsupialis*) capturados em mata virgem de um campo de instrução do exército e 20% (3/15) estavam infectados com *L. (V.) guyanensis* capturados em uma reserva biológica, por meio de cultura e posteriormente inoculando em hamsters (ARIAS et al., 1981). Ao Norte do Pará, Lainson et al. (1981) isolaram *L. (L.) amazonensis* na pele de um gambá-de-orelha-preta (*D. marsupialis*).

2.8 Referências

ALMEIDA, A. B. P. F. **Inquérito soroepidemiológico e caracterização da leishmaniose canina por PCR-RFLP em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.** 2009. 67 f. Dissertação (Mestrado). Ciência Veterinária. Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2009.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997, **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A G. **Leishmaniose visceral canina.** Manual da Schering-Plough, São Paulo, 2005.14 p.

AMÓRA, S. S. A.; SANTOS, M. J. P.; ALVES, N. D.; COSTA, S. C. G.; CALABRESE, K. S.; MONTEIRO, H. J.; ROCHA, M. F. G. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1854-1859, 2006.

ARIAS, J. R.; NAIFF, R. D.; MILES, M. A.; SOUZA, A. A. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75. p. 537-540, 1981.

ASHFORD, D. A.; DAVID, J.R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, M. C.; SAMPAIO, D. P.; BADARÓ, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **American Journal of Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 53-57, 1998.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar). **Veterinary News**, ano 10, n. 61, p.4-5, 2003.

BRAGA, G. M. S. **Aspectos epidemiológicos clínicos e imunológicos de cães (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758) como infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937) provenientes do Município de Imperatriz, Região Sudoeste do Estado do Maranhão, Brasil.** 2007. 113 f. Tese (Doutorado). Ciência Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2007.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; CAMPBELL-LENDRUM, D. H.; BRITO, M. E. F.; SHAW, J. J.; DAVIES C. R. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, p. 488-494, 1999.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; BRITO, M. E.; CARVALHO, F. G.; ISHIKAWA, E. A.; CUPOLILLO, E.; FLOETER-WINTER, L.; SHAW, J. J. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, p. 291-296, 2003.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral**, Brasília, DF, 2006, 120 p.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar americana**, Brasília, DF, 2007, 180 p.

BRENER, Z.; PELLEGRINO, J. Reações imunológicas cruzadas em cães com doença de chagas e leishmaniose visceral naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 10, p. 45-49, 1958.

CABRERA, M. A. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A. B.; MARZOCHI, M. C. A.; XAVIER, S. C.; SILVA, A. V. M.; JANSEN, A. M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.

CARVALHO, M. R. **Eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana na Zona da Mata norte de Pernambuco**. 2005. 98 f. Dissertação (Mestrado) – Saúde Coletiva. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Pernambuco, 2005.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: Clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 25, n. 5, p. 358 -368, 2003.

CORREDOR, A.; GALLEGRO, J. F.; TESH, R. B.; PELÁEZ, D.; DIAZ, A.; MONTILLA, M.; PALÁU, M. T. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colômbia, South America. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 195, 1989.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, n. 5, p. 361-372, 1990.

CURY, N. H. A.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S. A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian nation park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 99-101, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Distribuição espacial da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38 (supl. 1), p. 411-412, 2005.

DEANE, M. P.; DEANE, L. M. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente parasitada pela *Leishmania donovani*. **O Hospital**, v. 46, p. 651-653, 1954.

DEANE, L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil, estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará**. 1956.162 f. Tese (Serviço Nacional de Educação Sanitária), Rio de Janeiro, 1956.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 4, p. 149-212, 1962.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 692-693, 2004.

DIAS, E. L.; BATISTA, Z. S.; GUERRA, R. M. S. N. C.; CALABRESE, K. S.; BARBALHO-LIMA, T.; ABREU-LIMA, A. L. Canine visceral Leishmaniasis (CVL): seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José de Ribamar municipality, Maranhão state, Brazil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 740-745, 2008.

EL HARITH, A.; KOLK, A.H.; LEEUWENBURG, J.; MUIGAI, R.; HUIGEN, E.; JELSMA, T.; KAGER, P.A. Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 7, p. 1321-1325, 1988.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, n. 28, p. 36 - 44, 2000.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: KILLICK-KENDRICK. Canine leishmaniasis: an update, 1999. Barcelona, **Proceedings of canine leishmaniasis fórum**. Barcelona, 1999. p. 6 – 10.

FRANÇA-SILVA, J. C.; BARATA, R. A.; DA COSTA, R. T.; MICHALSKY MONTEIRO, E.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; VIEIRA, E. P.; PRATA, A.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E.; FORTE-DIAS, C.; DA SILVA, J. C.; DIAS, E. S. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 213-220, 2005.

FRANKE, C. R.; STAUBACH, C.; ZILLER, M.; SCHLUTER, H. Trends in the temporal and spatial distribution of visceral and cutaneous leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, from 1985 to 1999. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 3, p. 236-241, 2002.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Leishmaniose visceral. In:____. **Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil**. Brasília, 2002. p. 27-28.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; REGO JUNIOR, F. A.; OSHIRO, E. T.; CHANG, M. R. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.

GÁLLEGO, M. Zoonosis emergentes por patogenos parasitos: las leishmaniosis. **Revue Scientifique et Technique the Office International des Epizooties**, v. 23, n. 2, p. 661-676, 2004.

GOMES, A. C. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Revista Brasileira de Dermatologia**, v. 67 p. 55-60, 1992.

GOMES NETO, C. M. B. **Pesquisa sobre o envolvimento do marsupial *Didelphis albiventris* Lund, 1840 (Didelphimorphia, Didelphidae) e de cães domiciliados no ciclo de transmissão da leishmaniose visceral no município de Camaçari, localidade de Barra do Pojuca, Bahia**. 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Ciência Animal nos Trópicos, Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2006.

GOMES, Y. M.; CAVALCANTI, M. P.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G. C.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **Veterinary Journal**, v. 175, p. 45-52, 2008.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: Quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, 2004.

GUERRA, J. A. O.; RIBEIRO, J. A. S.; COELHO, L. I. A. R. C.; BARBOSA, M. G. V.; PAES, M. G. V. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 22, p. 2319-2327, 2006.

IKEDA-GARCIA, F. A.; FEITOSA, M. M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, n. 62, p. 32-38, 2006.

LAINSON, R. Our present knowledge of the ecology and control of leishmaniasis in the Amazon Region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, p. 47-56, 1985.

LAINSON, R.; DYE, C.; SHAW, J. J.; MACDONALD, D. W.; COURTENAY, O. SOUZA, A. A.; SILVEIRA, F. T. Amazonian visceral leishmaniasis – distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 135-137, 1990.

LAINSON, R.; ISHIKAWA, E. A. Y.; SILVEIRA, F. T. American visceral leishmaniasis: wild animal hosts. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 630-631, 2002.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005

LAINSON R.; SHAW, J. J.; READY, P. D.; MILES, M. A.; PÓVOA, M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of, *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of “pian-bois”. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, p. 530-536, 1981.

LUVIZOTTO, M. C. R. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. In: ____ **Manual Técnico Leishmune**, Fortdodge, seção 3, p. 28-29, 2005.

MALTA, M. C. C.; LUPPI, M. M. Marsupialia – Didelphimorphia (gambá, cuíca). In: ZALMIR, S. C.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. Cap. 23, p. 340-357.

MARTINS, I. V. **Aspectos epidemiológicos e de hemostasia na Leishmaniose visceral canina**. 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado). Ciência Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2008.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, (supl. 2), p. 359-375, 1994.

MARZOCHI, M. C. A.; SABROZA, P. C.; TOLEDO, L. M.; MARZOCHI, K. B.; TRAMONTANO, N. C.; FILHO, F. B. R. Leishmaniose Visceral na cidade do Rio de Janeiro – Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 1, n. 1, p. 5-17, 1985.

MARZOCHI, M. C. A. Curso – Doenças Infecto-Parasitárias. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina** v. 63, p. 82-104, 1992.

MATTOS Jr., D. G.; PINHEIROS, J. M.; MENEZES, R. C.; COSTA, D. A. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 119-122, 2004.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

MELO, M. A. Leishmaniose visceral no Brasil: Desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 23, suppl. 1, p. 41-45, 2004.

MILES, M. A.; VEXENAT, J. A.; FURTADO CAMPOS, J. H.; FONSECA DE CASTRO, J. A. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral. In: KILLICK-KENDRICK. Canine leishmaniasis: an update, 1999. Barcelona. **Proceedings of canine leishmaniasis fórum**. Barcelona, 1999. p. 46-53.

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p.365-368, 2008.

MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTES-DIAS, C. L.;

DIAS, E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 2, n. 38, p. 147-152, 2005.

MOTTA, M. F. D. **Estudo do desenvolvimento extra-uterino de *Didelphis aurita* wied 1826 em cativeiro investigação de critérios para estimativa de idade.** 1988. 105 f. Dissertação (Mestrado). Museu Nacional. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1988.

MOURA, S. T.; FERNANDES, C. G. N.; PANDOLPHO, V.C.; RODRIGUES E SILVA, R. Diagnosis of canine leishmaniasis in the urban área of the District of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 101-102, 1999.

NOLI, C. Canine leishmaniasis. **Waltham Focus**, v. 9, n. 2, p.16-24, 1999.

PEREIRA, G.; MACHADO, G.; PEREIRA, R.; GADELHA, J.; BARBOSA, M. L. Leishmaniose visceral em Pernambuco: dados epidemiológicos. **Boletim Trimestral da Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias**, v. 5, n. 1, p. 53-70. 1985.

REBÊLO, J. M. M.; OLIVEIRA, S. T.; BARROS, V. L. L.; SILVA, F. S.; COSTA, J. M. L.; FERREIRA, L. A.; SILVA, A. R. Phlebotominae (Díptera: Psychodidae) de Lagoas, Município de Buriticupu, Amazônia Maranhense. I- Riquesa e abundância relativa das espécies em área de colonização recente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2000.

REY, L. O. O complexo "*Leishmania donovani*" e a leishmaniose visceral. In: _____. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 19, p. 251-266.

RONDON, F. C. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; FRANKE, C. R.; BARROS, R. S.; OLIVEIRA, F. R.; ALCANTARA, A. C.; DINIZ, A. T. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1, p. 24-31, 2008.

SANTA-ROSA, I. C. A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, ano 2, n. 11, p.24-28, 1997.

SANTIAGO, M. E. B. **Investigação de *Leishmania* spp. em *Didelphis* spp. (Linnaeus, 1756) na cidade de Bauru-São Paulo**, 2007. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista – Ciência Animal, São Paulo, 2007.

SANTOS, C. A. C. **Percepção, epidemiologia e aspectos clínicos da Leishmaniose visceral canina em área urbana do Estado de Pernambuco**. 2006. 61 f. Dissertação (Mestrado). Ciência Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2006.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; PAIVA, HOFFMANN, M.; FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical Veterinary Entomology**, v. 12, p. 315-317, 1998.

SHERLOCK, I. A.; GUITTON, M. A. Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia. III. Alguns dados sobre *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 21, p. 541-548, 1969.

SHERLOCK, I. A.; ALMEIDA, S. P. Notas sobre leishmaniose canina no estado da Bahia. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 22, p. 231-242, 1970.

SHERLOCK, I. A.; MIRANDA, J. C.; SADIGURSKI, M.; GRIMALDI JR, G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p.511, 1984.

SHERLOCK, I. A.; MIRANDA, J. C.; SADIGURSKI, M.; GRIMALDI JR, G. Experimental infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 1, p. 141, 1988.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 6, p. 671-683, 1996.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; BRAZIL, R. P.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O. Visceral leishmaniasis in the crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. **Veterinary Record**, v. 147, p. 421- 422, 2000.

SILVA, A. V. M.; PAULA, A. A.; CABRERA, M. A. A.; CARREIRA, J. C. A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 324-328, 2005.

SILVA, O. A.; BRAGA, G. M. S. Leishmaniose visceral canina no município de São Vicente Férrer, Estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 15, n. 2, p. 101-102, 2008.

SOUSA, C. B. P.; SANTOS, W. R.; FRANCA- SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human Visceral Leishmaniasis in Brasil. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TAFURI, W. L.; OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p. 203-212, 2001.

TRAVI, B. L.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J.; SEGURA, I.; ZEA, A.; GONCALVES, A.; VELEZ, I. D. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 50, n. 5, p. 557-565, 1994.

TRAVI, B. L.; MONTOYA, J.; GALEGO, J.; JARAMILLO, C.; LLANO, R.; VELEZ, I. D. Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera, Psychodidae), vector of visceral leishmaniasis in northern Colombia. **Journal of Medical Entomology**. v. 33, n. 3, p. 278-285, 1996.

TRAVI, B.; OSORIO Y.; BECERRA M.; ADLER, G. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 92, p. 275-278, 1998.

VIDAL, I. F. **Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose visceral canina em Campina Grande, Paraíba, Brasil**. 2008. 54 f. Dissertação (Mestrado). Ciência Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2008.

ZULUETA, A. M.; VILLARROEL, E.; RODRIGUEZ, N.; FELICIANGELI, M. D.; MAZZARRI, M.; REIS, O.; RODRIGUES, V.; CENTENO, M.; BARRIOS, R. M.; ULRICH, M. Epidemiologic aspects of American Visceral Leishmaniasis in an endemic focus in Eastern Venezuela. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 61, n. 6, p. 945-950, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **Weekly Epidemiological Record**, v. 77, n. 44, p. 365-372, 2002.

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1*

OCORRÊNCIA DE *Leishmania (L.) chagasi* EM GAMBÁS (*Didelphis* sp) NA MATA ATLÂNTICA DE PERNAMBUCO, BRASIL

* Artigo científico redigido de acordo com as normas de Revista “*Journal of Wildlife Diseases*” Estados Unidos da América. Fonte: www.wildlifedisease.org

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) representa um desafio para a saúde pública no Velho e Novo Mundo, sendo os gambás *Didelphis* sp considerados um dos principais reservatórios silvestres da doença. Este trabalho teve como objetivo pesquisar a ocorrência de formas amastigotas e determinar a soroprevalência de *Leishmania (L.) chagasi* em gambás (*Didelphis* sp) na Mata Atlântica de Pernambuco, Nordeste do Brasil. Um total de 100 gambás do gênero *Didelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae), sendo 74 gambás-de-orelha-branca *D. albiventris* (36 machos e 38 fêmeas) e 26 gambás-de-orelha-preta *D. aurita* (10 machos e 16 fêmeas) foram capturados em armadilhas *live trap* do tipo *Tomahawk* e *Sherman* para colheita de amostras de sangue e de medula óssea. Os gambás foram provenientes de sete áreas de Mata Atlântica (Estação Ecológica de Tapacurá, São Lourenço da Mata; Parque Estadual de Dois Irmãos, Recife; Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti, Paudalho; Parque Ecológico São José, Igarassu; Aldeia, Camaragibe; Estação Ecológica de Caetés, Abreu e Lima e Reserva Biológica de Saltinho, Tamandaré) e das cidades de Abreu e Lima, Camaragibe, Jaboatão dos Guararapes e Recife. Para a pesquisa de

formas amastigotas foram realizadas biópsias de medula óssea para realização do exame parasitológico direto e da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para o exame sorológico utilizou-se a Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI com o ponto de corte na diluição de 1:40. Dentre os 100 gambás examinados, todos foram negativos para a pesquisa de formas amastigotas e 1 (1%) foi soropositivo para anticorpos anti-*Leishmania (L.) chagasi*. Das 29 amostras de medula óssea de 22 *D. albiventris* e sete *D. aurita* todos foram negativos para PCR. O gambá soropositivo foi procedente da Cidade de Abreu e Lima, o que sugeriu a exposição deste animal ao agente etiológico.

Palavras Chave: *Didelphis* sp, Nordeste do Brasil, Leishmaniose Visceral, reservatórios silvestres, Mata Atlântica.

OCCURRENCE OF *Leishmania (L.) chagasi* IN OPOSSUMS (*Didelphis* sp) IN THE ATLANTIC FOREST, PERNAMBUCO, BRAZIL

* Scientific paper drafted in compliance with the norms of the Journal of Wildlife Diseases (United States of America); source: www.wildlifedisease.org

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a public health challenge and opossums are one of the main wild reservoirs of this disease. The aim of the present study was to investigate the occurrence of amastigotes and determine the seroprevalence of *Leishmania (L.) chagasi* in opossums (*Didelphis* sp.) from the Atlantic Forest of the state of Pernambuco (northeastern Brazil). A total of 100 opossums of the genus *Didelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae)

were caught in Tomahawk and Sherman live traps for the collection of blood and bone marrow samples – 74 *D. albiventris* (36 males and 38 females) and 26 *D. aurita* (10 males and 16 females). The animals came from seven areas of the Atlantic Forest (Estação Ecológica do Tapacurá, São Lourenço da Mata; Parque Estadual Dois Irmãos, Recife; Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti, Paudalho; Parque Ecológico São José, Igarassu; Aldeia, Camaragibe; Estação Ecológica de Caetés, Abreu e Lima; and Reserva Biológica de Saltinho, Tamandaré) as well as the cities of Abreu e Lima, Camaragibe, Jaboatão dos Guararapes and Recife. For the study of amastigotes, bone marrow biopsies were performed for the direct parasitological exams and polymerase chain reaction (PCR). Indirect Immunofluorescence Test were performed for the serological exam, with a cutoff point at the dilution of 1:40. Among the 100 opossums examined, all were negative for amastigotes and one (1%) was seropositive for anti-*Leishmania (L.) chagasi* antibodies. Among the 29 bone marrow samples from 22 *D. albiventris* and seven *D. aurita*, all PCR results were negative. The seropositive opossum was from the city of Abreu e Lima and suggests that this specimen was exposed to the etiological agent.

Keywords: *Didelphis* sp, Northeastern Brazil, Visceral Leishmaniasis, Wild Reservoirs, Atlantic Forest

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença parasitária de grande importância para a saúde pública, sendo causada pelo protozoário do gênero *Leishmania* que acometem o homem, assim como diferentes espécies de mamíferos silvestres e domésticos no Velho e Novo Mundo (Marzochi e Marzochi, 1994). No Brasil, a doença é causada pela *Leishmania*

(L.) chagasi, sendo transmitida ao homem e aos animais por intermédio do vetor *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) (Lainson e Rangel, 2005).

Atualmente, a enfermidade é considerada endêmica em 19 estados do Brasil, destacando-se os da região Nordeste, onde se encontra o maior número de casos humanos notificados. Seu ciclo de transmissão, que anteriormente ocorria no ambiente silvestre e rural, hoje se tornou cada vez mais comum nos centros urbanos do Brasil (Gontijo e Melo, 2004).

Em Pernambuco, com relação a LV, entre 1990 e 2000, foi descrita a evolução da distribuição geográfica (Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2005) indicando, 119 municípios com casos da doença, com maior concentração no Sertão (Pereira et al., 1985), observou-se o registro de 1.190 casos no Agreste e na Região Metropolitana de Recife (Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2005).

Os cães domésticos são considerados principais reservatórios urbanos da *L. (L.) chagasi*, sendo responsáveis pela manutenção do ciclo da doença (Santa Rosa e Oliveira, 1997; Miles et al., 1999; Noli, 1999; Feitosa, 2001), em função da frequência e abundância do parasitismo cutâneo (Thomé, 1999; Feitosa et al., 2000; Ribeiro e Michalick, 2001). Entretanto, várias espécies de mamíferos silvestres no Brasil têm sido encontradas naturalmente infectadas com o parasito, destacando-se, as raposas: *Lycalopex vetulus* no Ceará (Deane, 1956) e *Cerdocyon thous* no Pará (Lainson et al., 1990) e Minas Gerais (Silva et al., 2000) e os marsupiais gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) na Bahia e Pernambuco (Sherlock et al., 1984; Carvalho, 2005) e gambá-de-orelha-preta (*Didelphis marsupialis*) no Rio de Janeiro (Cabrera et al., 2003), e em outros países da América Latina, como Colômbia e Venezuela (Corredor et al., 1989; Travi et al., 1998; Zulueta et al., 1999).

Entre os reservatórios silvestres e/ou sinantrópicos da *L. (L.) chagasi*, os gambás *Didelphis* sp constituem um importante papel na epidemiologia da LV (Sherlock et al.,

1984; Sherlock, 1996), pois já foram descritos com infecção natural, possuem enorme capacidade de adaptação, resistem bem às agressões sofridas em seu ambiente, encontrando-se amplamente distribuídos em florestas modificadas pelo homem, habitando áreas de remanescentes de matas e principalmente por estarem presente em abundância em ambientes peridomiciliares (Alessio e Nunes, 2004). Essas características tornam os gambás importantes elo na transmissão da leishmaniose no Brasil (Cabrera et al., 2003).

No Estado de Pernambuco, Brasil, ocorrem duas espécies de gambás: gambá-de-orelha-branca (*D. albiventris* Lund, 1840) e o gambá-de-orelha-preta (*D. aurita* Wied-Neuwied, 1826) que pertencem à Ordem Didelphimorphia e família Didelphidae (Monteiro da Cruz et al., 2002; Malta e Lupi, 2006).

O primeiro relato de *L. (L.) chagasi* em gambá-de-orelha *D. albiventris* naturalmente infectado foi no município de Jacobina, no Estado da Bahia, Brasil (Sherlock et al. 1984). Posteriormente, indivíduos desta espécie foram infectados experimentalmente e mostraram-se susceptíveis a LV, desenvolvendo a forma sistêmica com hepatomegalia, lesões no fígado e baço, quantidade abundante de formas de amastigotas e derme com infiltrado, dos quais não foi associado ao parasito. Todos os gambás infectados apresentaram doença subclínica (Sherlock et al., 1988).

Em estudo na zona da mata norte estado de Pernambuco, Brasil, Carvalho (2005) colheu fragmentos de baço e pele de 17 gambás-de-orelha-branca (*D. albiventris*), para realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), e destes 1,7% (1/17) das amostras do baço foi positiva. Contudo, as amostras de pele foram negativas. Gomes Neto (2006) pesquisou 15 exemplares de *D. albiventris* proveniente de Camaçari, Bahia, encontrando 26,7% (4/15) soropositivos, pelo exame de ELISA e, pela técnica da PCR, foram utilizados 17 animais, sendo 64,7% (11/17) positivos.

Considerando o comportamento sinantrópico dos gambás e seu papel na cadeia epidemiológica da LV, o objetivo desta pesquisa foi pesquisar a presença de anticorpos anti-

Leishmania (L.) chagasi em gambás *Didelphis* sp, provenientes da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de janeiro de 2008 a fevereiro de 2009 foram capturados 100 gambás do gênero *Didelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae), sendo 74 gambás-de-orelha-branca *D. albiventris* (36 machos e 38 fêmeas), dos quais três eram filhotes, 26 jovens, um subadulto e 44 adultos e 26 gambás-de-orelhas-pretas *D. aurita* (10 machos e 16 fêmeas), destes, 15 eram jovens, três subadultos, oito adultos. O padrão de idade foi considerado de acordo com a dentição (Macedo et al., 2006).

Os gambás foram provenientes de sete áreas de Mata Atlântica: Estação Ecológica de Tapacurá, São Lourenço da Mata (latitude: 8° 3'23.12"S, longitude: 35°10'48.53"O); Parque Estadual de Dois Irmãos, Recife (latitude: 8° 0'20.79"S, longitude: 34°56'51.85"O); Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti - CIMNC, Paudalho (latitude: 7°50'23.53"S, longitude: 35° 6'3.97"O); Parque Ecológico São José, Igarassu (latitude: 7°50'19.83"S, longitude: 34°59'52.86"O); remanescente da região de Aldeia, Camaragibe (latitude: 7°57'31.86"S, longitude: 34°59'6.99"O); Estação Ecológica de Caetés, Paulista (latitude: 7°55'17.23"S, longitude: 34° 55'44.39"O) e Reserva Biológica de Saltinho, Tamandaré (latitude: 8°40'09.23"S, longitude: 35°08'47.75"O). Alguns animais também foram capturados no *campus* da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife e das cidades de Abreu e Lima, Camaragibe, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco.

Cada período de captura teve cinco noites consecutivas e foram realizadas a cada 15 dias, em média, totalizando um esforço de captura de 25.231 armadilhas/noite. Para a captura dos animais, foram utilizadas armadilhas do tipo *Tomahawk* e do tipo *Sherman* ambas do tipo *Live trap*. Elas foram dispostas obedecendo duas metodologias, *grid* e

transecto. Cada animal do estudo foi identificado com brincos de alumínio (ZT 900[®], Zootech, Curitiba, Brasil) colocados na orelha esquerda, ou com uso da tatuagem na face medial do membro pélvico direito, utilizando-se tatuador (Mei-cha Dinasty Zafiro 2000[®], São Paulo, Brasil).

Os gambás foram contidos fisicamente utilizando-se luvas de raspas de couro e a contenção química foi realizada com a associação de cloridrato de cetamina na dose de 30 mg/kg (50mg/mL, Vetanarcol, König, Brasil) e cloridrato de xilazina na dose de 2 mg/kg (20mg/mL, Xilazin, Syntec, Brasil) pela via intramuscular (Malta e Luppi, 2006). Os animais foram monitorados por meio dos parâmetros fisiológicos (frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura) até o momento da recuperação anestésica e foram liberados no local de origem.

As amostras sanguíneas foram colhidas pela venopunção da veia caudal lateral, sendo estocadas em tubos estéril sem anticoagulante, devidamente identificadas. No Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da UFRPE, os tubos com sangue foram centrifugados para obtenção do soro sanguíneo que foram mantidos em microtubos de polipropileno e congelado a -20°C até a realização do exame de sorodiagnóstico para leishmaniose.

Após tricotomia e anti-sepsia da região lateral da coxa direita ou esquerda com álcool e povidine, foi realizada a biópsia de medula óssea, por punção medular do fêmur, utilizando-se seringas descartáveis de 3mL acopladas a agulhas de tamanho 40x12 mm. Uma parte do material puncionado foi utilizada para a realização de esfregaços em lâminas de vidro, três lâminas por animal.

Outra parte do material puncionado foi acondicionada em tubo de polipropileno de 1,5 mL, estéril, contendo EDTA e conservada a - 20°C até o processamento da PCR.

A leitura das lâminas foi desenvolvida no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da UFRPE. As lâminas foram fixadas com álcool metílico e coradas pelo método de coloração rápida Panótico. Posteriormente, foram observadas em microscópio óptico com objetiva de 100x na intenção de verificar a presença de formas amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*.

Para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*Leishmania (L.) chagasi* foi realizada o teste de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), segundo Bray e Lainson (1965), utilizando-se a Cepa MCER/BR/81/M6445 e como ponto de corte 1:40. O conjugado anti-IgG de gambá foi produzido de acordo com o método descrito por Beutner et al. (1965), Camargo (1974) e San Martin-Savani (1998). O teste sorológico e a produção do conjugado anti-IgG foi realizado no Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de São Paulo.

A PCR foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular - Área de Sanidade Animal - Embrapa Gado de Corte localizada em Campo Grande, MS. Utilizou-se o kit Easy (Invitrogen) para a extração do DNA. As reações foram realizadas conforme descrito em Cortes et al. (2004) e com os primers: MC1 (5'GTTAGCCGATGGTGGTCTTG 3') MC2 (5'CACCCATTTTCCGATTTTG 3'). Foi realizada a PCR de 29 amostras de medula óssea, sendo 22 animais da espécie *D. albiventris* (10 machos e 12 fêmeas) e sete de *D. aurita* (um macho e seis fêmeas).

Esta pesquisa possuiu licença do Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade (ICMBio SISBIO Números 11854-1, 11854-2 e 10769-2), órgão do Governo Brasileiro responsável pela concessão de autorizações relacionadas com a exploração, pesquisa e gestão da fauna silvestre brasileira.

RESULTADOS

Dos 100 gambás capturados, nenhum apresentou lesões sugestivas de leishmaniose ao exame clínico. No exame parasitológico direto, as 300 lâminas observadas (100%) foram negativas para a presença das formas amastigotas de *L.(L.) chagasi*.

Dentre as 100 amostras de soro analisadas, 1% (1/100) foi soropositiva para anticorpos anti- *L. (L.) chagasi*. O gambá positivo foi da espécie *Didelphis albiventris*, adulto, macho, procedente do Município de Abreu e Lima, Região Metropolitana de Recife.

Das 29 amostras analisadas para a PCR todas foram negativas.

DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos são muito importantes para verificar o papel dos animais silvestres na cadeia de transmissão da LV. Esta zoonose que avança cada vez mais em áreas urbanas pode possuir nestes ambientes outros reservatórios silvestres além do cão doméstico. Daí, a necessidade de intensificação de estudos com animais sinantrópicos que fazem um elo entre o ambiente silvestre e as áreas urbanas.

O encontro de um gambá-de-orelha-branca (*D. albiventris*) soropositivo para *L. (L.) chagasi* indicou que este marsupial teve contato prévio com este agente. Como seu deslocamento e sua área de vida não são muito extensos, possivelmente a região geográfica de Abreu e Lima, PE, pode ter um ciclo enzoótico silvestre da LV com a participação de marsupiais. Em Barra de Guaratiba, RJ, Cabrera et al. (2003) verificaram que a distância da residência à mata e a visita do gambá-de-orelha-preta (*D. marsupialis*) ao peridomicílio foram consideradas variáveis predisponentes da infecção em cães pela *L. (L.) chagasi*, demonstrando a existência de um ciclo enzoótico silvestre no local. Apesar da escassez de dados para incriminar este marsupial como reservatório primário, as evidências sugerem que ele represente um papel importante na manutenção da *L. (L.) chagasi* nesta localidade.

A utilização do conjugado anti-IgG de gambá aumentou a sensibilidade e especificidade da RIFI e o encontro de 1% (1/100) de soropositivos pode ser atribuído a outros fatores. Este resultado foi inferior aos registrados por Cabrera et al. (2003), utilizando o mesmo método, que encontraram 29,0% (9/31) de animais soropositivos pela RIFI; por Santiago (2007) em área urbana do município de Bauru, SP, que detectou 71,02% (76/107) de soropositivos pelo ELISA, e Gomes Neto (2006) que encontrou soroprevalência de 26,7% (4/15), soropositivos utilizando o ELISA no município de Camaçari, BA.

Nos exames parasitológicos, os resultados negativos para as formas amastigotas da *L. (L.) chagasi*, também foram encontrados no Brasil por Cabrera et al. (2003) que realizaram esfregaços de baço, fígado, linfonodos e medula óssea dos gambás de Barra de Guaratiba, RJ e Sherlock et al. (1984) em Jacobina, BA que utilizaram esfregaço de baço, fígado e pele. Esses resultados podem ser explicados devido à baixa densidade parasitária, que ocorre na maioria das infecções naturais de animais silvestres, dificultando assim o encontro dos parasitos em exame parasitológico direto (Rey, 2001).

A PCR realizada dos 29 animais resultou em negativa para todas as amostras. Convém salientar que as mesmas amostras foram negativas tanto na RIFI quanto ao exame parasitológico da medula óssea. Por outro lado, Gomes Neto (2006) em Barra do Ipojuca, registrou 64,7% (11/17) de animais positivos na PCR no município de Camaçari, BA e Santiago (2007) em área urbana do município de Bauru, SP, encontrou 91,56% (103/112) de positivos na PCR. Estas diferenças nas frequências observadas pode ser explicada devido à endemicidade do local de estudo, da cepa de *Leishmania* sp, da resposta imune do hospedeiro reservatório, além da natureza do antígeno utilizado e do teste diagnóstico (Ferrer, 1999).

Sendo o gambá-de-orelha-branca (*D. albiventris*) uma espécie com elevada capacidade de adaptação ao ambiente humano e raramente apresentar sinais clínicos da

doença, a detecção de anticorpos anti-*L. (L.) chagasi*, mesmo com a reduzida frequência encontrada, confirma a participação desta espécie de marsupial como um hospedeiro silvestre na cadeia epidemiológica da leishmaniose visceral na Região Metropolitana do Recife, visto que nesta área já foram relatados casos LV em humanos e cães (Carvalho, 2005). Entretanto, mais pesquisas serão necessárias para elucidar o grau de envolvimento dos gambás na cadeia epidemiológica da LV nesta região e sua importância no potencial zoonótico da *L. (L.) chagasi*.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (Projeto Universal Nº 478229/20070); Ao Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de São Paulo; Ao Laboratório de Biologia Molecular - Área de Sanidade Animal - Embrapa Gado de Corte localizada em Campo Grande – MS; À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de mestrado; À Estação Ecológica de Tapacurá – ESEC; Ao Parque Estadual de Dois Irmãos – PEDI; Ao Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti – CIMNC; Ao Parque Ecológico São José; À Estação Ecológica de Caetés; e À Reserva Biológica de Saltinho.

LITERATURA CITADA

ALESSIO, F. M., e J. G. NUNES. 2004. Importância de *Didelphis albiventris* como reservatório de parasitas intestinais de interesse médico em área urbana. *In Proceedings: XXV Congresso Brasileiro de Zoologia*, Brasília, Distrito Federal, pp. 463.

BEUTNER, E. H. 1965. A new fluorescent antibody method: mixed antiglobulin immunofluorescence-staining. *Nature* 208: 353-355.

BRAY, R. S., e R. LAINSON. 1965. The immunology and serology of leishmaniasis. I. The fluorescent antibody staining technique. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene 59: 535-544.

CABRERA, M. A. A., A. A. PAULA, L. A. B. CAMACHO, M. C. A. MARZOCHI, S. C. XAVIER, A. V. M. SILVA, e A. M. JANSEN. 2003. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. Revista do Instituto de Medicina Tropical 45: 79-83.

CAMARGO, M. E. 1974. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Revista Brasileira de Patologia Clínica 10: 143-169.

CARVALHO, M. R. 2005. Eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana na Zona da Mata norte de Pernambuco. Ph D. Dissertação, Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Pernambuco, Brasil, 98 pp.

CORREDOR, A., J. F. GALLEGU, R. B. TESH, D. PELÁEZ, A. DIAZ, M. MONTILLA, e M. T. PALÁU. 1989. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colômbia, South America. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 83: 195.

CORTES, S., N. ROLÃO, J. RAMADA, e L. CAMPINO. 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania*

donovani s. l.-specific kinetoplastid primers. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 98: 12-17.

DANTAS-TORRES, F., e S. P. BRANDÃO-FILHO. 2005. Distribuição espacial da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 38: 411-412.

DEANE, L. M. 1956. Leishmaniose visceral no Brasil, estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará. PhD. Dissertação, Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro, Brasil, 162 pp.

FEITOSA, M. M., F. A. IKEDA, M. C. R. LUVIZOTO, e S. H. V. PERRI. 2000. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). Clínica Veterinária 28: 36-44.

FEITOSA, M. M. 2001. Leishmaniose visceral: um desafio crescente. Revista Intervet Pet 1-15.

FERRER, L. M. 1999. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In Proceedings: of canine leishmaniasis forum, Barcelona, Espanha, R. Killick-Kendrick (ed), Hoechst Roussel Vet., Sumène, France, pp. 6-10.

GOMES NETO, C. M. B. 2006. Pesquisa sobre o envolvimento do marsupial *Didelphis albiventris* Lund, 1840 (Didelphimorphia, Didelphidae) e de cães domiciliados no ciclo de transmissão da leishmaniose visceral no município de Camaçari, localidade de Barra do

Pojuca, Bahia. Ph D. Dissertação, Ciência Animal nos Trópicos, Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, Bahia, Brasil, 79 pp.

GONTIJO, C. M. F., e M. N. MELO. 2004. Leishmaniose visceral no Brasil: Quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 7: 338-349.

LAINSON, R., C. DYE, J. J. SHAW, D. W. MACDONALD, O. COURTENAY, A. A. SOUZA, e F. T. SILVEIRA. 1990. Amazonian visceral leishmaniasis – distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 85: 135-137.

LAINSON, R., e E. F. RANGEL. 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 811-827.

MACEDO, J., D. LORETTO, M. V. VIEIRA, e R. CERQUEIRA. 2006. Classes de desenvolvimento em Marsupiais: um método para animais vivos. *Mastozoologia Neotropical* 13: 133-136.

MALTA, M. C. C., e M. M. LUPPI 2006. Marsupialia – Didelphimorphia (gambá, cuíca). *In* Tratado de animais selvagens: medicina veterinária, S. C. Zalmir, J. C. R. Silva, e J. L. Catão-Dias (eds.). Roca, São Paulo, Brasil, pp. 340-357.

MARZOCHI, M. C. A., e K. B. F. MARZOCHI. 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Caderno de Saúde Pública* 10: 359-375.

MILES, M. A., J. A. VEXENAT, J. H. FURTADO CAMPOS, e J. A. FONSECA DE CASTRO. 1999. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral. *In* Proceedings of canine leishmaniasis forum, Barcelona, Espanha, R. Killick-Kendrick (ed), Hoechst Roussel Vet., Sumène, France, pp. 46-53.

MONTEIRO DA CRUZ, M. A. O., M. C. C. CABRAL, L. A. M. SILVA, e M. L. C. B. CAMPELLO. 2002. Diversidade da mastofauna no estado de Pernambuco. *In* Diagnóstico da biodiversidade de Pernambuco, M. Tabarelli, e J. M. C. Silva (orgs.). Massangana, Pernambuco, Brasil, pp. 557-579.

NOLI, C. 1999. Canine leishmaniasis. *Waltham Focus*. 9: 16-24.

PEREIRA, G., G. MACHADO, R. PEREIRA, J. GADELHA, e M. L. BARBOSA. 1985. Leishmaniose visceral em Pernambuco: dados epidemiológicos. *Boletim trimestral da clínica de doenças infecciosas e parasitárias* 5: 53-70.

REY, L. O. 2001. O complexo "*Leishmania donovani*" e a leishmaniose visceral. *In* Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem, L. O. Rey (ed), 2nd Edition, Guanabara Koogan Rio de Janeiro, Brasil, pp. 251-266.

RIBEIRO, V. M., e M. S. M. MICHALICK. 2001. Protocolos terapêuticos e controle da leishmaniose visceral canina. *Revista Nosso Clínico*. 24: 10-20.

SAN MARTIN-SAVANI, E. M. 1998. Inquérito sorológico sobre Leishmaniose Tegumentar Americana em cães errantes do município de São Paulo, 1995-1996. Ph. D. Dissertação, Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 70pp.

SANTA-ROSA, I. C. A., e I. C. S. OLIVEIRA. 1997. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. *Clínica Veterinária*. 11: 24-28.

SANTIAGO, M. E. B. 2007. Investigação de *Leishmania* spp. em *Didelphis* spp. (Linnaeus, 1756) na cidade de Bauru - São Paulo. Ph D. Dissertação, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, São Paulo, 62 pp.

SHERLOCK, I. A., J. C. MIRANDA, M. SADIGURSKI, e G. GRIMALDI JR. 1988. Experimental infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 83: 141.

SHERLOCK, I. A., J. C. MIRANDA, M. SADIGURSKI, e G. GRIMALDI JR. 1984. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 79: 511.

SHERLOCK, I. A. 1996. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1: 671-683.

SILVA, E. S., C. M. F. GONTIJO, R. P. BRAZIL, C. PIRMEZ, e O. FERNANDES. 2000. Visceral leishmaniasis in the crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. *Veterinary Record* 147: 421- 422.

THOMÉ, S. M. G. 1999. Cuidados com as leishmanioses. *Revista Cães e Gatos*. 14: 46-50.

TRAVI, B., Y. OSORIO, M. BECERRA, e G. ADLER. 1998. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 92: 275-278.

ZULUETA, A. M., E. VILLARROEL, N. RODRIGUEZ, M. D. FELICIANGELI, M. MAZZARRI, O. REIS, V. RODRIGUES, M. CENTENO, R. M. BARRIOS, e M. ULRICH. 1999. Epidemiologic aspects of American Visceral Leishmaniasis in an endemic focus in Eastern Venezuela. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 61: 945-950.

3.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2*

OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS anti-*Leishmania (L.) amazonensis* EM GAMBÁ-DE-ORELHA-PRETA (*Didelphis aurita*) NA MATA ATLÂNTICA DE PERNAMBUCO, BRASIL

* Short communication redigida de acordo com as normas da Revista “Memórias do Instituto Oswaldo Cruz” Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Fonte: <http://memorias.ioc.fiocruz.br>

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana é uma zoonose amplamente distribuída no Brasil com registro de casos autóctones em todos os estados. Este trabalho teve como objetivo descrever a ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania (L.) amazonensis* em gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) na Mata Atlântica do Estado de Pernambuco. Foram capturados 26 gambás-de-orelha-preta, 3,8% (1/26) foi soropositivo para anticorpos anti-*Leishmania (L.) amazonensis*, pela técnica da RIFI com ponte de corte na diluição 1:40. Esta é a primeira descrição da ocorrência de anticorpos anti-*L. (L.) amazonensis* em *D. aurita* em Pernambuco.

Palavras-chave: Marsupial, *L. (L.) amazonensis*, Nordeste do Brasil.

OCCURRENCE OF anti- *Leishmania (L.) amazonensis* ANTIBODIES IN BLACK-EARED OPOSSUM (*Didelphis aurita*) IN THE ATLANTIC FOREST OF THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL

* Short communication drafted in compliance with the norms of the magazine “Memórias do Instituto Oswaldo Cruz” Rio de Janeiro, RJ, Brazil; source: <http://memorias.ioc.fiocruz.br>

ABSTRACT

American tegumentary leishmaniasis is a widely distributed zoonosis in Brazil, with records of native cases in all states of the country. The aim of the present study was to describe the occurrence of anti-*Leishmania (Leishmania) amazonensis* antibodies in a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from the Atlantic Forest of the state of Pernambuco. Twenty-six black-eared opossums were captured, one of which (3.8%) was seropositive for anti-*Leishmania (L.) amazonensis* antibodies, as determined by indirect immunofluorescence with a cutoff point at the dilution of 1:40. This is the first description of the occurrence of anti-*L. (L.) amazonensis* antibodies in *D. aurita* in Pernambuco.

Keywords: Marsupial, American tegumentary leishmaniasis, Northeastern Brazil

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma zoonose de relevante importância na saúde pública em virtude de sua ampla distribuição geográfica, alta prevalência, severidade dos casos, dificuldades no seu diagnóstico e tratamento (MS 2007). No Brasil, já foram identificadas sete espécies de *Leishmania* dermatrópicas, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania* (MS 2007). Dentre as espécies de *Leishmania* que ocorrem no Brasil, a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é uma das mais prevalentes, com distribuição geográfica em florestas primárias e secundárias da Amazônia, especialmente em áreas de igapó e de floresta tipo “várzea”. Sua presença amplia-se para o Nordeste, Sudoeste e Centro-Oeste (Marzochi 1992, MS 2007). A LTA possui como principal hospedeiro silvestre o roedor rato-soiá (*Proechymis* sp), além de outros roedores:

rato-do-mato (*Oryzomys* sp), rato-de-espinho (*Neacomys* sp), rato-d'água (*Nectomys* sp), assim como marsupiais e canídeos silvestres (MS 2007). Seus principais vetores são *Lutzomyia flaviscutelata*, *Lu. reducta* e *Lu. olmeca nociva*. Estas espécies de mosquitos são pouco antropofílicas, o que justifica uma menor frequência de infecção humana pela *Leishmania (L.) amazonensis* (Marzochi 1992, Lainson 1997, MS 2007).

Com os constantes desmatamentos em áreas florestais, como na Mata Atlântica, a nova dinâmica de dispersão dos animais silvestres e de vetores adquiriram um importante papel na cadeia epidemiológica da LTA. Isto se deve à enorme capacidade de adaptação dos vetores e dos reservatórios as agressões sofridas em seu ambiente e ao convívio com os humanos, facilitando assim a proliferação da LTA nas periferias das cidades (Gomes 1992).

No Estado de Pernambuco não há relatos de estudos sobre a ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania (L.) amazonensis* em animais silvestres. Desta forma, este trabalho teve como objetivo descrever a ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania (L.) amazonensis* em gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) na Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, nordeste do Brasil.

No período de janeiro de 2008 até fevereiro de 2009 foram capturados 26 *D. aurita* (10 machos e 16 fêmeas), dos quais, 15 eram jovens, três subadultos, oito adultos.

Os gambás foram provenientes de quatro áreas de Mata Atlântica do Estado de Pernambuco: Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti - CIMNC, Paudalho (latitude: 7°50'23.53"S, longitude: 35° 6'3.97"O); Parque Ecológico São José, Igarassu (latitude: 7°50'19.83"S, longitude: 34°59'52.86"O); Estação Ecológica de Caetés, Abreu e Lima (latitude: 7°55'17.23"S, longitude: 34° 55'44.39"O) e Reserva Biológica de Saltinho, Tamandaré (latitude: 8°40'09.23"S, longitude: 35°08'47.75"O).

Cada período de captura teve cinco noites consecutivas e foram realizadas a cada 15 dias, em média, totalizando um esforço de captura de 25.231 armadilhas/noite. Para a

captura dos animais foram utilizadas armadilhas de modelo *Tomahawk* e do tipo *Sherman* ambas do tipo *Live trap*. Elas foram dispostas obedecendo duas metodologias, *grid* e transecto. Cada animal do estudo foi identificado com brincos de alumínio colocados na orelha esquerda, ou com uso da tatuagem na face medial do membro pélvico direito, utilizando-se tatuador.

Os gambás foram contidos fisicamente utilizando-se luvas de raspas de couro e a contenção química foi realizada com a associação de cloridrato de cetamina na dose de 30 mg/kg (50mg/mL) e cloridrato de xilazina na dose de 2 mg/kg (20mg/mL) pela via intramuscular (Malta e Luppi, 2006). Os animais foram monitorados por meio dos parâmetros fisiológicos (frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura) até o momento da recuperação anestésica e foram liberados no local de origem.

As amostras sanguíneas foram colhidas pela venopunção da veia caudal lateral, sendo estocadas em tubos estéril sem anticoagulante, devidamente identificadas. No Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da UFRPE, os tubos com sangue foram centrifugados para obtenção do soro sanguíneo que foram mantidos em microtubos de polipropileno e congelado a -20°C até a realização do exame de sorodiagnóstico para leishmaniose.

Esta pesquisa possuiu licença do Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade (ICMBio SISBIO Números 11854-1, 11854-2 e 10769-2), órgão do Governo Brasileiro responsável pela concessão de autorizações relacionadas com a exploração, pesquisa e gestão da fauna silvestre brasileira.

Para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*L. (L.) amazonensis* foi realizada o teste de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), segundo Bray e Lainson (1965), utilizando-se a Cepa IFLA/BR/67/PH8 e com ponto de corte na diluição de 1:40. O conjugado anti-IgG de gambá foi produzido de acordo com o método descrito por Beutner (1965), Camargo

(1974) e San Martin-Savani (1998). O teste sorológico e a produção do conjugado anti-IgG foi realizado no Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de São Paulo.

Das 26 amostras de soro analisadas pela RIFI, 3,8% (1/26) foi soropositiva para anticorpos anti-*Leishmania (L.) amazonensis*. O gambá positivo foi da espécie *Didelphis aurita*, fêmea, jovem, do Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti - CIMNC, Paudalho, localizado na Zona da Mata Norte de Pernambuco. Nenhum dos animais apresentou lesões sugestivas de LTA ao exame clínico.

Este é o primeiro relato da ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania (L.) amazonensis* em gambá-de-orelha-preta (*D. aurita*) em unidade de treinamento militar no município de Paudalho e no Estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. Nesta mesma área, a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* já foi identificada em roedores silvestres e sinantrópicos, tais como: rato-do-chão (*Bolomys lasiurus*), rato-d'água (*Nectomys squamipes*) e rato-de-telhado (*Rattus rattus*) (Brandão-Filho et al. 2003). Recentemente, também foi descrito um novo surto de LTA causado pela *Leishmania (Viannia) braziliensis* em 71 casos humanos confirmados pelos critérios clínicos, epidemiológicos e laboratorial (intradermorreação de Montenegro e biópsias das lesões) (Andrade et al. 2009). Desta forma, estes resultados indicaram que nesta unidade de treinamento possivelmente existe um ciclo enzoótico silvestre na Mata Atlântica desta região.

No Estado do Amazonas foi relatada a ocorrência *L. (L.) amazonensis* em 25% (2/8) dos gambás-de-orelha-preta (*D. marsupialis*) capturados em mata virgem de um campo de instrução do exército, por meio de cultura e posteriormente inoculado em hamsters (Arias et al. 1981). Ao Norte do Pará, Lainson et al. (1981) isolaram *L. (L.) amazonensis* em 4, 76% (1/21) gambá-de-orelha-preta (*D. marsupialis*), 18,18% (2/11) cuíca-lanosa (*Philander opossum*) e 66,66% (2/3) cuíca-de-quatro-olhos (*Metachirus nudicaudatus*).

As principais espécies de flebotomíneo incriminadas na transmissão da *L. (L.) amazonensis*, são: *Lu. flaviscutellata* e *Lu. olmeca*, porém não são relatadas na área em que foi encontrado o gambá soropositivo. No entanto, há relatos de *Lu. flaviscutellata* no Parque Estadual de Dois Irmãos – PEDI podendo essa espécie estar associada na transmissão da LTA no CIMNC (Balbino et al. 2001).

Devido a sua adaptação em florestas alteradas pela ação antrópica e por conviverem próximo ao homem os gambás do gênero *Didelphis* adquiriram grande importância como hospedeiro da LTA. Entretanto, mais pesquisas serão necessárias para elucidar o papel deste hospedeiro na cadeia epidemiológica da LTA na área investigada e sua importância no potencial zoonótico da *L. (L.) amazonensis*.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (Projeto Universal Nº 478.229/2007-0); Ao Laboratoire Population Environnement Developpement, UMR-151, Université de Provence – IRD pelo apoio financeiro e logístico; Ao Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de São Paulo; A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de mestrado; Ao Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti; Ao Parque Ecológico São José; À Estação Ecológica de Caetés; À Reserva Biológica de Saltinho.

REFERÊNCIAS

Andrade MS, Brito MEF, Silva ST, Ishikawa E, Carvalho SMS, Brandão-Filho SP 2009. Novo surto de leishmaniose tegumentar americana em área de treinamento militar na Zona da Mata norte do Estado de Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 594-596.

Arias JR, Naiff RD, Miles MA, Souza AA 1981. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 75: 537-540.

Balbino VQ, Marcondes CB, Alexander B, Luna LKS, Lucena MMM, Mendes ACS, Andrade PP 2001. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* Ward & Frahia, 1977 outside of Amazonian Region, in Recife, State of Pernambuco, Brazil (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 315-317.

Beutner EH 1965. A new fluorescent antibody method: mixed antiglobulin immunofluorescence-staining. *Nature* 208: 353-355.

Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, Shaw JJ 2003. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 97: 291-296.

Bray RS, Lainson R 1965. The immunology and serology of leishmaniasis. I. The fluorescent antibody staining technique. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 59: 535-544.

Camargo ME 1974. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Rev Bras Pat Clín* 10: 143-169.

Gomes AC 1992. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. *Rev Bras Dermatol* 67: 55-60.

Lainson R, Shaw JJ, Ready PD, Miles MA, Póvoa M 1981. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of, *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of “pian-bois”. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 75: 530-536.

Lainson R 1997. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região amazônica do Brasil. *Rev Paraense Med* 11: 29-40.

Malta MCC, Luppi MM 2006. Marsupialia – Didelphimorphia (gambá, cuíca). In: Zalmir, S. C.; Silva, J. C. R.; Catão-Dias, J. L. *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária*. São Paulo: Roca, p. 340-357.

Marzochi MCA 1992. Curso – Doenças Infecto-Parasitárias. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *J Bras Med* 63: 82-104.

MS - Ministério da saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica 2007. *Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar americana*, MS, Brasília, 180 pp.

San Martin-Savani, EM 1998. Inquérito sorológico sobre Leishmaniose Tegumentar Americana em cães errantes do município de São Paulo, 1995-1996. Dissertação, Universidade de São Paulo, São Paulo, 70pp.

4 CONCLUSÕES

A ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania (L.) chagasi* e anti- *Leishmania (L.) amazonensis* em gambás do gênero *Didelphis*, procedentes da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco indicam a possibilidade de um ciclo enzoótico silvestre da Leishmaniose Visceral e da Leishmaniose Tegumentar Americana, respectivamente. No entanto novos trabalhos serão necessários para elucidar o papel destes didelfídeos como hospedeiros na cadeia epidemiológica da leishmaniose na Mata Atlântica do Estado de Pernambuco.