



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

26 de setembro
a
01 de outubro
de 2010

Estudo da prevalência e perfis de infecção por *Leishmania sp.* em mamíferos silvestres e sinantrópicos na localidade Canto dos Araçás, município de Florianópolis/SC

Este relatório é resultado do trabalho realizado pelo Laboratório de Referência em Taxonomia e Diagnóstico de Reservatórios Silvestres das Leishmanioses no município de Florianópolis no estado de Santa Catarina.

O objetivo desta atividade foi avaliar a transmissão de Leishmania sp. entre pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos e sua importância na manutenção do parasito na área.

Coordenação Geral

Ana Maria Jansen¹

Paulo Sergio D'Andrea²

Participantes

André Luiz Rodrigues Roque¹

Fabiana Lopes Rocha^{1,2}

Fabiano Araujo Fernandes³

Francisco Gomes⁴

Michel Barros Faria²

Paulo Sergio D'Andrea²

Vitor Antônio Louzada de Araújo¹

¹ Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

² Laboratórios de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

³ Laboratório de Ecoepidemiologia de Doença de Chagas – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

⁴ Laboratório de Imunoparasitologia – Centro de Pesquisas Ageu Magalhães/FIOCRUZ

PARCERIAS

A realização desta atividade só foi possível graças a parceria realizada entre este Laboratório de Referência, Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública (CGLab), Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) e Secretaria Estadual de Saúde de Santa Catarina. Participaram desta articulação o Programa Nacional de Leishmanioses (Mauro Arruda e equipe), CGLab e SVS (Ana Nilce, Mauro Eulkory e equipe) e a Coordenação da Rede de Serviços de Referência em Leishmanioses da Fiocruz (Elisa Cupolillo e Sinval Brandão).

A estrutura local foi provida pela Coordenação de Zoonoses do Estado de Santa Catarina (Suzana Zeccer e equipe), e participaram diretamente das atividades de captura e coleta de materiais de mamíferos silvestres: na coleta e checagem de armadilhas João Cezar do Nascimento, no transporte os motoristas Henrique e Ednei e nas atividades laboratoriais e de campo as biólogas e veterinárias da Secretaria Estadual de Saúde Juliana Rossi, Janaina Tomio, Daniella de Mattia Biz e Josiane Martins.

Agradecemos também o apoio dos moradores Idésio Leal Lourenço, Lívia Ferraro, Vitor Peterson e Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque, que nos forneceram infra-estrutura e apoio por todo o período do trabalho.

SUMÁRIO

Introdução	1
Considerações sobre o conceito “reservatório”	2
Histórico do problema na localidade	4
Descrição da área investigada	4
Objetivos da excursão	6
Atendimento as normas de ética na manipulação de animais	6
Atividades no campo	7
<i>Captura de pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos</i>	7
Atividades no laboratório de campo	11
Identificação taxonômica	12
Diagnóstico da infecção.....	12
1) <i>Cultura de tecidos</i>	12
2) <i>Sorologia</i>	12
3) <i>PCR</i>	13
Como interpretar os resultados desse relatório	13
<i>Crítérios de positividade</i>	14
Resultados e discussão	15
<i>Pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos – sucesso de captura e abundância relativa</i>	15
<i>Informações sobre as espécies de pequenos mamíferos estudadas</i>	15
<i>Infecção por Leishmania em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos</i>	18
Conclusões.....	23
Recomendações.....	23
Referências bibliográficas.....	24
Anexo.....	26

Introdução

As leishmanioses são consideradas doenças reemergentes e importante problema de saúde pública em função dos novos e complexos cenários epidemiológicos que vem surgindo. Além disso, a zoonose ocorre em focos descontínuos, tanto no tempo quanto no espaço, o que torna fundamental um programa constante de vigilância epidemiológica que considere sempre as peculiaridades das áreas. As principais espécies de *Leishmania* com importância em saúde pública, além de infectar o homem, podem também infectar um amplo espectro de hospedeiros mamíferos, o que resulta em uma epidemiologia complexa e peculiar nas áreas de ocorrência deste parasito. Embora numerosas espécies de mamíferos silvestres já tenham sido encontradas infectadas, os papéis desempenhados por estas na epidemiologia das leishmanioses em diferentes regiões de sua ocorrência são ainda desconhecidos. Um aspecto importante a ser considerado, diz respeito às espécies de mamíferos silvestres e sinantrópicos e seu contato com animais domésticos e peridomiciliares que, como consequência, pode resultar em novas áreas endêmicas. Adicionalmente, novos casos humanos podem se originar a partir da expansão de um foco zoonótico residual (Ashford 1996).

O gênero *Leishmania* inclui tripanosomatídeos flagelados digenéticos cujos hospedeiros vertebrados compreendem mamíferos de pelo menos sete diferentes ordens e seus hospedeiros invertebrados no Brasil são insetos hematófagos do gênero *Lutzomyia* (Murray *et al.* 2005). Nos humanos, as leishmanioses podem assumir diferentes formas clínicas que, para melhor compreensão, foram divididas em tegumentar (cutânea, cutâneo-mucosa e cutâneo-difusa) e visceral. Esta categorização não deve ser levada em consideração quando se analisa a infecção desses tripanosomatídeos nos outros mamíferos, onde raramente podem-se diferenciar as formas clínicas observadas em humanos e o diagnóstico, como em qualquer outra parasitose, deve ser realizado, preferencialmente, pela visualização e caracterização da espécie do parasito.

No caso de *Leishmania* spp, o isolamento e crescimento *in vitro* para visualização e posterior caracterização do parasito nem sempre é possível, dada às dificuldades inerentes do processo (baixa carga parasitária, contaminação bacteriana). Nesse sentido, métodos moleculares de reação em cadeia da polimerase (PCR) vêm sendo amplamente utilizados para diagnóstico da infecção em animais silvestres (Brandão-Filho *et al.* 2003, Oliveira *et al.*

2005). Testes sorológicos também podem ser empregados e sua positividade resulta da produção de anticorpos anti-*Leishmania spp.* por parte do hospedeiro mamífero, após este ser exposto a parasitos deste gênero.

Considerações sobre o conceito “reservatório”

A importância de compreender a ecologia dos reservatórios de uma zoonose é reconhecida há muitos anos. Consideramos como “RESERVATÓRIO” a espécie ou conjunto de espécies que garantem a circulação (manutenção) de um determinado parasito na natureza (Ashford 1997). Um aspecto que em geral as definições de reservatório não consideram, é o caráter temporal e espacial da condição de reservatório, fundamental nos estudos dos ciclos de transmissão e da epidemiologia de uma determinada zoonose.

Quando uma doença emerge ou reemerge, uma rápida e acurada identificação da(s) espécie(s) reservatório(s) permite uma correta avaliação de todas as opções/estratégias de controle da parasitose. Para tanto, os primeiros passos são: **(a)** verificar alguns indicadores como evidência de associação epidemiológica; **(b)** diagnosticar a infecção nas espécies alvos e **(c)** determinar as características genéticas dos parasitos isolados nas espécies alvos (Haydon *et al.* 2002).

A interação reservatório-parasito é considerada um sistema complexo, na medida em que é multifatorial, imprevisível e dinâmica, formando uma unidade biológica que está em constante mudança em função das alterações do meio ambiente. Isto significa que generalizar cenários epidemiológicos e medidas de controle pode resultar no insucesso.

Estudos com hospedeiros reservatórios devem considerar as diferentes características epidemiológicas e padrões de infecção, os quais se modificam de uma região para outra em função de: **(a)** das estratégias de vida e ciclo reprodutivo dos hospedeiros vertebrados; **(b)** do habitat e clima locais; **(c)** da presença, hábitos e capacidade vetorial do hospedeiro invertebrado e; **(d)** das peculiaridades da interação parasito-hospedeiro (Ashford 1996, Roque *et al.* 2005).

Para definir uma determinada espécie animal como reservatório de um determinado parasito, é necessário determinar os seguintes parâmetros:

1) Distribuição geográfica do hospedeiro: define a área máxima de ocorrência da parasitose (Mills & Childs 1998). Assim, é importante definir a composição faunística e a representatividade de cada espécie dentro da comunidade de potenciais reservatórios, bem como sua distribuição pelos estratos florestais.

2) Perfil de infecção e sua distribuição na área de ocorrência dos hospedeiros: A prevalência da infecção na população de potenciais reservatórios pode ser muito alta em algumas localidades e muito baixa em outras áreas, que podem inclusive estar bem próximas. É possível que parasitos sejam extintos periodicamente em uma determinada população de reservatórios e seja re-introduzida algum tempo mais tarde.

3) Prevalência da infecção nos hospedeiros em diferentes características ecológicas: Com esta informação é possível determinar se a infecção é recente (p. ex. caso a prevalência da parasitose seja elevada na população de animais jovens) ou se ocorre em diferentes composições demográficas, grupos sociais, comportamentais, etc. Tomando como exemplo: **(a) os gambás:** estes são descritos como animais nômades, no entanto, os machos têm um comportamento nômade muito mais acentuado do que as fêmeas, **(b) primatas:** vivem em grupos e tem um comportamento territorialista. Essas diferenças comportamentais apontam para a dinâmica das populações de hospedeiros no tempo e espaço, nos ajudando a prever oscilações na transmissão baseada nas flutuações sazonais populacionais dos principais hospedeiros (Noireau *et al.* 2009).

4) Dinâmica das populações de hospedeiros no tempo: As redes de transmissão de parasitos variam no tempo e espaço. A dinâmica e os fatores que controlam estes processos são ainda desconhecidos, mas indicam que o estudo longitudinal é fundamental para esclarecer o padrão temporal e espacial da parasitose e determinar: a) os efeitos de um determinado parasito na população e/ou indivíduo; b) flutuação sazonal desta parasitose; c) estabilidade da infecção na população de reservatórios; d) transmissibilidade desse parasito (Haydon *et al.* 2002).

A importância da utilização de pequenos mamíferos silvestres como bioindicadores da presença de parasitos multi-hospedeiros reside no fato que esses animais são abundantes e, quando susceptíveis a infecção de um dado parasito, podem refletir o impacto das alterações no ambiente com alterações em suas taxas de prevalência/incidência da infecção atuando, dessa forma, como sentinelas da saúde ambiental. Na medida em que se detecta que estas espécies de hospedeiros apresentam

altas taxas de prevalência de infecção, reforça-se a necessidade de se aprofundar a investigação epidemiológica como forma de redefinir o manejo nessas áreas a fim de evitar o estabelecimento ou o aumento da prevalência de infecção na população de animais domésticos e humanos da área.

Histórico do problema na localidade

Em julho de 2010, a Secretária Estadual de Saúde de Santa Catarina (SES/SC) notificou ao Ministério da Saúde quatro casos suspeitos de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) oriundos do município de Florianópolis. Esta suspeita originou uma investigação local que resultou no exame clínico e coleta de amostras dos cães suspeitos. No dia 13 de agosto de 2010, o Laboratório de Vigilância em Leishmaniose do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas/FIOCRUZ emitiu os laudos confirmando a caracterização da espécie *Leishmania infantum*, em dois dos quatro animais examinados. A localidade onde foram identificados os casos de LVC está situada ao nordeste do município de Florianópolis, às margens da Lagoa da Conceição. Nas residências onde ocorreram os casos suspeitos haviam 6 cães, dos quais 4 apresentaram sorologia (RIFI e Elisa) e PCR positivos, confirmando assim a infecção por *L. infantum*.

Diante deste quadro, o Programa Nacional de Leishmaniose do Ministério da Saúde contatou a Rede de Serviços de Referência em Leishmanioses da Fiocruz para realização de uma investigação na área para coleta e exame do(s) possível(is) reservatório(s) silvestre(s).

Descrição da área investigada

O estudo foi desenvolvido em uma área de Mata Atlântica, uma floresta ombrófila densa submontana (Klein 1990), na localidade do Canto dos Araçás, Lagoa da Conceição, em Florianópolis/SC. A Lagoa da Conceição é uma laguna localizada a leste da Ilha de Santa Catarina, entre uma cadeia de montanhas, planícies costeiras, uma restinga e o mar.

A Lagoa tem uma área de 19,71 km². Divide-se em duas partes: a Lagoa de Dentro, ao sudoeste, e a Lagoa de Fora, ao nordeste. Seu relevo é formado por cristas montanhosas e descontínuas, servindo como divisor de águas da ilha. Paralelamente às montanhas surgem esparsas planícies, em direção leste e na porção noroeste da ilha.

Esta zona de encosta é caracterizada por uma grande heterogeneidade e um grande número de árvores altas, entre 20 e 30 metros de altura, formando uma cobertura contínua e densa (Klein, 1990). As estações do ano são bem caracterizadas, verão e inverno bem definidos, sendo o outono e primavera de características semelhantes. O clima é mesotérmico úmido. A umidade relativa é alta, com média anual de aproximadamente 82%.

A média das máximas do mês mais quente varia de 26 °C a 31 °C e a média das mínimas do mês mais frio, de 7,5 °C a 12 °C. A temperatura média anual está em torno de 21° C. Elevadas precipitações ocorrem de janeiro a março, com média de 160 mm mensais, sendo que de abril a dezembro há pouca variação, com uma média em torno de 100 mm mensais. Os valores mais baixos ocorrem de junho a agosto.

O Canto dos Araçás, localidade onde foram identificados os casos de LVC e principal local de coleta dos pequenos mamíferos, está situado na margem oeste da Lagoa da Conceição na coordenada UTM 22J 750311/6946337. É um bairro residencial, caracterizado por casas esparsas de classe média alta, cercadas por áreas de Mata Atlântica em recuperação (Fig. 1).

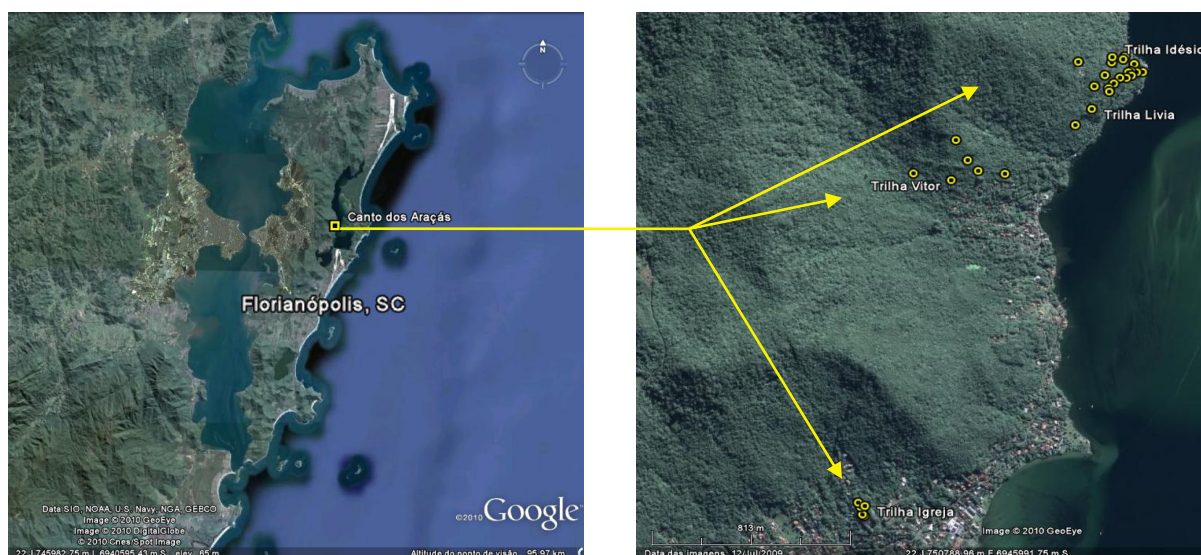


Figura 1. Localização do Canto dos Araçás em Florianópolis, SC. Os pontos amarelos indicam os locais de armadilhamento para captura de pequenos mamíferos entre 26 de setembro e 01 de outubro de 2010. Fonte: Mapas modificados do Google Earth®.

Objetivos da excursão

O objetivo desta atividade foi avaliar a transmissão de *Leishmania* sp. entre pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos e sua importância na manutenção do parasito na área.

Objetivos específicos:

- Capturar pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos e coletar amostras para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* sp. na área amostrada;
- Determinar a riqueza e abundância relativa da mastofauna de pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos no local;
- Avaliar a prevalência e o perfil da infecção por *Leishmania* sp. nestes animais;
- Avaliar a abundância relativa dos mamíferos com potencial infectivo.

Atendimento as normas de ética na manipulação de animais

A manipulação dos animais coletados foi realizada, desde o momento de sua captura, atendendo as recomendações do Guia da Sociedade Americana de Mamíferos para o uso de animais selvagens em pesquisa (Gannon & Animal Care and Use Committee 2007) e de biossegurança estabelecidas pela Comissão de Biossegurança do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, que incluem a utilização de material individual de proteção (EPI) de nível III, composto por filtros motorizados de ar tipo HEPA, máscara facial completa de pressão positiva, além de vestuário básico (aventais de manga longa e luvas cirúrgicas).

A captura e coleta de amostras biológicas de roedores e marsupiais estão licenciadas para este laboratório através da licença permanente nº 2588-1 do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), registro da expedição nº 13373 (Anexo) e aprovados na Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto “Identificação de hospedeiros reservatórios silvestres para Tripanosomatídeos patogênicos em áreas com diferentes características ambientais e sociais” nº L-0015/07.

Durante a checagem das armadilhas, todas as unidades que contivessem animais ou sinais de sua presença foram colocadas em sacos plásticos e removidas para o laboratório

de campo. O início da manipulação dos animais só ocorreu após toda a equipe estar devidamente paramentada.

Os protocolos de coleta nos pequenos mamíferos incluíram anestesia por Cloridrato de Ketamina com associação de Acepromazina, a critério do Médico Veterinário responsável. A coleta de sangue foi realizada através de punção cardíaca e a eutanásia dos animais foi realizada atendendo às normas estabelecidas pela Resolução nº. 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, de 20 de junho de 2002, e segundo as condições requeridas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (Certificado 0015-2007).

Atividades no campo

Captura de pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos

Os pontos de capturas foram distribuídos equidistantes em cerca de dez metros ao longo dos transectos (= linhas de captura), de modo que em cada ponto de captura foi estabelecida, na maioria das vezes, uma armadilha, do tipo “live-trap” do modelo Tomahawk (40,64 cm x 12,70 cm x 12,70 cm) ou do modelo Sherman (10,0 cm x 12,0 cm x 37,5 cm). Em alguns destes transectos, as trilhas foram montadas utilizando-se exclusivamente armadilhas de um mesmo modelo. Foram montadas 200 armadilhas em 10 transectos por um período de 5 noites consecutivas, totalizando um esforço total de captura de 1000 armadilhas-noite. (Tab. 1-2, Fig. 2).

Tabela 1. Descrição dos transectos montados na localidade de Canto dos Araçás, município de Florianópolis/SC, no período de 26 de setembro a 01 de outubro de 2010, indicando pontos de captura, número e modelo de armadilhas e esforço de captura.
(**Tw** = armadilha modelo Tomahawk; **Sh** = armadilha modelo Shermann)

Transecto	Descrição	Número de armadilhas (modelo)	Esforço de captura total
Vitor 1 (V1-V20)	Início do transecto localizado próximo a uma residência, com floresta de mata secundária apresentando árvores de médio e grande porte (altura média 25 metros). Terreno inclinado com presença de <i>Pinnus sp.</i> , sub-bosque aberto e com poucas gramíneas.	20 (10Tw; 10Sh)	100
Vitor 2 (V21-40)	Transecto caracterizado por floresta de mata secundária apresentando árvores de médio e grande porte (altura média 25 metros), com folhíço abundante em terreno muito inclinado, sub-bosque fechado e poucas gramíneas.	20 (10Tw; 10Sh)	100
Vitor 3 (V41-60)	Floresta de mata secundária ao longo de todo transecto em terreno inclinado, com cursos d'água, e apresentando árvores de médio porte com troncos e pedras ao longo do transecto.	20 (10Tw; 10Sh)	100
Luiza 1 (L61-80)	Transecto subindo um morro bastante íngreme, com mata secundária formada por árvores de diferentes tamanhos na porção inicial. Ao longo de todo transecto existem restos de lixo provenientes das residências no topo da trilha. Na região final da trilha encontramos mato/capim alto, bambuzal e algumas grutas	20 (10Tw; 10Sh)	100
Luiza 2 (L81-100)	Formação de mata secundária com árvores de médio e grande porte, muito folhíço e dossel fechado.	20 (10Tw; 10Sh)	100
Luiza 3 (L101-120)	Formação de mata secundária com árvores de médio e grande porte, muito folhíço e dossel fechado.	20 (10Tw; 10Sh)	100
Luiza 4 (L121-130)	Continuação do transecto Luiza 3 em uma região com menos cobertura vegetal	10 (10Sh)	50
Idésio 1 (I131-140)	Transecto nas proximidades do canil onde foram encontrados cães infectados. Caracterizado por bambuzal, apresentando muitas pedras, arbustos e árvores de pequeno porte	10 (10Sh)	50
Idésio 2 (I141-160)	Região bastante antropizada cruzando uma pequena estrada com árvores de pequeno e médio porte, gramíneas e folhíço esparsos	20 (10 Tw; 10Sh)	100
Igreja (G 161-200)	Transecto em área de mata atlântica secundária com plantações relictuais de café e bambu. Próximo à residências, com árvores de médio e grande porte, cruzando um riacho e áreas alagadiças	40 (10Tw; 30Sh)	200
TOTAL		200 (80Tw; 120Sh)	1000

Tabela 2. Pontos georreferenciados das trilhas para coleta de pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos na localidade de Canto dos Araçás, município de Florianópolis/SC, no período de 26 de setembro a 01 de outubro de 2010.

Trilha	Ponto	UTM Zona	Leste	Norte
VITOR	V1	22J	750480	6946261
VITOR	V10	22J	750386	6946282
VITOR	V20	22J	750327	6946324
VITOR	V21	22J	750369	6946276
VITOR	V30	22J	750311	6946337
VITOR	V40	22J	750280	6946237
VITOR	V41	22J	750257	6946237
VITOR	V50	22J	750176	6946247
VITOR	V60	22J	750103	6946270
LUIZA	L61	22J	750899	6946689
LUIZA	L70	22J	750858	6946730
LUIZA	L80	22J	750791	6946750
LUIZA	L81	22J	750855	6946641
LUIZA	L90	22J	750843	6946541
LUIZA	L100	22J	750773	6946471
LUIZA	L110	22J	751006	6946705
LUIZA	L115	22J	750996	6946700
LUIZA	L120	22J	750961	6946677
LUIZA	L121	22J	750936	6946647
LUIZA	L125	22J	750916	6946616
LUIZA	L130	22J	750914	6946631
IDESIO	I131	22J	751021	6946736
IDESIO	I138	22J	750983	6946770
IDESIO	I140	22J	751056	6946700
IDESIO	I141	22J	751055	6946699
IDESIO	I151	22J	750975	6946758
IDESIO	I160	22J	750929	6946745
IGREJA	G169	22J	750932	6946769
IGREJA	G171	22J	749873	6944801
IGREJA	G190	22J	749862	6944764
IGREJA	G191	22J	749869	6944758
IGREJA	G200	22J	749855	6944798

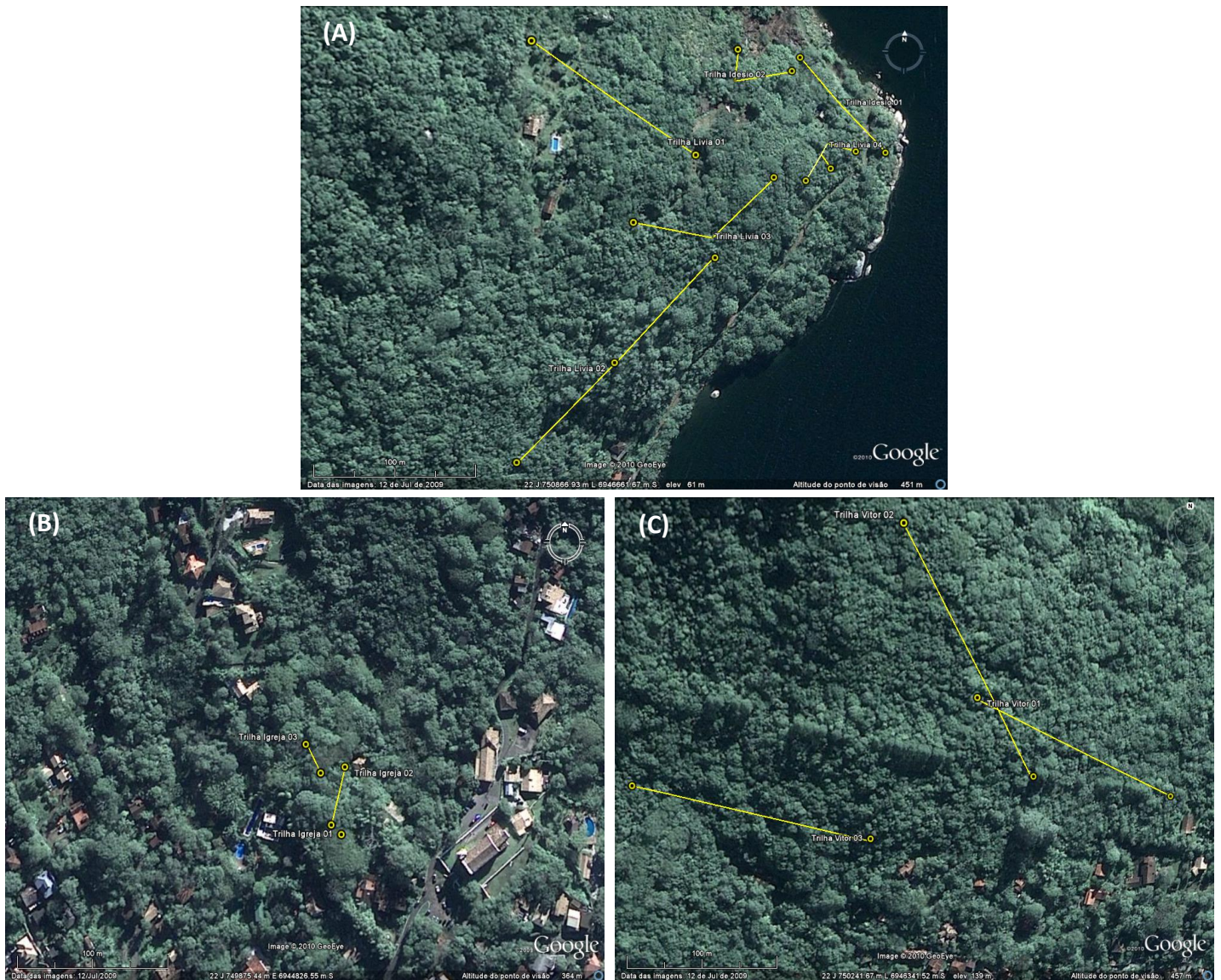


Figura 2. Transectos montados para captura de pequenos mamíferos entre 26 de setembro e 01 de outubro de 2010 no Canto dos Araçás, Florianópolis/SC. (A) Trilhas Idésio e Livia. (B) Trilha Igreja e (C) Trilha Vitor. Fonte: Mapas modificados do Google Earth®

Para captura dos pequenos mamíferos silvestres foi utilizada uma mistura padrão de bacon, banana, pasta de amendoim e aveia, adaptado conforme procedimento padrão para o grupo (August 1983, Fonseca 1989, Paglia *et al.* 1995). Esta isca é generalista sendo composta de itens que representam grãos, proteína animal e frutas, e visa atrair animais de todos os hábitos alimentares, como carnívoros (ou insetívoros), granívoros e frugívoros.

O esforço de captura foi estimado através do número de armadilhas estabelecidas em uma localidade, multiplicado pelo número de noites de captura. O sucesso de captura foi estimado através do número de animais capturados em uma localidade, dividido pelo esforço total de captura. A riqueza de espécies dos mamíferos foi quantificada pelo número

total de espécies coletadas e a abundância relativa foi estimada pelo número de indivíduos coletados de cada espécie em relação ao número total de indivíduos coletados.

Atividades no laboratório de campo

Todos os animais capturados foram removidos e levados para o laboratório de campo, onde foi realizada a coleta de amostras. Dos espécimes capturados foram obtidos os seguintes dados: gênero, ponto de captura, peso, sexo, grau de erupção e funcionalidade dos dentes dos marsupiais, medidas corporais e observações individuais. A condição reprodutiva de todos os animais foi verificada: posição dos testículos dos roedores (abdominais ou escrotais), presença de embriões em fêmeas de roedores ou de atividade de lactação nas fêmeas de marsupiais e roedores.

Inicialmente os pequenos mamíferos capturados foram anestesiados com uma associação de cloridrato de ketamina (100mg/ml) e acepromazina a 1%, na proporção de 9:1, nas doses intencionais de 0,1ml para cada 100g no caso dos roedores e 0,05ml para cada 100g no caso dos marsupiais. Logo após, o sangue de cada animal foi coletado através de punção cardíaca para obtenção de soro para diagnóstico sorológico da infecção por *Leishmania* sp., sendo outra parte coletada em microcapilar para posterior centrifugação e obtenção do creme leucocitário. Com o animal ainda anestesiado, e após tricotomia e assepsia do local com solução desinfetante e álcool iodado, foram coletados fragmentos de pele para cultura (forma estéril) e diagnóstico molecular.

Exceto no caso dos *Didelphis* spp., quando a morte clínica não era constatada após a coleta de sangue, os pequenos mamíferos foram eutanasiados (ainda sob efeito do anestésico) com cloreto de potássio 19,1% via intracardíaca. Uma vez constatada a morte clínica, foram tomadas as medidas biométricas (comprimento do corpo, da cauda, da orelha e das patas traseiras). Após este procedimento os animais foram necropsiados para a coleta dos órgãos: baço e fígado para cultura e diagnóstico molecular de *Leishmania* sp. A medula óssea do fêmur era retirada para realização de cariotipagem e, outra parte, caso houvesse material suficiente, era destinada para análise molecular. Dos animais eutanasiados, material testemunho está sendo preparado por taxidermia para depósito em coleção científica (Museu Nacional, UFRJ, Rio de Janeiro) como material testemunho.

Identificação taxonômica

A identificação taxonômica é realizada preliminarmente ainda no campo, baseada na morfologia externa. Desta forma, todos os espécimes coletados são inicialmente identificados em nível de gênero, sendo possível, apenas em alguns casos, a identificação em nível específico. Posteriormente, a identificação específica da maioria das espécies é realizada através da análise cariotípica por técnicas citogenéticas e, quando necessário, pela análise da morfologia craniana (Bonvicino *et al.* 2008). A técnica de cariotipagem visa determinar o número cromossômico diplóide com objetivo de descrever e associar cada complemento cromossômico à espécie, confirmando assim, a identificação morfológica. No caso dos marsupiais, quando a análise da morfologia externa não é suficiente, é realizada a análise da morfologia do crânio.

Diagnóstico da infecção

O ciclo de transmissão de *Leishmania* sp. entre pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos na localidade de Canto dos Araçás, município de Florianópolis/SC, foi avaliada através do estudo da prevalência e perfil de infecção dos mamíferos coletados através de exames parasitológicos (direto enriquecido), sorológicos e moleculares. As seguintes metodologias foram utilizadas para avaliar a infecção por *Leishmania* sp.:

1) Cultura de tecidos: Foram coletados fragmentos de pele (de todos os animais), baço e fígado (apenas para os animais que foram eutanasiados) de forma estéril, e colocados em um eppendorfe com salina a 0,9% com 1% de solução antibiótica e antimicótica e mantidos por um período de 24 horas. Após esse período, de forma estéril, esses fragmentos eram colocados em tubos de cultura com base NNN (Nicolle, Novy and Mc Neal) com meio líquido Schneider. Também foram realizadas punções de medula nos *Didelphis aurita* capturados e inoculadas nas mesmas condições. As culturas foram examinadas duas vezes por semana pelo período de um mês no Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz/RJ).

2) Sorologia: O diagnóstico sorológico, ou seja, a pesquisa de anticorpos específicos, foi realizado através de pesquisa do nível de anticorpos séricos (anticorpos da classe IgG

anti-*Leishmania*), utilizando-se da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), segundo Camargo (1966). Os soros foram diluídos serialmente em uma proporção decrescente de 2x (1:10 – 1:320). Os soros de roedores da família Muridae e Sigmodontinae, foram testados com IgG anti- rato conjugado a Isotiocianato de Fluoresceína da Sigma®, e os marsupiais foram testados com anticorpos intermediários específicos anti-IgG de *Didelphis* sp. obtido em coelhos, sendo a reação revelada por IgG anti-coelho conjugado a Isotiocianato de Fluoresceína da Sigma®. O ponto de corte para os títulos sorológicos em roedores foi de 1:10 para roedores e de 1:40 para marsupiais.

3) PCR: Foi realizada Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do DNA do parasito em fragmentos de pele, baço e/ou fígado mantidos em etanol absoluto. Foi também realizada a PCR em material de medula óssea coletada em papel filtro (apenas para os animais onde foi possível a coleta) e do creme leucocitário (realizada para todos os animais onde foi possível coletar uma amostra de sangue maior que 0,6mL).

A extração de DNA dos tecidos foi realizada dentro de capela de segurança biológica utilizando-se de Kits comerciais (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega Corporation, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A extração de papel filtro foi realizada através de aquecimento em água e centrifugação do material segundo Marques *et al.* 2001. O DNA obtido das extrações foi armazenado em freezer a -20° C até sua utilização.

A amplificação do kDNA dos parasitos foi realizada utilizando PCR pureTaq Beads (illustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads®, GE Healthcare, EUA) e os iniciadores 5'-GGGGAGGGCGTTCTGCGAA-3' e 5'-GGCCACTAT ATTACACCAACCCC-3' (Roque *et al.* 2010). Os produtos amplificados na reação foram visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 4%, e submetido à coloração por Nitrato de Prata (DNA Silver Staining Kit, GE Healthcare, EUA).

Como interpretar os resultados desse relatório

Deve ser avaliada primeiramente a abundância relativa de todos os animais capturados. Em alguns cenários uma espécie infectada que apresente uma alta abundância relativa tem maior competência enquanto reservatório em um determinado local do que em outro, cujo número e biomassa sejam pouco expressivos. Mais ainda, deve ser sempre

considerado que as redes de transmissão de parasitos variam no tempo e espaço e isso vale para a grande maioria das parasitoses. Este fato significa que dados secundários devem apenas orientar, mas nunca decidir uma ação.

O encontro de uma espécie animal infectada ainda não define sua importância na cadeia de transmissão. Este atributo dependerá das peculiaridades desta interação parasito-hospedeiro e é esta que vai resultar na competência da espécie animal em questão com vista a garantir a manutenção e/ou transmissão do parasito.

Critérios de positividade

Foram considerados positivos (infectados) os animais nos quais a presença do parasito foi detectada por qualquer um dos métodos parasitológicos (cultura ou PCR) empregados e/ou apresentaram positividade ao exame sorológico. Os animais foram considerados livres da infecção caso os testes parasitológicos e sorológicos fossem negativos. Vale lembrar que durante a janela imunológica – período em que o animal recém infectado ainda não desenvolveu resposta imune humoral específica – a carga parasitária ainda é baixa e a não há produção de anticorpos da classe IgG.

Outro aspecto importante diz respeito ao perfil de infecção dos mamíferos: se a população parasitária de um dado hospedeiro se mantém em níveis baixos e/ou em tecidos que não estão ao acesso do vetor (por ex. baço e fígado), este hospedeiro sozinho não conseguirá garantir a manutenção do parasito na natureza. Por outro lado, o conjunto destes hospedeiros e/ou a presença de outros cujo perfil de infecção resulte na presença de parasitos em sangue e/ou pele, com mais altas cargas parasitárias mantidas por mais tempo, garantirão a manutenção e transmissão do parasito na área.

O perfil desta infecção também pode se modificar no decurso do tempo e hospedeiros “mantenedores” (aqueles que estão infectados, mas com baixo potencial para transmitir os parasitos) podem se transformar em transmissores em situações especiais influenciadas pelo ambiente onde estão inseridos, como quando sofrem doenças debilitantes que podem levar a um aumento da carga parasitária e dispersão dos parasitos por diferentes tecidos.

Resultados e discussão

Pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos – sucesso de captura e abundância relativa

Foram capturados no total 40 pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos pertencentes a sete diferentes espécies (Fig. 3), resultando num sucesso de captura de 4%. Este sucesso pode ser considerado bom, tratando-se de uma área de Mata Atlântica secundária com alto índice de antropização.

Foram coletadas 05 espécies de roedores: (a) Rodentia: Sigmodontinae: *Akodon montensis* (Thomas 1913) – n = 14; *Euryoryzomys russatus* (Wagner 1848) – n = 13; *Oligoryzomys nigripes* (Thomas 1913) – n = 3; *Sooretamys angouya* (G. Fisher 1814) – n = 1; (b) Rodentia: Murinae: *Mus musculus* (Linnaeus 1758) – n = 2; e 2 espécies de marsupiais (*Didelphis aurita* – n = 4; e *Micoureus demerarae* (Thomas 1905) – n=3) (Fig. 3).

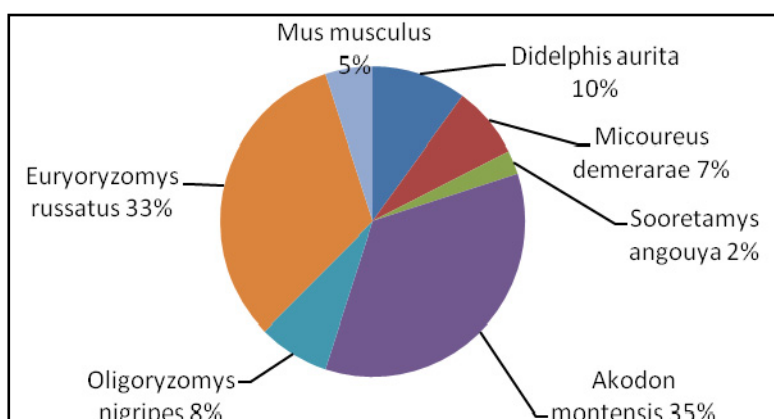


Figura 3. Abundância relativa dos pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos capturados na localidade do Canto dos Araçás, no município de Florianópolis/SC, no período de 26 de setembro a 01 de outubro de 2010.

Informações sobre as espécies de pequenos mamíferos estudadas

✓ ***Didelphis aurita*** (Wied-Neuwied 1826) é um marsupial conhecido como gambá. Encontra-se distribuído na porção leste do Brasil, de Alagoas a Santa Catarina, e estendendo-se a oeste até o Mato Grosso do Sul. O comprimento médio do corpo varia de 350 a 450 mm e seu peso varia de 670 a 1880 gramas. Caracteriza-se por uma listra escura na frente e outra sobre cada olho, com pavilhão auditivo grande e completamente negro. É uma espécie bastante comum em toda sua área de distribuição. Possui hábitos noturnos e solitários, sendo a espécie de pequeno mamífero com maiores deslocamentos entre fragmentos de Mata Atlântica e com grande capacidade locomotora e grande eficiência adaptativa aos mais variados habitats, incluindo grandes centros urbanos e localidades com

altos índices de antropização (Rossi *et al.* 2006). Foram capturados quatro gambás, sendo apenas um macho e três fêmeas, com duas capturas na localidade Lúvia, um na Igreja e outro no Vitor. Foram realizadas coletas de material para diagnóstico da infecção apenas para o macho e uma das fêmeas, pois as outras duas estavam com filhotes em avançado estágio de desenvolvimento em seus marsúpios e a manipulação dos animais poderia trazer riscos à prole.

✓ ***Micoureus demerarae*** é um marsupial que apresenta ampla distribuição no Brasil, caracterizando-se por uma larga faixa de pêlos escurecidos ao redor dos olhos, com pelagem dorsal longa e lanosa, de coloração marrom-acinzentada. Sua cauda com pelagem dorsal, cobrindo a região proximal denota seu hábito arborícola (Rossi *et al.* 2006). Foram capturados três exemplares desta espécie, um na localidade Vitor, um na Lúvia e outro na Igreja, sendo dois machos e uma fêmea.

✓ ***Akodon montensis*** é um roedor de tamanho pequeno, comprimento da cauda pouco menor do que o do corpo. Coloração do dorso castanho, sem limite definido com a coloração do ventre, que é amarelo-acinzentada ou branco-acinzentada, com as bases dos pêlos acinzentadas. Tem orelhas grandes, pouco pilosas e superfície superior das patas clara. É terrestre e habita formações florestais (Bonvicino *et al.* 2008). Foram capturados 14 exemplares desta espécie, sete machos e sete fêmeas, apenas nas localidades Vitor e Lúvia.

✓ ***Oligoryzomys nigripes*** tem hábitos terrestres, tamanho pequeno, comprimento da cauda maior que o do corpo. Coloração do dorso castanho, com as laterais mais claras, com limite definido, ou pouco definido com a coloração do ventre, que é esbranquiçada ou amarelada. Apresenta olhos grandes, patas longas e finas cobertas de pequenos pêlos claros e cauda fina e pouco pilosa (Bonvicino *et al.* 2008). Apenas dois machos e uma fêmea foram capturados desta espécie, sendo cada um deles em uma das trilhas: Vitor, Idésio e Lúvia.

✓ ***Euryoryzomys russatus*** é um roedor de hábitos terrestres, com tamanho médio, cauda de comprimento maior ou similar ao do corpo. Coloração do dorso castanho, com os pêlos mais claros nas laterais, que são delimitadas em relação ao ventre esbranquiçado. Possui patas longas e estreitas, geralmente com a superfície superior recoberta de pêlos

claros (Bonvicino *et al.* 2008). Dos 13 animais capturados, nove eram machos e quatro eram fêmeas. Destes, nove indivíduos foram capturados na localidade Lúvia e apenas um exemplar foi capturado em cada uma das demais localidades.

✓ *Sooretamys angouya* é um roedor terrestre e ocorre em florestas de mata Atlântica. Apresenta tamanho relativamente grande, com a cauda maior do que o corpo, coloração do dorso castanho, com os pêlos mais claros nas laterais e limite pouco definido com o ventre, que é amarelado. Sua cauda pouco pilosa e suas patas longas e estreitas (Bonvicino *et al.* 2008). Uma única fêmea desta espécie foi capturada na localidade Lúvia.

✓ *Mus musculus* é geralmente encontrado próximo, ou mesmo dentro, de habitações humanas. Tem tamanho pequeno, cauda aproximadamente igual ao comprimento do corpo e orelhas grandes. Sua pelagem é uniformemente castanho-acinzentada, sem contraste entre as superfícies dorsal e ventral (Bonvicino *et al.* 2008). Foram capturadas apenas duas fêmeas, ambas muito próximas à residência.

A falta de conhecimento acerca da mastofauna brasileira, aliada à drástica redução da Mata Atlântica, uma das florestas tropicais mais ameaçadas do mundo, vem despertando o interesse dos pesquisadores nos últimos anos, promovendo um aumento significativo das pesquisas nesta região.

No estado de Santa Catarina, a maior parte dos estudos sobre mamíferos restringe-se a listas taxonômicas, eventualmente com comentários relacionados a capturas (revisado em Graipel *et al.* 2006). Na Ilha de Santa Catarina, o panorama não é diferente. Além disso, o processo de degradação dos habitats, aliado à caça, tem levado uma parcela significativa da fauna de mamíferos à extinção local (Caruso 1990, Olimpio 1995). Atualmente, suas florestas estão reduzidas a menos de 10% do território insular (Caruso 1990) e mais de 50% das espécies de médio porte e todas as de grande porte foram extintas (Olimpio 1995, Graipel *et al.* 2001). Além das dificuldades para recomposição natural da fauna autóctone em função de barreiras próprias de uma ilha, ainda que continental, há outros impactos como a introdução de fauna exótica (Graipel *et al.* 2001), que vem trazendo prejuízos consideráveis.

Podemos afirmar que durante nossos estudos foram capturadas as espécies que eram esperadas de pequenos mamíferos para a região. Apenas duas espécies de marsupiais (*Chironectes minimus* e *Lutreolina crassicaudata*) que apresentam hábitos semi-aquáticos e vivem em áreas onde não realizamos coletas não foram capturadas. Da mesma forma uma espécie de roedor semi-aquático (*Nectomys squamipes*) não foi capturada. Além desta, apenas mais uma espécie de roedor (*Phyllomys medius*), raramente registrada em outros estudos não foi capturada.

Infecção por Leishmania em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos

O diagnóstico da infecção por *Leishmania* foi realizado de forma direta (parasitológico e molecular) através da detecção do parasito ou partes constituintes dele, ou de forma indireta (sorológico) através da detecção da resposta imunológica do hospedeiro ao contato prévio com o parasito.

Destes testes, o que tem apresentado a maior sensibilidade no caso de mamíferos silvestres infectados por *Leishmania* sp. é o diagnóstico molecular por PCR. Os testes sorológicos também apresentam boa sensibilidade, mas podem estar negativos, ainda que o animal esteja infectado, em duas situações: (i) quando há uma baixa produção de anticorpos, que não consegue ser detectada pelo teste; e (ii) quando a infecção é recente e ainda não houve produção suficiente de IgG anti-*Leishmania* sp. Já as culturas de tecidos apresentam muito menor sensibilidade, mas é um indicativo de maior carga parasitária e a única que permite o isolamento do agente etiológico para posterior caracterização específica.

Dentre os testes diagnósticos aplicados para investigação frente à infecção por *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos coletados em Florianópolis/SC, somente um indivíduo foi positivo apenas na PCR de amostra de fígado (Tab. 3 e 4).

Tabela 3. Diagnóstico da infecção por *Leishmania* sp. nos exames parasitológicos (culturas de pele, fígado e baço) e sorológico (Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI) em mamíferos silvestres e sinantrópicos coletados no Canto dos Araçás, município de Florianópolis/SC, no período de 26 de setembro a 01 de outubro de 2010. A tabela indica o número de registro, gênero e espécie do mamífero, trilha, ponto e localidade de captura e resultados dos exames parasitológicos e sorológico.

Número de campo	Gênero	Espécie	Trilha	Ponto	Cultura Pele	Cultura Fígado	Cultura Baço	RIFI ¹
LBCE 14901	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	L	110	NEG	NEG	NEG	N.R. ²
LBCE 14902	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	L	114	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14903	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	L	61	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14904	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	L	98	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14905	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	L	88	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14906	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	L	67	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14907	<i>Micoureus</i>	<i>demerarae</i>	V	4	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14908	<i>Micoureus</i>	<i>demerarae</i>	G	178	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14909	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	V	16	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14910	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	L	126	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14911	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	G	172	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14912	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	V	44	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14913	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	L	88	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14914	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	L	94	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14915	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	V	14	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14916	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	L	112	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14917	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	V	71	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14918	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	G	193	NEG	NEG	NEG	1:20 ³
LBCE 14919	<i>Micoureus</i>	<i>demerarae</i>	L	104	NEG	NEG	NEG	N.R.
LBCE 14920	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	V	22	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14921	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	I	164	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14922	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	L	72	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14923	<i>Sooretamys</i>	<i>angouya</i>	L	127	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14924	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	L	70	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14925	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	L	89	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14926	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	V	14	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14927	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	V	42	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14928	<i>Mus</i>	<i>musculus</i>	V	casa	NEG	NEG	NEG	N.R.
LBCE 14929	<i>Mus</i>	<i>musculus</i>	V	casa	NEG	NEG	NEG	N.R.
LBCE 14930	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	L	92	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14931	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	L	77	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14932	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	L	115	NEG	NEG	NEG	1:20 ³
LBCE 14933	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	V	20	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14934	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	L	111	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14935	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	L	64	NEG	NEG	NEG	NEG

(continua)

(continuação)

Número de campo	Gênero	Espécie	Trilha	Ponto	Cultura Pele	Cultura Fígado	Cultura Baço	RIFI
LBCE 14936	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	L	42	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14937	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	I	140	NEG	NEG	NEG	N.R.
LBCE 14938	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	V	49	NEG	NEG	NEG	N.R.
LBCE 14939 ⁴	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	I	140	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
LBCE 14940 ⁴	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	V	49	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.

¹N.R. = Teste não realizado; ²RIFI = Titulação Sorológica frente à infecção por *Leishmania* sp. na Reação de Imunofluorescência Indireta; ³Titulação de corte 1:40 para marsupiais; ⁴Indivíduos não analisados.

Tabela 4. Diagnóstico da infecção por *Leishmania* sp. através de reação em cadeia da polimerase (PCR) em diferentes tecidos coletados de pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos capturados no município de Florianópolis/SC, na localidade Canto dos Araçás, no período de 26 de setembro a 01 de outubro de 2010.

Número de campo	Gênero	Espécie	Crema Leucocitário	Medula	Pele	Fígado	Baço
LBCE 14901	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	-----	-----	NEG	NEG	NEG
LBCE 14902	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	NEG	-----	NEG	NEG	NEG
LBCE 14903	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	NEG	-----	NEG	NEG	NEG
LBCE 14904	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14905	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14906	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	NEG	-----	NEG	NEG	NEG
LBCE 14907	<i>Micoureus</i>	<i>demerarae</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14908	<i>Micoureus</i>	<i>demerarae</i>	-----	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14909	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	-----	NEG	NEG	POS	NEG
LBCE 14910	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14911	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14912	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	-----	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14913	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14914	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14915	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14916	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14917	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	-----	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14918	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	NEG	NEG	NEG	-----	-----
LBCE 14919	<i>Micoureus</i>	<i>demerarae</i>	-----	-----	NEG	-----	-----
LBCE 14920	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	-----	-----	NEG	NEG	NEG
LBCE 14921	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	NEG	-----	NEG	NEG	NEG
LBCE 14922	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14923	<i>Sooretamys</i>	<i>angouya</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14924	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	-----	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14925	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14926	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	-----	-----	NEG	-----	-----
LBCE 14927	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	-----	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14928	<i>Mus</i>	<i>musculus</i>	-----	NEG	NEG	NEG	NEG

(continua)

(continuação)

Número de campo	Gênero	Espécie	Crema Leucocitário	Medula	Pele	Fígado	Baço
LBCE 14929	<i>Mus</i>	<i>musculus</i>	-----	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14930	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	NEG	-----	NEG	NEG	NEG
LBCE 14931	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
LBCE 14932	<i>Didelphis</i>	<i>aurita</i>	NEG	-----	NEG	-----	-----
LBCE 14933	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	NEG	-----	NEG	NEG	NEG
LBCE 14934	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	-----	-----	NEG	NEG	NEG
LBCE 14935	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	NEG	-----	NEG	NEG	NEG
LBCE 14936	<i>Akodon</i>	<i>montensis</i>	-----	-----	NEG	NEG	NEG
LBCE 14937	<i>Oligoryzomys</i>	<i>nigripes</i>	-----	-----	NEG	NEG	NEG
LBCE 14938	<i>Euryoryzomys</i>	<i>russatus</i>	-----	-----	NEG	-----	-----

Nossos resultados mostraram que não há um ciclo de transmissão de *Leishmania* sp. bem estabelecido entre os pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos. Nenhum animal apresentou culturas positivas, o que poderia, no caso de animais infectados, indicar uma alta carga parasitária e potencial de infectividade ao vetor. No exame sorológico, todos os animais foram negativos. Ressaltam-se que dois *D. aurita* apresentaram uma titulação de 1:20, abaixo do ponto de corte estabelecido de 1:40 e, portanto, considerados negativos. Este ponto de corte foi estabelecido por ser a menor titulação observada em animais cuja infecção foi confirmada parasitologicamente. Vale ressaltar que os marsupiais são autóctones das Américas e hospedeiros de outros tripanosomatídeos que não apenas o *T. cruzi* e *Leishmania* sp. A titulação observada deve-se, provavelmente a reação cruzada com alguns destes outros tripanosomatídeos.

No total foram realizados 146 testes para diagnóstico molecular em crema leucocitário, medula, pele, baço e fígado dos pequenos mamíferos coletados na localidade de Canto dos Araçás, Florianópolis/SC. A infecção foi diagnosticada apenas em um animal, um roedor *Akodon montensis* (LBCE 14909) e apenas no fígado do mesmo. As amostras de medula, pele e baço do mesmo roedor foram todas negativas. O encontro de apenas um tecido (uma amostra) positivo entre outras amostras negativas é normal no caso de infecções parasitárias por parasitos intracelulares. A distribuição dos parasitos não é homogênea nos diferentes tecidos de um hospedeiro e nem mesmo dentro de um mesmo tecido, visto que esta distribuição dá-se normalmente, em ninhos teciduais. Assim, um hospedeiro pode ter uma infecção estabelecida no fígado e não em outros tecidos, ou ainda, estabelecida com maiores cargas parasitárias em alguns tecidos do que em outros. A

negatividade do teste nas demais amostras do mesmo roedor, portanto, não exclui a possibilidade da presença do parasito nestes tecidos – a infecção pode estar presente, mas a carga parasitária é provavelmente menor e não foi detectada nas amostras testadas.

Este roedor foi capturado no ponto 16 da trilha V, que é uma área próxima da residência onde havia quatro cães confirmados com infecção canina. A ausência de outros pequenos mamíferos silvestres infectados na área sugere que a origem da infecção deste roedor por ser a mesma dos demais cães infectados. Este roedor, assim como os cães, foi exposto a vetores infectados, mas a origem desta infecção não parece ser o ambiente silvestre.

O encontro de um animal infectado mostra que este animal é um hospedeiro do parasito, mas sua importância como reservatório dependerá das características desta interação parasito-hospedeiro. Esta é que definirá a habilidade deste hospedeiro em manter e transmitir o parasito e, assim, sua importância como reservatório. No caso do roedor encontrado infectado, a presença do parasito foi diagnosticada apenas em um tecido e por uma abordagem bastante sensível, no caso a PCR. Isto mostra que este roedor é um hospedeiro do parasito, mas sua carga parasitária é baixa e este animal provavelmente não seria infectivo ao flebotomíneo. Além disso, a PCR tem sido utilizada como uma ferramenta extremamente útil para o diagnóstico da presença do parasito, mas não garante a viabilidade do parasito, uma vez que é capaz de detectar apenas fragmentos do mesmo.

Outro aspecto importante é que esta infecção foi diagnosticada em apenas 1 dos 40 animais (2,5%) e, considerando apenas os *Akodon montensis*, em 1 dos 14 capturados (7,14%). Isto significa que, mesmo que este animal apresentasse uma alta carga parasitária e potencial de infectividade ao vetor, não poderia ser considerado como reservatório uma vez que sozinho não conseguiria garantir a manutenção do parasito naquela área.

Vale ressaltar que esse tipo de investigação reflete uma situação pontual que pode se modificar no decurso do tempo. No momento da realização dessa expedição não parecia haver um ciclo bem estabelecido, contudo a área reúne todas as características para o estabelecimento de um ciclo silvestre de transmissão: (i) mamíferos silvestres próximos das casas - hospedeiros em potencial do parasito, (ii) presença de outros mamíferos infectados (cães), e (iii) diferentes espécies de flebotomíneos, potenciais vetores.

Conclusões

1) Neste momento, embora um dos roedores tenha sido encontrado infectado, não parece haver um ciclo de transmissão de *Leishmania* sp. bem estabelecido entre os pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos da localidade de Cantos dos Araçás, Florianópolis/SC;

2) O único animal encontrado infectado apresentava baixa carga parasitária e certamente não pode ser responsável pela manutenção do parasito na área, ou seja, não é um reservatório. A origem desta infecção não parece ser o ambiente silvestre;

3) Os achados anteriores de cães infectados, com altas cargas parasitárias e potencial de infectividade ao vetor apontam para a importância destes como os reservatórios do parasito na área.

Recomendações

1) Certificar-se de que nenhum cão que tenha visitado alguma área de transmissão de *Leishmania* sp. tenha sido introduzido ou visitado a área e servido de fonte de infecção para o estabelecimento do surto da doença canina observada;

2) Triar mensalmente e eliminar os cães positivos enquanto a transmissão ainda está restrita, tanto em termos geográficos, quanto em diversidade de hospedeiros;

3) Dar continuidade às buscas por insetos que possam estar atuando como vetores na área;

4) Realizar nova investigação na fauna de mamíferos silvestres após 6 meses. A dinâmica de transmissão de parasitos e a presença de potenciais hospedeiros próximo às casas apontam para o risco iminente do estabelecimento de um ciclo de transmissão entre estes mamíferos;

5) A complexidade do perfil enzoótico observado em outras áreas de LVC aponta para a importância da implantação de políticas abrangentes de controle que incluam um forte programa de sensibilização, informação e educação da comunidade local;

6) Realizar campanhas educativas no sentido de não se deslocar cães na área (tanto em relação à saída quanto, principalmente, em relação à entrada) ao menos pelos próximos 6 meses e até que se tenha um diagnóstico mais detalhado da área;

7) Sugerir fortemente o uso de coleiras repelentes nos cães do município até que a situação possa ser declarada sob controle.

Referências bibliográficas

- Ashford, R. W. 1996. Leishmaniasis reservoir and their significance in control. *Clin Dermat*, 14: 523-32
- Ashford, R.W. 1997. What it takes to be a reservoir host. *Bel. J. Zool.* 127: 85-90.
- August, P. V. 1983. The role of habitat complexity and heterogeneity in structure tropical mammal communities. *Ecology*, 64: 1465-1513.
- Bonvicino, C.R.; Oliveira, J.A.; D'Andrea, P.S. 2008. *Guia dos Roedores do Brasil com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos*. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa-OPAS/OMS.
- Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, Shaw JJ, 2003. Wild and synantropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97: 291-296.
- Caruso, M.M.L. 1990. *O desmatamento na Ilha de Santa Catarina de 1500 aos dias atuais*. 2a.ed. Editora da UFSC. 158p.
- Fonseca, G.A.B. 1989. Small mammal species diversity in Brazilian tropical primary and secondary forest of different sizes. *Rev. Bras. Zool.* 6 (3): 381-422.
- Gannon, W. L. & Animal Care and Use Committee. 2007. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research, *Journal of Mammalogy*, 88(3): 809-823.
- Graipel, M. E.; Cherem, J. J. & Ximenez, E. A. 2001. Mamíferos terrestres não voadores da Ilha de Santa Catarina, sul do Brasil. *Biotemas*, 14: 109-140.
- Graipel, M. E., Cherem, J. J., Monteiro-Filho, E. L. A. & Glock, L. 2006. Dinâmica populacional de marsupiais e roedores no Parque Municipal da Lagoa do Peri, Ilha de Santa Catarina, sul do Brasil. *Mastozoología Neotropical*, 13(1): 31-49.
- Haydon, D.T.; Cleaveland, S.; Taylor, L.H.; Laurenson, M.K. 2002. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis*: 8(12): 1468-73.
- Klein, R.M. 1990. Estrutura, composição florística, dinamismo e manejo da "Mata Atlântica" (Floresta Ombrófila Densa) do sul do Brasil. *II Simp. Ecosist Costa Sul e Sudeste Brasileira: Estrutura, Função e Manejo*, São Paulo 1: 259-286.
- Mills, J.N. & Childs, J.E. 1998. Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance for human health. *Emerg Infect Dis.*, 4(4): 529-537.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561–1577.
- Noireau F, Diosque P, Jansen AM, 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet. Res.* 40: 26.
- Olimpio, J. 1995. Conservação da fauna de mamíferos silvestres da Ilha de Santa Catarina: Aspectos biogeográficos, históricos e sócio-ambientais. *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil.

- Oliveira, F.S.; Pirmez, C.; Pires, M.Q.; Brazil, R.P. & Pacheco, R.S. 2005. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol.*, 129(3-4): 219-227.
- Paglia, A. P.; De Marco Jr., P.; Costa, F. M.; Pereira, R. F. E Lessa, G. 1995. Heterogeneidade estrutural e diversidade de pequenos mamíferos em um fragmento de mata secundária de Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 12 (1): 67-79.
- Roque, A. L. R.; D'Andrea, P.S.; de Andrade, G.B. & Jansen, A. M. 2005. *Trypanosoma cruzi*: distinct patterns of infection in the sibling caviomorph rodent species *Thrichomys apereoides laurentius* and *Thrichomys pachyurus* (Rodentia, Echimyidae). *Exp Parasitol.*, 111(1): 37-46.
- Rossi, R.V.; Bianconi G.V.; Pedro, W.A. 2006. Ordem Didelphimorphia. pp 27-66. In: Reis, R.R., Peracchi, A.L., Pedro, W.A. & Lima, I.P. (Editors). Mamíferos do Brasil. Londrina. UFSC, Florianópolis.

Anexo. Registro de expedição no SISBIO – Florianópolis 25/09 a03/10/2010.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Registro de Expedição
Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 2588-1	Data da emissão: 16/09/2010 13:17
Número da solicitação: 13373	Data da expedição: 25/09/2010 à 03/10/2010

Dados do titular

Cadastro Ibama: 608054	Nome: PAULO SÉRGIO D ANDREA	CPF: 062.639.198-92
Instituição: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0001-35	

Equipe

#	Nome	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade	*Responsável
1	Vitor Antonio Louzada de Araújo	105.230.047-61	2027 21825 DIC-RJ	Brasileira	Não
2	FABIANO ARAUJO FERNANDES	076.039.387-75	08479632-6 Detran-RJ	Brasileira	Sim
3	Fabiana Lopes Rocha	696.485.671-87	1751262 SSP-DF	Brasileira	Não
4	Michele Barros Faria	051.421.116-48	12052630 SSP-MG	Brasileira	Não

* O titular não é responsável pela equipe caso não designe alguém para exercer tal função.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Localidade	UF	Município
1	Florianópolis	SC	FLORIANOPOLIS

Taxons autorizados

Taxon(s)
Oitros mamíferos Rodeante, Didelphiomorpha

Este documento foi expedido pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO de acordo com a Instrução Normativa Ibama número 154/07. Qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 83241184



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

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

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Registro de Expedição
Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 2588-1	Data da emissão: 16/09/2010 13:17
Número da solicitação: 13373	Data da expedição: 25/09/2010 à 03/10/2010

Dados do titular

Cadastro Ibama: 608054	Nome: PAULO SÉRGIO D ANDREA	CPF: 062.639.198-92
Instituição: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0001-35	

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento foi expedido pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO de acordo com a Instrução Normativa Ibama número 154/07. Qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 83241184



Página 3/3