



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ECOEPIDEMIOLOGIA DA *Leishmania* spp EM ZONA
ENDÊMICA DO DISTRITO DO TIRIRICAL**

Alessandra Lima Rocha

São Luis – MA
2013

Alessandra Lima Rocha

**ECOEPIDEMIOLOGIA DA *Leishmania* spp EM ZONA
ENDÊMICA DA ILHA DE SÃO LUIS, ESTADO DO MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-graduação
da Universidade Estadual do
Maranhão, como requisito
parcial para obtenção do grau
de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva – UEMA

São Luis
2013

Rocha, Alessandra Lima.

Ecopidemiologia da “Leishmaniose SPP” em zona epidêmica do Distrito
Tirirical, São Luís/MA / Alessandra Lima Rocha.– São Luís, 2013.

73f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade
Estadual do Maranhão, 2013.

Orientador: Profa. Ana Lúcia Abreu Silva

1.Leishmaniose. 2.Cão. 3.*Didelphis marsupialis*. I.Título

CDU: 636.7:616.993.161(812.1)

Dissertação de Mestrado defendida aos 27 de maio de 2013, banca examinadora composta pelos seguintes membros:

1° Membro

Profa. Dra. Michele Moreira Martins de Oliveira
Faculdade de Imperatriz - FACIMP

2° Membro

Prof. Dr. Antonio Rafael da Silva
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

3° Membro

Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

*Aos meus amados Pais, Benoni e Conceição,
por acreditarem que a educação é um elemento
transformador na vida de um ser humano.*

Agradecimentos

O meu primeiro gesto é de agradecimento a Deus por ter estado ao meu lado em todos os momentos e por ter colocado em meu coração o amor aos animais.

Aos meus pais, Benoni e Conceição, que mesmo diante de todas as dificuldades, me incentivaram a transformar o meu sonho em realidade;

A minha orientadora, Profa Ana Lucia Abreu Silva, por nunca ter desistido de me orientar e sempre compreender as minhas dificuldades, coisas está a faz um ser humano único e inesquecível em minha vida;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e a CAPES pelo auxílio ao longo destes dois anos;

Ao Prof Fábio, pelos conselhos, orientações e principalmente pela amizade dada ao longo destes anos no laboratório de Anatomopatologia;

Aos professores Ferdinan, Alcina e Debora pelas orientações;

A veterinária Nádia, Sofia e Ana Caroline no acompanhamento deste trabalho;

Os estagiários Aarão, Carol, Anderson, Higor, Breno, André, Gustavo, Denize, Alana, Sabrina, Vanessa, Pablo, Allef, Renata, Marlise, Isadora e Marina por trazerem vida a PATOMOL;

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular, Joyce (apoio sempre presente), Mylena (conselhos diante dos problemas do dia-a-dia), Zulmira, Larissa, Weline e Iara (pelo bate-papo nos momentos de descontração);

Aos meus irmãos de coração Inaldo, Rose, Glaucia, Francineto e Ronaldo, por serem a minha família nesses anos e serem a promessa viva de Deus, me fazendo habitar em família;

A Profa Solange por ser uma amiga e acima de tudo um modelo a ser seguido;

A meu namorado Isaac, pela paciência e carinho dado nos dias mais difíceis;

Aos amigos Janaira, Sonia, Eduardo, Tioh, Rita, Valéria, Marcelo e Danilo pela ajuda nos momentos difíceis;

Meu sincero obrigado!

“É preciso passar por uma metamorfose lenta e segura, para voar como uma borboleta madura. Olhar para trás e ler escrito no antigo casulo: Aqui jaz um inseto incerto e quase nulo. Ao olhar para frente e ler novamente: Aqui há uma libélula de luz que faz jus ao poder da criação”

Metamorfose – A. Grimaldi

ROCHA, A.L **Ecoepidemiologia da *Leishmania* spp em Zona Endêmica do Distrito do Tirirical, São Luis/ MA.** [Ecoepidemiology of *Leishmania* spp in Endemic Area of District Tirirical, São Luis / MA]. 2013. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luis, 2013.

Resumo

A leishmaniose é uma zoonose de notificação compulsória no Brasil. O município de São Luís se inclui entre as capitais onde a leishmaniose visceral passou a ser uma endemia urbana, constituindo-se uma referência de urbanização da leishmaniose visceral no Brasil. Nosso estudo foi realizado no Distrito do Tirirical, bairro do São Raimundo, São Luis-MA onde se avaliou a presença de flebotomíneos e a soroprevalência da Leishmaniose visceral canina (LVC), assim como a investigação de marsupiais na cadeia epidemiológica. O inquérito entomológico revelou que em toda a área de estudo foram capturados 4480 flebótomos, os quais pertenciam a nove espécies. Entre essas, *Lutzomyia Longipalpis* foi a mais frequente. Foram avaliados 341 cães, 173 (50,73%) apresentavam anticorpos anti-*Leishmania* sp, 135 (39,59%) apresentaram-se soronegativos e 33 (9,67%) dos cães apresentaram resultado indeterminado ao ELISA/S7®. A captura de marsupiais foi realizada em 19 pontos e 12 animais capturados foram identificados com *Didelphis marsupialis*. No teste sorológico (IFI), esfregaço de medula óssea e histológico não foi detectada a presença do parasita. No entanto, na análise da Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) foram detectados DNA do parasita no sangue e na medula óssea de três (25%) dos animais estudados. Estes dados indicam que os marsupiais pode ser um reservatório silvestre da leishmaniose no estado do Maranhão, uma vez que observado no Estado da Bahia. Assim, é preciso realizar outros estudos para elucidar a real participação de *D. marsupialis* no ciclo de transmissão desta zoonose no Município de São Luís.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, cão e *Didelphis* sp

ROCHA, A.L **Ecoepidemiology of Leishmania spp in Endemic Area of District Tirirical, São Luis / MA.** [Ecoepidemiologia da *Leishmania* spp em Zona Endêmica do Distrito do Tirirical, São Luis/ MA]. 2013. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luis, 2013

Abstract

Leishmaniasis is a zoonosis which notification is mandatory in Brazil. São Luis Municipality is one Brazilian capitals where visceral leishmaniasis is endemic urban. This study was conducted in the District of Tirirical, district of São Raimundo, São Luis-MA which we evaluated the occurrence of sandflies and seroprevalence of canine visceral leishmaniasis (CVL) as well as we investigated the role of marsupials in the epidemiological chain. The entomological survey showed that sandflies 4480 were captures, which belonged to nine species. Among them *Lutzomyia longipalpis* was the specie more frequent. In regard the dogs survey was observed that among 341 dogs, 173 (50.73%) had anti-Leishmania sp, 135 (39.59%) were seronegative and 33 (9.67%) of the dogs had indeterminate results by ELISA/S7 test. The capture of marsupials was performed in 19 points and 12 captured animals were identified with *Didelphis marsupialis*. In serologic test (IFAT), and histological bone marrow smear was not detected the presence of the parasite. However, on examination of the Polymerase Chain Reaction (PCR) were detected DNA parasites the blood and bone marrow in 3 (25%) of the animals studied. These data indicate that marsupials could be a sylvatic reservoir of leishmaniasis in the state of Maranhão as it observed in Bahia State. Thus, we need to conduct other studies in order to elucidate the actual participation of *D. marsupialis* in the transmission cycle of this zoonosis in São Luís Municipality.

Keywords: Visceral leishmaniasis, dog and *Didelphis* sp

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
INTRODUÇÃO.....	17
CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura	
1 HISTÓRICO.....	21
2 EPIDEMIOLOGIA	22
3 AGENTE ETIOLÓGICO.....	23
4 VETOR BIOLÓGICO.....	25
5 TRANSMISSÃO	27
6 HOSPEDEIROS.....	28
7 RESERVATÓRIO DOMESTICO.....	28
8 RESERVATÓRIO SILVESTRE.....	29
9 DIAGNOSTICO.....	30
10 CONTROLE.....	31
11 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	
CAPÍTULO 2: Estudo do reservatório domestico e vetor	
1 INTRODUÇÃO.....	45
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1 ÁREA DE ESTUDO.....	45
2.2 POPULAÇÃO CANINA.....	46
2.2.1 SELEÇÃO DA POPULAÇÃO E AMOSTRAGEM.....	46
2.2.1 ELISA	47
2.3 COLETA DE FLEBOTOMÍNEOS.....	47
2.4 REAÇÃO DE PRECIPITINA.....	48
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
3 RESULTADO.....	48
4 DISCUSSÃO	50
5 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	51
CAPÍTULO 3: Reservatório silvestres	
1 INTRODUÇÃO.....	59
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1 ÁREA DE ESTUDO.....	59
2.2 CAPTURA DE MARSUPIAL.....	60
2.3 COLETA DE MATERIAL.....	61
2.4 PUNÇÃO DE MEDULA ÓSSEA.....	62
2.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	62
2.5 REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)	63
2.6 EXTRAÇÃO DE DNA.....	63
2.7 REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA.....	63

3 RESULTADOS.....	64
4 DISCUSSÃO.....	66
5 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores totais dos resultados conforme distribuição em animais soropositivos, soronegativos e indeterminados.

Tabela 2. Correlação entre animais sintomáticos e assintomáticos

Tabela 3. Resultados dos exames: RIFI, HE e esfregaço de medula óssea

LISTA DE FIGURAS

Quadro 1. Classificação taxonômica dos complexos de *Leishmania* em seus subgêneros

Figura 1. Mapa mostrando a origem presumível de *L.infantum* no Brasil

Fonte: Kuhls et al, 2011

Figura 2. Ilha de São Luís representada na composição colorida das bandas TM/ LANDSAT-5: TM5 (R), TM4 (G) e TM3 (B), de 11/ 06/ 2006.

Fonte: Rocha (2007)

Figura 3. Mapa mostrado a correlação da positividade canina com a presença de animais silvestres. Fonte: Google maps

Figura 4. Animal capturado em armadilhas colapsava do tipo Tomahawk e Sherman

Figura 5. Contenção por sedação e coleta de sangue da veia caudal

Figura 6. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Leishmania* sp (120 pares de base pb) pelas técnicas de PCR PM- Marcador de peso molecular - Controle negativo; Controle positivo; 2, 3 e 8 amostras positivas.

Figura 7. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Leishmania* sp (120 pares de base pb) pelas técnicas de PCR PM- Marcador de peso molecular - Controle negativo; Controle positivo; 1, 2 e 5 – Amostras positivas na medula óssea

LISTA DE ABREVIATURAS

ALUMAR- Consórcio de Alumínio do Maranhão

CVRD- Companhia Vale do Rio Doce

IBAMA- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

LV- Leishmaniose visceral

LVC- Leishmaniose visceral canina

OMS- Organização Mundial da Saúde

PCR- Reação de polimerase em cadeia

INTRODUÇÃO

A ocupação desordenada e a expansão da agropecuária nos últimos anos permitiram um contato mais próximo do homem e os animais domésticos com os ecossistemas silvestres, facilitando assim a disseminação de agentes infecciosos e parasitários para novos hospedeiros e ambientes. Os flebotomíneos, vetores da leishmaniose, ao longo dos anos foram se adaptando às vicissitudes do meio ambiente e desta forma, deixaram de ser encontrado apenas em ecótopos silvestres e passaram a povoar ambientes urbanos e peri-urbanos. Com as mudanças drásticas ocorridas nos grandes centros urbanos, as leishmanias encontraram condições favoráveis para se desenvolverem e um novo ciclo enzootico foi estabelecido graças à abundância de hospedeiros silvestres e domésticos, bem como, a ocorrência de diferentes espécies de flebotomíneos e histórico de leishmaniose na vizinhança.

A leishmaniose é uma zoonose que possui uma alta incidência no velho e no novo mundo. No Brasil é considerada uma doença de notificação obrigatória e tendo como principal medida de controle adotada a eutanasia dos cães positivos. A região Nordeste apresenta condições favoráveis para a proliferação do mosquito e na transmissão da doença, fato este que leva esta região a ser a maior notificadora da leishmaniose no país. A Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão são os estados que apresentaram maiores prevalências da doença nos últimos anos.

No Maranhão até meados de 1970 não havia relatos da leishmaniose visceral (LV), em 1980 teve-se o início no estado, tendo o seu primeiro relato no Distrito do Tirirical na cidade de São Luís, expandindo-se para as demais cidades da região metropolitana da capital, levando a LV ser considerada uma endemia urbana na Ilha de São Luís (BARBOSA *et al*, 2010; ABREU-SILVA *et al*, 2008).

Na década de 80 o Distrito do Tirirical teve um grande fluxo migratório de pessoas vindas do interior do estado e de estados vizinhos, como Piauí e Ceará, sendo considerada uma das áreas de maior expansão urbana em São Luis. Estudos realizados por Mendes, 2000 atribuem à ocupação nesta região periferia da capital a introdução de dois grandes centros industriais (ALUMAR e CVRD). Há aproximadamente 20 anos depois, em 1998 o Distrito do Tirirical e a região do Bacanga já eram responsáveis por 30% da ocupação na cidade. A ruralização da periferia contribui para a ocorrência da LV e sua propagação ao longo dos anos na Ilha de São Luis.

A ocupação da periferia de São Luís contribuiu para a infecção de indivíduos susceptíveis, a domiciliação do vetor *L. longipalpis*, proximidade do ecótonos silvestres e o aumento de animais domésticos na região. Esses fatores possibilitaram a consolidação de um ciclo enzoótico da leishmaniose visceral na Ilha de São Luis.

Segundo relatório de controle proposto pela a OMS em 2010, o sistema ecológico no qual uma espécie *Leishmania* é mantida geralmente é composto por um pequeno número de vetores, os flebotomíneos, e algumas espécies de hospedeiros vertebrados que funcionam como reservatórios da doença. Em São Luís, os cães são o principal reservatório doméstico nos ambientes urbano e periurbano. Apesar dessa constatação, os estudos em diversas regiões têm mostrado que a eutanásia dos cães em áreas endêmicas não diminui a prevalência da doença. No Distrito do Tirirical a soroprevalência canina manteve-se constante nos ultimos anos, com uma media de 70% (ABREU-SILVA, 2008; BARBOSA, 2010).

Acredita-se que a presença de animais silvestres, o não combate ao vetor, à retirada tardia de cães soro-reagentes tem contribuido para a manutenção do ciclo na região metropolitana de São Luis. Desta forma este estudo foi realizado em 03 etapas onde se levantou a soroprevalência dos cães, captura e identificação dos flebotomíneos e posterior análise da fonte alimentar do vetor e por último

o estudo de *Didelphis marsupialis* como possível reservatório silvestre da leishmaniose no Distrito do Tirirical

A presente pesquisa foi dividida em 03 capítulos para melhor disposição dos dados. O capítulo 1 é referente à revisão de literatura, os capítulos 2 e 3 abordam os objetivos, metodologias, resultados e discussão.

REVISÃO DE LITERATURA

1 HISTÓRICO

A LV inicialmente foi descrita na Grecia no ano de 1835, ficando conhecida como febre negra ou “kala-azar”, botão de Biskra, úlcera do Oriente e botão endêmico dos países quentes. No início do sec XX, William Leishman identificou a presença do protozoário no baço de uma pessoa que havia vindo a óbito na Índia. Donovan encontra o mesmo parasita em 1903 (MAZOCHI *et al*, 1981; JACOBINA & GELMAN, 2008). No mesmo ano, Major Ross classificou esse parasito em *Leishmania donovani* criando assim o gênero *Leishmania* (PRATA & SILVA, 2005).

No Brasil em 1913 foi diagnosticado o primeiro caso da doença por Migone, existindo controvérsia sobre a sua introdução no país, não se sabe se a LV foi introduzida pelos colonizadores europeus que trouxeram cães infectados pelo parasita no sec XVI ou se o protozoário já estava presente quando houve a introdução de canídeos no Novo Mundo. Estudos moleculares realizados com *L. chagasi* e a *L. infantum* consideram uma única espécie corroborando com a hipótese da introdução recente da leishmaniose no Novo Mundo, visto que *L. infantum* é a responsável pela LV na Europa (GOTIJO & MELO, 2004).

Penna (1934), um patologista do Instituto Oswaldo Cruz, encontrou formas amastigotas de *Leishmania* em cortes histológicos de fígado de pessoas que morreram com suspeita de febre amarela, neste estudo foi comprovando 41 casos de leishmaniose visceral, após a realização de 40.000 viscerotomias examinadas para febre amarela provenientes de vários estados do Brasil. Dois anos após a identificação do parasita no Brasil, Evandro Chagas deu início a estudos para elucidação do ciclo de transmissão da LV no Brasil, onde se demonstrou a doença no homem e em cães e a infecção do “provável” vetor *Lutzomyia longipalpis*. Em 1937, Cunha e Chagas estabeleceram agente etiológico

da doença denominando-o de *Leishmania donovani chagasi* (GENARO, 2003).

Foi notificado o primeiro surto da LV no Brasil por Pessoa (1953), no estado do Ceará sendo identificada a maior infecção em zona rural, mas a presença de casos em áreas suburbanas e urbanas (PESSÔA, 1963; RIBEIRO, 2003).

Em 1955, Deane e Alencar em estudo com variáveis epidemiológicas, conseguiram elucidar os aspectos epidemiológicos da Leishmaniose no Ceará, sendo definida como uma zoonose e a participação de reservatórios silvestre, a raposa (*Lycalopex vetulus*), no ciclo de transmissão. (MARZOCHI et al., 1981). No ano de 1958, Forattini encontrou roedores silvestres infectados com *L. donovani* em florestas do Estado de São Paulo (DEANE & VERONESI, 1962).

Nos anos 80, a leishmaniose visceral já se encontrava amplamente distribuída em vários estados da federação. Atualmente, a LV é endêmica em 72 países, com um total estimado de 200 milhões de pessoas sob-risco de adquirirem a infecção. Aproximadamente 90% dos casos ocorrem em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (WHO, 2001).

2 EPIDEMIOLOGIA

A leishmaniose constitui um problema de saúde pública em 88 países, 72 destes em desenvolvimento, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera, a leishmaniose como uma das seis doenças infecciosas mais importantes no mundo e associa como principais fatores de risco envolvidos na ocorrência de novos casos as alterações ambientais, tais como: migrações humanas intensas, urbanização e desmatamento (WHO, 2008).

Até a década de 1970 a leishmaniose era conhecida como uma doença típica de área rural, no entanto, a urbanização desenfreada, processo migratório e mudanças ecológicas, contribuíram para uma expansão desta doença nas áreas urbanas do país (BRASIL, 2004).

O Brasil é o país que mais notifica casos de leishmaniose nas Américas. A partir do ano de 2000 todos os estados da Federação registraram casos de Leishmaniose com uma frequência constante (AMPUERO, 2006). Já no Maranhão, desde o ano de 1982, a LV tem apresentado um comportamento endêmico, com maiores registros nos anos de 1984-1985, 1993-1994 e 1998-2001. No biênio 1999 e 2000 foi o estado que mais notificou de casos à Fundação Nacional de Saúde. A região metropolitana de São Luis responde por uma importante parcela destes casos, com destaque para São Luis e Paço do Lumiar (NASCIMENTO, 2006).

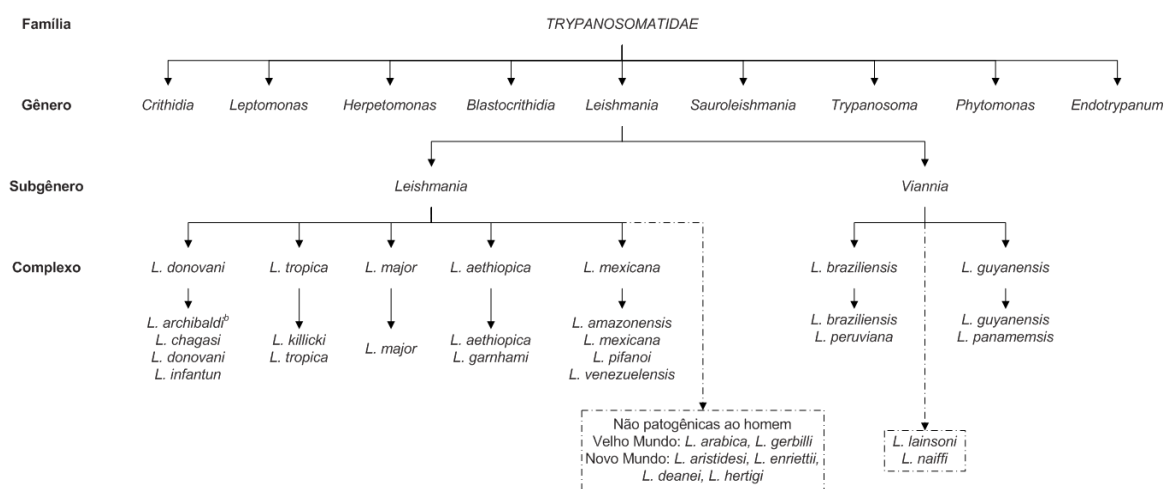
No município de São Luís a doença tem uma grande importância para a Saúde Pública, tendo como marco o diagnóstico do primeiro caso de LV no Distrito do Tirirical em 1982 (MENDES, 2002). A região do Distrito do Tirirical é propícia para a disseminação da doença devido à proximidade à mata, circulação indiscriminada de cães errantes e presença de animais sinantrópicos no local. Inquéritos epidemiológicos mostraram que na Ilha de São Luís a soroprevalência da LVC varia de 25 a 51,61% (ABREU-SILVA *et al*, 2008).

3 AGENTE ETIOLÓGICO

A *Leishmania* é protozoário digenético pertencente ao sub-reino Protozoa, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. É um parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, que possui duas principais formas: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestório do inseto vetor, e outra a amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (LAINSON & SHAW, 1987; BRASIL, 2006).

No Brasil, as principais espécies de *Leishmania* pertencem a dois subgêneros: *Viannia*, que inclui espécies do complexo *braziliensis* e *Leishmania*, que inclui espécies do complexo *mexicana* (Quadro1) . Cada subgênero apresenta padrões e ciclo de transmissão distinta (LAINSON & SHAW, 1998; MOMEM & CUPOLILLO, 2000).

Quadro 1. Classificação taxonômica dos complexos de *Leishmania* em seus subgêneros



Fonte: Brasil, 2006

A grande diversidade de espécies que faz parte este complexo acaba sendo dificultando ações de controle epidemiológico e políticas públicas para o controle da leishmaniose em países acometidos pela doença (BRASIL, 2006; GONTIJO & MELO, 2004).

Nas Américas, Leishmaniose visceral (LV) é causada por protozoário do subgênero *Leishmania*, a *L. infantum*/ *L. chagasi*. A introdução deste agente ao continente é incerta, porém estudos recentes tem fornecido suporte para a teoria de que a LV se originou no Velho Mundo (Figura 1) (BATISTA et al, 2012; FERREIRA et al, 2012; KUHLS et al, 2011).

Além das controversia sobre a introdução da leishmaniose visceral nas Américas, outro ponto tem sido muito discutido, a similaridade

genética da *L. infantum* (Europa) com *L. chagasi* (Brasil). Estudos realizados nos últimos anos usando técnicas moleculares concluíram que a *L. chagasi* e *L. infantum* são a mesma espécie, por possuírem DNA semelhante (KUHLS et al, 2011), e que o segundo termo deve ser usado nas publicações científicas por ser mais antigo (MAURICIO et al, 1999; MAURICIO et al 2000).

Lainson & Shaw em 2005, publicaram um trabalho defendendo a manutenção do parasito em um nível subespecífico, como *Leishmania* (*L.*) *infantum chagasi*, com base em suas características etiológicas, como o habitat silvestre de seu vetor *Lutzomyia longipalpis*. Segundo Silveira & Corbett, 2010, a descoberta da similaridade genética das duas espécies, em alguns estudos, não são dados considerados suficientes para a mudança taxanômica *L. chagasi* nas Américas.

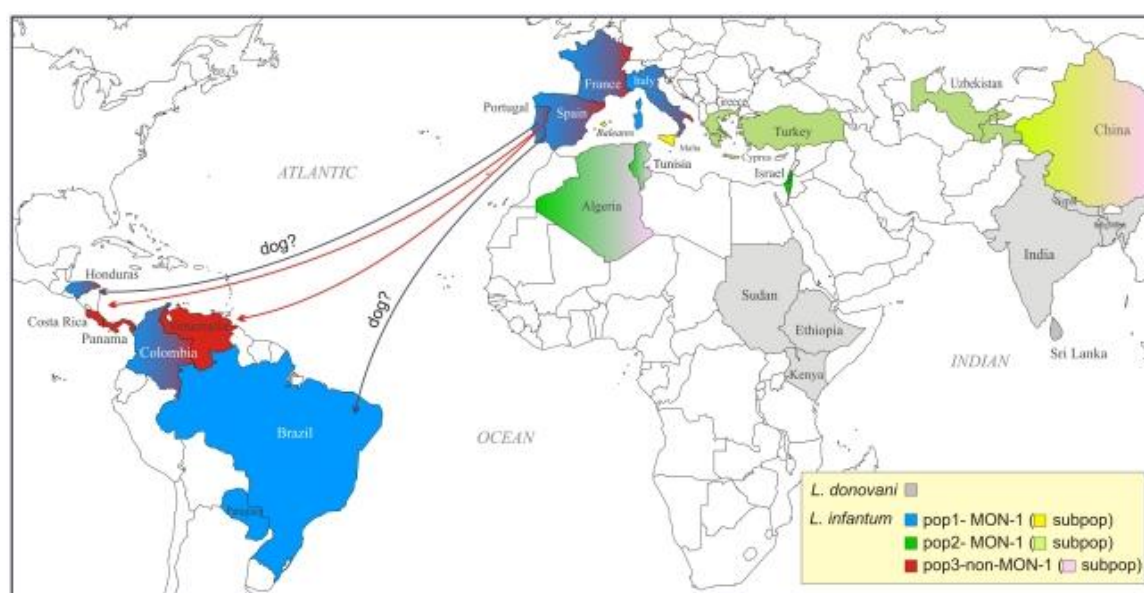


Figura 1. Mapa mostrando a origem presumível de *L. infantum* no Brasil

Fonte: Kuhls et al, 2011

4 VETOR BIOLÓGICO

Os flebotomíneos incriminados como vetores das leishmanioses, tanto visceral quanto tegumentar, no Novo Mundo

pertencem ao gênero *Lutzomyia*. Aproximadamente 30 insetos vetores, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, foram associados à transmissão das diversas formas de leishmaniose. No Brasil, a espécie *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) é a mais bem estudada e associada com a transmissão da *Leishmania (infantum) chagasi*, sendo popularmente conhecida como “mosquito palha”, “tatuquira” e “birigui”, entre outras denominações, nas diversas regiões do país (BRASIL, 2006).

Em 1936, Evandro Chagas, observa a presença de *L. longipalpis* nos principais focos de leishmaniose na região nordeste do Brasil. Estudos realizados comprovaram que este inseto está presente no ciclo de transmissão da doença, sendo considerada a espécie de maior importância epidemiológica da LV no Brasil (LAINSON & RANGEL, 2005). Entretanto outras espécies foram também incriminadas como a *Lutzomyia Cruzi* no Estado de Mato Grosso do Sul e a *Lutzomyia evansi* na Colômbia e Venezuela (SANTOS *et al.*, 1998).

L. Longipalpis era encontrada exclusivamente em matas nas regiões Norte e Nordeste participando do ciclo primário ou silvestre. No Brasil esta espécie já foi descrita em todos os estados (SOUZA *et al.*, 2009). Nas periferias de grandes centros urbanos é encontrada no domicílio e no peridomicílio, galinheiros e pombais é o grande foco desses insetos, seguidos dos chiqueiros. Apesar das aves serem refratárias à infecção, são fortes atrativos para os flebótomos e, já foi verificado que onde ocorre doença canina ou humana sempre há galinheiro no quintal ou nas proximidades (NEVES, 2003; BRASIL, 2003).

Estudo sobre a fonte alimentar de *L. longipalpis*, revela que este inseto se alimenta, ao mesmo tempo, com sangue humano, de marsupiais (mucura) e de canídeos, reforçando a hipótese de que a transmissão da LV esteja ocorrendo realmente no ambiente antrópico. Estes achados reforçam a necessidade do estudo de animais sinantrópicos como possíveis reservatórios de *L. chagasi* (DIAS *et al.*, 2003).

5 TRANSMISSÃO

Os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos ao homem e para os animais durante o repasto sanguíneo, realizado por flebotomíneos fêmeas. A infecção inicia-se quando o flebotomíneo regurgita formas promastigotas do parasito em seu estágio metacíclico (SACKS, 1989; SCHLEIN, 1993), dentro das chamadas “piscinas de sangue” na derme dos hospedeiros vertebrados, formadas pela ação de sucção do inseto. Após inoculação, as formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos da pele, onde se transformam em amastigotas. Nos mamíferos as formas amastigotas residem e multiplicam-se principalmente dentro dos endossomos das células constituintes do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM). (CHANG, 1979; RUSSEL & TALAMAS-ROHANA, 1989; MOSSER & ROSENTHAL, 1993).

Dentro das células do SFM a forma amastigota multiplica-se por divisão binária até ocupar todo o citoplasma. Em alguns casos o núcleo dessas células chega a deslocar-se lateralmente para dar lugar ao vacúolo com as formas amastigotas (RUSSELL, 1989). O processo ininterrupto de divisão das amastigotas leva a um abarrotamento de parasitas dentro dos macrófagos, até que esses sejam lisados, liberando as amastigotas que infectarão novas células.

Pequenas variações nesse processo podem ocorrer de acordo com as diferentes espécies de *Leishmania* e as características genéticas dos hospedeiros e das interações imunológicas elucidadas pelo parasitismo (CHANG, 1979; MOSSER & ROSENTHAL, 1993; MOSSER & BRITTINGHAM, 1997). Ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, os insetos ingerem formas amastigotas presente no sangue. No tubo digestório dos insetos, as formas amastigotas transformam-se em formas promastigotas. As formas promastigotas por sua vez, sofrem várias transformações, com migração para porções anteriores desse trato digestório (formas metacíclicas infectantes). A fêmea ao fazer um novo repasto sanguíneo no hospedeiro

vertebrado inocula as formas promastigotas fechando-se o ciclo (CHANG, 1979; SCHLEIN, 1993).

Estudo sobre a fonte alimentar de *Lutzomyia longipalpis*, revela que este inseto se alimenta, ao mesmo tempo, com sangue humano, de mucura e de canídeos, reforçando a hipótese de que a transmissão do calazar esteja ocorrendo realmente no ambiente antrópico. Estes achados reforçam a necessidade do estudo de animais sinantrópicos como possíveis reservatórios de *L. chagasi* (DIAS, 2003).

6 HOSPEDEIROS

Dentre os hospedeiros têm-se os invertebrados e os vertebrados. Os hospedeiros invertebrados, ou vetores da *Leishmania* são insetos hematófagos conhecidos como os flebotomíneos, dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Em quanto os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos, sendo os mais comuns os roedores e os canídeos, mas também podem aparecer os edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados e primatas, incluindo o homem (LAINSON & SHAW, 1987).

O principal reservatório doméstico de *L. chagasi* é o cão. Já no ambiente silvestre, os principais reservatórios são canídeos, destacando-se as raposas, gambás, e ratos, sendo este ultimo encontrado naturalmente infectado por *L. chagasi*, sendo também incriminado como reservatório silvestre da LV no Novo Mundo (CORREDOR et al., 1989; ZULUETA et al., 1999; SHAW, 2003).

7 RESERVATÓRIO DOMÉSTICO

O cão é o principal reservatório doméstico de *L. chagasi*, sendo o responsável pela manutenção desse agente na área urbana (ALMEIDA, 2010) por serem susceptíveis, por possuir um intenso parasitismo cutâneo e por ter um convívio direto com o homem. Todos os focos da

leishmaniose humana foram encontrados cães soropositivos, podendo o considerar um elo na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral.

Estudos realizados por OLIVEIRA-NETO (1988), apontam uma correlação entre os casos positivos de cães e a ocorrência de posteriores infecções no homem. No Ceará, Deane & Deane (1955), em estudo comparativo entre a infecção humana e canina, encontrou parasitos na pele de 16,3% dos indivíduos e em 77,6% dos cães naturalmente infectados. Além disso, verificou que a infecção experimental de flebotomíneos era mais freqüente e intensa quando os insetos se alimentavam em cães (75%) do que em pacientes humanos (28,5%). Essas observações, bem como outros trabalhos relacionados com a doença canina em áreas endêmicas de leishmaniose visceral humana, mostram o cão como a principal fonte de infecção para os flebotomíneos, quer seja pela alta prevalência da infecção canina nessas regiões, quer seja pela presença mais prolongada do parasito na pele do cão, o que favorece a infecção do inseto vetor e, conseqüentemente, a transmissão ao homem (DEANE & DEANE, 1962; IVERSSON et al., 1983; MARZOCHI, et al., 1985).

8 RESERVATÓRIO SILVESTRE

Didelphis marsupialis

Os marsupiais vêm sendo encontrados infectados por várias espécies de protozoários flagelados, sendo que os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são os mais relevantes em Saúde Pública (SHERLOCK, 1984; TRAVI et al., 1994).

Estes animais costumam ser encontrados em áreas que sofreram ações antrópicas. São vistos com frequência nos quintais das residências situadas nas bordas das matas visitando galinheiros e latas de lixo em busca de alimento. Apresentam hábitos crepusculares e noturnos. Escondem-se em ocos de árvores onde passam o dia dormindo.

Apesar de ser nômades, não ultrapassam mais de 2,5 km da circunvizinhança (NOWAK,1991). Este comportamento sinantrópico e a circulação não muito longa desses animais tornam possível o compartilhamento dos vetores e parasitos com o homem e o cão (TRAVI et al.,1994). Estudos colocam estes animais na lista de preferências alimentares tanto pela *Lutzomyia longipalpis*, no Brasil (SHERLOCK et al.,1984) assim como pela *Lutzomyia evansi* na Colômbia (TRAVI et al., 1994).

Os marsupiais infectados, assim como os cães, podem apresentar duas formas da doença: uma subclínica ou inaparente, com apenas discretas alterações inflamatórias no fígado, baço e linfonodos, perceptíveis somente pela histopatologia e outra forma grave, onde são encontrados macrófagos repletos de parasitas na pele e órgãos linfóides, necrose esplênica e esteatose hepática (TRAVI et al,1998).

9 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LV é sempre baseado em dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. A OMS recomenda que se proceda a investigação de LV em pacientes procedentes ou moradores de áreas endêmicas, que apresentem quadro febril por mais de 15 dias sem motivo aparente, bem como nos casos onde haja hepatoesplenomegalia. A sistematização de critérios epidemiológico, clínico e laboratorial possibilita o diagnóstico precoce, disso resulta importante redução da letalidade. O diagnóstico parasitológico é fundamental e deve ser estabelecido sempre que possível (BRASIL, 2004; MEDEIROS et al., 2005).

O diagnóstico em cães pode ser feito com base nas características clínicas apresentadas pelos animais, confirmado por métodos laboratoriais diretos e indiretos (BONATES, 2003).

Os métodos de diagnóstico laboratorial para as leishmanioses podem ser agrupados em: histopatológicos, pesquisa direta do parasito, sorológicos e moleculares (ANDRESEN et al., 1996). Existem exames laboratoriais,

específicos ou não para diagnóstico. Os exames específicos baseiam-se na demonstração do parasito por métodos diretos ou indiretos; já os inespecíficos como exame clínico e hemograma, entre outros, são auxiliares (MEDEIROS et al., 2005). Os métodos diretos compreendem a visualização do agente etiológico, enquanto os indiretos baseiam-se na detecção de anticorpos, por meio de provas sorológicas, além de detecção de DNA (FEITOSA et al., 2000).

Atualmente, o Ministério da Saúde (MS) recomenda a utilização de duas técnicas sorológicas, o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), sendo a RIFI a técnica diagnóstica de rotina (BRASIL, 2004).

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico de Leishmaniose visceral humana e canina. Muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, mas a despeito do grande número de testes disponíveis para o diagnóstico da LV, nenhum apresentam 100% de sensibilidade e especificidade (GONTIJO & MELO, 2004).

10 CONTROLE

O controle da LVC depende de ações voltadas para vetor (flebotomíneos) e os hospedeiros reservatórios (cães, raposas e animais sinantrópicos). Cães infectados, sintomáticos e assintomáticos, representam uma fonte importante de infecção para o vetor, constituindo-se em um elo na manutenção da transmissão da LV (MORENO & ALVAR, 2002).

A principal medida profilática recomendada pelo Ministério da Saúde no controle da LVC consiste na eutanasia dos cães, porém essa medida, além de criar conflitos entre os proprietários e os agentes de Saúde Pública, representa uma medida de controle ineficaz pela reintrodução de novos animais nas áreas endêmicas (MARZOCHI et al., 1985; DIETZE et al., 1997).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABREU-SILVA, A.L.; LIMA, T.B.; MACEDO, A.M.; GUERRA, R.M.S.N.C. Soroprevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por *Leishmania* em cães naturalmente infectados e fauna de flebotomíneos em uma área endêmica na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia**. Vet 17. supl.1, p. 197-203, 2008.

ALMEIDA, ABPF; MENDONÇA, AJ; SOUSA, VRF. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.7, p.1610-1615, jul, 2010.

AMPUERO, J M V; MARSDEN, P. Características clínicas da leishmaniose tegumentar em crianças de 0 a 5 anos em uma área endêmica de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, vol.39, p.22-26, 2006.

ANDRESEN K., GAAFAR A., ELHASSAN AM., ISMAIL A., DAFALLA M., THEANDER T.G., KHARAZMI A. Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*: a comparison with direct microscopy of smears and sections from

lesions. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** v.90, n.2, p. 133-5, 1996.

BARBOSA, DS, ROCHA AL, SANTANA AA, SOUZA CSF, DIAS RA, COSTA-JÚNIOR LM, ABREU-SILVA, AL. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v 11(3) p. 653-659, 2010.

BATISTA et al, 2012. An Assessment of the Genetic Diversity of *Leishmania infantum* Isolates from Infected Dogs in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 86(5), p. 799–806, 2012.

BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar). **Vet News**, v. 61, p.4-5, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília. p. 120, 2003.

BRASIL. 2004. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, p. 112, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. - Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

CHANG, K. P. Leishmania donovani: Promastigote -macrophage surface interactions in vitro. **Exp. Parasitol**, v.48, p.175-189. 1979.

DEANE, L.M. & DEANE, M.P. Observações preliminares sobre a importância do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório de *L. donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. **Hospital**, Rio de Janeiro, v. 48, p.61-76, 1955.

DEANE LM, DEANE MP & ALENCAR JE, OBSERVAÇÕES sobre o Combate ao *Phlebotomus longipalpis* Pela dedetização DOMICILIARIA los focos endêmicos de calazar, Ceará **Rev bras Malar**. v. 7 ,p. 131-141, 1955.

DEANE, L.M.; VERONESI, R. Leishmaniose Visceral. IN: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e Parasitárias**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p.519-536, 1962.

DIAS, F.O.P; LOROSA, E.S; REBELO, J.M.M. Blood feeding sources and peridomiciliation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cad. Saúde Pública**, Sept./Oct. 2003, v.19, n.5, p.1373-1380, 2003.

DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of Eliminating Seropositive Canines on the Transmission of Visceral Leishmaniasis in Brazil. Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. **Brasil; and the Division of Infectious Diseases**, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA. 1997.

FEITOSA, M.M., Ikeda, F.A., Luvizotto, M.C.R., Perri, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**.v. 28,p.36-44, 2000.

FERREIRA GEM, SANTOS BN, DORVAL MEC, RAMOS TPB, PORROZZI R, PEIXOTO AA, CUPOLILLO . The Genetic Structure of *Leishmania infantum* Populations in Brazil and Its Possible Association with the Transmission Cycle of Visceral Leishmaniasis. **PLoS ONE** v.7(5): 36-242. 2012.

FORATTINI, O. P. **Entomologia médica**. V. 4. São Paulo: Edgard Blucher, 1973.

GENARO, Odair. Leishmaniose Visceral Americana. In: **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, p 56-72, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

IVERSSON, L.B.; CAMARGO, M.E.; VILLANOVA, A.; REISHMANN, M.I.; ANDRADE, E.A.; TOLEZANO, J.E. Serological survey for research on visceral leishmaniasis in an urban dog population of the municipality of São Paulo, Brazil (1979-1982). **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v.25, p.310-317, 1983.

JACOBINA, R.R.; GELMAN, E.A. Juliano Moreira e a Gazeta Médica da Bahia. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**. Rio de Janeiro, v. 15, n. 4, p. 1077-1097, dez. 2008.

KUHLS, K; MOHAMMAD Z. A, CUPOLILLO; FERREIRA, E.G.E.M, ISABEL L. MAURICIO I.L; ODDONE R; FELICIANGLI, M.D, WIRTH T,

MILES, M.A; GABRIELE SCHONIAN, G. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. **Plos Neglected Tropical Diseases**. v. 5, p. 1155, 2011.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, vol.100, n.8, p.811-827 Dec. 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W. KILLICK-KENDRICK, R. The Leishmaniasis in biology and medicine. New York: **Academic Press**, 1987. p.1-120, 1987.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S.; TOLEDO, L.M.; GRIMALDI JR, G.; MOMEN, H.; PACHECO, R.S.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A; RANGEL JR, F.B. & TRAMONTANO, N. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and Epidemiological findings (1977-1983). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.80, p.349-357, 1985.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J.; AMENDOEIRA, M.R. Leishmaniose Visceral (Calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina**. V. 41 n.5. p. 61-84, 1981.

MAURICIO, I.L., HOWARD, M.K., STOTHARD, J.R., MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**. v. 119, n. 3, p. 237-46, Set. 1999.

MAURICIO, I.L., STOTHARD, J.R., MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**. v. 16, n. 5, p. 188-9, Maio 2000.

Medeiros IM, Nascimento ELT, Hinrichsen SL. Leishmanioses (visceral e tegumentar). In: Hinrichsen SL. Doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p.398-409.

MENDES WS, SILVA AAM, TROVÃO JR, SILVA AR, COSTA JML. Expansão espacial da Leishmaniose visceral Americana em São Luis do Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 35. p.227-231, 2002.

MOMEM, H.; CUPOLILLO, E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. Mem Inst Oswaldo Cruz. Jul-Aug;95(4):583-8, 2000.

MORENO, J; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol**.v.18.p. 399-405, 2002.

MOSSER, D. M. e L. A. ROSENTHAL. Leishmania-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. **Semin Cell Biol**, v.4, n.5, p.315-22. 1993.

MOSSER, DM; BRITTINGHAM, A. Leishmania, macrophages and complement: A tale of subversion and exploitation. **Parasite**. v. 115, p. 9-23, 1997.

NASCIMENTO, MDSB et al . Comparative study about the specific antileishmania of immunoglobulin IgG and IgE as markers of infection and illness among dwellers of a visceral leishmaniasis endemic area in São Luis, MA. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**,Uberaba, v. 39, n. 1, 2006.

NEVES, D. P. Leishmaniose Visceral Americana. In: _____. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, p. 67-83, 2005.

NOWAK RM 1991. Walker's Mammals of the World, 5th ed., Vol. II, The Johns Hopkins University Press, **Baltimore and London**, p. 643-1629.

OLIVEIRA CDL, Morais MHF, MACHADO-COELHO GLL. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. **Cadernos de Saúde Pública**.v. 24 p.53-58, 2008.

OLIVEIRA-NETO, M.P., PIRMEZ, C., RANGEL, E., SCHUBACH, A., GRIMALDI, J.R.G. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of Rio de Janeiro: clinical and epidemiological. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 83, 427–435, 1988.

PENNA,H.A. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Brasil Médico**,v.18: p.940-950, 1934.

PESSÔA, Samuel Barnsley. Calazar. In: _____. Endemias Parasitárias da Zona Rural Brasileira. São Paulo: **Patrocinado pelo Fundo Editorial Prociex**, p. 457-89, 1963.

PRATA, A.; SILVA, L. A. Calazar. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 1, p. 713-732, 2005.

RIBEIRO, J. M.; VALENZUELA, J. G. The salivary purine nucleosidase of the mosquito, *Aedes aegypti* . **Insect Biochem Mol Biol** . 33:13-22, 2003.

RUSSELL, D. G. E P. TALAMAS-ROHANA. Leishmania and the macrophage: a marriage of inconvenience. **Immunol.Today**, v.10, n.10, p.328-333, 1989.

Russell, D. G. e P. Talamas-Rohana. Leishmania and the macrophage: a marriage of inconvenience. **Immunol.Today**, v.10, n.10, p.328-333. 1989.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Exp.Parasitol.**, v.69, n.1, 7/1989, p.100-103. 1989.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J., RIBEIRO, A. A.; DE PAIVA HOFFMANN, M., DE FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med Vet Entomol**; v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.

SCHLEIN, Y., JACOBSON, R. L. et al. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v.89, n.20, p. 9944-9948. 1993.

SHERLOCK, I.A.; MIRANDA, J.C.; SADIGURSKY, M. & GRIMALDI Jr. G. Natural infection in the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 79: 515. 1984.

SILVEIRA, F.T; CORBETT, C.E.P. *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937: nativa ou introduzida? Uma breve revisão. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 1, n. 2, jun. 2010.

SOUZA, G. D.; SANTOS, E.; FILHO, J.D.A.. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.8, p.1181-1182, 2009.

TRAVI, B. L.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J.; SEGURA, I.; ZEA, A.; GONÇALVES, A. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and *Leishmania* (*leishmania*) *chagasi* in Colômbia. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.**, vol. 50, p. 557-565, 1994.

TRAVI, B. L.; OSÓRIO, Y.; BECERRA, M. T.; ADLER, G. H. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and

degraded dry forests of northern Colômbia. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, vol. 92, p.275-278, 1998.

World Health Organization – WHO. The world health report. Geneva, 2001.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível na Web-site: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>, acessado em 25/06/2008.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis 2008. Disponível na Web-site: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>, acessado em 26/02/2013.

Capitulo 2 – Estudos do reservatório domestico e vetor

1 INTRODUÇÃO

No município de São Luís, a leishmaniose vem sendo notificada com grande frequência, tendo o Distrito do Tirirical como uma zona considerada de alta endemicidade para a leishmaniose canina e humana, apresentando prevalência de 65% nos cães desta região (BARBOSA et al, 2010).

O cão exerceu um papel importante na urbanização da leishmaniose visceral, o que pode ser explicado pela estreita convivência com o homem e, por apresentar alto parasitismo cutâneo mesmo em animais sem sintomatologia clínica da doença, favorecendo assim a infecção do vetor e, conseqüentemente a transmissão da leishmaniose (DESJEUX, 2001; FRANÇA-SILVA, 2003).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO

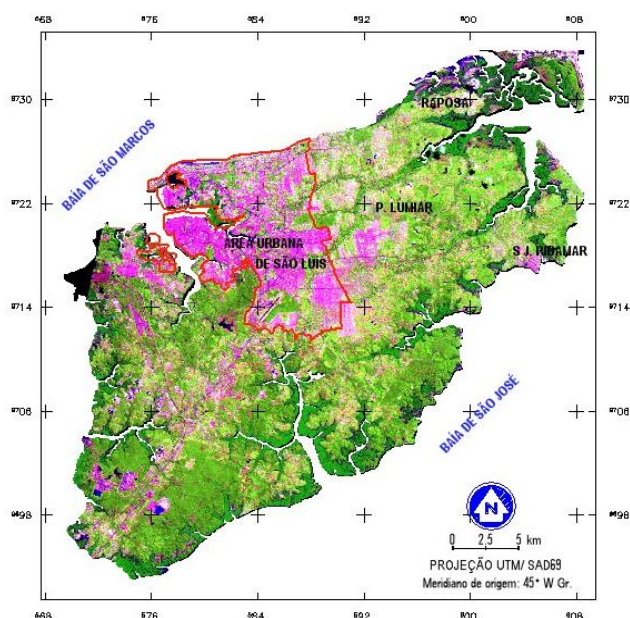


Figura 2. Ilha de São Luís representada na composição colorida das bandas TM/ LANDSAT-5: TM5 (R), TM4 (G) e TM3 (B), de 11/ 06/ 2006. Fonte: Rocha (2007)

O estudo foi realizado na Ilha do Maranhão, situada no litoral setentrional brasileiro com uma área de 905km². A região metropolitana de São Luís é composta pelos municípios de São José de Ribamar, Raposa, Paço do Lumiar e São Luís.

O clima é do tipo Tropical, quente e semiúmido da Zona Equatorial. A Ilha de São Luís tem duas estações distintas: o verão, de julho a dezembro, e o inverno, de janeiro a junho. O verão é quente e seco com ventos frescos e o inverno é chuvoso. Possui média pluviométrica de 1953 mm.

Como critério de avaliação da área de estudo, selecionou-se o distrito do Tirirical, por possuir a maior prevalência da leishmaniose visceral humana e canina do município de São Luís - MA.

O distrito do Tirirical é formado por seis localidades, distribuídas da seguinte forma: três localidades da zona urbana (Conjunto São Raimundo, Santa Efigênia e Cidade Olímpica), e três da zona rural (Cruzeiro de Santa Bárbara, Santa Bárbara e Tajaçuaba) de acordo com a Secretaria Municipal de Saúde do Município de São Luís (SEMUS).

2.2 POPULAÇÃO CANINA

2.2.2 Seleção da população e amostragem

A população em estudo foi constituída por cães domiciliados nas zonas urbana e rural do Distrito do Tirirical, de ambos os sexos, com ou sem raça definida, idade mínima de quatro meses, cujos proprietários aceitaram participar do estudo, após conhecimento dos objetivos e importância do estudo, mediante consentimento livre e esclarecido.

Para se estabelecer o tamanho da amostra foi adotada como valor de referência, a prevalência observada que foi de 78% no distrito industrial no município de São Luís-MA, sendo considerada uma margem

de erro (e) de 5% e um nível de confiança (Z) de 95%, segundo Stenvenson. Desta forma, foram amostrados 45 cães por localidade, totalizando 270 amostras.

2.2.3 ELISA

O diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral canina foi feita a reação ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) que se baseia no reconhecimento de anticorpos específicos para antígenos fixados em placas, revelados através de uma proteína conjugada a uma enzima peroxidase que permite a visualização da reação antígeno-anticorpo para o diagnóstico sorológico de leishmaniose. Para o desenvolvimento do exame sorológico realizou-se a sensibilização das placas, segundo a recomendação do fabricante (Biogene).

O cálculo do ponto para análise foi feito a partir da média das Densidades Ópticas (D.O) dos soros não reagentes, somado ao fator $R=0,142$ determinando assim, a amplitude da zona cinza (faixa de indeterminados) e subtraída do ponto de corte 0,03. As D.Os dos controles não reagentes foram sempre inferiores a 0,100 e as D.Os dos controles reagentes sempre superiores a 0,300. Todos os cálculos foram realizados segundo as recomendações do fabricante (Biogene).

2.3 COLETA DOS FLEBOTOMÍNEOS

Os flebotómos foram coletados com o auxílio de armadilhas de luz do tipo CDC, as armadilhas eram instaladas no entardecer por volta de 18:00 horas e retiradas ao amanhecer às 06:00 horas e eram dispostas tanto no domicílio como no peridomicílio. A identificação dos exemplares por espécie foi realizada levando-se em consideração as características morfológicas adotando a sistemática de Young & Duncan (1994).

2.4 REAÇÃO DE PRECIPITINA

Para o estudo da reação da precipitina foi aplicado ao conteúdo intestinal das fêmeas previamente alimentadas com sangue de vertebrados. O tubo digestório dos espécimes foi retirado e o conteúdo estomacal foi triturado em salina a 0,85%. Esse macerado foi deixado por 12 horas à temperatura entre 4° e 8°C e logo após centrifugado por 5 minutos a 1.500 rpm; o sobrenadante foi exposto a anti-soros de humano, ave, bovino, canino, eqüídeos, caprinos, felinos, suínos, roedor, mucura (*Didelphis* sp).

2.5 ANALISE ESTATÍSTICA

Através do teste de qui-quadrado de aderência foi feita a verificação da proporção de cães soropositivos. As demais variantes foram analisadas por modelo estatístico não paramétrico.

3 RESULTADO

O inquérito entomológico revelou que em toda a área de estudo foram capturados 4480 flebótomos, os quais pertenciam a nove espécies: sendo 2443 exemplares (54,53%) de *L. longipalpis*, 1771 exemplares (39,53%) de *L. whitmani*, 120 exemplares (2,67%) de *L. antunesi*, 113 exemplares (2,52%) de *L. evandrol*, 14 exemplares (0,31) de *L. sordelli*, 12 exemplares (0,26%) de *L. flaviscutellata*, 3 exemplares (0,06%) de *L. richardwardi*, 3 exemplares (0,06%) *L. choti* 1 exemplar (0,02%) de *L. umbratilis*. Do total 2916 (65,08%) eram machos e 1564 (34,92%) fêmeas. Os resultados revelam que as espécies mais frequentes na área *L. longipalpis*, *L. whitmani* e *L. flaviscutellata* que são reconhecidamente vetores das leishmanioses em suas várias formas. A maior frequência de *L. longipalpis* e a ocorrência de reservatórios nessas áreas justificam a

manutenção de LVA na Ilha de São Luís. Em outros estados, como Mato Grosso do Sul, os autores também encontram uma maior frequência de *L. longipalpis* (ALMEIDA et al., 2010; RESENDE et al., 2006).

Para a avaliação da fonte alimentar foram obtidos menos de 1% eram poucas as fêmeas que estavam ingurgitadas durante a captura. A precipitina das oito amostras apresentava anticorpos anti-sangue de aves, os demais não apresentaram reação a nenhum dos anticorpos testados, evidenciando que provavelmente estes insetos naquele período não fizeram nenhum repasto sanguíneo e que tenham se alimentado de néctar de plantas. Em um inquérito entomológico realizado em Pernambuco também foi observado um baixo número de fêmeas ingurgitadas (COSTA, 2011).

Dos 341 cães avaliados, 173 (50,73%) apresentavam anticorpos anti-*Leishmania* sp, 135 (39,59%) apresentaram-se soronegativos e 33 (9,67%) dos cães apresentaram resultado indeterminado ao ELISA/S7® (Tabela 1).

Tabela 1. Valores totais dos resultados conforme distribuição em animais soropositivos, soronegativos e indeterminados.

Soro reação	Valores (%)
Positivos	173 (50,73)
Negativos	135 (39,59)
Indeterminados	33 (9,67)
Total	341 (100)

Quando se relaciona o número de animais sintomáticos e assintomáticos, observa-se que dos animais soronegativos 66 (36,87%)

apresentaram sinais clínicos sugestivos de LVC e 69 (42,59%) não apresentaram sinais clínicos da doença (Tabela 2).

Tabela 2. Correlação entre animais sintomáticos e assintomáticos

Sintomático		Assintomático	Total
N (%)		N (%)	N
SP	97 (54,19)	76 (46,91)	173
SN	66 (36,87)	69 (42,59)	135
IND	16 (8,93)	17 (10,49)	33
Total	179 (100)	162 (100)	341

SP: soropositivo; SN: soronegativo; IND: Indeterminado

4 DISCUSSÃO

A captura de *L.longipalpis* em grande quantidade na localidade estudada é um fator determinante na infecção tanto humana quanto canina. Estudos realizados em São Luis apontam um percentual maior desta espécie de flebótomo (BARATA et al., 2004; MONTEIRO et al., 2005) e sua presença tem sido mais evidenciada no peridomicílio favorecendo uma maior transmissão aos cães que são criados nos quintais (PENHA et al, 2013).

Estudos realizados por Oliveira-Pereira et al, 2009 no município de Buriticipu confirmaram que 40% das reações eram compatíveis com roedores. Estudos anteriores nessa mesma localidade mostraram que as aves eram os animais domésticos mais frequentemente encontrados nos domicílios. DIAS et al, 2003 demonstraram que os flebótomos tem predileção pelo sangue de aves chegando a atingir um percentual de 87,9

% que é bastante significativo já que nessa região há uma grande densidade de aves . A elevada concentração de aves em galinheiros no peridomicílio explica essa discordância.

Estudos de prevalência da doença canina em várias cidades do Brasil têm detectado índices que variam desde 3,4% em Cuiabá, Mato Grosso (ALMEIDA et al., 2009), 9,7% em Montes Claros, Minas Gerais (FRANÇA-SILVA et al., 2003), 34% Mossoró, Rio Grande do Norte (AMÓRA et al., 2006) até 40,3% em Paulista, Pernambuco (DANTAS-TORRES et al., 2006).

O percentual elevado de animais positivos para *Leishmania* spp encontrados no presente trabalho confirma a alta endemicidade da área em estudo. De acordo com Feitosa (2000) e Silva, (2001) em áreas endêmicas a prevalência de leishmaniose em cães é alta, acometendo em torno de 20 a 40% da população canina. A prevalência em São Luis (50,7%) é significativamente alta ($\chi^2 = 7,92$ $p = 0,0049$) diferente até dos 40% encontrado por Feitosa (2000) e Silva (2001) em outras áreas endêmicas de leishmaniose, sendo portanto mais alarmante a situação em São Luis.

O Bairro São Raimundo localizado no Distrito de Tiririca foi escolhido não só pela alta soroprevalência demonstrada em outros estudos (ABREU-SILVA et al, 2008, BARBOSA et al., 2010) mas, principalmente pela elevada taxa de soroconversão demonstrada em um experimento onde foram introduzidos 18 beagles na área e em 270 dias todos os animais estavam clínica, sorológico e parasitologicamente positivos para *Leishmania* (COSTA, 2013). Provavelmente os animais oriundos do distrito tenham uma maior resistência ao parasito quando comparados aos animais que foram introduzidas na localidade, que provavelmente nunca tenham sido expostos nem ao parasito e nem a picada de flebótomo, o que poderia induzir uma resposta imunológica capaz de combater a infecção ou retardá-la.

Os cães positivos foram classificados como assintomáticos conforme a classificação de Mancianti et al. (1988). Esse resultado está em concordância com Cabral et al. (1998) e Sideris et al. (1999), onde relatam que nem todos os cães infectados apresentam qualquer sinal clínico da LVC. Podendo existir um período assintomático variável, onde os animais podem desenvolver os sinais clínicos posteriormente ou continuar como portadores sãos da leishmaniose canina, mas potenciais transmissores do parasito ao inseto vetor (ABRANCHES et al., 1998). Como a leishmania tem intenso tropismo pela pele nos reservatórios, mesmo nos animais assintomáticos, ocorre à transmissão do agente aos flebotomíneos. Nos caninos com lesões cutâneas ou perda de pelos, a exposição da pele facilita a infecção dos vetores, mas caninos que não manifestam sinais clínicos também são infectantes para os flebotomíneos (DEANE & DEANE, 1955; TAFURI, 2004).

CONCLUSÃO

O elevado número de cães com sorologia positiva para LVC explica, em parte, a alta endemicidade da doença no município de São Luís/MA. Os resultados demonstram que o cão pode ser um importante reservatório doméstico de *Leishmania* sp. à semelhança do que acontece em outras áreas endêmicas do Brasil. Assim, por ter um importante papel na compreensão da epidemiologia da leishmaniose visceral urbana, os inquéritos caninos são de extrema importância para um bom entendimento da doença, assim como seu controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P., L. CAMPINHO, *et al.* Leishmaniose canina: novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controle da leishmaniose visceral humana. **Acta Médica Portuguesa**, v.11, p.871-875. 1998.

ABREU-SILVA, A.L.; LIMA, T.B.; MACEDO, A.M.; GUERRA, R.M.S.N.C. Soroprevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por *Leishmania* em cães naturalmente infectados e fauna de flebotomíneos em uma área endêmica na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia**. Vet. supl.1, 2008.

ALEMEIDA ABPF.; MENDONÇA AJ.; SOUSA VRF. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.7, p.1610-1615, jul, 2010.

ALMEIDA, A.B.P.F.; Faria, R.P.; Pimentel, M.F.A.; Dahroug, M.A.A.; Turbino, N.C.M.R.; Sousa,V.R.F. 2009. Inquérito soroepidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 42, 156-159, 2009.

AMÓRA S.S.A, Santos M.J.P, Alves N.D, Costa S.C.G, Calabrese K.S, Monteiro A.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** 36:1854-1859, 2006.

BARATA RA, FRANÇA-SILVA JC, COSTA RT, FORTES-DIAS CL, SILVA JC, DE PAULA EV, PRATA A, MONTEIRO EM, DIAS ES 2004. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of american visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 99: 481-487.

MONTEIRO EM, FRANÇA-SILVA JC, COSTA RT, COSTA DC, BARATA RA, PAULA EV, MACHADO-COELHO GLL, ROCHA MF, FORTES-DIAS CL, DIAS ES 2005. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop** 38: 147-152.

BARBOSA, DS, ROCHA AL, SANTANA AA, SOUZA CSF, DIAS RA, COSTA-JÚNIOR LM, ABREU-SILVA, AL. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v 11(3) p. 653-659, 2010.

CABRAL, M. et al. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 76, n. 3, p. 173-180, 1998.

COSTA, C.H.N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.2, p.232-242, 2011.

COSTA DJ, CARVALHO RMDA, ABBEHUSEN M, TEIXEIRA C, PITOMBO M, et al. Experimental Infection of Dogs with Leishmania and Saliva as a Model to Study Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS ONE** v. 8 n.4:, 2013.

DANTAS-TORRES F, Brito M.E.F, Brandão-Filho S.P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology** 140, 54-60, 2006.

DEANE LM, DEANE MP 1955. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **O Hospital** v.47: p.75-87, 1955.

DEANE, L.M. & DEANE, M.P. Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.4, p.149-212, 1962.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.95, p.239-243, 2001.

DIAS, F.O.P; LOROSA, E.S; REBELO, J.M.M. Blood feeding sources and peridomiciliation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cad. Saúde Pública**, Sept./Oct. 2003, v.19, n.5, p.1373-1380, 2003.

FEITOSA, M.M., Ikeda, F.A., Luvizotto, M.C.R., Perri, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**. 28, 36-44, 2000.

FRANÇA-SILVA, J. C., Costa, R.T., Siqueira, A.M., Machado-Coelho, G.L.L., Mayrink, W., Vieira, E.P., Costa, J.C., Genaro, O., Nascimento, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**. 111, 161-173, 2003.

MANCIANTI, F. et al. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 82, p. 566-567, 1988.

ROCHA, C. R. Utilização de micro-habitat por três espécies de roedores cricetídeos em um cerrado do Brasil central. 2007. 46p.Dissertação (mestrado em ecologia) – **Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília**. 2007.

MARANHÃO. Secretaria Municipal da Saúde (SEMUS) do Município de São Luís-MA. Superintendência de Vigilância Epidemiológica e Sanitária. Resumo de Km², localidades, prédios e habitantes do Município de São Luís de zonas rural e urbana por distrito, 2007.

SIDERIS, V. et al. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. **European Journal of Epidemiology**, v. 15, n. 3, p. 271-276, 1999.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C. M. F.; PIRMEZ, C.; FERNANDÉS, O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Higiene**, v. 65, n. 6, p. 896-898, 2001.

Tafuri WL, Santos Rde L, Arantes RM, Goncalves R, de Melo MN, Michalick MS. Na alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **J. Immunol. Methods**. 2004;292(1-2):17-23.

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

1 INTRODUÇÃO

Mucuras do gênero *Didelphis* são marsupiais que estão amplamente distribuídos no continente Americano que se estende desde Canadá até a Argentina (VENTURA et al, 2002). Eles vivem em diversos habitats, apresentando comportamento sinantrópico, participando assim no ciclo de transmissão de algumas zoonoses como: leishmaniose e doença de chagas.

Tem sido relatado casos de leishmaniose em marsupiais na Bahia (SHERLOCK, 1984), São Paulo (YOSHIDA et al, 1985), Rio de Janeiro (CABREIRA et al, 2003), Mato Grosso do Sul (HUMBERG et al, 2008). Levando-se em consideração que as leishmanioses têm peculiaridades inerentes a cada região de ocorrência e devido à necessidade de identificar os possíveis reservatórios no estado do Maranhão, objetivamos realizar um estudo sobre esse reservatório como forma de fornecer subsídios que permitam elucidar aspectos epidemiológicos ainda obscuros quanto ao ciclo de transmissão.

2 MATERIAL E METODOS

Este trabalho teve a permissão do Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) Licença 11714-1 de 26/07/2007 e este projeto foi aprovado pela comissão de ética da Universidade Estadual do Maranhão sobre o numero12/2007.

2.1 ÁREA DE ESTUDO

O bairro Conjunto São Raimundo, pertencente ao distrito do Tirirical está localizado ao sudeste do Município de São Luís - Maranhão,

nas coordenadas geográficas 2° 35' 57"S e 44° 13' 36" W. Possui um clima tropical quente e úmido (úmido B2), com temperatura média de 26,1°C, precipitação pluviométrica anual de 2.328 mm, apresentando duas estações bem definidas, uma chuvosa de janeiro a julho, e outra seca de agosto a dezembro (LABMET/UEMA, 2010). Segundo levantamento realizado pela prefeitura municipal, o bairro São Raimundo possui 4.139 residências, com uma população de 11.637 habitantes (SEMUS/São Luís, 2007).

Foram selecionados 19 pontos onde foi relatada a presença de cães positivos para a leishmaniose, presença de vetor e animais silvestres (dados não publicados) através de questionários e levantamentos soroepidemiológicos (Figura 3).

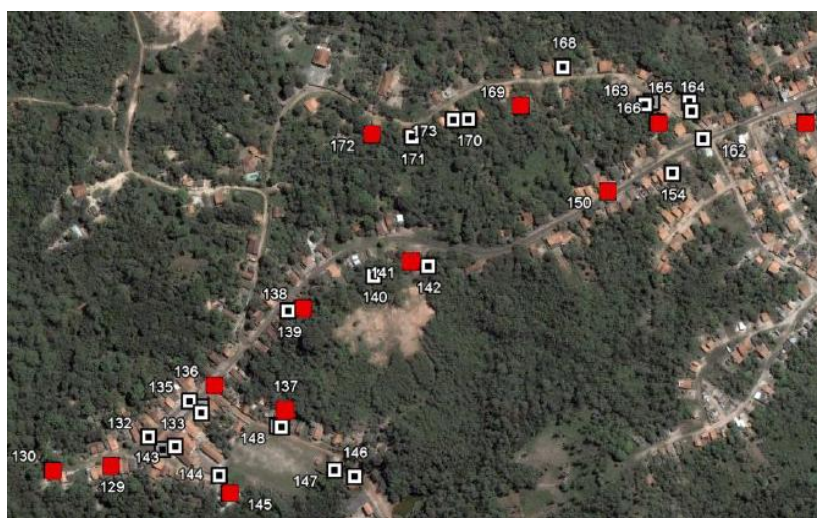


Figura 3. Mapa mostrado a correlação da positividade canina com a presença de animais silvestres. Fonte: Google maps

2.2 CAPTURA DE MARSUPIAL (*Didelphis marsupialis*)

Foram colocadas armadilhas colapsáveis do tipo Tomahawk e Sherman utilizando-se banana, embutidos, ovos e manga como isca para

atrair os marsupiais (Figura 4). As armadilhas foram dispostas ao entardecer e recolhidas até as oito horas do dia seguinte, permanecendo na moradia por um período de 7 dias.



Figura 4. Animal capturado em armadilhas colapsava do tipo Tomahawk e Sherman

2.3 COLETA DE MATERIAL

Os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de quetamina 30mg/kg e cloridrato de xilazina 20mg/kg. Após a anestesia, foi feito o exame físico do animal e coletado sangue da veia caudal numa quantidade de 2 ml por animal em frasco de vidros com e sem anticoagulante (Figura 5). Posteriormente o sangue foi centrifugado a

2000 rpm em temperatura ambiente por cinco minutos e o soro, separado e armazenado a temperatura de -20°C até a realização da RIFI.



Figura 5. Contenção por sedação e coleta de sangue da veia caudal

2.4 PUNÇÃO DE MEDULA ÓSSA

A punção da medula óssea foi realizada na tuberosidade ilíaca, onde o material foi aspirado com auxílio de agulha 40x40 e seringa de 5 ml e posteriormente foi colocado em tubos com EDTA e armazenados no freezer a uma temperatura de -20°C . Parte deste material foi utilizada para a confecção de esfregaço em lâminas para a pesquisa direta do parasita.

2.5 ANALISE HISTOPATOLÓGICA

Foi realizada a eutanásia de três animais que apresentavam ulcerações pelo corpo, sendo coletados fragmentos do fígado, baço, pele, linfonodo, glândula anal e rim fixado em formol a 10% por 48h e processados segundo as técnicas rotineiras de inclusão em parafina. Os tecidos foram cortados e posteriormente corados pela técnica de

Hematoxilina e Eosina (H&E), para descrição histológica, conforme métodos descritos por LUNA (1968).

2.6 REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

Utilizou-se anticorpo intermediário Ig total de coelho anti Ig de *Didelphis*, conforme Jansen et al.(1985). Como antígeno foi utilizado formas promastigotas de *L. chagasi*, isolada de um *Didelphis*. Soros de *Didelphis* infectados experimentalmente foram utilizados como padrão positivo e soros de animais nascidos e criados em cativeiro como padrão negativo. A reação foi realizada, com base a descrição de Camargo & Rebonato (1969).

A leitura foi realizada com auxílio de microscópio que utiliza incidência de luz azul e ultravioleta, sendo considerados reagentes os soros que apresentaram fluorescência e não reagentes os soros que apresentarem ausência de fluorescência, tomando-se como referência os soros controle positivo e negativo que devem ser incluídos em cada lâmina.

2.7 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA das amostras de sangue e medula óssea dos marsupiais foi extraído com o Wizard Genomic DNA Purification Kit, segundo recomendações do fabricante. Após a extração o DNA foi armazenado em freezer a -20°C.

2.8 TÉCNICA REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

Na reação utilizou-se o par de oligonucleotídeos descrito por Rodgers et al. (1990): 13A 5'-dGTG GGG GAG GGG CGT TCT-3' e 13B

5'-dATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3' como iniciadores para a amplificação de fragmentos de DNA de 120pb. Os produtos de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% corados com brometo de etídio a 0,5g/ml visualizados em transluminador e fotografados.

3 RESULTADOS

Dos 19 pontos estudados foram capturados 12 animais que foram identificados com *Didelphis marsupialis* conhecido como gambá-de-orelha preta. Destes, sete machos e cinco fêmeas, adultos, como peso médio de 1,6 a 2,3 kg. Todos marsupiais capturados foram no peridomicílio próximo às moradias.

Três animais apresentaram ulcerações pelo corpo, aumento dos linfonodos e uma possível onicogribose, sintomas sugestivos de leishmaniose. Foi realizada a eutanásia dos mesmos, objetivando verificar um parasitismo nos tecidos coletados. A eutanásia foi realizada usando todos os preceitos éticos, minimizando qualquer tipo de sofrimento do animal.

Nos exames sorológico (RIFI), HE, esfregaço sanguíneo não foi verificada a presença do parasito tanto no exame sorológico quanto no exame direto dos tecidos (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados dos exames: RIFI, HE e esfregaço de medula óssea

	RIFI	HE	Esfregaço de medula óssea
Positivo	-	-	-
Negativo	-	-	-
n	12	3	12

Dentre os 12 animais estudado três (25%) foram detectados o DNA de *Leishmania* tanto no sangue quanto na medula óssea de (Figura 4 e 5).

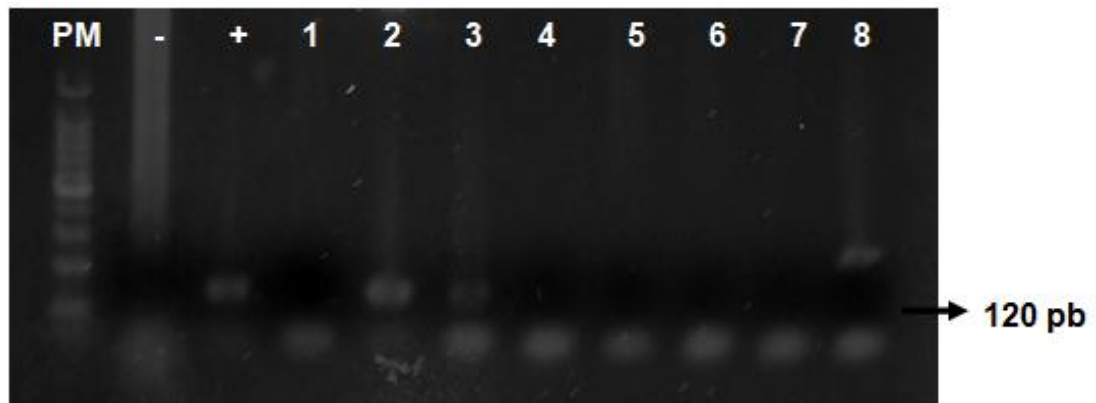


Figura 6. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Leishmania* sp (120 pares de base pb) pelas técnicas de PCR PM- Marcador de peso molecular - Controle negativo; Controle positivo; 2, 3 e 8 amostras positivas.

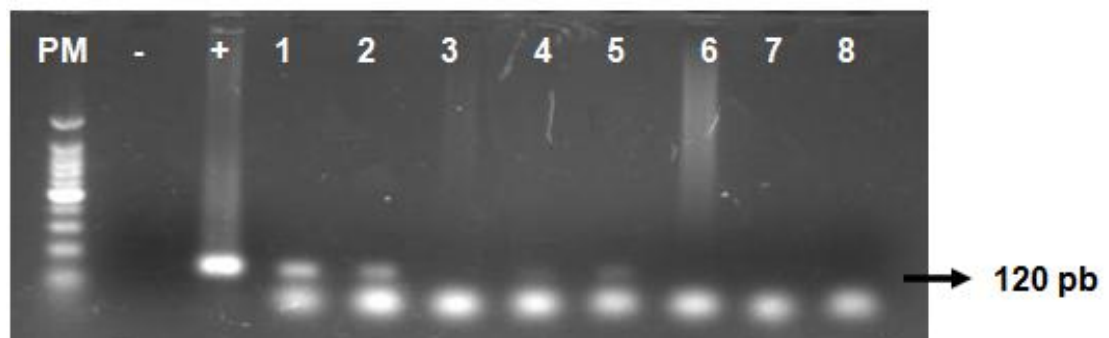


Figura 7. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Leishmania* sp (120 pares de base pb) pelas técnicas de PCR PM- Marcador de peso molecular - Controle negativo; Controle positivo; 1, 2 e 5 – Amostras positivas na medula óssea

4 DISCUSSÃO

A captura de *D. marsupialis* sugere que este animal possa estar participado como um elo importante da transmissão da doença como reservatório secundário de *L.V* por apresentar uma boa capacidade de adaptação em ambientes periurbanos, vivendo em transição entre a floresta e as residências (ANDRADE 1998; GUERRA *et al.*, 2006).

Nos exames diretos, imprint e histopatológico (HE), também foram realizados por Serlok (1984) e Travi *et al.* (1998), nesta mesma espécie e não foi detectado a presença do parasita. A detecção da *Leishmania* pelo exame microscópico dependente da presença de um grande número de parasitas na amostra e a sensibilidade desta técnica varia de 52% a 98% (DISCH *et al.*, 2006), influenciando assim no resultado da amostra. Até o momento não foi realizado nenhum estudo para a determinação de carga parasitária em *Didelphis sp*, pois esta espécie pode apresentar um baixo parasitismo nos tecidos.

A técnica de PCR foi realizada em outros estudos onde foi encontrado uma positividade de 7% de *Didelphis* na Venezuela (ZULUETA *et al.* 1999). No Brasil, Brandão-Filho *et al.* (2003) analisando baço identificaram que 13,3% dos animais eram positivos. Em Bauru-SP foi observada uma positividade foi de 82,14%. (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003). Por outro lado em Cajauata/ Bolívia não foi observada gambás positivos para *Leishmania* (TELLERIA *et al* 1999). No presente estudo foram observado que não houve diferença entre os dois tecidos estudados, uma vez que os mesmos animais foram positivos no sangue também foram positivos na medula.

Embora os animais apresentem baixa parasitemia, estes resultados reforçam as observações de Cabral (2007) de que o sangue é um tipo de material clínico confiável para a detecção de DNA de *Leishmania* por PCR devido simplicidade da coleta de sangue, que faz este procedimento

menos sujeito a erros e permite o usar uma maior quantidade de volume de amostra do que amostras de medula óssea, conforme descrevem Hu et al. (2000); Reale et al., (1999) e Bettini et al. (1990)

Estudos anteriores mostraram que nas áreas de maior seroprevalência sempre era descrito pelos moradores a ocorrência dos marsupiais no peridomicílios (BARBOSA *et al.*, 2010). O estreito elo entre o ambiente silvestre e os domicílios e a alta frequência dos vetores propiciam o aumento do número de cães positivos próximos à mata (Silva, 2005), o que foi confirmado por Carvalho (2008), que observaram que tanto no Jardim São Raimundo quanto no Conjunto São Raimundo havia maior soroprevalência da leishmaniose visceral canina em cães que residiam próximo à mata.

A comparação dos resultados obtidos pela sorologia e pelo PCR, feitos das mesmas amostras de sangue, não tiveram concordância nos resultados, sendo que nenhum animal foi dado como positivos na RIFI. Isto por ter ocorrido porque o soro primário não era específico para espécie. Não foi possível a obtenção de anticorpos anti *Leishmania* produzido em mucura.

CONCLUSÃO

O resultado da PCR em *D. marsupialis* indica que a espécie participa do ciclo de transmissão da *L. chagasi*, no entanto são necessários estudos para definir seu verdadeiro papel na epidemiologia da LV.

REFERENCIA

ANDRADE, S.L. 1998. Leishmaniose Tegumentar Americana em área de ocupação recente na periferia da cidade de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. **Dissertação de Mestrado**, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. 206pp.

BARBOSA DS, ROCHA AL, SANTANA AA, SOUZA CSF, DIAS RA, COSTA-JÚNIOR LM, ABREU-SILVA AL 2010. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Cienc Anim Bras** 11: 653-659.

BETTINI, S., GRAMICCIA, M., GRADONI, L., BIGGIO, P., LOI, R., COTTONI, F., PAU, M. AND ATZENI, M.C., (1990). Leishmaniasis in Sardinia. IV. Epidemiological appraisal of cutaneous leishmaniasis and biochemical characterization of isolates. **J. Trop. Med. Hyg.** 93, 262– 269.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; BRITO, M. E.; CARVALHO, F. G.; ISHIKAWA, E. A.; CUPOLILLO, E.; WINTER, L.F.; SHAW, J.J. Wild and synanthropic host 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, vol. 97, p. 291-296, 2003.

CABRAL, A. W..D. Estudo comparativo entre o diagnóstico por técnicas sorológicas e da PCR para a detecção de *Leishmania* spp. / Alberto Wagner Delmondes Cabral. – Botucatu: [s.n.], 2007.

CABRERA, M.A.; PAULA, A.A.; CAMACHO, L.A.; MARZOCHI, M.C.; XAVIER, S.C.; SILVA, A.V.; 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.25, n.2, p.79-83, 2003.

CAMARGO, M. E. & REBONATO, C. Cross – reactivity in immunofluorescence for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.18, p.500 – 505, 1969

CARVALHO GM, ANDRADE FILHO JD, FALCAO AL, ROCHA LIMA, AC, Gontijo CM. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis** 8: 407-414, 2008.

DISCH, J., CALIGIORNE, R.B., MACIEL, F., OLIVEIRA, M.C., ORSINI, M., NETO, E.D., RABELLO, A., **Diag. Microbiol. and Inf. Dis.** 56, 395-400. 2006.

GOOGLE MAPS - Disponível em [http:// maps.google.com.br//](http://maps.google.com.br//). Acesso em:2009

GUERRA, J. A. O.; RIBEIRO, J. A. S.; COELHO, L. I. A. R. C.; BARBOSA, M. G. V.; PAES, G. P. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. **Cadernos de Saúde Publica** v. 22:, n.11, p. 2319-27, 2006.

HU, X.S., YANG, W.T., LU, H.G., YAN, H.P., CHENG, J.P., MA, Y., JIN, B.Q., ZHANG, T., (2000). Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. **J. Parasitol.** 86, 822–826.

HUMBERG, R. M. P. *Leishmania* sp. em animais silvestres de cativeiro e de vida livre, 2008-2009. **Dissertação** (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) -Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2009.

JANSEN, A.M.; MORIEARTY, P.L.; CASTRO, B.G. & DEANE, M.P. - *Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphis marsupialis*: an indirect fluorescent antibody test for the diagnosis and follow-up of natural and

experimental infections. **Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.**, 79: 474-477, 1985.

LABMET - Laboratório de Meteorologia da Universidade Estadual do Maranhão. Disponível em <http://www.nemrh.uema.br/>. Acesso em: 2010.

LUNA LG 1968. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**, 3rd ed., McGraw-Hill, New York.

REALE, S., MAXIA, L., VITALE, F., GLORIOSO, N.S., CARACAPPA, S., VESCO, G., Detection of Leishmania infantum in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **J. Clin. Microbiol.** 37, 2931–2935. 1999.

REBELO, José Manuel Macário et al. Sandflies (Diptera, Psychodidae) from an endemic leishmaniasis area in the cerrado region of the State of **Maranhão, Brazil. Cad. Saúde Pública**, v..15, n.3, p.623-630,1999.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. **Experimental Parasitology**, v.71, n.3, p.267-275, 1990.

SEMUS - Secretaria Municipal de Saúde. Disponível em <http://www.semus.saoluis.ma.gov.br>. Acesso em: 2007.

SHERLOCK, I.A.; MIRANDA, J.C.; SADIGURSKY, M. & GRIMALDI Jr. G. Natural infection in the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 79: 515. 1984.

SILVA, Alba Valéria Machado da et al . Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. **Cad. Saúde Pública.**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, 2005.

TELLERIA, J.; BOSSENO, M. F.; TARIFA, T.; BUITRAGO, R.; MARTINEZ, E.; TORREZ, M.; PONT, F.L. E.; BRENIERE, S. F. Putative reservoirs of *Leishmania 38 amazonensis* in a Sub andean focus of Bolívia identified by KDNA-polymerase chain reaction. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, vol. 94, p 5-6, 1999.

TRAVI, B. L.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J.; SEGURA, I.; ZEA, A.; GONÇALVES, A. *Didelphis marsupialis*, na important reservoir of

Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi and Leishmania (leishmania) chagasi in Colômbia. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.**, vol. 50, p. 557-565, 1994.

TRAVI, B. L.; OSÓRIO, Y.; BECERRA, M. T.; ADLER, G. H. Dynamics of Leishmania chagasi infection in small mammals of the undisturbed and degraded dry forests of northern Colômbia. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, vol. 92, p.275-278, 1998.

VENTURA, R.M.; TAKEDA, G.; SILVA, F.; NUNES, R.A.; BUCK, V.L.; TEIXEIRA, G.A.M.M.G. Genetic relatedness among Trypanosoma evansi stocks by random amplification of polymorphic DNA and evaluation of a synapomorphic DNA fragment for species-specific diagnosis. **Int. J. Parasitol.**, 32, pp. 53–63. 2002.

YOSHIDA, E.L.A.; SILVA, R.L.; CORTEZ, Jr. L.S.; CORRÊA, F.M.A. Encontro de espécie do gênero Leishmania em Didelphis marsupialis aurita in São Paulo State, Brazil. **Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo**, v.27, p.172, 1985.

Zulueta A.M., Villarroel E., Rodriguez N., Feliciangeli D., Mazzarri M., Reyes O., Rodriguez V., Centeno M., Barrios R.M. & Ulrich M. Epidemiologic aspects of American leishmaniasis in an endemic focus in eastern Venezuela. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 61(6):945-950, 1999.