

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
DOUTORADO EM SAÚDE PÚBLICA

José Ferreira Marinho Júnior

CARACTERIZAÇÃO DA INFECCIOSIDADE DE ROEDORES SILVESTRES E  
SINANTRÓPICOS COMO HOSPEDEIROS RESERVATÓRIOS ENVOLVIDOS NO  
CICLO ZONÓTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA  
ASSOCIADA À *Leishmania (Viannia) braziliensis*

RECIFE

2015

**JOSÉ FERREIRA MARINHO JÚNIOR**

**CARACTERIZAÇÃO DA INFECCIOSIDADE DE ROEDORES SILVESTRES E  
SINANTRÓPICOS COMO HOSPEDEIROS RESERVATÓRIOS ENVOLVIDOS NO  
CICLO ZOONÓTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA  
ASSOCIADA À *Leishmania (Viannia) braziliensis***

**Tese apresentada ao Curso de  
Doutorado em Saúde Pública do  
Centro de Pesquisas Aggeu  
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz,  
para obtenção do título de Doutor  
em ciências.**

**Orientador: Dr. Sinval Pinto Brandão Filho**

**RECIFE**

**2015**

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

M338c Marinho Júnior, José Ferreira.

Caracterização da infecciosidade de roedores silvestres e sinantrópicos como hospedeiros reservatórios envolvidos no ciclo zoonótico da leishmaniose tegumentar americana associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis*. / José Ferreira Marinho Júnior. — Recife: [s.n.], 2015.

102 p : il., graf., tab., 30 cm.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) — Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2015.

Orientador: Sinval Pinto Brandão Filho.

1. Leishmaniose Cutânea – prevenção & controle. 2. *Leishmania Braziliensis* - parasitologia. 3. Reservatórios de Doenças. I. Brandão Filho, Sinval Pinto. II. Título.

---

CDU 613.993.161

**JOSÉ FERREIRA MARINHO JÚNIOR**

**CARACTERIZAÇÃO DA INFECCIOSIDADE DE ROEDORES SILVESTRES E  
SINANTRÓPICOS COMO HOSPEDEIROS RESERVATÓRIOS ENVOLVIDOS NO  
CICLO ZOONÓTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA  
ASSOCIADA À *Leishmania (Viannia) braziliensis***

**Tese apresentada ao Curso de  
Doutorado em Saúde Pública do  
Centro de Pesquisas Aggeu  
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz,  
para obtenção do título de Doutor  
em ciências.**

**Aprovado em: 29/9/2015.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Dr. Sinval Pinto Brandão Filho**  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fiocruz

---

**Dra. Zulma Maria Medeiros**  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fiocruz

---

**Dr. Wayner Vieira de Souza**  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fiocruz

---

**Dr. Reginaldo Peçanha Brazil**  
Instituto Oswaldo Cruz - IOC/Fiocruz

---

**Dr. Jeffrey Jon Shaw**  
Universidade de São Paulo/USP

*A minha mãe, Sônia Oliveira Cavalcanti, meu orgulho, meu exemplo de vida... a base de todas as minhas vitórias.*

*A Sônia Maria (Soninha) e Juliana, minhas irmãs, que me apoiaram desde o início.*

*A Juliane Marcele, minha namorada, companheira, pelo amor, apoio, carinho e compreensão durante todo esse trajeto.*

*Aos meus anjos, Alcides Ferraz Cavalcanti e Primitiva de Oliveira Cavalcanti meus avós maternos (in memoriam), eterna gratidão por tudo.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por tudo em minha vida!

Ao orientador, Dr. Sinval Pinto Brandão Filho, pela amizade, ensinamentos, competência e pelo apoio incondicional, na minha carreira científica.

Ao Dr. Orin Courtenay, professor da Life Sciences / University of Warwick / UK e, pesquisador visitante do CPqAM/FIOCRUZ, do programa Ciências sem fronteiras, por todo o apoio, aprendizado, sendo fundamental sua participação desde a elaboração do projeto até a defesa.

A Dr<sup>a</sup>. Milena Paiva, pela amizade, pelo incondicional apoio, sempre disposta a ajudar. Obrigado por tudo, principalmente, no diagnóstico molecular por PCR em tempo real.

A Dr<sup>a</sup>. Juliana Figueiredo, amiga e grande colaboradora do projeto, obrigado por tudo, todo o suporte.

A Dr<sup>a</sup>. Maria Edileuza Brito, amiga, que me acompanha desde a iniciação científica, pelos ensinamentos e valiosas considerações.

Ao Dr. Eduardo Rodrigues, amigo, que sempre incentivou, obrigado pelos ensinamentos, dedicação e suporte de sempre.

Ao pesquisador Francisco Gomes Carvalho, pela amizade, aprendizado, empenho e dedicação no árduo trabalho de campo.

Ao doutorando George Diniz, muito obrigado por todo apoio nas análises estatísticas.

A mestrandia Ana Waléria, obrigado pelo suporte na execução das atividades em campo.

A Fernando Silva (CPqAM) e Hélio Valença (FUNASA), por toda ajuda na coleta, identificação, nos xenodiagnósticos, e todo o trabalho com flebotomíneos, obrigado por tudo.

A Amilton (FUNASA), pelo incondicional apoio no trabalho de campo, principalmente nas capturas e recapturas de roedores.

A Egberto (Beto) e Romário (Pesão), por todo apoio no laborioso trabalho de campo.

A Luana Brito, aluna de iniciação científica durante maior parte da execução desse projeto, obrigado por todo apoio em laboratório.

A Priscila Carla e Mariana Veríssimo, também alunas de iniciação científica, pelo apoio no laboratório.

Aos colegas do grupo de pesquisa: Rômulo, Vanessa, Pietra, Suênia, Lays, Rayana, Brenda, Cíntia, Kamila, Kyldman, Joana, Juliana, Bruna, Isabele, e demais integrantes da equipe de Leishmanioses pelo apoio direto e indireto na realização deste trabalho.

A Haílton, Robson e Assis, por todo o suporte no biotério e na coleta de amostras dos animais no NA3.

A Dr<sup>a</sup>. Cássia Docena, Viviane, Marlos, Ana Karina e todos que compõem o Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT-1) do CPqAM por todo suporte na realização das PCR's em tempo real.

Aos que compõem o SRL – Serviço de Referência em Leishmanioses: Éricka Almeida, Leonardo Dutra, Andréa Sales.

Aos colegas de turma do doutorado, por todo aprendizado, troca de saberes. Em especial, agradeço a Dr<sup>a</sup>. Suellen Carvalho, além de colega de turma, colega na bancada do LIMP.

Aos pesquisadores do Departamento de Imunologia que contribuíram de forma direta e indireta para realização deste trabalho.

A Simone Santos, secretária do Departamento de Imunologia por todo apoio.

A todos os professores que fizeram parte deste curso.

A toda direção do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, pela disponibilidade de equipamentos, materiais e instalações.

A todos que fazem a SEAC – Secretaria Acadêmica por todo o apoio.

A FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pela bolsa concedida e incentivo financeiro para realização deste trabalho.

A Prefeitura do Jaboatão dos Guararapes que me concedeu licença para realização deste estudo.

A Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco, que, no início, propiciou boa parte da execução do trabalho de campo com a cessão de veículo e motorista.

A população de Amaraji, em especial, das localidades de Raiz de Dentro e Refrigério, pelo acolhimento na realização deste trabalho.

A Manoel (Neco) e Ronaldo por todo apoio no campo, principalmente na cessão de local para guarda de nosso material.

A Prefeitura Municipal de Amaraji, na pessoa do Sr Jânio Gouveia, prefeito do município, pela concessão de local para instalação de nossa base de campo, e, por todo apoio na realização deste trabalho.

A todos que fazem parte do Laboratório de Imunoparasitologia – LIMP: Dr<sup>a</sup>. Yara, Dr<sup>a</sup> Virgínia, Mineo, Michele, Adriene, Fred, Patrícia, Arthur, Amanda, Luciane... muito obrigado pelo convívio e apoio, durante as atividades no laboratório.

A Bernadete Brito por fornecer informações importantes sobre a LTA no município de Amaraji.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta para que fosse possível a conclusão desta tese!



MARINHO JÚNIOR, José Ferreira. **Caracterização da infecciosidade de roedores silvestres e sinantrópicos como hospedeiros reservatórios envolvidos no ciclo zoonótico da Leishmaniose Tegumentar Americana associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2015. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

## RESUMO

Uma das lacunas relacionadas com a ecoepidemiologia da LTA associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis* está relacionada à identificação de hospedeiros reservatórios e flebotomíneos que mantém o ciclo de transmissão. Amaraji, município da Zona da Mata de Pernambuco, apresenta importante incidência da LTA. Este estudo objetivou caracterizar a infecciosidade de roedores silvestres e sinantrópicos à *L. (V.) braziliensis* como reservatórios envolvidos na manutenção do ciclo zoonótico na região, através do diagnóstico de infecção natural por *L. (V.)* spp detectado por qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa); xenodiagnósticos utilizando *Lutzomyia longipalpis* ou *Lutzomyia whitmani* em roedores infectados; e, avaliação da interrupção de exposição à transmissão. Estudo experimental realizado entre maio/2012 e agosto/2014, capturou-se 638 roedores pertencentes a 11 diferentes espécies, com predominância de *Nectomys squamipes* 38,3% (245/638), e, *Rattus rattus* 23,2% (148/638). Foram marcados com microchips 603 animais, e, realizadas 394 recapturas. Foram obtidos DNA de pele e sangue dos roedores a cada captura/recaptura. Em 176 (29,2%) roedores detectou-se infecção. Foram realizados 51 xenodiagnósticos (46 *L. whitmani*; 5 *L. longipalpis*), onde infectaram-se 72,58% (1400/1929) dos flebotomíneos. Não foram identificadas diferenças quanto às espécies vetoras. Roedores foram infectivos aos vetores independentemente da carga parasitária da infecção natural. Foi verificada diminuição da carga parasitária dos roedores em laboratório. A infecção natural por *L. (Viannia.)* spp detectada nos roedores, indicam que *N. squamipes* e *N. lasiurus* atuam como reservatórios primários e, *R. rattus*, como reservatório secundário no ciclo de transmissão da LTA na região.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar – epidemiologia. *Leishmania (Viannia) braziliensis* - parasitologia. Hospedeiros reservatórios, vetores.

MARINHO JÚNIOR, José Ferreira. **Characterization of infectivity of wild and synanthropic rodents as reservoir hosts involved in the zoonotic cycle of American Cutaneous Leishmaniasis associated with *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2015. Thesis (Doctor Degree in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

### ABSTRACT

One of the gaps related to ACL (American Cutaneous Leishmaniasis) eco-epidemiology associated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* is related to identification of reservoir hosts and sand flies that keeps the transmission cycle. Amaraji, municipality of Zona da Mata of Pernambuco state, show a significant incidence of ACL. This study aimed to characterize the infectivity of wild and synanthropic rodents to *L. (V.) braziliensis* as reservoirs involved in maintaining the zoonotic cycle in the region, through the diagnosis of natural infection with *L. (V.)* spp detected by qPCR (quantitative Reaction Polymerase Chain); xenodiagnoses using fed sandflies (*Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia whitmani*) on infected rodents; and evaluation of exposure to interrupt transmission. Experimental study conducted between may/2012 and august/2014 was captured 638 rodents of 11 various species, with a predominance of *Nectomys squamipes* 38.3% (245/638), and *Rattus rattus* 23.2% (148/638). They were mark with microchips 603 rodents, and performed 394 recaptures. DNA samples were obtained from skin and blood of rodents every capture / recapture. In 176 (29.2%) was detected rodents infection. 51 xenodiagnosis were performed (46 use *L. whitmani* and 5 use *L. longipalpis*), where an infected 72.58% (1400/1929) of sand flies. No differences were identified as the vector species. Rodents were infectious to vectors regardless of the load parasite of infection. It was observed decrease in parasite load of laboratory rodents. Natural infection by *L. (V.)* spp in rodents indicate that *N. squamipes* and *N. lasiurus* act as primary reservoirs and *R. rattus* as secondary reservoir in transmission cycle of LTA in region.

Key-words: Cutaneous Leishmaniasis – prevention & control. *Leishmania braziliensis* - parasitology. Disease reservoirs.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	29
<b>Figura 2</b> – Localização do município de Amaraji e das localidades estudadas, engenho Raiz de Dentro e Engenho Refrigério	42
<b>Figura 3</b> – Domicílio no Engenho Raiz de Dentro.	43
<b>Figura 4</b> – Domicílio no Engenho Refrigério	43
<b>Figura 5</b> – Armadilha Tomahowk	44
<b>Figura 6</b> – Armadilhas Tomahowk	44
<b>Figura 7</b> – Anestesia roedor.	45
<b>Figura 8</b> – Coleta sangue	45
<b>Figura 9</b> – Coleta Pele	45
<b>Figura 10</b> – Marcação microchip	45
<b>Figura 11</b> – Captura sazonalidade	47
<b>Figura 12</b> – Xenodiagnóstico	47
<b>Figura 13</b> – Termociclador modelo 7500/2011 Applied Biosystems®	48
<b>Figura 14</b> – Roedor silvestre <i>Nectomys squamipes</i> .	55
<b>Figura 15</b> – Roedor sinantrópico <i>Rattus rattus</i>	55
<b>Figura 16</b> – Roedor silvestre <i>Necromys lasiurus</i>	55
<b>Figura 17</b> – Amplificação de amostras de DNA de sangue de roedores	58
<b>Figura 18</b> – Curva de Melt em qPCR de amostras de DNA de sangue de roedores	58

**Figura 19** – Curva padrão em qPCR de amostras de DNA de sangue de roedores

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Prevalência de infecção por *Leishmania (Viannia)* spp. nas diferentes espécies de roedores silvestres e sinantrópicos estudadas por mês de diagnóstico. 60
- Gráfico 2** - Prevalência da infecção por *Leishmania (Viannia)* spp. entre todas as espécies de roedores silvestres e sinantrópicos estudadas, referentes as expedições realizadas no período de maio/2012 a agosto/2014. 60
- Gráfico 3** - Incidência da infecção por *Leishmania (Viannia)* spp. entre todas as espécies de roedores silvestres e sinantrópicos estudadas, por mês, considerando observação do primeiro mês de infecção. 61
- Gráfico 4** - Distribuição sazonal de flebotomíneos coletados na localidade de Raiz de Dentro – Amaraji, durante o período de ago/2013 a jul/2014. 65
- Gráfico 5** - Distribuição das espécies de flebotomíneos coletados por ecótopo de captura. 65
- Gráfico 6** - Proporção de *L. whitmani* positivos nos xenodiagnósticos 72
- Gráfico 7** - Associação entre carga parasitária dos roedores e fêmeas de *L. whitmani* infectadas no xenodiagnóstico 73
- Gráfico 8** - Associação entre a média (ln) de carga de infecção em *L. whitmani*, com o estado de carga (ln) de infecção no sangue do animal no momento da xenodiagnóstico. 74
- Gráfico 9** - Propabilidade de infecção de flebotomíneos em xenos realizados com *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus* 76
- Gráfico 10** - Média das cargas parasitárias de flebotomíneos infectados nos xenodiagnósticos realizados com *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus*. 76

<b>Gráfico 11</b> - Evolução das cargas parasitárias de roedores com exposição contínua e com interrupção da exposição à transmissão	77
<b>Gráfico 12</b> - Dispersão das cargas parasitárias de roedores com exposição contínua e com interrupção da exposição à transmissão.	78
<b>Gráfico 13</b> - Evolução das cargas parasitárias dos roedores com interrupção da transmissão após detecção da infecção por <i>Leishmania (Viannia) spp.</i>	78

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Resultado das expedições ao campo nas localidades do Engenho Raiz de Dentro e Engenho Refrigério, município de Amaraji – PE, durante o período de maio/2012 a agosto/2014.	54
<b>Tabela 2</b> - Animais silvestres e sinantrópicos capturados nas localidades dos Engenhos Raiz de Dentro e Refrigério, Amaraji-PE, quanto ao sexo, no período de maio de 2012 a agosto de 2014.	56
<b>Tabela 3</b> - Roedores silvestres e sinantrópicos capturados e marcados nas localidades dos Engenhos Raiz de Dentro e Refrigério, Amaraji-PE, por ecótopo, no período de maio de 2012 a agosto de 2014.	56
<b>Tabela 4</b> - Roedores silvestres e sinantrópicos capturados e recapturados nas localidades dos Engenhos Raiz de Dentro e Refrigério, Amaraji-PE, por recapturas (R1-R10), no período de junho de 2012 a agosto de 2014.	57
<b>Tabela 5</b> - Resultados dos testes moleculares (qPCR) de amostras DNA dos roedores silvestres e sinantrópicos positivos das localidades de Engenho Raiz de Dentro e Engenho Refrigério, Amaraji-PE, no período de maio de 2012 a agosto de 2014.	59
<b>Tabela 6</b> - Comparação da detecção de infecção natural por <i>Leishmania (Viannia)</i> spp considerando os ecótopos plantações e mata, das diferentes espécies de roedores capturadas nas localidades de Raiz de Dentro e Refrigério, Amaraji-PE, no período de maio/2012 a agosto/2014.	61
<b>Tabela 7</b> - Comparação da detecção da infecção natural por <i>Leishmania (Viannia)</i> spp. entre as localidades Raiz de Dentro e Refrigério, Amaraji-PE, no período de maio/2012 a agosto/2014.	62
<b>Tabela 8</b> - Comparação da detecção da infecção natural por <i>Leishmania (Viannia)</i> spp. entre os diferentes ecótopos de captura.	62
<b>Tabela 9</b> - Comparação da detecção da infecção natural por <i>Leishmania</i>	63

(*Viannia*) spp. entre os diferentes ecótopos de captura, apenas da espécie *Rattus rattus*.

**Tabela 10** - Comparação da detecção da infecção natural por *Leishmania* (*Viannia*) spp. entre os ecótopos Plantações e Mata Atlântica. 63

**Tabela 11** - Distribuição da infecção natural por *Leishmania* (*Viannia*) spp. entre as espécies por localidades (Refrigério e Raiz de Dentro). 63

**Tabela 12** - Resultado da Sazonalidade de flebotomíneos coletados na localidade de Raiz de Dentro – Amaraji, durante o período de ago/2013 a jul/2014. 64

**Tabela 13** - Resultado geral dos ensaios de infecciosidade, por xenodiagnóstico, realizados com roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Raiz de Dentro, Amaraji-PE no período de 2012-2014. 67

**Tabela 14** - Resultado geral dos Ensaio de infecciosidade utilizando fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, por xenodiagnóstico, realizados com roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Raiz de Dentro, Amaraji-PE no período de 2012-2013. 69

**Tabela 15** - Resultado geral dos Ensaio de infecciosidade utilizando fêmeas de *Lutzomyia whitmani* capturadas no campo, por xenodiagnóstico, realizados com roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Raiz de Dentro, Amaraji-PE no período de 2013-2014. 70

**Tabela 16** - Análise da proporção de *L. whitmani* positivos nos xenodiagnósticos 72

**Tabela 17** - Análise da associação entre carga parasitária dos roedores e fêmeas de *L. whitmani* infectadas no xenodiagnóstico. 73

**Tabela 18** - Associação entre a média (ln) de carga de infecção em *L. whitmani*, com o estado de carga (ln) de infecção no sangue do animal no momento do xenodiagnóstico. 74



<b>Tabela 19</b> - Análise da proporção de <i>L. longipalpis</i> infectados nos xenodiagnósticos em relação à média de parasitos (fg).	75
<b>Tabela 20</b> - Análise da proporção de <i>L. longipalpis</i> infectados nos xenodiagnósticos em relação à carga de infecção no roedor.	75
<b>Tabela 21</b> - Análise da probabilidade <i>Nectomys squamipes</i> infectar flebotomíneos ( <i>L. longipalpis</i> ou <i>L. whitmani</i> ) nos xenodiagnósticos.	75
<b>Tabela 22</b> - Análise da probabilidade <i>Rattus rattus</i> infectar flebotomíneos ( <i>L. longipalpis</i> ou <i>L. whitmani</i> ) nos xenodiagnósticos.	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LT - Leishmaniose Tegumentar

LV - Leishmaniose Visceral

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LVA - Leishmaniose Visceral Americana

OMS - Organização Mundial de Saúde

SINAN - Sistema de Informações de Agravos de Notificação

LC - Leishmaniose Cutânea

qPCR – Real time Polymerase Chain Reaction

kDNA - Kinetoplastic Deoxyribonucleic Acid

uL – microlitro

rpm – rotações por minuto

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

MS - Ministério da Saúde

S – South

W – West

NBA - Nível Biossegurança Animal

DNA - Deoxyribonucleic Acid

pb - Pares de base

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

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

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	20
<b>1.1 Aspectos gerais da leishmaniose tegumentar americana</b>	24
<b>1.2 Ciclos de transmissão da LTA</b>	27
1.2.1 <i>Ciclo Biológico</i>	28
1.2.2 <i>Agente etiológico</i>	29
1.2.3 <i>Vetores</i>	31
1.2.4 <i>Hospedeiros Reservatórios</i>	33
<b>1.3 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana</b>	37
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	39
<b>3 HIPÓTESE</b>	40
<b>4 OBJETIVOS</b>	41
4.1 <b>Geral</b>	41
4.2 <b>Específicos</b>	41
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	42
5.1 <b>Área de estudo</b>	42
5.1.2 <i>Pontos de captura</i>	44
5.2 <b>Fauna das espécies capturadas e recapturadas de roedores silvestres e sinatrópicos</b>	44
5.2.1 <i>Captura-marcação-soltura-recaptura</i>	44
5.3 <b>Flebotomíneos</b>	46
5.3.1 <i>Capturas para sazonalidade e xenodiagnósticos</i>	46
5.4 <b>Extração do DNA das amostras</b>	47
5.4.1 <i>Amostras de roedores silvestres e sinatrópicos</i>	47
5.4.2 <i>Amostras de flebotomíneos</i>	47
5.5 <b>PCR em Tempo real (qPCR)</b>	48
5.6 <b>Ensaio de infecciosidade através de xenodiagnósticos</b>	48
5.6.1 <i>Xenodiagnóstico realizado em laboratório com exemplares de <i>Lutzomyia longipalpis</i>, oriundos da colônia do CPqAM/Fiocruz</i>	49
5.6.2 <i>Xenodiagnóstico com flebotomíneos capturados no campo</i>	50
5.7 <b>Avaliação da interrupção de exposição à transmissão</b>	50
5.8 <b>Análise estatística</b>	51

<b>6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b>	<b>52</b>
<b>7 RESULTADOS</b>	<b>53</b>
<b>7.1 Identificação das espécies de roedores silvestres e sinantrópicos que compõem a fauna</b>	<b>53</b>
<b>7.2 Diagnóstico molecular por PCR em Tempo Real (qPCR)</b>	<b>57</b>
<b>7.3 Sazonalidade de flebotomíneos</b>	<b>64</b>
<b>7.4 Ensaio de infecciosidade através de xenodiagnóstico</b>	<b>66</b>
<b>7.5 Avaliação da interrupção de exposição à transmissão em roedores</b>	<b>77</b>
<b>8 DISCUSSÃO</b>	<b>79</b>
<b>9 CONCLUSÕES</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO A – Parecer Comitê Ética em Uso com Animais – CEUA/FIOCRUZ-PE</b>	<b>96</b>
<b>ANEXO B – Autorização para atividades com finalidade científica – IBAMA/MMA</b>	<b>99</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por diferentes protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, da família Trypanosomatidae, apresentando-se sob duas formas clínicas: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). A forma LT acomete pele, cartilagens e mucosas, já a LV, acomete vísceras, principalmente, baço e fígado, nas Américas, são denominadas leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA) (LAINSON; SHAW, 1998; MICHALICK; NEVES; MELO, 2005).

Atualmente, as leishmanioses estão incluídas no rol de doenças tropicais negligenciadas, sendo consideradas prioritárias nos programas e ações da Organização Mundial de Saúde (BRASIL, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL SAÚDE, 2015). Do ponto de vista da saúde pública, as leishmanioses são consideradas um grande problema de saúde no mundo devido a sua complexidade epidemiológica, onde em seus ciclos de transmissão, participam diversos agentes etiológicos, vetores e hospedeiros (BRASIL, 2007).

Várias espécies de leishmanias estão envolvidas na transmissão da LTA (BRASIL, 2010). Dentre essas, destaca-se *Leishmania (Viannia) braziliensis* que é a espécie encontrada em todas as unidades federadas, sendo a mais predominante envolvida com a LTA no Nordeste brasileiro (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; BRITO *et al.*, 2009).

Poucos estudos relacionados à ecoepidemiologia da LTA associada à *L. (V.) braziliensis* estão relacionados com a identificação de hospedeiros reservatórios e flebotomíneos que mantêm o ciclo de transmissão do parasito. Embora tenhamos obtidos alguns avanços no conhecimento sobre o potencial de pequenos roedores silvestres e sinantrópicos como hospedeiros reservatórios desta espécie (ANDRADE *et al.*, 2010; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003), ainda são necessários mais estudos sobre o papel categórico das espécies em relação à infecciosidade para flebotomíneos a fim de reforçar a hipótese sobre seu importante papel na manutenção da LTA associada à *L. (V.) braziliensis* no Brasil (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003).

Estudos longitudinais desenvolvidos nos últimos anos na Zona da Mata de Pernambuco, evidenciaram diferentes aspectos relacionados à ecoepidemiologia da LTA associada a *L. (V.) braziliensis*, com importantes contribuições relacionadas à

prevalência e a força da infecção na população humana, caracterização da fauna de flebotomíneos e identificação de prováveis hospedeiros reservatórios envolvidos na manutenção da endemia nesta região (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1994, 1999, 2003). Nestes estudos, avaliando a infecção natural em animais silvestres, sinantrópicos e domésticos, foram identificados roedores silvestres das espécies *Necomys lasiurus* e *Nectomys squamipes*, e o roedor sinantrópico, rato doméstico (*Rattus rattus*), como prováveis reservatórios primários e secundário, respectivamente, de *L. (V.) braziliensis* nesta região, (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2013; MARINHO-JÚNIOR, 2010). *Lutzomyia whitmani* parece ser a principal espécie de flebotomíneo envolvida na transmissão, tendo em vista o resultado obtido de infecção natural por *L.(V.) braziliensis* com amostra pertencente ao mesmo zimodemo verificado em amostras isoladas de pacientes (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003).

Para considerar uma determinada espécie como hospedeiro reservatório ou vetor, são utilizados como parâmetros critérios clássicos preconizados por Ashford (1996) e Killick-Kendrick (1990). Dentre outras evidências verificam-se a abundância da espécie na fauna e ecótopos mutuamente comuns; que esta seja encontrada naturalmente infectada por *Leishmania* spp, caracterizada pelos métodos clássicos de tipagem; que a espécie do parasito seja a mesma isolada em paciente na população residente daquela região; e, que seja demonstrado categoricamente que este hospedeiro é capaz de infectar o flebotomíneo e que este seja capaz de transmitir a infecção para outro espécime do hospedeiro (ASHFORD, 1996; KILLICK-KENDRICK, 1990).

Conforme os postulados clássicos para incriminação de espécies como hospedeiros reservatórios e vetores, propostos respectivamente por Ashford (1996) e Killick-Kendrick (1990), foram obtidos resultados nos estudos de Brandão-Filho *et al.* (2003) que evidenciam espécies de roedores como reservatórios de *L. (V.) braziliensis*. Nos estudos no município de Amaraji, localizado na Zona da Mata de Pernambuco, foram obtidos isolados de *L. (V.) braziliensis* em roedores. Estes isolados foram caracterizados categoricamente através de isoenzimas e apresentaram o mesmo zimodemo (IOC-74) encontrado em pacientes da região e no flebotomíneo *L. whitmani* (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; BRITO *et al.*, 2009).

Nas zoonoses, o entendimento da epidemiologia da infecção em hospedeiros reservatórios é essencial para planejar o controle de infecção humana (BRANDÃO-

FILHO; SHAW, 2006). Em particular, é necessário saber: (i) a intensidade de transmissão entre espécies de roedores, sumarizados pelo número básico de reprodução, (ii)  $R_0$ , a proporção de cada população de roedores que é infecciosa para flebotomíneos, (iii) e a localização do (s) ecótopo (s) de maior transmissão como alvo de controle.  $R_0$  é definido como a média do número de casos secundários decorrentes de um caso primário em uma população suscetível (GARRETT-JONES, 1964; MACDONALD, 1957). Para uma espécie de parasito persistir em uma população de hospedeiro, ela deve ter  $R_0 \geq 1$  (ANDERSON; MAY; ANDERSON, 1992). Quando várias espécies de hospedeiros podem ser infectadas, como na leishmaniose cutânea zoonótica, genericamente denominada leishmaniose tegumentar americana (LTA), é possível dividir as espécies epidemiologicamente em hospedeiros primários, secundários e acidentais (HAYDON *et al.*, 2002).

Com relação aos hospedeiros de uma endemia, são classificados primários, àqueles que podem manter o  $R_0$  superior a 1, na ausência de outros hospedeiros, desta forma o parasito pode persistir indefinidamente nesta população de hospedeiro. Entretanto, os hospedeiros secundários, são aqueles que podem transmitir a infecção, de modo que  $R_0$  é aumentada, mas não conseguem manter a transmissão do parasita, na ausência de hospedeiro (s) primário (s). Os hospedeiros classificados como acidentais, são aqueles que podem ser infectados, mas normalmente não transmitem o parasita e, portanto, não têm efeito sobre  $R_0$ . O controle da transmissão do parasita pelo reservatório primário pode eliminar a doença, reduzindo  $R_0$  abaixo de 1. O controle voltado para reservatórios secundários pode reduzir o  $R_0$ , mas não pode levar à eliminação, enquanto que o controle dirigido ao reservatório acidental não afetará  $R_0$  (HAYDON *et al.*, 2002).

A magnitude do  $R_0$  também fornece uma medida da dificuldade de controle da doença, pois o esforço (E) necessário para eliminar a infecção (ou seja, a unidade de  $R_0 < 1$ ),  $E > 1 - 1/R_0$ . Desta forma,  $R_0$  pode ser estimada, utilizando a prevalência de infecção do hospedeiro, ou a incidência de infecção do hospedeiro e expectativa de vida de acolhimento. Mas estimativas precisas requerem o uso de métodos sensíveis para detectar a infecção (por exemplo, vários testes de diagnóstico), detalhados estudos longitudinais, ou ambos (DYE *et al.*, 1992; HASIBEDER *et al.*, 1992). Usando esses métodos, tem sido estimado que para leishmaniose visceral americana (LVA),  $R_0 = 10$  e  $R_0 = 9$  na região amazônica no Brasil (COURTENAY *et al.*, 2002b; DYE *et al.*, 1992; QUINNELL *et al.*, 1997). Estes

dados sugerem que o controle da LVA torna-se difícil, exigindo uma redução maior que 89% de transmissão para eliminar a infecção. Estudos longitudinais na França e Itália têm demonstrado uma alta incidência (40-92%) por período de transmissão, sugerindo que a  $R_0$  nestas áreas podem ser igualmente altas (DYE *et al.* 1993; OLIVA *et al.* 2006). Para nosso conhecimento, não há estimativas atualmente disponíveis para a LVA no Brasil ou em outro local nas Américas.

Por outro lado, a avaliação da infecciosidade exige estudos de xenodiagnóstico. Tais estudos foram realizados em cães que apresentavam gravidade variável de leishmaniose visceral (sintomas clínicos da doença), tanto na Europa como na América do Sul. Os resultados mostram que uma alta proporção de cães infectados são infectivos para uma alta proporção de flebotomíneos alimentados neles, e a proporção de cães infectivos aumenta significativamente com o aumento da gravidade clínica (QUINNELL; COURTENAY, 2009). Pode haver também uma maior susceptibilidade de algumas espécies de flebotomíneos vetores, como por exemplo, entre *Phlebotomus perniciosus* na Europa em comparação com *Lutzomyia longipalpis* no Brasil. Estas diferenças também devem ser observadas entre outras espécies de hospedeiros. Com efeito, também pode haver um alto grau de variação na proporção de flebotomíneos infectados quando expostos repetidas vezes a longos intervalos, por exemplo, entre dias consecutivos (em fase de elaboração)<sup>1</sup>.

Em estudos realizados sobre a LVA na Ilha de Marajó, Pará constatou-se, através de estudos longitudinais utilizando modelos matemáticos, que o xenodiagnóstico realizado nos cães domésticos simpátricos e raposas (*Cerdocyon thous*), que os cães domésticos são os reservatórios primários ( $R_0 > 1$ ) (COURTENAY *et al.*, 2002a, 2002b). Anteriormente, acreditava-se que as raposas seriam um reservatório significativo para a infecção humana (ASHFORD, 2000; DEANE; DEANE, 1954; 1955), pois apresentam alta prevalência de infecção com até 42% dos animais positivos para infecção por *Leishmania chagasi* com altas taxas de contato com o ambiente peridoméstico (COURTENAY *et al.* 1994, 2001; DEANE; DEANE, 1955; LAINSON *et al.*, 1990). No entanto, foi verificado que elas contribuíram com menos de 9% do total de transmissão e que poderiam não manter a infecção, na ausência de cães domésticos:  $R_0$  em raposas foi  $< 1$ , indicativo de um

---

<sup>1</sup> O. Courtenay, dados não publicados



acidente (ou "spill-over") (COURTENAY *et al.*, 2002a). Estes estudos constataram também que uma alta prevalência de infecção natural em uma determinada espécie não pode ser tomada como evidência desta espécie ser o mais importante reservatório, o que reforça a importância da avaliação da infecciosidade em relação a população como um todo e não ao nível de uma única espécie. Assim, a importância de qualquer uma das espécies de roedores em ser um importante reservatório de *L. (V.) braziliensis*, vai depender de sua capacidade para transmitir com sucesso a infecção para flebotomíneos, ao invés de apenas a sua taxa de infecção natural, e sua capacidade de manter o ciclo de transmissão na ausência de hospedeiros alternativos.

### **1.1 Aspectos gerais da leishmaniose tegumentar americana**

A LTA é uma doença que apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil com registro de casos em todas as unidades federadas. Segundo dados do Sistema Nacional de Agravos e Notificação (SINAN) tem-se registrado anualmente cerca de 35 mil casos novos de LTA com coeficiente de detecção médio de 18,5 casos/100.000 habitantes. Não se inclui nestes dados os casos subnotificados, decorrente das deficiências no sistema de notificação compulsória e dos casos de LTA ocorrerem predominantemente em áreas rurais, onde as condições de assistência à saúde são precárias, e, ainda, os casos de cura espontânea (BRASIL, 2007).

A primeira evidência da LTA no Brasil, foi descrita por Moreira em 1895, o qual identificou pela primeira vez a existência do botão endêmico dos países quentes, chamado "botão da Bahia" ou "botão de Biskra" (BRASIL, 2007). Em 1908, houve uma epidemia em Bauru/SP, quando Lindemberg (1909), Carini e Paranhos (1909) correlacionaram a "úlceras de Bauru" com o "botão do Oriente" e o seu agente causal com *Leishmania tropica*. Carini e Paranhos (1909), fizeram observações pioneiras de lesões mucosas confirmadas por demonstração de *Leishmania*. Já em 1911, Vianna verificou diferenças morfológicas entre a *Leishmania tropica* e o agente etiológico da Leishmaniose Cutânea (LC) e a denominou de *Leishmania braziliensis*. Em 1923, o termo Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) foi criado, denominando tanto a forma cutânea como a forma mucosa da doença (BRASIL, 2007).

No início do século XX, após os achados de Lindenberg, em 1909, e, de Vianna, em 1911, foi descoberta a ação curativa do tártaro emético, modificando o destino dos pacientes com leishmaniose em todo o Mundo. Neste período, verificou-se que o padrão epidemiológico que predominou foi o de antropozoonoses de transmissão silvestre, que atinge o homem quando este invade os ambientes florestais. Porém, alterações do meio ambiente em vários estados do Brasil vêm modificando o perfil epidemiológico da LTA, permitindo a invasão de áreas peridomiciliares por mamíferos silvestres reservatórios de *Leishmania* spp., e espécies de flebotomíneos adaptadas ao ambiente modificado pelo homem. A persistência da LTA nessas áreas ecologicamente alteradas indica claramente a evolução de um ciclo de transmissão antropozoonótico ocorrendo no ambiente peridoméstico (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999, 2003; BRASIL, 2007; LAINSON; SHAW, 1998).

Diversos relatos de surtos de casos de LTA decorrentes de construção de estradas, ocorreram no início do século XX. Na construção da estrada de ferro que ligava Bauru (São Paulo) a Porto Esperança (Mato Grosso), pesquisadores verificaram a ocorrência de surtos da doença entre operários da construção, denominando as lesões leishmanióticas cutâneas de "úlceras de Bauru". Estes surtos se caracterizavam por elevada incidência de LTA, constituindo um grave problema de Saúde Pública no estado de São Paulo (ALVAR *et al.*, 2006). Também foram relatados focos da doença nos estados de Minas Gerais e Bahia em trabalhadores da construção da Estrada de Ferro Central do Brasil, o que reforça a relação existente entre o surgimento de focos de transmissão de LTA, e as modificações do ambiente natural decorrentes da ação antrópica, caracterizando a LTA como uma doença ocupacional (PASSOS *et al.*, 1993).

Relatos de surtos da LTA, também foram registrados na região Norte do Brasil, como resultado da exploração de florestas e colonização rural. No Pará, onde foram implantados vários projetos de ocupação, como o projeto de mineração Carajás, e o projeto de celulose Jari, atraindo trabalhadores para zonas de floresta, e favorecendo o surgimento da doença entre os indivíduos envolvidos nesses projetos (SILVEIRA *et al.*, 1991). A história da LTA no Brasil evidencia que o surgimento de casos da doença está, por vezes, diretamente relacionado às atividades do homem no campo, ao habitat de insetos transmissores e dos hospedeiros reservatórios (SILVEIRA *et al.*, 1991).

A LTA no Brasil, constitui um agravo de notificação compulsória, e é considerada uma doença em expansão, representando importante causa de morbidade para a população residente em áreas endêmicas. Dentre os agentes etiológicos envolvidos com a LTA, destaca-se *Leishmania (Viannia) braziliensis*, por ser a espécie mais prevalente, com registro de casos em todas as regiões do país. Estudos ecoepidemiológicos sobre a LTA têm demonstrado, que tanto as características clínicas da doença, como o local e modo de transmissão tem-se expressado de acordo com as particularidades de cada região (LAINSON; SHAW, 1998).

No Nordeste do Brasil, a incidência da LTA ocorre principalmente em áreas com resquícios da Mata Atlântica, nas quais se verifica vegetação abundante, como também em áreas com predominância de mata secundária e diversos tipos de plantações, propícias à colonização de vetores e hospedeiros reservatórios, mas também em regiões desmatadas, com adaptação de vetores e reservatórios à ambientes modificados, com transmissão peridomiciliar (MARZOCHI, 1992). A LTA tem acometido mulheres, crianças e, principalmente, adultos do sexo masculino, e, em alguns casos, todos os indivíduos de uma mesma família são acometidos pela doença (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999).

Em Pernambuco, a LTA apresenta incidência importante com média de 500 casos notificados anualmente. A LTA incide em todas as mesorregiões do Estado, com predominância na Zona da Mata, com mais de 60% do total de casos notificados (BRANDÃO-FILHO, 2001; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999).

Num estudo longitudinal desenvolvido na Zona da Mata Sul de Pernambuco, diversos aspectos relacionados à ecoepidemiologia da LTA na região, foram bem caracterizados com importantes contribuições relacionadas à compreensão da expressão e prevalência da infecção e doença, vetores e hospedeiros reservatórios envolvidos na transmissão e manutenção da endemia na região (BRANDÃO-FILHO, 2001; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1994, 1999, 2003).

Em Pernambuco, o principal agente etiológico da LTA encontrado é, *L. (V.) braziliensis*, com registros de casos apresentando diversas manifestações clínicas associada a limitações no tratamento e à diversidade de vetores e reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão, o que torna esta endemia um desafio para parasitologistas e para os programas governamentais de controle (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003). Neste sentido, considerando a complexidade da doença, os

diferentes aspectos apresentados, faz-se necessário, para um melhor entendimento da ecoepidemiologia da doença, a identificação de hospedeiros naturais, reservatórios de *L. (V.) braziliensis* e das demais espécies de *Leishmania*, que constitui etapa de fundamental importância para determinar o ciclo natural do parasito e, conseqüentemente, da doença.

## 1.2 Ciclos de transmissão da LTA

A LTA corresponde a uma doença que ocorre em todas as faixas etárias, acometendo homens e mulheres. Considerando a complexidade epidemiológica da LTA, foram descritos três padrões de transmissão: silvestre, ocupacional e rural e periurbano em áreas de colonização. O padrão silvestre ocorre em áreas de vegetação primária e, está relacionada, fundamentalmente, ao ambiente silvestre, onde acomete animais, o homem, pode ser infectado, quando entra em contato com este ambiente. O padrão ocupacional está relacionado, principalmente, com a exploração desordenada da floresta, derrubada de matas e atividades de ecoturismo. Os processos migratórios, a ocupação de encostas e aglomerados em centros urbanos associados a matas secundárias ou residuais correspondem ao padrão rural e periurbano em áreas de colonização (BRASIL, 2007). Segundo Desjeux (2001), o padrão de transmissão predominante é o peridomiciliar, onde verifica-se que vem ocorrendo um processo gradual de domesticação da doença, principalmente em áreas com história de colonização antiga, onde há poucos remanescentes de floresta primária e houve a adaptação dos flebotomíneos vetores ao ambiente peridoméstico e doméstico e provavelmente a presença de hospedeiros reservatórios secundários, o que facilita a transmissão (DESJEUX, 2001).

No Nordeste do Brasil, a LTA ocorre tanto em áreas preservadas da Mata Atlântica, onde é mantida através do ciclo enzoótico primário entre mamíferos silvestres e algumas espécies de flebotomíneos e nas quais se verifica vegetação abundante, como também, em áreas com predominância de mata secundária e plantações diversas, ocupadas para a exploração agrícola e propícias à colonização dos flebotomíneos, mamíferos silvestres e sinantrópicos, nas quais a adaptação de vetores e reservatórios possibilitou a instalação de ciclos zoonóticos com transmissão peridomiciliar (LAINSON; SHAW, 1998; MARZOCHI, 1992).

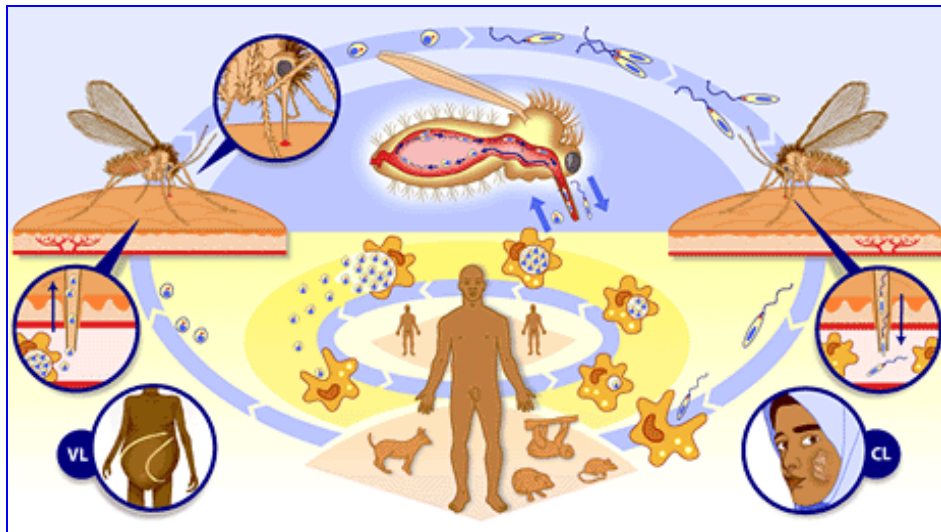
Devido aos diversos fatores que envolvem a manutenção de ciclos de transmissão da LTA, são observados diferentes perfis que vão depender da área de circulação do parasito, das áreas onde ocorrem desmatamento para a construção de estradas e instalações de povoados, extração de madeira, atividades agrícolas e de pecuária, das áreas com preservação de pequenos trechos de cobertura vegetal, assim como áreas em que o processo de urbanização criou as condições favoráveis à produção de surtos endêmicos na periferia de cidades e povoados (BRASIL, 2007).

### 1.2.1 Ciclo Biológico

Os agentes etiológicos da LTA são parasitos heteroxênicos, intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear, e apresentam-se sob duas principais formas evolutivas: uma flagelada ou promastigota, que corresponde a forma infectante, e é encontrada no aparelho digestivo dos vetores; e, uma segunda forma sem flagelo livre ou amastigota, encontrada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, especialmente nos macrófagos (SOARES-BEZERRA; GENESTRA, 2004).

A transmissão da *Leishmania* spp. aos hospedeiros vertebrados, ocorre através da picada de fêmeas de flebotomíneos. Ao realizar repasto sanguíneo em reservatório natural do parasito infectado, a fêmea pode se infectar e, no segundo repasto realizado em outro hospedeiro vertebrado, pode transmitir as formas flageladas do parasito para a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado através do inóculo no hospedeiro (MICHALICK; NEVES; MELO, 2005). Dessa forma, *Leishmania* spp. vive alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Os hospedeiros são, comumente, animais vertebrados pertencentes à classe dos mamíferos, entre eles estão: roedores, edentados, marsupiais, canídeos e primatas, incluindo o homem (MICHALICK; NEVES; MELO, 2005). (Figura 1).

**Figura 1** - Ciclo biológico de *Leishmania* spp.



**Fonte:** Organização Mundial de Saúde (2015).

### 1.2.2 Agente etiológico

Os protozoários causadores das diferentes manifestações clínicas das leishmanioses, são encontrados em todas as regiões do mundo, com ênfase maior, eles acometem populações da África, América Latina, Ásia do Sul e Central, bacia do Mediterrâneo e no Oriente Médio. Trata-se de um protozoário heteroxênico, pertencente à família Trypanosomatidae, que se reproduz por divisão binária, e é um parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com duas formas principais: a promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e a amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015; REY, 2001).

No Brasil, já foram identificadas sete espécies de *Leishmania*, pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, como agentes etiológicos da forma tegumentar da doença: *L.(V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindebergi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (BRASIL, 2007).

A *L. (V.) braziliensis*, principal agente etiológico no Brasil, encontra-se distribuída em todas as regiões, com registro de casos em todas as unidades federadas (BRASIL, 2007). Os casos de LTA por *L.(V.) braziliensis* são frequentemente encontrados em zonas de cultivo de cana-de-açúcar, cacau e

banana. Em geral a transmissão vincula-se com atividades profissionais agrícolas realizadas nestas regiões (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; MARZOCHI *et al.*, 1992). Nas áreas de colonização antiga, com ambiente modificado, também registra-se casos onde *L. (V.) braziliensis* é o agente mais frequentemente associado à LTA (BRASIL, 2007; BASANO; CAMARGO, 2004).

A LTA relacionada a *L.(V.) braziliensis* caracteriza-se por apresentar diferentes padrões regionais, da Amazônia ao Sudeste do Brasil, relacionados aos vetores envolvidos, possíveis reservatórios e perfil ecoepidemiológico (BRANDÃO-FILHO, 2001; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; SHAW; LAINSON, 1987). Os principais vetores associados à transmissão são: *Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia whitmani* (BRAZIL; RODRIGUES; ANDRADE FILHO, 2015). *L. intermedia* é encontrado em áreas de colonização antiga, principalmente nas regiões sul e sudeste, nos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Paraná. Já *L. whitmani*, é encontrado em áreas de caatinga, cerrado, mata atlântica, nos Estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Paraná. Também envolvidos na transmissão os vetores *Lutzomyia wellcomei*, encontrado em áreas silvestres nos Estados do Pará, Amazonas e Ceará (ARIAS *et al.*, 1996) e, possivelmente relacionado à transmissão, *Lutzomyia migonei*, que nas regiões Norte e Nordeste, constitui-se em importante vetor do parasita (BRAZIL; RODRIGUES; ANDRADE FILHO, 2015).

Ao norte da região amazônica (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) e nas Guianas, foram registrados casos de LTA associados à *L. (V.) guyanensis*. A doença, tipo "pian bois", pode apresentar metástases nodulares ao longo dos vasos linfáticos. Os animais *Choleopus didactylus* (preguiça de dois dedos), *Tamandua tetradactyla* (Tamanduá-mirim), o marsupial *Didelphis marsupialis* e o roedor *Proechinys guyanensis*, encontrados em florestas primárias e secundárias, atuam como reservatórios (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2007). Dentre os vetores, o principal envolvido na transmissão é *Lutzomyia umbratilis* (BRAZIL; RODRIGUES; ANDRADE FILHO, 2015), entretanto, *Lutzomyia anduzei* e *Lutzomyia whitmani* também estão envolvidos na transmissão (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2007).

Em florestas primitivas e secundárias, na região do Amazonas, a espécie *L.(V.) lainsoni* causa lesões cutâneo-ulcerativas, é frequente em humanos e está

associada com roedores silvestres. *Lutzomyia ubiquitalis*, um flebotomíneo não muito antropofílico, é o vetor incriminado na região (BASANO; CAMARGO, 2004; BRAZIL; RODRIGUES; ANDRADE FILHO, 2015; SILVEIRA *et al.*, 1987).

Com poucos casos de leishmaniose relatados em humanos, *L. (V.) naiffi*, é encontrada no Estado do Pará e Amazonas, tendo o tatu (*Dasypus novemcinctus*) como reservatório conhecido. O parasita causa lesões simples ou ulceradas que em geral evoluem para cura. Seus principais vetores são *Lutzomyia squamiventris*, *Lutzomyia paraensis* e *Lutzomyia ayrozai* (BASANO; CAMARGO, 2004; BRAZIL; RODRIGUES; ANDRADE FILHO, 2015; LAINSON; SHAW, 1989).

*L. (V.) shawi* causa leishmaniose com lesões cutâneas e está associada aos animais silvestres, sendo encontrada na região do Amazonas. A transmissão é realizada pelo vetor *Lutzomyia whitmani* (BASANO; CAMARGO, 2004; BRAZIL; RODRIGUES; ANDRADE FILHO, 2015; LAINSON; SHAW, 1989).

Em áreas de treinamento militar, a espécie *L. (V.) lindenbergi* foi descrita de infecções em soldados em treinamento em uma área de reserva florestal no Estado do Pará. Não existem relatos de infecções em animais ou flebotomíneos. A espécie provável como vetora é *Lutzomyia antunesi* (BRASIL, 2007; BRAZIL; RODRIGUES; ANDRADE FILHO, 2015).

Em áreas de igapó e de florestas tipo "várzea" dos estados do Pará, Rondônia, sudeste do Maranhão, tem-se encontrado a espécie *L. (Leishmania) amazonensis*, que estendeu-se para a região Nordeste (Bahia, Ceará, Piauí), região Sudeste (Minas Gerais) e região Centro Oeste (Goiás, Mato Grosso). Trata-se de um protozoário pouco frequente, associada à cerca de 3% dos casos em humanos. A doença causada por este parasito provoca lesões cutâneas e difusas (forma anérgica). É considerada essencialmente uma zoonose e encontra-se em pequenos roedores silvestres, sendo transmitida ao homem ocasionalmente, caracterizando uma antroponose. Os principais vetores incriminados são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia reducta* e *Lutzomyia olmeca nociva* (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2007; BRAZIL; RODRIGUES; ANDRADE FILHO, 2015).

### 1.2.3 Vetores

Os vetores da LTA são insetos fêmeas hematófagos denominados flebotomíneos. Conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica,



como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros; constituem insetos pertencentes à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, Gênero *Lutzomyia* (MARZOCHI, 1992; SHAW; LAINSON, 1987; YOUNG; DUNCAN, 1994).

Os flebotomíneos são pequenos dípteros de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, com patas longas e delgadas, e o corpo densamente piloso. Voam aos saltos e mantêm as asas eretas mesmo em repouso, ao contrário de outros dípteros da subfamília Phlebotominae, o que facilita a sua identificação. O sangue, ingerido durante o repasto, é necessário para a maturação dos ovos. Os machos se alimentam de sucos de flores e plantas, sendo considerados fitófagos (BASANO; CAMARGO, 2004).

No mundo, atualmente, existem mais de 1000 espécies de flebotomíneos descritos, destes, 530 espécies são encontrados na região Neotropical do planeta. Dentre estes, pouco mais de 20 espécies de flebotomíneos são considerados vetores das leishmanioses (BRAZIL; RODRIGUES; ANDRADE FILHO, 2015). No Brasil, em relação à LTA, as principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia migonei*. Contudo, cabe salientar que estas espécies foram definidas como vetoras por atenderem aos critérios que atribuem a uma espécie a competência vetorial. Além disso, o papel vetorial de cada uma dessas espécies depende da *Leishmania* spp. envolvida (BRASIL, 2007).

Na região Nordeste do Brasil, particularmente na Zona da Mata Sul do Estado de Pernambuco, 97,4% da fauna é representada pela espécie de *Lutzomyia whitmani*, o provável vetor de *L. braziliensis* (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999) na região, sendo *Lutzomyia complexa* o principal representante da fauna da Zona da Mata Norte (ANDRADE, 2004).

Em estudos de infecciosidade experimental em relação à *Leishmania (Viannia) braziliensis*, realizados com *L. longipalpis*, vetor comprovado da LVA no Brasil, demonstraram que esta espécie vetora apresenta capacidade de infectar-se com o parasito em ensaios experimentais, sendo assim considerada, um vetor permissivo à infecção (ANDRADE, 2010).

É importante ressaltar a vigilância entomológica em áreas de risco para a LTA no intuito de analisar as condições epidemiológicas de transmissão, bem como

fornecer dados básicos para a implementação de medidas de controle (GARCEZ *et al.*, 2009). Também é necessário compreender aspectos fundamentais da ecologia e comportamento do vetor, especialmente hábitos alimentares relacionado ao grau de antropofilia e a atração por reservatórios naturais do parasito que constituem dois requisitos essenciais para classificação de uma espécie como vetora de doença (AFONSO *et al.*, 2005).

#### 1.2.4 Hospedeiros Reservatórios

Os hospedeiros de *Leishmania* spp são vertebrados, que pertencem à classe dos mamíferos, entre eles podem ser citados: roedores, edentados, marsupiais e canídeos (MARINHO-JÚNIOR, 2010; MICHALICK; NEVES; MELO, 2005). Alguns dos hospedeiros também podem ser considerados como reservatórios desde que o agente infeccioso possa persistir indefinidamente (ASHFORD, 1996, 2000). No entanto, há pouco conhecimento sobre os reservatórios de *L. (V.) braziliensis* e isto constitui um importante obstáculo para caracterizar a ecoepidemiologia da LTA associado a esta espécie (ANDRADE, 2010).

Diversos animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos e equídeos), foram descritos como reservatórios de diferentes espécies de *Leishmania*. (GRIMALDI JUNIOR; TESH, 1993). Geralmente, a infecção no animal é inaparente, com parasitos podendo ser encontrados na pele ou vísceras. Todas as espécies de *Leishmania* têm uma origem zoonótica, sendo a variante antroponótica, ocorrente na Índia, Sudão e Afeganistão, consequência da adaptação de algumas espécies a estes ciclos (SHAW, 2007). Segundo Noyes *et al.* (1998), o homem é considerado hospedeiro acidental (antropozoonose), enquanto o protozoário infecta cerca de nove ordens de mamíferos e répteis em áreas subtropicais e tropicais do mundo.

Desde as primeiras décadas do século XX, diversos grupos de pesquisa, tem buscado descobrir os reservatórios “primários” das leishmanioses, os quais por definição, seriam “um sistema ecológico no qual o agente infeccioso possa persistir indefinidamente” (ASHFORD, 1996, 2000). Podendo nas infecções transmitidas por vetores ocorrer uma ou mais espécies de mamíferos, vivendo em condições de densidade populacional e proximidade espacial, tal que o agente possa ser indefinidamente transferido entre eles (ASHFORD, 1996).

No Novo Mundo, mais de 40 espécies de mamíferos de várias ordens são conhecidas como sendo hospedeiros de *Leishmania* spp., em diferentes ciclos de transmissão. Apesar dos diversos registros de infecção por *Leishmania* em animais silvestres, sinantrópicos e domésticos. Há poucas evidências científicas que comprovam o papel destes animais como reservatórios das espécies de *Leishmania*, sendo considerados hospedeiros acidentais da doença (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003).

Animais domésticos (caninos, felinos e equinos) podem apresentar lesões tegumentares causadas *L. (V.) braziliensis*, no entanto, por não serem capazes de manter o ciclo epidemiológico em um ecótopo, são considerados hospedeiros secundários ou acidentais (FALQUETO; FERREIRA, 2005; GRIMALDI JUNIOR; TESH, 1993; LAINSON; SHAW, 1998; MADEIRA *et al.*, 2003; REITHINGER; DAVIES, 1999; SCHUBACH *et al.*, 2004). Silva *et al.* (2005) associaram o desenvolvimento de lesões de pele nestes animais como a demonstração de não serem hospedeiros naturais do parasito. A LTA nesses animais pode apresentar-se como uma doença crônica com manifestações semelhantes às da doença humana, ou seja, o parasitismo ocorre preferencialmente em mucosas das vias aerodigestivas superiores (BRASIL, 2007).

Outros estudos demonstram que caninos e equídeos podem ser considerados reservatórios de *L. (V.) braziliensis* em ambiente peridoméstico (CRUZ *et al.*, 1989; FALQUETO *et al.*, 1986; REITHINGER; DAVIES, 2002; REITHINGER *et al.*, 2003). Em área endêmica de LTA, pesquisadores demonstraram que a presença de cães no peridomicílio poderia aumentar em até 15 vezes o risco de transmissão para as pessoas. Em área endêmica de São Paulo, onde a busca do parasito entre reservatórios silvestres fracassou, concluiu-se que a doença poderia ocorrer não somente em ambientes florestais, mas também em focos antigos, com manutenção do ciclo entre animais domésticos e flebotomíneos com hábitos peridomiciliares (YOSHIDA *et al.*, 1990).

No Panamá, estudos demonstraram a suspeita da origem silvestre das leishmanioses, onde detectou-se a infecção natural por *Leishmania* spp. em animais pertencentes às ordens Carnivora, Marsupialia, Primata, Rodentia e Xenarthra (=Edentados), sugerindo, pelos diferentes comportamentos das cepas em cultura e em modelos animais (hamster), tratar-se de isolados de *L. braziliensis*, *L. mexicana*

e *L. hertigi*. (HERRER; CHRISTENSEN; BEUMER, 1973; HERRER; CHRISTENSEN, 1975).

Na Amazônia Brasileira, estudos demonstraram, através de isolamento e caracterização, a infecção natural de animais por espécies de *Leishmania* como: *L. (V.) guyanensis* em *Tamandua tetradactyla*, “tamanduá-mirim” (LAINSON; SHAW; POVOA, 1981) e *L. (V.) naiffi* em *Dasybus novemcinctus*, “tatu-galinha” (GRIMALDI JUNIOR; TESH, 1993), *L. (V.) shawi* em *Cebus apella*, “macaco-prego”, *Chiropotes satanus*, “caxiú-preto”, *Chloepus didactylus*, “preguiça de dois dedos”, *Bradypus tridactylus*, “preguiça de três dedos” e *Nasua nasua*, “quati” (GRIMALDI JUNIOR; TESH, 1993; LAINSON *et al.*, 1989).

O primeiro estudo demonstrando a importância dos roedores na epidemiologia da leishmaniose ocorreu no Panamá, onde Hertig, em 1957, detectou *Leishmania braziliensis* a partir de hemocultura em 10% dos 110 exemplares de “ratos de espinho” (*Proechimys semispinosus* e *Hoplomys gymminurus*) sem nenhuma lesão aparente. Forattini (1960) e Forattini *et al.* (1972, 1973) conseguiram demonstrar infecção de roedores por isolamento do parasito em cultura de sangue e pele, comprovando a hipótese de que espécies de *Leishmania* do Novo Mundo possuem hospedeiros de habitats florestais onde mantém o ciclo enzoótico, e expandem-se para o homem e animais domésticos, no ciclo antroponótico. O tipo de lesão pode funcionar como índice dessa adaptação do parasito ao hospedeiro, de modo que, quanto maior fosse a adaptação, menor a gravidade da lesão, podendo atingir um estado de equilíbrio em que estas não se manifestariam mais, de tal maneira que esses hospedeiros desempenhariam a função de reservatório do parasito (LAINSON; SHAW; POVOA, 1981). Lainson e Shaw (1992) reforçam que, entre animais silvestres, a infecção tende a ser benigna e inaparente, sugestiva de uma relação equilibrada resultante de uma antiga associação entre parasito e hospedeiro.

Diversos relatos de infecção natural por *Leishmania* spp em roedores silvestres e sinantrópicos, marsupiais, dentre outras espécies animais já foram descritos no Brasil. Com relação à infecção natural por *Leishmania braziliensis*, os seguintes gêneros de roedores já foram evidenciadas infecção por *Leishmania (Viannia)* spp: *Oryzomys* (LAINSON; SHAW; POVOA, 1981; LAINSON; SHAW, 1989), *Akodon* (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; FORATTINI *et al.*, 1972), *Holochilus* (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2013; MARINHO-JÚNIOR, 2010), *Proechimys*

(LAINSON; SHAW, 1973), *Rattus* (BRANDÃO-FILHO, 2001; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1994, 2003; FERREIRA, *et al.*, 2015; LAINSON; SHAW, 1979; LIMA *et al.*, 2013; MARINHO-JÚNIOR, 2010; VASCONCELLOS *et al.*, 1994), *Rhipidomys* (LAINSON, SHAW; POVOA, 1981), *Nectomys* (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1994; LIMA *et al.*, 2013; MARINHO-JÚNIOR, 2010; PETERSON *et al.*, 1988), *Bolomys* (BRANDÃO-FILHO, *et al.*, 1994, CARDOSO *et al.*, 2015; DE FREITAS *et al.*, 2012; MARINHO-JÚNIOR, 2010) e o marsupial *Didelphis* (FREITAS, 2010; LAINSON; SHAW, 1973; MELO, 2008). Através de infecção experimental, Roque *et al.* (2010), demonstraram que roedores do gênero *Thrichomys* podem atuar como hospedeiros de manutenção de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. No estudo longitudinal desenvolvido, em Pernambuco, foram incriminados categoricamente, através do isolamento e caracterização do parasito e associação com o mesmo fenótipo e genótipo do parasito que causa a doença na população desta região, os roedores silvestres e sinantrópicos *Necromys lasiurus*, *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus*, como reservatórios primários de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003).

Evidências epidemiológicas têm demonstrado que a maioria das áreas endêmicas está intimamente relacionada a áreas florestais, via de regra com pouca densidade populacional. Guimarães *et al.* (1968) observam que: “dizimada e afugentada a fauna de roedores silvestres com o desbravamento de zonas desérticas e com o povoamento, estabelecem-se focos leishmanióticos endêmicos rurais (e mais tarde suburbanos e até mesmo, excepcionalmente, urbanos), com a participação de flebotomíneos peridomiciliários e tendo como reservatório (secundário) o cão e talvez até o próprio homem”.

As alterações do meio ambiente decorrentes das ações antrópicas para a exploração de recursos naturais e agricultura, modificaram a epidemiologia da doença e, com isto, houve surgimento de novas áreas endêmicas (LAINSON; SHAW, 1998). Brito *et al.* (1993) registram uma variante de *Leishmania (Viannia) braziliensis* ocorrida no Estado de Pernambuco, Brasil, onde a ecologia da região é similar às já descritas para outras áreas endêmicas de LTA, nas quais o ambiente florestal original vem sendo alterado.

### 1.3 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana

O diagnóstico da LTA abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Desta forma, o diagnóstico epidemiológico pode ser realizado com base nos dados das áreas endêmicas, como a existência de casos de LTA nas regiões e referências de animais que atuam no ciclo de transmissão. Por sua vez, o diagnóstico clínico pode ser realizado através das observações das características das lesões, que nem sempre é fácil ou imediato, devido ao amplo espectro de formas de lesões cutâneas e mucosas (GONTIJO; CARVALHO, 2003), e o diagnóstico laboratorial através da evidenciação do parasita e em provas imunológicas (BRASIL, 2010). Apesar disso, os métodos convencionais para o diagnóstico apresentam limitações. Sendo assim, não existe um método que possa ser classificado como padrão-ouro para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp. (WILSON, 1995). Neste contexto, existe a necessidade de se desenvolver uma ferramenta que seja capaz de promover um diagnóstico rápido, preciso e acurado (BRASIL, 2007; RODRIGUEZ *et al.*, 1994).

As técnicas clássicas de diagnóstico para LTA incluem diagnóstico microscópico, Intradermorreação de Montenegro, isolamento do parasito em meio de cultura e detecção de anticorpos anti-*Leishmania* por métodos sorológicos (BRITO *et al.*, 2000; WEIGLE *et al.*, 1987). O exame mais simples e de baixo custo é a pesquisa direta de formas amastigotas visualizadas ao microscópio óptico. A sensibilidade deste teste é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão, sendo raros os parasitos após um ano de evolução da doença, com exceção dos pacientes que desenvolvem a forma difusa da LTA, pois neste caso os nódulos presentes na pele estão ricos em parasitos (CUBA-CUBA *et al.*, 1985). Além do exame direto, a tentativa do isolamento do parasito *in vivo* ou *in vitro* é fundamental, inoculando o material obtido de lesões em meio de cultura e em animais susceptíveis como o hamster (*Mesocricetus auratus*) (BRASIL, 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Devido aos avanços da biologia molecular, a reação em cadeia de polimerase (PCR) vem ganhando espaços nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisas por gerar resultados quantitativos (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004). Segundo Brujin e Barker (1992), a PCR é um exame que permite amplificar em escala exponencial sequências de DNA. Dotada de alta sensibilidade, é capaz

de detectar quantidades tão pequenas quanto 1 fentograma do DNA de um parasito, o equivalente a 1/10 do parasita. Devido a estas características, essa técnica permite uma diagnose rápida, precisa e acurada da LTA. Para Rodrigues *et al.* (2002), a vantagem da PCR em relação aos demais métodos é que ela proporciona uma estimativa do diagnóstico e da resposta terapêutica, auxiliando as decisões sobre a conduta dos casos pelos profissionais de assistência à saúde.

A PCR constitui o principal teste molecular devido à alta sensibilidade e especificidade podendo detectar DNA ou RNA do parasito antes mesmo de aparecerem alguns sintomas ou sinais clínicos (SINGH; SIVAKUMAR, 2003). A disponibilidade de métodos diagnósticos baseados em PCR tem permitido maior sensibilidade e rapidez no diagnóstico, além da tipagem de *Leishmania* spp.

Um dos grandes desafios relacionados ao controle da LTA está relacionado à complexidade epidemiológica da doença, que possuem características particulares nos diferentes focos de transmissão. Desta forma, há a importância de ressaltar a vigilância entomológica em áreas de risco para a LTA no intuito de analisar as condições epidemiológicas de transmissão, bem como fornecer dados básicos para a implementação de medidas de controle (GARCEZ *et al.*, 2009). Também é necessário compreender aspectos fundamentais da ecologia e comportamento do vetor, especialmente hábitos alimentares relacionados ao grau de antropofilia e a atração por reservatórios naturais do parasito, que constituem dois requisitos essenciais para classificação de uma espécie como vetora de doença (AFONSO *et al.*, 2005).

## 2 JUSTIFICATIVA

Diferenciar reservatórios primários e secundários é notoriamente difícil. Evidências diretas de que uma determinada espécie é um reservatório primário exige a demonstração de que o parasita pode persistir em áreas onde apenas esta espécie esteja infectada, ou que métodos de controle de prevenção da transmissão dessa espécie são eficazes na interrupção da transmissão. Na ausência de tais dados, a incriminação de reservatórios dependerá de evidências relacionadas à prevalência da infecção em hospedeiros simpátricos; a infecção crônica com duração ao longo do período de não-transmissão, onde a transmissão é sazonal; e a infecciosidade de hospedeiros simpátricos para o vetor. A duração da infecção na LTA em potenciais reservatórios raramente têm sido avaliada.

No município de Amaraji, localizado na Zona da Mata sul de Pernambuco, estudos anteriores realizados por nossa equipe obtiveram resultados que evidenciaram a participação de *L. whitmani* como provável vetor, e, de espécies de roedores como prováveis reservatórios, sendo *Necromys lasiurus* e *Nectomys squamipes* como reservatórios primários, e, *Rattus rattus* como secundário. Nesse sentido, este estudo propõe caracterizar a infecciosidade de roedores silvestres e sinantrópicos, através de xenodiagnósticos, comprovando o papel dessas espécies como hospedeiros reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão da LTA na região.



### 3 HIPÓTESE

Os roedores silvestres e sinantrópicos são os hospedeiros reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão da *Leishmania (Viannia) braziliensis* na Zona da Mata Sul de Pernambuco.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Caracterizar a infecciosidade de roedores silvestres e sinantrópicos classificando-os como hospedeiros reservatórios envolvidos no ciclo zoonótico da leishmaniose tegumentar americana associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

### 4.2 Específicos

- a) Identificar as espécies de roedores silvestres e sinantrópicos que compõem a fauna das localidades dos engenhos Refrigério e Raiz de Dentro, município de Amaraji, Zona da Mata Sul de Pernambuco;
- b) Caracterizar a infecção por *Leishmania (Viannia)* spp. nas populações de roedores silvestres e sinantrópicos;
- c) Identificar a proporção de roedores infectados em relação à infecciosidade para flebotomíneos;
- d) Verificar a sazonalidade de flebotomíneos na localidade do Engenho Raiz de Dentro;
- e) Avaliar os efeitos da interrupção de exposição a transmissão em animais naturalmente infectados.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Área de estudo

O trabalho de campo foi desenvolvido no município de Amaraji (Figura 2), nas localidades do Engenho Raiz de Dentro (Figura 3) e Engenho Refrigério (Figura 4), os quais são áreas nas quais nosso grupo vem desenvolvendo estudos longitudinais sobre a ecoepidemiologia da LTA há mais de dez anos.

O município de Amaraji está localizado ao Sul da Zona da Mata no Estado de Pernambuco, a cerca de 100 Km do Recife, entre 8° 23' S, 35° 27'W, a 385m acima do nível do mar, com índice pluviométrico médio anual superior a 1.000mm. A população total está estimada em cerca de 22.600 habitantes, onde aproximadamente 70% reside em área urbana e os demais na zona rural (IBGE, 2014).

**Figura 2** - Localização do município de Amaraji e das localidades estudadas, engenho Raiz de Dentro e Engenho Refrigério.



Fonte: o autor, 2015.

**Figura 3** - Domicílio no Engenho Raiz de Dentro.



**Fonte:** o autor, 2015.

**Figura 4** - Domicílio no Engenho Refrigério.



**Fonte:** o autor, 2015.

### 5.1.2. Pontos de captura

Nas localidades estudadas (Engenho Raiz de Dentro e Refrigério) foram determinados 15 pontos de capturas de roedores silvestres e sinantrópicos, sendo dez na localidade do Engenho Raiz de Dentro, e, cinco no Engenho Refrigério. As armadilhas tipo Tomahawk (dimensões 45cm x 21cm x 21cm) utilizadas para captura de roedores silvestres e sinantrópicos eram instaladas nos pontos pré-determinados onde permaneciam por 12 horas, sendo corrigidas diariamente.

## 5.2 Fauna das espécies capturadas e recapturadas de roedores silvestres e sinantrópicos

### 5.2.1 Captura-marcação-soltura-recaptura

Durante o período de maio/2012 a agosto/2014, foram realizadas 20 expedições ao campo, com duração que variou três a nove dias por expedição, com objetivo de realizar capturas de roedores silvestres e sinantrópicos nas localidades de Engenho Raiz de Dentro e Refrigério, município de Amaraji. As capturas dos roedores foram realizadas em diferentes ecótopos correspondentes a resquícios de Mata Atlântica, plantações, domicílios e anexos, de residências das localidades, utilizando-se 80 armadilhas em arame do tipo Tomahawk (Figuras 5 e 6), com dimensões de modelo padronizado para pequenos mamíferos (roedores). As armadilhas foram numeradas e distribuídas nos diferentes habitats, movendo-se as posições diariamente a cada ponto de captura.

**Figura 5** – Armadilha Tomahawk



Fonte: o autor, 2015.

**Figura 6** – Armadilhas Tomahawk

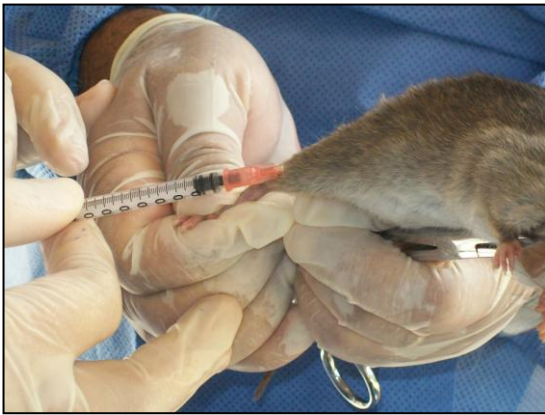


Fonte: o autor, 2015.



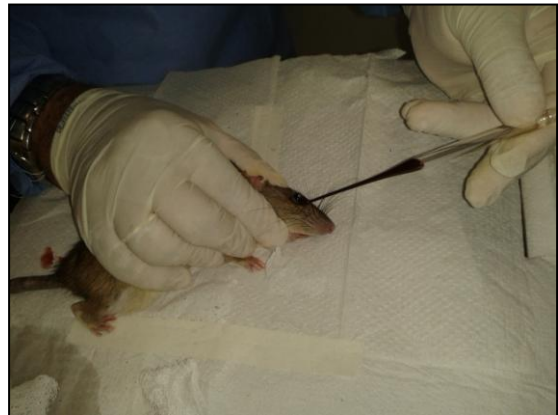
Os animais capturados pela 1ª vez foram devidamente identificados quanto a espécie, ao sexo e à idade, retirados ectoparasitos, em seguida, anestesiados seguindo protocolo com pré-anestésico Xilazina 2%, anestésico Cetamina 10%, (Figura 7), e coletadas amostras de sangue total entre 0,5 a 1 mL, (Figura 8) através de pipetas Pasteur por via retroorbital. Em seguida, foram coletados fragmento de pele da orelha direita de cada animal (Figura 9). Após a coleta das amostras os animais foram devidamente marcados com microchip (Figura 10). e colocados em microisoladores para recuperação do procedimento anestésico e, posterior devolução ao ponto de captura no dia seguinte.

**Figura 7** – Anestesia roedor.



Fonte: o autor, 2015.

**Figura 8** – Coleta sangue



Fonte: o autor, 2015.

**Figura 9** – Coleta Pele



Fonte: o autor, 2015.

**Figura 10** – Marcação com microchip.



Fonte: o autor, 2015.

Nas recapturas de roedores silvestres e sinantrópicos, estes foram identificados quanto ao número do microchip, em seguida, verificada o número da recaptura. A primeira recaptura dos roedores foi denominada R1, a segunda

recaptura R2, a terceira R3 e assim sucessivamente. Após identificação da recaptura, os roedores foram anestesiados, coletadas amostras de sangue total e fragmento de pele, colocados em microisoladores para posterior devolução ao ponto de captura, tudo conforme descrição anterior. Alguns espécimes recapturados, com resultado anterior de infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp, detectado por qPCR, foram também submetidos a ensaio de infecciosidade, utilizando-se flebotomíneos. As amostras coletadas foram acondicionadas à temperatura de refrigeração, e, ao final da expedição, transportadas ao Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ para o devido processamento (Extração e purificação de DNA e teste molecular por qPCR).

Quando no resultado de capturas e/ou recapturas se verificava, outras espécies de animais (Ex.: Marsupiais), os mesmos eram identificados quanto à espécie, sexo e idade, e, posteriormente, devolvidos ao campo, por não possuímos equipamentos apropriados para processamento e manutenção desses animais.

### 5.3 Flebotomíneos

Foram realizadas capturas de flebotomíneos para determinação de sazonalidade (Figura 11) e, capturas para realização de xenodiagnósticos (Figura 12) utilizando-se predominantemente exemplares da espécie *Lutzomyia whitmani*, que é o principal vetor encontrado na fauna em Amaraji, Zona da Mata Sul de Pernambuco (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003).

#### 5.3.1 Capturas para sazonalidade e xenodiagnósticos

Foram realizadas capturas de flebotomíneos, no período de agosto/2013 a julho/2014, para determinação da sazonalidade de flebotomíneos na localidade do Engenho Raiz de Dentro. As capturas foram realizadas no Intradomicílio e Abrigo de animais, utilizando-se nove armadilhas luminosas do tipo CDC, instaladas das 18:00h as 06:00h, a fim de avaliação da densidade de vetores nesses ecótopos na localidade. Para realização dos xenodiagnósticos foram realizadas capturas no engenho Raiz Nova, seguindo procedimento acima descrito.

**Figura 11** – Captura sazonalidade

Fonte: o autor, 2015.

**Figura 12** – Xenodiagnóstico.

Fonte: o autor, 2015.

## 5.4 Extração do DNA das amostras

### 5.4.1 Amostras de roedores silvestres e sinantrópicos

Para extração do DNA das amostras utilizou-se o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)® para amostras de tecido, e QIAamp DNA Mini Kit Blood (QIAGEN)® para amostras de sangue, ambos, seguindo os protocolos sugeridos pelo fabricante.

### 5.4.2 Amostras de flebotomíneos

A extração do DNA das fêmeas de flebotomíneos utilizadas nos xenodiagnósticos foi realizada individualmente, seguindo as condições descritas por Solano *et al.* (1997).

Inicialmente, foi adicionado a cada tubo contendo um exemplar de fêmea de flebotomíneo, 100uL de solução Chelex 5%, e, em seguida, realizada a maceração dos flebotomíneos com o uso de um pistilo plástico descartável. Após este procedimento, homogeneizou-se o macerado em vórtex por 15 segundos, e, colocou-se o mesmo a banho-maria com temperatura de 56 °C por 1 hora. Posteriormente, após homogeneização em vórtex durante 15 segundos, o macerado permaneceu no banho-maria elevando-se a temperatura à 94 °C por 30 minutos. Após essa etapa, realizou-se a centrifugação a 13000 rpm por 6 minutos, e, em seguida, o sobrenadante (DNA) foi transferido para um novo tubo tipo eppendorf de 1,5mL devidamente identificado e estocado a -20°C para posterior realização de



teste molecular.

### 5.5 PCR em Tempo real (qPCR)

As amostras de DNA extraídas, foram analisadas pela qPCR, tendo como alvo o kDNA do subgênero (*Viannia*), que amplificam um fragmento de 138 pares de base de DNA em termociclador modelo/ano 7500/2011 Applied Biosystems® (Figura 13), através do Software 7500 version 2.0.5 (Applied Biosystems®). A reação teve um volume final de 50µl, contendo 25µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems®), 1µL de cada *primer* (kDNA 1f e kDNA 1r) na concentração de 5pmol/µL, 21µL de H<sub>2</sub>O Milliq e 2µL do DNA da amostra. As reações e seus resultados foram realizados e analisados conforme as descrições de (PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2013).

**Figura 13** - Termociclador modelo 7500/2011 Applied Biosystems®



Fonte: o autor, 2015.

### 5.6 Ensaios de infecciosidade através de xenodiagnósticos

Foram realizados ensaios de infecciosidade com roedores naturalmente infectados por *Leishmania (Viannia)* spp, utilizando-se fêmeas de flebotomíneos oriundas de colônia do CPqAM/Fiocruz, e, fêmeas de flebotomíneos oriundas de capturas no campo.

Para a realização dos ensaios de infecciosidade com fêmeas oriundas da

colônia do CPqAM/Fiocruz (*Lutzomyia longipalpis*), foram utilizados cinco roedores silvestres e sinantrópicos, pertencentes a duas espécies, (3 *Nectomys squamipes* e 2 *Rattus rattus*) infectados naturalmente com *Leishmania (Viannia)* spp. conforme resultado de diagnóstico de amostras analisadas por qPCR. Já para realização dos ensaios com fêmeas oriundas do campo (*L. whitmani*) foram utilizados 37 (trinta e sete) roedores silvestres e sinantrópicos, pertencentes a cinco espécies diferentes, a maioria com diagnóstico prévio de infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp. conforme resultado positivo de amostras analisadas por qPCR.

#### 5.6.1 Xenodiagnóstico realizado em laboratório com exemplares de *Lutzomyia longipalpis*, oriundos da colônia do CPqAM/Fiocruz

No momento das recapturas de roedores, e, na disponibilidade de flebotomíneos da colônia do CPqAM/Fiocruz, verificou-se dentre os animais recapturados, os que apresentaram resultado positivo na qPCR para detecção de DNA de *Leishmania (Viannia)* spp. Estes roedores foram segregados, acondicionados em microisoladores, e transportados ao NA-3 CPqAM/Fiocruz, onde permaneceram até realização do xenodiagnóstico em seguida, foram transportados ao campo, e liberados no ponto de sua recaptura na expedição seguinte. No momento de realização do xenodiagnóstico em laboratório, os animais foram anestesiados, coletadas amostras de sangue e tecido, e, em seguida colocados em gaiola contendo fêmeas de *L. longipalpis* em jejum, onde permaneceram por 60 minutos. Após, as fêmeas foram segregadas em pools de 25 espécimes em potes plásticos com gesso. Em intervalos que variaram de 7 a 10 dias da data de realização do xenodiagnóstico, as fêmeas que permaneceram vivas foram dissecadas e os tubos digestivos analisados em microscópio óptico para pesquisa direta de formas promastigotas do parasito. As fêmeas dissecadas e não dissecadas foram colocadas em microtubos de fundo cônico, individualmente, para a extração do DNA e diagnóstico molecular de infecção por *Leishmania (Viannia)* spp por qPCR.

### 5.6.2 Xenodiagnóstico com flebotomíneos capturados no campo

No momento das capturas e recapturas de roedores, e, na disponibilidade de flebotomíneos de campo, verificou-se dentre os animais recapturados, os que apresentaram resultado positivo na qPCR para detecção de DNA de *Leishmania* (*Viannia*) spp. Estes roedores foram anestesiados, coletadas amostras de sangue e pele (fragmento de orelha), conforme descrito anteriormente, e submetidos ao xenodiagnóstico por 60 minutos. Após a realização dos xenodiagnósticos, as fêmeas foram segregadas em alimentadas e não alimentadas, e em seguida, armazenadas em tubo tipo eppendorf 1,5mL com etanol 70% para posterior processamento.

As fêmeas alimentadas durante os ensaios de infecciosidade, xenodiagnósticos, foram identificadas quanto a taxonomia (YOUNG; DUNCAN, 1994), e, em seguida, foram utilizadas para avaliação da infecciosidade dos roedores, e, as demais fêmeas não alimentadas, foram utilizadas posteriormente, para aferição do índice de infecção natural dos flebotomíneos.

### 5.7 Avaliação da interrupção de exposição à transmissão

No último dia de capturas e recapturas, 01/08/2014, 13 animais pertencentes a quatro espécies diferentes (5 *Nectomys squamipes*, 4 *Necromys lasiurus*, 3 *Akodon arviculoides* e 1 *Rattus rattus*) foram transportados para o biotério do laboratório de Biossegurança Animal nível 3 (NA3), do CPqAM/Fiocruz. Esses animais, tendo em vista resultado de diagnóstico molecular positivo para *Leishmania* (*Viannia*) spp, foram também utilizados para avaliação da interrupção de exposição à transmissão, e comparação com outros animais em condições naturais de transmissão, também utilizados nesse estudo.

Durante o período de agosto/2014 a março/2015, os animais permaneceram na colônia do biotério NA3, sob condições padrão de manutenção, sem coletas de amostras. Entre março/2015 e julho/2015, foram realizadas coletas de amostras (fragmento de pele e sangue total) seguindo o protocolo de coleta anteriormente descrito. Após a coleta, foi extraído DNA das amostras e realizado teste molecular por qPCR, todos esses procedimentos, conforme os descritos anteriormente. Em seguida, foi realizado pareamento aleatório desses animais com outros do estudo

sendo considerados similaridades em: espécie, idade, local de captura, tempo de monitoramento, número de recapturas, a fim de avaliar os efeitos da interrupção de exposição à transmissão nesses roedores.

## **5.8 Análise estatística**

Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de tabelas incluindo também o uso de algumas medidas descritivas. Para análise das variáveis qualitativas foi utilizado uma abordagem com a análise univariada de cada uma das variáveis independentes com a variável resposta, a força de associação entre as variáveis independentes e a variável resposta foi expressa pela Razão de Chances “Odds Ratio – OR” com intervalo de confiança 95%. Para o cálculo da Razão de Chances foi utilizado a regressão logística com abordagem das análises univariada. Para análise das variáveis quantitativas foi utilizado o teste de Bartlett para testar a suposição de homogeneidade das variáveis envolvidas no estudo aplicado em seguida Anova quando observado o pressuposto de homogeneidade com o post hoc o teste de Tukey, também foi utilizado o teste de Shapiro Wilk para testar a suposição de normalidade das variáveis envolvidas e, para a análise comparativa das variáveis foi utilizado o teste de Mann-Whitney. A análise comparativa entre as variáveis qualitativas foi aplicado o teste qui-quadrado, e quando necessário Fisher. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

## **6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Para realização deste trabalho obtivemos aprovação e Certificado da Comissão de Ética em Uso de Animais da Fundação Osvaldo Cruz (CEUA / FIOCRUZ), sob nº 017/2011 (ANEXO A) segundo o protocolo intitulado: “Estudos integrados para identificação de hospedeiros reservatórios e flebotomíneos vetores envolvidos no ciclo zoonótico das leishmanioses em área endêmica de Pernambuco e avaliação de novas abordagens para o diagnóstico parasitológico rápido”, e, Autorização para atividades com finalidade científica emitida pelo IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), nº 12749. (ANEXO B)

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Identificação das espécies de roedores silvestres e sinantrópicos que compõem a fauna

Durante o período de maio de 2012 a agosto de 2014 foram realizadas 20 expedições ao campo com duração total de 124 (cento e vinte e quatro) dias, sendo as expedições de periodicidade mensal com duração de três a nove dias, e as áreas de captura/recapturas determinadas e condicionadas à acessibilidade dos locais no momento da expedição. No total foram realizadas 1032 (mil e trinta e dois) coletas com média diária de 8,3 capturas/dia, destas, em 997 (novecentos e noventa e sete) foram coletadas amostras para processamento (Tabela 1). Foram identificados 638 (seiscentos e trinta e oito) animais silvestres e sinantrópicos pertencentes a onze espécies diferentes, sendo 345 (trezentos e quarenta e cinco) machos e 293 (duzentos e noventa e três) fêmeas. As espécies *Nectomys squamipes* 38,3% (245/638), *Rattus rattus* 23,2% (148/638) e *Necromys lasiurus* 13,3% (85/638), (figuras 14, 15 e 16 respectivamente) foram as principais encontradas (Tabela 2).

As capturas ocorreram nas localidades de Engenho Raiz de Dentro e Engenho Refrigério, zona rural do município de Amaraji em áreas correspondentes ao Intradomicílio, Peridomicílio (até 20 metros de distância das casas) e Extradomicílio (a partir de 20 metros de distância das casas), em ecótopos correspondentes ao intradomicílio no interior de casas (Casas), áreas de plantações no peridomicílio e extradomicílio (Plantações) e, em áreas de remanscentes de Mata Atlântica no extradomicílio (Mata) (Tabela 3). *Rattus rattus* e *Didelphis albiventris* foram as únicas espécies capturadas no intradomicílio.

Dos animais capturados, 35 (trinta e dois) não foram processados, sendo 32 marsupiais (21 *Didelphis albiventris*, seis *Marmosa* spp. e cinco *Monodelphis domestica domestica*) devolvidos ao campo, por não possuímos microisoladores com dimensão adequada para estes animais; dois *Necromys lasiurus* e um *Oxymycterus angulares* morreram nas armadilhas não havendo possibilidade de processá-los, os demais 603 (seiscentos e três) exemplares foram processados (Tabela 2).

**Tabela 1.** Resultado das expedições ao campo nas localidades do Engenho Raiz de Dentro e Engenho Refrigério, município de Amaraji – PE, durante o período de maio/2012 a agosto/2014.

Expedição	Período	Ano	Dias	Nº Animais capturados	Nº Animais Recapturados	Total	Médias diárias		
							Capturas /dia	Recapturas /dia	Total /dia
1	22 a 28 / mai	2012	5	54	0	54	10,8	0,0	10,8
2	27 / jun a 01 / jul	2012	5	36	11	47	7,2	2,2	9,4
3	28 / ago a 01 / set	2012	5	40	15	55	8,0	3,0	11,0
4	17 a 20 / out	2012	4	34	23	57	8,5	5,8	14,3
5	27 a 30 / Nov	2012	4	29	25	54	7,3	6,3	13,5
6	29 / jan a 06 / fev	2013	9	54	19	73	6,0	2,1	8,1
7	19 a 26 / mar	2013	8	71	17	88	8,9	2,1	11,0
8	09 a 17 / abr	2013	9	63	25	88	7,0	2,8	9,8
9	04 a 12 / jun	2013	9	57	27	84	6,3	3,0	9,3
10	09 a 11 / jul	2013	3	16	20	36	5,3	6,7	12,0
11	20 a 29 / ago	2013	8	43	34	77	5,4	4,3	9,6
12	10 a 19 / set	2013	8	27	39	66	3,4	4,9	8,3
13	08 a 18 / out	2013	7	34	27	61	4,9	3,9	8,7
14	19 a 28 / Nov	2013	8	28	36	64	3,5	4,5	8,0
15	10 a 19 / dez	2013	8	10	27	37	1,3	3,4	4,6
16	21 a 30 / jan	2014	8	10	22	32	1,3	2,8	4,0
17	27 a 28 / mar	2014	2	0	3	3	0,0	1,5	1,5
18	20 a 24 / mai	2014	5	17	8	25	3,4	1,6	5,0
19	01 a 05 / jul	2014	5	9	10	19	1,8	2,0	3,8
20	29 / jul a 01 / ago	2014	4	6	6	12	1,5	1,5	3,0
<b>Total</b>			<b>124</b>	<b>638</b>	<b>394</b>	<b>1032</b>	<b>5,1</b>	<b>3,2</b>	<b>8,3</b>

Fonte: o autor, 2015.

**Figura 14-** Roedor silvestre *Nectomys squamipes*.



**Fonte:** Marinho-Júnior (2010).

**Figura 15-** Roedor sinantrópico *Rattus rattus*.



**Fonte:** Marinho-Júnior (2010).

**Figura 16.** Roedor silvestre *Necromys lasiurus*.



**Fonte:** Marinho-Júnior (2010).



**Tabela 2.** Animais silvestres e sinantrópicos capturados nas localidades dos Engenhos Raiz de Dentro e Refrigério, Amaraji-PE, quanto ao sexo, no período de maio de 2012 a agosto de 2014.

<b>Espécie</b>	♂	♀	<b>Total</b>	<b>%</b>
<i>Nectomys squamipes</i>	128	117	245	38,3
<i>Rattus rattus</i>	87	61	148	23,2
<i>Necomys lasiurus</i>	47	38	85	13,3
<i>Oxymycterus angulares</i>	28	22	50	7,8
<i>Holochilus sciureus</i>	17	23	40	6,3
<i>Akodon arviculoides</i>	19	13	32	5,0
<i>Didelphis albiventris</i> *	8	13	21	3,3
<i>Marmosa sp</i> *	4	2	6	0,9
<i>Monodelphis domestica domestica</i> *	3	2	5	0,8
<i>Oryzomys subflavus</i>	2	2	4	0,6
<i>Olygoryzomys eliurus</i>	2	0	2	0,3
<b>Total</b>	<b>345</b>	<b>293</b>	<b>638</b>	<b>100,0</b>

**Fonte:** o autor, 2015.

**Nota:**\*Animais devolvidos ao campo

**Tabela 3-** Roedores silvestres e sinantrópicos capturados e marcados nas localidades dos Engenhos Raiz de Dentro e Refrigério, Amaraji-PE, por ecótopo, no período de maio de 2012 a agosto de 2014.

<b>Espécie</b>	<b>Locais de captura</b>			<b>Total</b>	<b>%</b>
	<b>Casas</b>	<b>Plantações</b>	<b>Mata</b>		
<i>Nectomys squamipes</i>	0	216	29	245	38,3
<i>Rattus rattus</i>	43	90	15	148	23,2
<i>Necomys lasiurus</i>	0	70	13	83	13,3
<i>Oxymycterus angulares</i>	0	44	5	49	7,8
<i>Holochilus sciureus</i>	0	40	0	40	6,3
<i>Akodon arviculoides</i>	0	21	11	32	5,0
<i>Oryzomys subflavus</i>	0	3	1	4	0,6
<i>Olygoryzomys eliurus</i>	0	1	1	2	0,3
<b>Total</b>	<b>43</b>	<b>485</b>	<b>75</b>	<b>603</b>	<b>100</b>

**Fonte:** o autor, 2015.

**Nota:** \*Animais devolvidos ao campo

Foram realizadas 394 (trezentos e noventa e quatro) recapturas de animais silvestres e sinantrópicos marcados, sendo 186 (cento e oitenta e seis) R1 (recaptura 1), 97 R2, 52 R3, 27 R4, dezoito R5, seis R6, três R7, dois R8, dois R9 e

um R10, conforme descrito na tabela 4. Observou-se que apenas exemplares da espécie *Nectomys squamipes* foram recapturados a partir de R5.

**Tabela 4-** Roedores silvestres e sinantrópicos capturados e recapturados nas localidades dos Engenhos Raiz de Dentro e Refrigério, Amaraji-PE, por recapturas (R1-R10), no período de junho de 2012 a agosto de 2014.

<b>Espécie</b>	<b>N</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>
<i>Nectomys squamipes</i>	245	106	74	41	23	18
<i>Rattus rattus</i>	148	30	4	2	-	-
<i>Necomys lasiurus</i>	83	20	7	2	1	-
<i>Oxymycterus angulares</i>	49	14	5	4	2	-
<i>Holochilus sciureus</i>	40	13	6	2	1	-
<i>Akodon arviculoides</i>	32	3	1	1	-	-
<i>Oryzomys subflavus</i>	4	-	-	-	-	-
<i>Olygoryzomys eliurus</i>	2	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>603</b>	<b>186</b>	<b>97</b>	<b>52</b>	<b>27</b>	<b>18</b>

**Fonte:** o autor, 2015.

**Nota:**

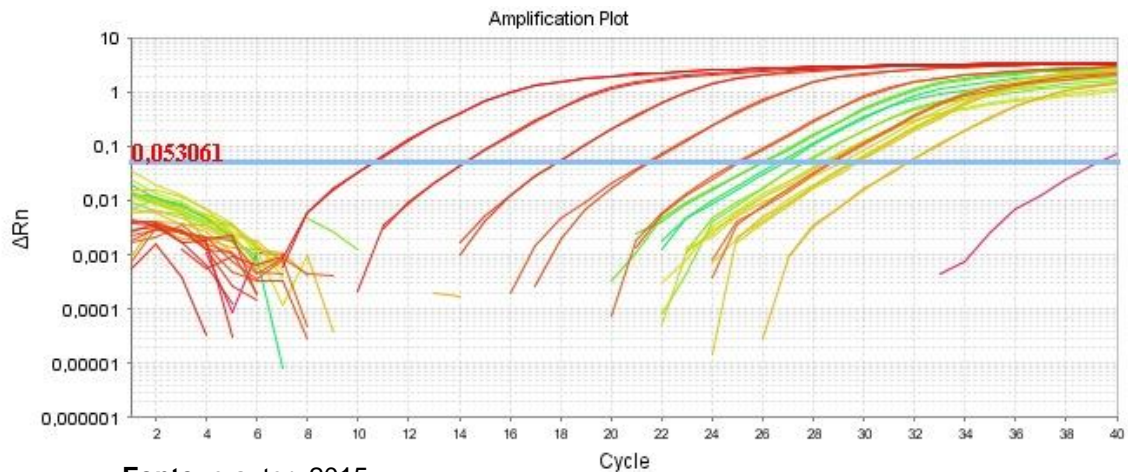
R6 – 6 *Nectomys squamipes*  
 R7 – 3 *Nectomys squamipes*  
 R8 – 2 *Nectomys squamipes*  
 R9 – 2 *Nectomys squamipes*  
 R10 – 1 *Nectomys squamipes*

## 7.2 Diagnóstico molecular por PCR em tempo real (qPCR)

A partir dos 603 roedores silvestres e sinantrópicos utilizados na pesquisa, foram analisadas por qPCR para detecção de infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp., um total de 1768 amostras de DNA, sendo 983 (601 de capturas e 382 de recapturas) extraídas de sangue total, e, 785 (592 de capturas e 193 de recapturas) de amostras de pele (fragmento da orelha), todas, obtidas dos 603 roedores silvestres e sinantrópicos utilizados na pesquisa. Foi detectada, através da qPCR (Figuras 14, 15 e 16), no período total estudado considerando recapturas, infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp em 29,2 % (176/603) dos roedores. Considerando as seis espécies mais abundantes na fauna de roedores, o resultado apresentou significância estatística ( $p < 0,0001$ ), indicando distribuição significativa da infecção entre as espécies de roedores. Na comparação entre as espécies,

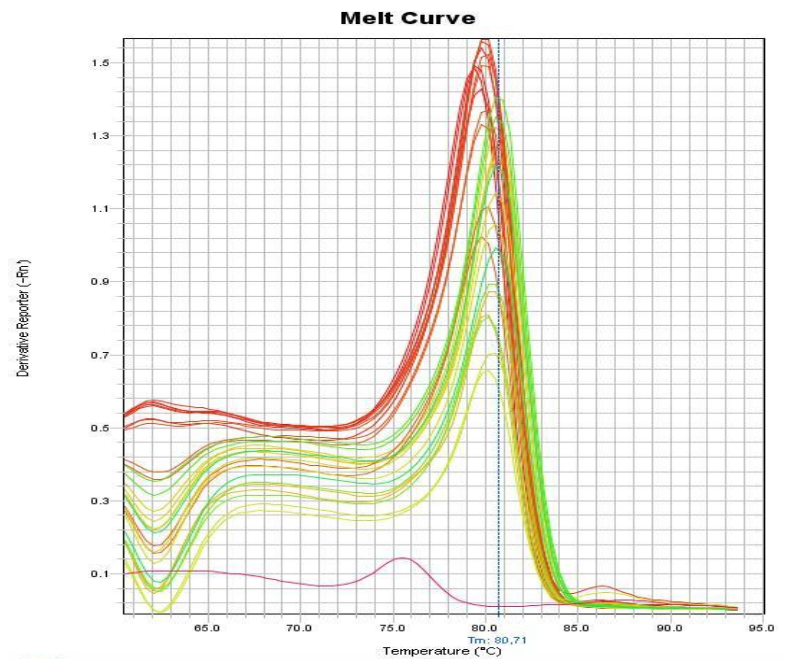
verifica-se significância estatística em relação à comparação de infecção entre as espécies *Rattus rattus*, *Nectomys squamipes* e *Necromys lasiurus* ( $p < 0,05$ ) conforme tabela 5. Nos gráficos 1, 2 e 3 verificamos a prevalência e incidência da infecção.

**Figura 17** - Amplificação de amostras de DNA de sangue de roedores



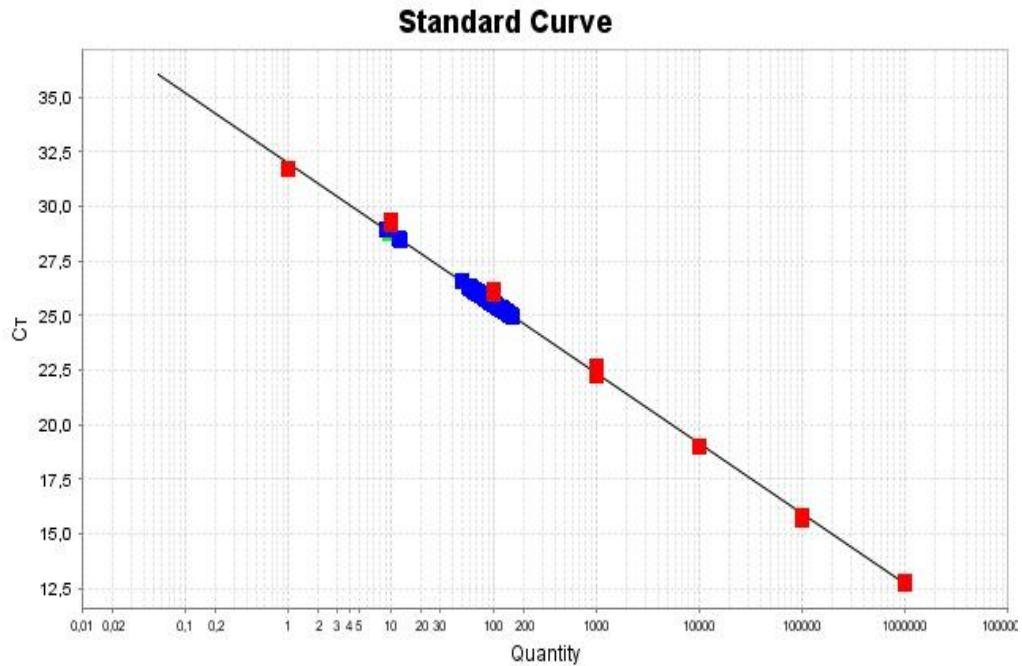
Fonte: o autor, 2015.

**Figura 18** - Curva de Melt em qPCR de amostras de DNA de sangue de roedores.



Fonte: o autor, 2015.

**Figura 19** - Curva padrão da qPCR de amostras de DNA de sangue de roedores.



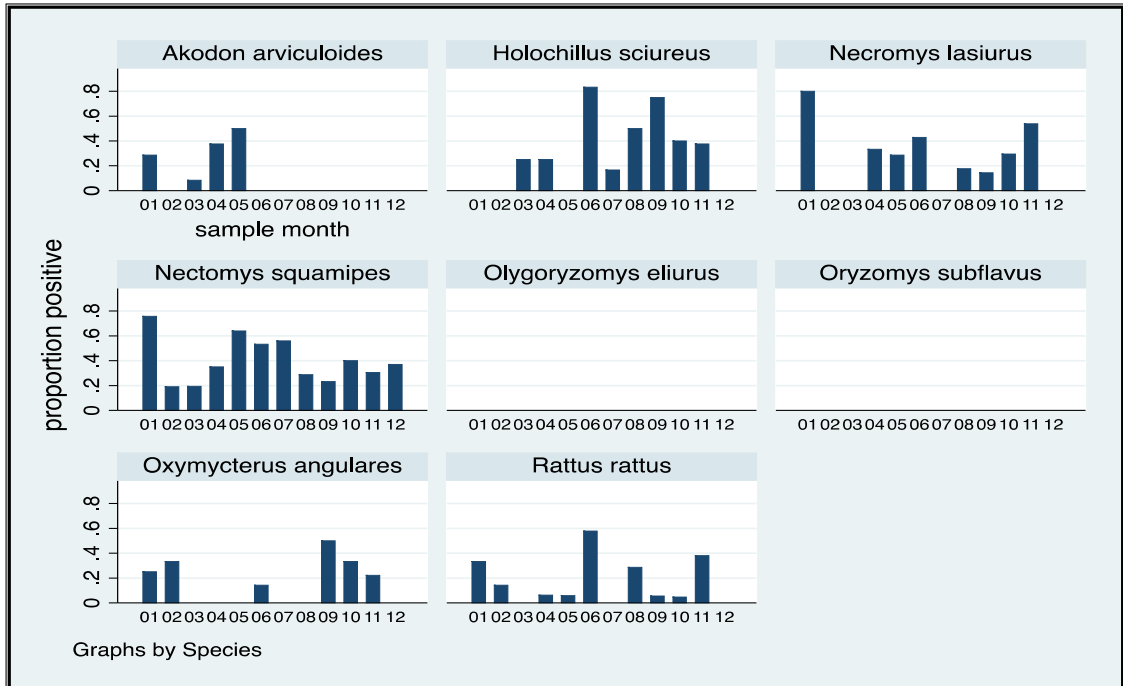
Fonte: o autor, 2015.

**Tabela 5.** Resultados dos testes moleculares (qPCR) de amostras DNA dos roedores silvestres e sinantrópicos positivos das localidades de Engenho Raiz de Dentro e Engenho Refrigério, Amaraji-PE, no período de maio de 2012 a agosto de 2014.

Espécies	Negativo		Positivo		OR	IC 95%		p-valor <sup>1</sup>	p-valor <sup>2</sup>
	N	%	N	%		Lower	Higher		
<i>Rattus rattus</i>	124	29,5	24	13,6	1,000				
<i>Nectomys squamipes</i>	139	33,0	106	60,2	3,940	2,412	6,644	0,0000	
<i>Necromys lasiurus</i>	58	13,8	25	14,2	2,227	1,173	4,248	0,0144	
<i>Oxymycterus angulares</i>	41	9,7	8	4,6	1,008	0,398	2,337	0,9855	
<i>Holochilus sciureus</i>	30	7,1	10	5,7	1,722	0,720	3,911	0,2039	
<i>Akodon arviculoides</i>	29	6,9	3	1,7	0,534	0,121	1,666	0,3322	
<b>Total</b>	<b>421</b>	<b>69,8</b>	<b>176</b>	<b>29,2</b>					<b>&lt; 0,0001</b>

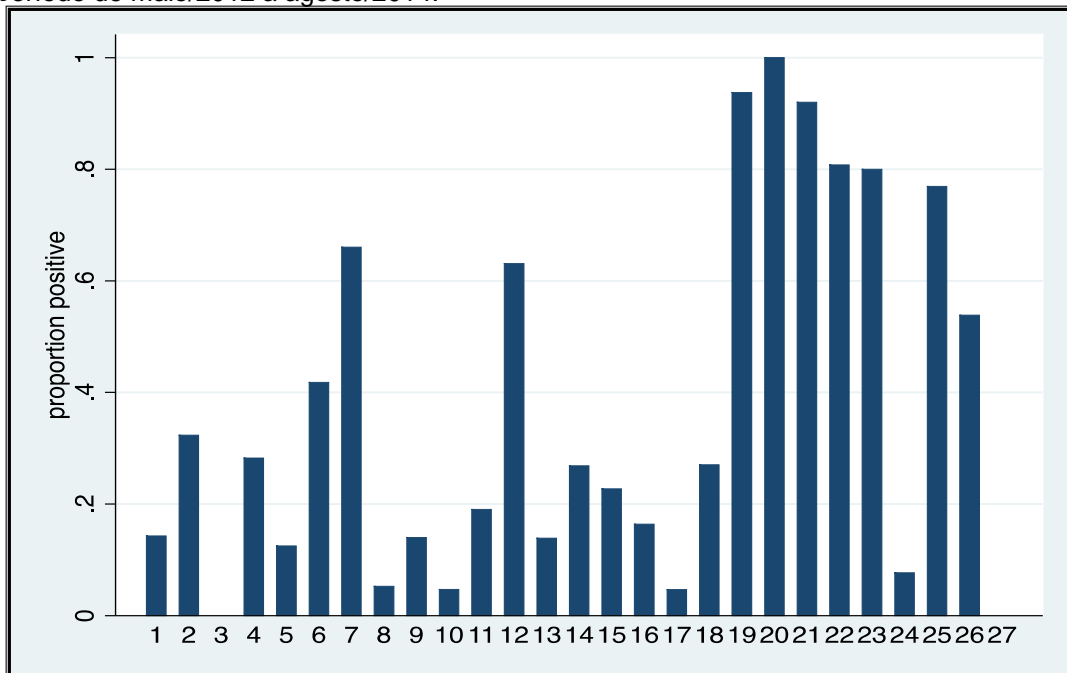
Fonte: o autor, 2015.

**Gráfico 1-** Prevalência de infecção por *Leishmania (Viannia)* spp. nas diferentes espécies de roedores silvestres e sinantrópicos estudadas por mês de diagnóstico.



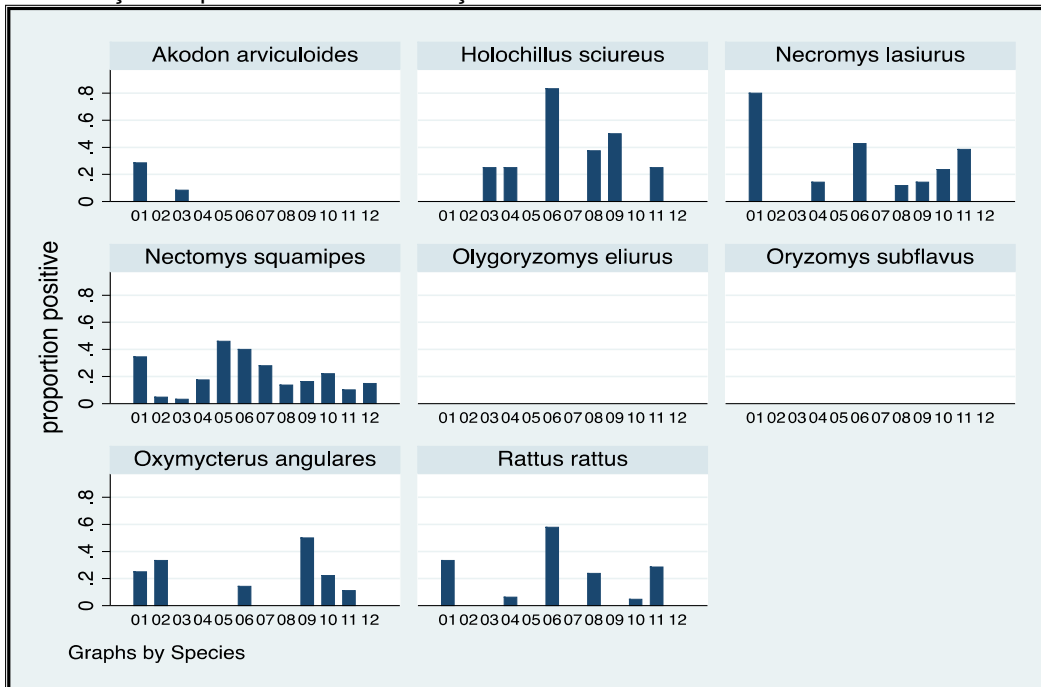
Fonte: o autor, 2015.

**Gráfico 2.** Prevalência da infecção por *Leishmania (Viannia)* spp. entre todas as espécies de roedores silvestres e sinantrópicos estudadas, referentes as expedições realizadas no período de maio/2012 a agosto/2014.



Fonte: o autor, 2015.

**Gráfico 3.** Incidência da infecção por *Leishmania (Viannia)* spp. entre todas as espécies de roedores silvestres e sinantrópicos estudadas, por mês, considerando observação do primeiro mês de infecção.



**Fonte:** o autor, 2015.

Considerando os ecótopos de captura comuns para todas as espécies, excluindo o intradomicílio (apenas *R. rattus* foi encontrado nesse ecótopo), foram analisados os ecótopos referentes a plantações e remanescentes de Mata Atlântica, e, verificou-se significância estatística entre a espécie *R. rattus*, e as espécies *N. squamipes* e *N. lasiurus*, com p-valor<sup>1</sup> e p-valor<sup>2</sup> < 0,05 em ambas comparações, e OR de 4,957 entre *R. rattus* e *N. squamipes*, e, OR de 2,802, comparando *R. rattus* com *N. lasiurus*. (Tabela 6)

**Tabela 6.** Comparação da detecção de infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp considerando os ecótopos plantações e mata, das diferentes espécies de roedores capturadas nas localidades de Raiz de Dentro e Refrigério, Amaraji-PE, no período de maio/2012 a agosto/2014.

Espécie	Negativo		Positivo		OR	IC 95%		p-valor <sup>1</sup>	p-valor <sup>2</sup>
	N	%	N	%		Lower	Higher		
<i>Rattus rattus</i>	91	23,5	14	8,4	1,000				
<i>Nectomys squamipes</i>	139	35,8	106	63,9	4,957	2,752	9,526	0,0000	
<i>Necromys lasiurus</i>	58	15,0	25	15,1	2,802	1,364	5,956	0,0058	
<i>Oxymycterus angulares</i>	41	10,6	8	4,8	1,268	0,474	3,204	0,6216	
<i>Holochillus sciureus</i>	30	7,7	10	6,0	2,167	0,854	5,366	0,0960	
<i>Akodon arviculoides</i>	29	7,5	3	1,8	0,672	0,148	2,240	0,5541	< 0,0001

**Fonte:** o autor, 2015.

Relacionando a localidade de captura e os resultados de infecção geral dos roedores, os resultados apresentam que a infecção natural em roedores silvestres e sinantrópicos do Engenho Raiz de Dentro é 11,294 (OR) vezes maior que a infecção no Engenho Refrigério, apresentando p-valor<sup>1</sup> e p-valor<sup>2</sup> < 0,05. (Tabela 7)

**Tabela 7.** Comparação da detecção da infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp. entre as localidades Raiz de Dentro e Refrigério, Amaraji-PE, no período de maio/2012 a agosto/2014.

Local de Captura	Negativo		Positivo		OR	IC 95%		p-valor <sup>1</sup>	p-valor <sup>2</sup>
	N	%	N	%		Lower	Higher		
REF	106	24,8	5	2,8	1,000				
RD	321	75,2	171	97,2	11,294	4,994	32,425	< 0,0001	< 0,0001

**Fonte:** o autor, 2015.

**Nota:**

REF – Engenho Refrigério

RD – Engenho Raiz de Dentro

Analisando os diferentes ecótopos de captura com a infecção dos animais, não foi verificada diferença significativa estatisticamente, estando a infecção natural distribuída de forma homogênea nos três ecótopos, apresentando p-valor<sup>1</sup> e p-valor<sup>2</sup> > 0,05. (Tabela 8)

**Tabela 8.** Comparação da detecção da infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp. entre os diferentes ecótopos de captura.

Ecótopo	Negativo		Positivo		OR	IC 95%		p-valor <sup>1</sup>	p-valor <sup>2</sup>
	N	%	N	%		Lower	Higher		
INTRADOMICÍLIO	33	7,7	10	5,7	1,000	1,000			
MATA	57	13,4	18	10,2	1,042	0,436	2,594	0,9271	
PLANTAÇÕES	337	78,9	148	84,1	1,449	0,720	3,171	0,3214	0,3461

**Fonte:** o autor, 2015.

Tendo em vista que no Intradomicílio apenas a espécie *Rattus rattus* foi capturada e marcada, realizou-se comparação entre a distribuição de infecção dessa espécie nos três ecótopos de capturas (Intradomicílio, Plantações e Mata Atlântica), conforme tabela 9, bem como verificou-se a distribuição de infecção natural entre os ecótopos Plantações e Mata Atlântica apenas (Tabela 10). Nenhuma dessas correlações apresentou resultado estatisticamente significativo, sendo  $p > 0,05$ , em ambas análises.

**Tabela 9.** Comparação da detecção da infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp. entre os diferentes ecótipos de captura, apenas da espécie *Rattus rattus*.

Local – Ecótipo	Negativo		Positivo		OR	IC 95%		p-valor <sup>1</sup>	p-valor <sup>2</sup>
	N	%	N	%		Lower	Higher		
INTRADOMICÍLIO	33	26,6	10	41,7	1,000				
MATA	14	11,3	1	4,2	0,2357	0,0123	1,4127	0,1874	
PLANTAÇÕES	77	62,1	13	54,2	0,5571	0,2223	1,4246	0,2126	0,2716

Fonte: o autor, 2015.

**Tabela 10.** Comparação da detecção da infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp. entre os ecótipos Plantações e Mata Atlântica.

Local – Ecótipo	Negativo		Positivo		OR	IC 95%		p-valor <sup>1</sup>	p-valor <sup>2</sup>
	N	%	N	%		Lower	Higher		
MATA	57	14,5	18	10,8	1,000				
PLANTAÇÕES	337	85,5	148	89,2	1,3907	0,8058	2,5052	0,2518	0,3106

Fonte: o autor, 2015.

Comparando os resultados de infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp. das espécies de roedores em relação às localidades estudadas, a correlação apresenta-se estatisticamente significativa, com  $p < 0,05$ , (Tabela 11).

**Tabela 11.** Distribuição da infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp. entre as espécies por localidades (Refrigério e Raiz de Dentro).

Espécies	REF				RD				P-valor
	Negativo		Positivo		Negativo		Positivo		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
<i>Rattus rattus</i>	16	15,1	0	0,0	108	33,6	24	14,0	
<i>Nectomys squamipes</i>	30	28,3	2	40,0	109	34,0	104	60,8	
<i>Necromys lasiurus</i>	15	14,2	2	40,0	43	13,4	23	13,5	
<i>Oxymycterus angulares</i>	15	14,2	1	20,0	26	8,1	7	4,1	
<i>Holochilus sciureus</i>	0	0,0	0	0,0	30	9,4	10	5,9	
<i>Akodon arviculoides</i>	25	23,6	0	0,0	4	1,3	3	1,8	
<i>Oryzomys subflavus</i>	3	2,8	0	0,0	1	0,3	0	0,0	
<i>Olygoryzomys eliurus</i>	2	1,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	< 0,0001

Fonte: o autor, 2015.

**Nota:**

REF – Engenho Refrigério

RD – Engenho Raiz de Dentro



### 7.3 Sazonalidade de flebotomíneos

No período de agosto/2013 a julho/2014, foram realizadas 9 expedições com duração de quatro dias para coleta de flebotomíneos a fim de verificar a sazonalidade destes na localidade Engenho Raiz de Dentro. Foram coletados no total 1.168 exemplares, pertencentes a cinco espécies, sendo 598 machos e 570 fêmeas, a distribuição por captura encontra-se na tabela 12 e gráfico 4. *Lutzomyia whitmani* foi a principal espécie encontrada com correspondendo a 58,56% (684/1168).

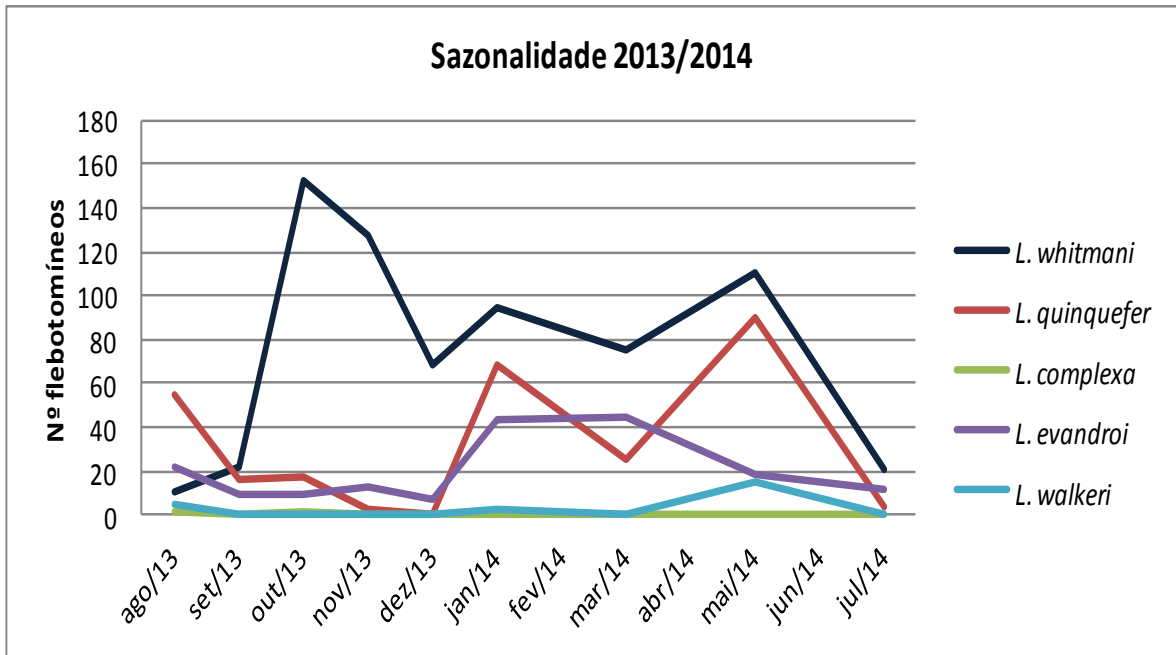
Considerando o resultado da coleta por ecótopos (intradomicílio, estábulos e galinheiros), *Lutzomyia quinquefer* foi a mais abundante no intradomicílio com 48,68% do total. Já nos abrigos de animais, galinheiros e estábulos, *Lutzomyia whitmani* foi a principal espécie encontrada com 48,11% e 82,48% do total coletado respectivamente. (Gráfico 5)

**Tabela 12.** Resultado da Sazonalidade de flebotomíneos coletados na localidade de Raiz de Dentro – Amaraji, durante o período de ago/2013 a jul/2014.

Mês/coleta	<i>L. whitmani</i>		<i>L. quinquefer</i>		<i>L. complexa</i>		<i>L. evandroi</i>		<i>L. walkeri</i>		Total
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
ago/13	11	11,70%	55	58,51%	1	1,06%	22	23,40%	5	5,32%	94
set/13	22	45,83%	16	33,33%	0	0,00%	10	20,83%	0	0,00%	48
out/13	153	84,53%	17	9,39%	1	0,55%	10	5,52%	0	0,00%	181
nov/13	128	88,89%	3	2,08%	0	0,00%	13	9,03%	0	0,00%	144
dez/13	69	90,79%	0	0,00%	0	0,00%	7	9,21%	0	0,00%	76
jan/14	95	45,24%	68	32,38%	0	0,00%	44	20,95%	3	1,43%	210
mar/14	75	51,72%	25	17,24%	0	0,00%	45	31,03%	0	0,00%	145
mai/14	110	47,21%	90	38,63%	0	0,00%	18	7,73%	15	6,44%	233
jul/14	21	56,76%	4	10,81%	0	0,00%	12	32,43%	0	0,00%	37
<b>Total</b>	<b>684</b>	<b>58,56%</b>	<b>278</b>	<b>23,80%</b>	<b>2</b>	<b>0,17%</b>	<b>181</b>	<b>15,50%</b>	<b>23</b>	<b>1,97%</b>	<b>1168</b>

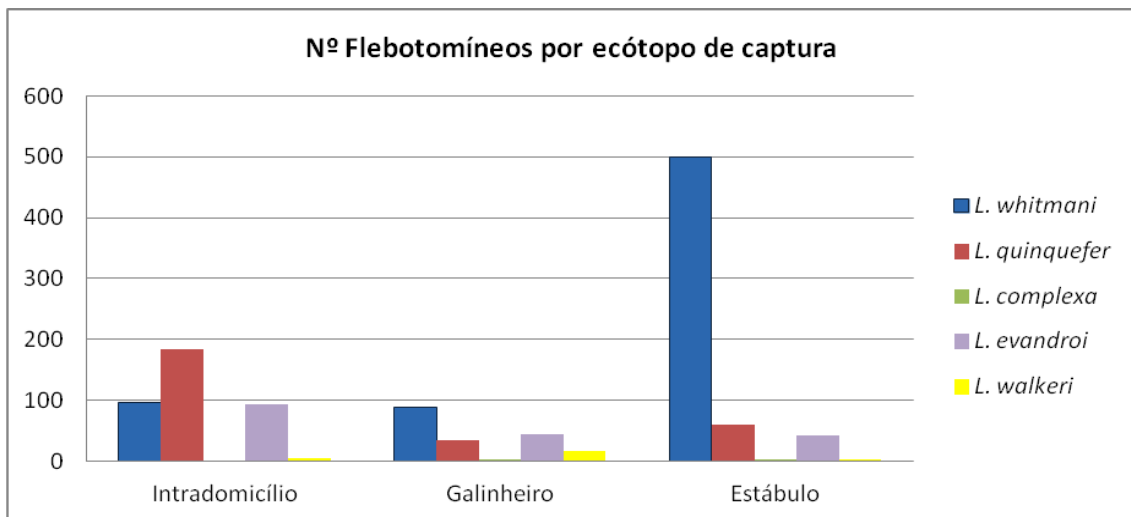
Fonte: o autor, 2015.

**Gráfico 4** - Distribuição sazonal de flebotomíneos coletados na localidade de Raiz de Dentro – Amaraji, durante o período de ago/2013 a jul/2014



Fonte: o autor, 2015.

**Gráfico 5.** Distribuição das espécies de flebotomíneos coletados por ecótopo de captura.



Fonte: o autor, 2015.

#### 7.4 Ensaios de infecciosidade através de xenodiagnóstico

Foram realizados 51 (cinquenta e um) xenodiagnósticos com roedores silvestres e sinantrópicos naturalmente infectados sendo 44 xenodiagnósticos com *Nectomys squamipes*, quatro com *Rattus rattus*, um com *Necromys lasiurus*, um com *Akodon arviculoides* e, um com *Oxymycterus angulares* (Tabela 13). Desse total, 5 (três *Nectomys squamipes* e dois *Rattus rattus*) foram realizados com fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* oriundas de colônia, e, os demais, 46, realizados com fêmeas de *Lutzomyia whitmani* provenientes de capturas realizadas no campo.

Do total de xenodiagnósticos realizados, foram identificadas e contabilizadas as fêmeas de flebotomíneos alimentadas. No total, 1929 fêmeas se alimentaram em roedores durante os xenodiagnósticos sendo: 407 *L. longipalpis* (Tabela 14) e 1522 *L. whitmani* (Tabela 15).

Foi detectada infecção natural por *Leishmania (Viannia) spp.* em 72,58% (1400/1929) do total de espécimes analisadas, sendo 1150 de *Lutzomyia whitmani* e 250 *L. longipalpis*. Considerando os ensaios apenas com utilização de fêmeas de *L. longipalpis*, foram 61,43% positivos para infecção natural por *Leishmania (Viannia) spp.*, enquanto que para xenodiagnósticos com *L. whitmani*, foram 75,58% de espécimes positivos.

Com relação às fêmeas de flebotomíneos não alimentadas durante os xenodiagnósticos, utilizadas como controle da infecção natural, foram analisadas 280 fêmeas e foi verificado 5,4% (15/280) de infecção natural em flebotomíneos.

**Tabela 13.** Resultado geral dos ensaios de infecciosidade, por xenodiagnóstico, realizados com roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Raiz de Dentro, Amaraji-PE no período de 2012-2014. (continua)

Nº	Espécies	Recaptura	DNA Sangue Roedor				DNA Flebotomíneos alimentados			
			Data Xeno	qPCR	CP (fg/uL)	Espécie Flebotomo	qPCR positivo	%	Média CP Positivos (fg/uL)	Total
5	<i>Nectomys squamipes</i>	R5	25/01/2014	Pos	83,06	<i>L. whitmani</i>	0	0,0%	0,0	12
12	<i>Nectomys squamipes</i>	R2	12/12/2012	Pos	446,56	<i>L. longipalpis</i>	13	15,9%	50,3	82
16	<i>Nectomys squamipes</i>	R4	03/12/2012	Pos	605,98	<i>L. longipalpis</i>	26	44,8%	295,1	58
40	<i>Nectomys squamipes</i>	R9	14/12/2013	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	1	9,1%	1,6	11
40	<i>Nectomys squamipes</i>	R10	27/03/2014	Pos	39,28	<i>L. whitmani</i>	1	2,9%	2,2	35
40	<i>Nectomys squamipes</i>	R10 X2	05/07/2014	Pos	5,67	<i>L. whitmani</i>	16	94,1%	2,3	17
185	<i>Nectomys squamipes</i>	R1	07/03/2013	Neg	0	<i>L. longipalpis</i>	71	88,8%	10,2	80
187	<i>Rattus rattus</i>	R1	18/02/2013	Pos	10,28	<i>L. longipalpis</i>	42	79,2%	110,5	53
188	<i>Rattus rattus</i>	R1	05/03/2013	Pos	8,83	<i>L. longipalpis</i>	98	73,1%	23,4	134
221	<i>Oxymycterus angulares</i>	R4	26/03/2014	Pos	74,36	<i>L. whitmani</i>	1	2,2%	2,8	45
272	<i>Nectomys squamipes</i>	R4	16/10/2013	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	6	60,0%	22,5	10
379	<i>Nectomys squamipes</i>	R3	26/03/2014	Pos	46,21	<i>L. whitmani</i>	4	6,7%	29,8	60
379	<i>Nectomys squamipes</i>	R3 X2	24/05/2014	Pos	20,57	<i>L. whitmani</i>	32	97,0%	15,5	33
387	<i>Nectomys squamipes</i>	R3	20/11/2013	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	2	7,7%	6,7	26
393	<i>Nectomys squamipes</i>	R4	19/12/2013	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	6	100,0%	119,7	6
393	<i>Nectomys squamipes</i>	R5	28/03/2014	Pos	35,26	<i>L. whitmani</i>	6	33,3%	1,3	18
393	<i>Nectomys squamipes</i>	R5 X2	05/07/2014	Pos	17,04	<i>L. whitmani</i>	20	80,0%	7,6	25
397	<i>Nectomys squamipes</i>	R2	20/05/2014	Pos	9,83	<i>L. whitmani</i>	24	100,0%	65,3	24
398	<i>Nectomys squamipes</i>	R1	04/07/2014	Pos	2,19	<i>L. whitmani</i>	15	100,0%	7,7	15
404	<i>Nectomys squamipes</i>	R2	12/12/2013	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	3	18,8%	117,7	16
404	<i>Nectomys squamipes</i>	R3	29/01/2014	Pos	39,58	<i>L. whitmani</i>	3	13,6%	2,3	22
410	<i>Nectomys squamipes</i>	R3	30/01/2014	Pos	29,29	<i>L. whitmani</i>	1	4,3%	1,5	23
421	<i>Nectomys squamipes</i>	R4	18/12/2013	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	0	0,0%	0,0	23
421	<i>Nectomys squamipes</i>	R5	28/03/2014	Pos	45,16	<i>L. whitmani</i>	0	0,0%	0,0	18
432	<i>Nectomys squamipes</i>	R2	30/01/2014	Pos	738,23	<i>L. whitmani</i>	8	18,6%	15,5	43

**Tabela 13.** Resultado geral dos ensaios de infecciosidade, por xenodiagnóstico, realizados com roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Raiz de Dentro, Amaraji-PE no período de 2012-2014. (continuação)

Nº	Espécies	Recaptura	DNA Sangue Roedor				DNA Flebotomíneos alimentados			
			Data Xeno	qPCR	CP (fg/uL)	Espécie Flebotomo	qPCR positivo	%	Média CP Positivos (fg/uL)	Total
432	<i>Nectomys squamipes</i>	R3	21/05/2014	Pos	7,35	<i>L. whitmani</i>	15	93,8%	7,6	16
432	<i>Nectomys squamipes</i>	R4	03/07/2014	Pos	54,45	<i>L. whitmani</i>	19	100,0%	58,5	19
432	<i>Nectomys squamipes</i>	R5	30/07/2014	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	3	50,0%	1,5	6
443	<i>Rattus rattus</i>	R1	30/01/2014	Pos	364,15	<i>L. whitmani</i>	18	100,0%	19,1	18
452	<i>Nectomys squamipes</i>	R7	23/05/2014	Pos	1,46	<i>L. whitmani</i>	33	97,1%	501,0	34
452	<i>Nectomys squamipes</i>	R8	04/07/2014	Pos	17,57	<i>L. whitmani</i>	1	100,0%	52,4	1
452	<i>Nectomys squamipes</i>	R9	31/07/2014	?	0,95	<i>L. whitmani</i>	47	97,9%	176,0	48
456	<i>Nectomys squamipes</i>	R3	21/05/2014	Pos	11,69	<i>L. whitmani</i>	30	100,0%	154,9	30
501	<i>Rattus rattus</i>	R2	22/01/2014	Pos	90,43	<i>L. whitmani</i>	13	92,9%	25,5	14
505	<i>Nectomys squamipes</i>	R5	23/05/2014	Pos	15,06	<i>L. whitmani</i>	53	98,1%	192,1	54
524	<i>Nectomys squamipes</i>	R1	17/10/2013	Pos	2,55	<i>L. whitmani</i>	4	100,0%	62,6	4
524	<i>Nectomys squamipes</i>	R3	22/05/2014	Pos	5,44	<i>L. whitmani</i>	29	85,3%	9,8	34
567	<i>Nectomys squamipes</i>	R3	20/05/2014	Pos	6,59	<i>L. whitmani</i>	31	91,2%	32,7	34
572	<i>Akodon arviculoides</i>	R1	27/03/2014	Pos	25,09	<i>L. whitmani</i>	9	100,0%	19,2	9
573	<i>Nectomys lasiurus</i>	R1	28/01/2014	Pos	76,59	<i>L. whitmani</i>	17	68,0%	6,2	25
577	<i>Nectomys squamipes</i>	R1	03/07/2014	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	34	97,1%	75,9	35
607	<i>Nectomys squamipes</i>	R2	29/07/2014	Pos	2,65	<i>L. whitmani</i>	29	87,9%	1,7	33
618	<i>Nectomys squamipes</i>	-	24/05/2014	Pos	12,85	<i>L. whitmani</i>	77	95,1%	42,1	81
618	<i>Nectomys squamipes</i>	R1	03/07/2014	Pos	4,04	<i>L. whitmani</i>	92	100,0%	7,6	92
619	<i>Nectomys squamipes</i>	-	24/05/2014	Pos	18,06	<i>L. whitmani</i>	29	100,0%	17,2	29
623	<i>Nectomys squamipes</i>	R2	01/08/2014	?	0,72	<i>L. whitmani</i>	314	98,7%	85,7	318
633	<i>Nectomys squamipes</i>	-	30/07/2014	Pos	1,58	<i>L. whitmani</i>	9	100,0%	268,7	9
634	<i>Nectomys squamipes</i>	-	30/07/2014	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	6	100,0%	15,4	6
635	<i>Nectomys squamipes</i>	-	31/07/2014	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	69	100,0%	54,6	69
636	<i>Nectomys squamipes</i>	-	29/07/2014	Pos	234,62	<i>L. whitmani</i>	13	92,9%	11,7	14

**Tabela 13.** Resultado geral dos ensaios de infecciosidade, por xenodiagnóstico, realizados com roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Raiz de Dentro, Amaraji-PE no período de 2012-2014. (conclusão)

Nº	Espécies	Recaptura	DNA Sangue Roedor				DNA Flebotomíneos alimentados			
			Data Xenó	qPCR	CP (fg/uL)	Espécie Flebótomo	qPCR positivo	%	Média CP Positivos (fg/uL)	Total
637	<i>Nectomys squamipes</i>	-	29/07/2014	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	7	87,5%	2,1	8
<b>TOTAL</b>							<b>1400</b>	<b>72,58%</b>	<b>55,2</b>	<b>1929</b>

Fonte: o autor, 2015.

**Legenda:**

CP - Carga Parasitária

R3 X2 – Recaptura 3 - 2º Xenodiagnóstico

R5 X2 – Recaptura 5 - 2º Xenodiagnóstico

R10 X2- Recaptura 10 - 2º Xenodiagnóstico

**Tabela 14.** Resultado geral dos Ensaio de infecciosidade utilizando fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, por xenodiagnóstico, realizados com roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Raiz de Dentro, Amaraji-PE no período de 2012-2013.

Nº	Espécies	Recaptura	DNA Sangue Roedor				DNA Flebotomíneos alimentados			
			Data Xenó	qPCR	Carga Parasitária (fg/uL)	Espécie Flebótomo	qPCR positivo	%	Média CP Positivos (fg/uL)	Total
12	<i>Nectomys squamipes</i>	R2	12/12/2012	Pos	446,56	<i>L. longipalpis</i>	13	15,9%	50,3	82
16	<i>Nectomys squamipes</i>	R4	03/12/2012	Pos	605,98	<i>L. longipalpis</i>	26	44,8%	295,1	58
185	<i>Nectomys squamipes</i>	R1	07/03/2013	Neg	0	<i>L. longipalpis</i>	71	88,8%	10,2	80
187	<i>Rattus rattus</i>	R1	18/02/2013	Pos	10,28	<i>L. longipalpis</i>	42	79,2%	110,5	53
188	<i>Rattus rattus</i>	R1	05/03/2013	Pos	8,83	<i>L. longipalpis</i>	98	73,1%	23,4	134
<b>TOTAL</b>							<b>250</b>	<b>61,43%</b>	<b>97,9</b>	<b>407</b>

Fonte: o autor, 2015.

**Tabela 15.** Resultado geral dos Ensaios de infecciosidade utilizando fêmeas de *Lutzomyia whitmani* capturadas no campo, por xenodiagnóstico, realizados com roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Raiz de Dentro, Amaraji-PE no período de 2013-2014. (continua)

Nº	Espécies	Recaptura	DNA Sangue Roedor				DNA Flebotomíneos alimentados			
			Data Xeno	qPCR	CP (fg/uL)	Espécie Flebotomo	N qPCR positivo	%	Média CP Positivos (fg/uL)	Total
5	<i>Nectomys squamipes</i>	R5	25/01/2014	Pos	83,06	<i>L. whitmani</i>	0	0,0%	0,0	12
40	<i>Nectomys squamipes</i>	R9	14/12/2013	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	1	9,1%	1,6	11
40	<i>Nectomys squamipes</i>	R10	27/03/2014	Pos	39,28	<i>L. whitmani</i>	1	2,9%	2,2	35
40	<i>Nectomys squamipes</i>	R10 x2	05/07/2014	Pos	5,67	<i>L. whitmani</i>	16	94,1%	2,3	17
221	<i>Oxymycterus angulares</i>	R4	26/03/2014	Pos	74,36	<i>L. whitmani</i>	1	2,2%	2,8	45
272	<i>Nectomys squamipes</i>	R4	16/10/2013	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	6	60,0%	22,5	10
379	<i>Nectomys squamipes</i>	R3	26/03/2014	Pos	46,21	<i>L. whitmani</i>	4	6,7%	29,8	60
379	<i>Nectomys squamipes</i>	R3 x2	24/05/2014	Pos	20,57	<i>L. whitmani</i>	32	97,0%	15,5	33
387	<i>Nectomys squamipes</i>	R3	20/11/2013	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	2	7,7%	6,7	26
393	<i>Nectomys squamipes</i>	R4	19/12/2013	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	6	100,0%	119,7	6
393	<i>Nectomys squamipes</i>	R5	28/03/2014	Pos	35,26	<i>L. whitmani</i>	6	33,3%	1,3	18
393	<i>Nectomys squamipes</i>	R5 x2	05/07/2014	Pos	17,04	<i>L. whitmani</i>	20	80,0%	7,6	25
397	<i>Nectomys squamipes</i>	R2	20/05/2014	Pos	9,83	<i>L. whitmani</i>	24	100,0%	65,3	24
398	<i>Nectomys squamipes</i>	R1	04/07/2014	Pos	2,19	<i>L. whitmani</i>	15	100,0%	7,7	15
404	<i>Nectomys squamipes</i>	R2	12/12/2013	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	3	18,8%	117,7	16
404	<i>Nectomys squamipes</i>	R3	29/01/2014	Pos	39,58	<i>L. whitmani</i>	3	13,6%	2,3	22
410	<i>Nectomys squamipes</i>	R3	30/01/2014	Pos	29,29	<i>L. whitmani</i>	1	4,3%	1,5	23
421	<i>Nectomys squamipes</i>	R4	18/12/2013	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	0	0,0%	0,0	23
421	<i>Nectomys squamipes</i>	R5	28/03/2014	Pos	45,16	<i>L. whitmani</i>	0	0,0%	0,0	18
432	<i>Nectomys squamipes</i>	R2	30/01/2014	Pos	738,23	<i>L. whitmani</i>	8	18,6%	15,5	43
432	<i>Nectomys squamipes</i>	R3	21/05/2014	Pos	7,35	<i>L. whitmani</i>	15	93,8%	7,6	16
432	<i>Nectomys squamipes</i>	R4	03/07/2014	Pos	54,45	<i>L. whitmani</i>	19	100,0%	58,5	19
432	<i>Nectomys squamipes</i>	R5	30/07/2014	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	3	50,0%	1,5	6
443	<i>Rattus rattus</i>	R1	30/01/2014	Pos	364,15	<i>L. whitmani</i>	18	100,0%	19,1	18

**Tabela 15.** Resultado geral dos Ensaios de infeciosidade utilizando fêmeas de *Lutzomyia whitmani* capturadas no campo, por xenodiagnóstico, realizados com roedores silvestres e sinantrópicos capturados na localidade de Raiz de Dentro, Amaraji-PE no período de 2013-2014. (conclusão)

Nº	Espécies	Recaptura	DNA Sangue Roedor				DNA Flebotomíneos alimentados			
			Data Xeno	qPCR	CP (fg/uL)	Espécie Flebótomo	N qPCR positivo	%	Média CP Positivos (fg/uL)	Total
452	<i>Nectomys squamipes</i>	R7	23/05/2014	Pos	1,46	<i>L. whitmani</i>	33	97,1%	501,0	34
452	<i>Nectomys squamipes</i>	R8	04/07/2014	Pos	17,57	<i>L. whitmani</i>	1	100,0%	52,4	1
452	<i>Nectomys squamipes</i>	R9	31/07/2014	?	0,95	<i>L. whitmani</i>	47	97,9%	176,0	48
456	<i>Nectomys squamipes</i>	R3	21/05/2014	Pos	11,69	<i>L. whitmani</i>	30	100,0%	154,9	30
501	<i>Rattus rattus</i>	R2	22/01/2014	Pos	90,43	<i>L. whitmani</i>	13	92,9%	25,5	14
505	<i>Nectomys squamipes</i>	R5	23/05/2014	Pos	15,06	<i>L. whitmani</i>	53	98,1%	192,1	54
524	<i>Nectomys squamipes</i>	R1	17/10/2013	Pos	2,55	<i>L. whitmani</i>	4	100,0%	62,6	4
524	<i>Nectomys squamipes</i>	R3	22/05/2014	Pos	5,44	<i>L. whitmani</i>	29	85,3%	9,8	34
567	<i>Nectomys squamipes</i>	R3	20/05/2014	Pos	6,59	<i>L. whitmani</i>	31	91,2%	32,7	34
572	<i>Akodon arviculoides</i>	R1	27/03/2014	Pos	25,09	<i>L. whitmani</i>	9	100,0%	19,2	9
573	<i>Nectomys lasiurus</i>	R1	28/01/2014	Pos	76,59	<i>L. whitmani</i>	17	68,0%	6,2	25
577	<i>Nectomys squamipes</i>	R1	03/07/2014	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	34	97,1%	75,9	35
607	<i>Nectomys squamipes</i>	R2	29/07/2014	Pos	2,65	<i>L. whitmani</i>	29	87,9%	1,7	33
618	<i>Nectomys squamipes</i>	-	24/05/2014	Pos	12,85	<i>L. whitmani</i>	77	95,1%	42,1	81
618	<i>Nectomys squamipes</i>	R1	03/07/2014	Pos	4,04	<i>L. whitmani</i>	92	100,0%	7,6	92
619	<i>Nectomys squamipes</i>	-	24/05/2014	Pos	18,06	<i>L. whitmani</i>	29	100,0%	17,2	29
623	<i>Nectomys squamipes</i>	R2	01/08/2014	?	0,72	<i>L. whitmani</i>	314	98,7%	85,7	318
633	<i>Nectomys squamipes</i>	-	30/07/2014	Pos	1,58	<i>L. whitmani</i>	9	100,0%	268,7	9
634	<i>Nectomys squamipes</i>	-	30/07/2014	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	6	100,0%	15,4	6
635	<i>Nectomys squamipes</i>	-	31/07/2014	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	69	100,0%	54,6	69
636	<i>Nectomys squamipes</i>	-	29/07/2014	Pos	234,62	<i>L. whitmani</i>	13	92,9%	11,7	14
637	<i>Nectomys squamipes</i>	-	29/07/2014	Neg	0	<i>L. whitmani</i>	7	87,5%	2,1	8
<b>TOTAL</b>							<b>1150</b>	<b>75,56%</b>	<b>50,5</b>	<b>1522</b>

Fonte: o autor, 2015.



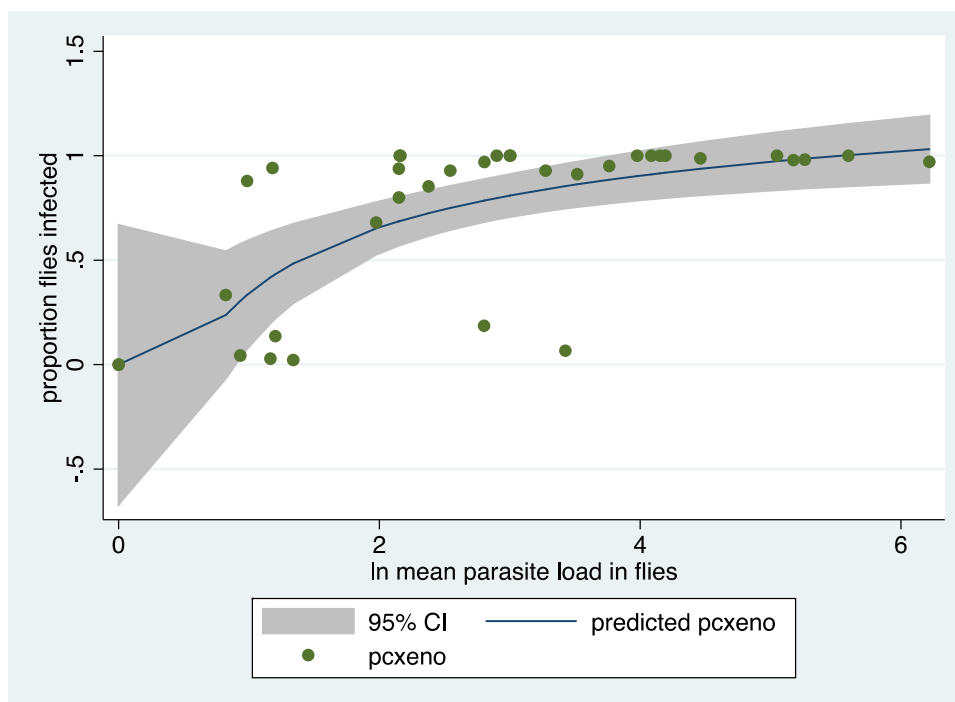
Na análise dos resultados de flebotomíneos infectados nos xenodiagnósticos, a probabilidade de *L. whitmani* ser infectado num ensaio, em relação a proporção de flebotomíneos positivos, foi positivamente associado com a quantidade média de DNA do parasito detectado por qPCR nos flebotomíneos testados ( $z = 17,6$ ,  $P < 0,001$ ). (de Spearman  $r = 0,303$ ,  $p = 0,040$ ) (Tabela 16, Gráfico 6).

**Tabela 16.** Análise da proporção de *L. whitmani* positivos nos xenodiagnósticos

	Odds Ratio	Desvio padrão	Z	p-valor	95%	Intervalo de confiança
Inxeno	1.026402	.0584508	17.56	0.000	.9118402	1.140963
Iposneg	.8316986	.2015293	4.13	0.000	.4367085	1.226689
cons	-2.453827	.2511360	-9.77	0.000	-2.946045	-1.96161

Fonte: o autor, 2015.

**Gráfico 6.** Proporção de *L. whitmani* positivos nos xenodiagnósticos



Fonte: o autor, 2015.

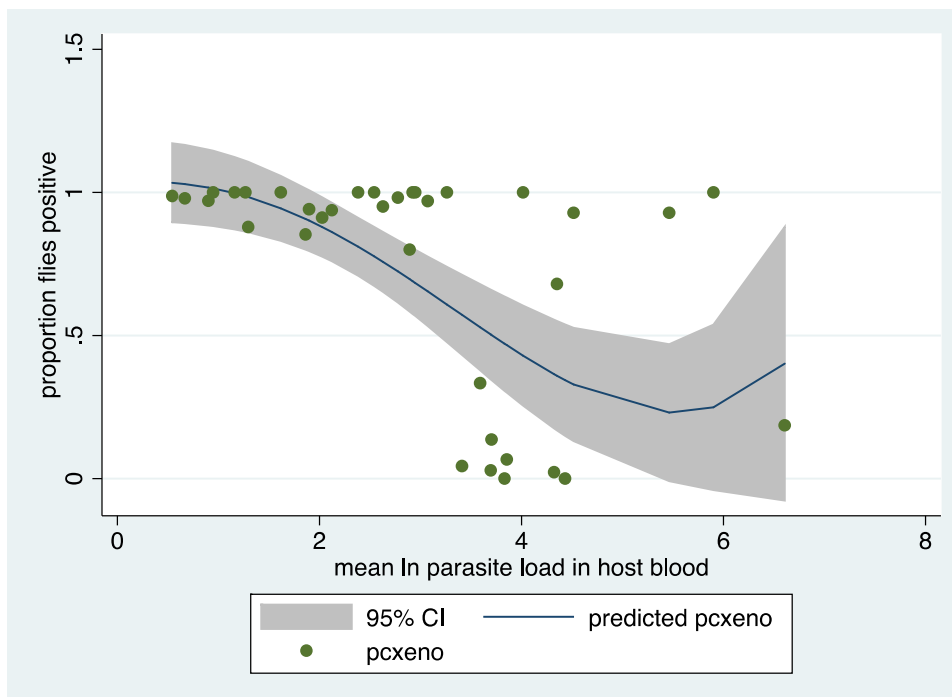
Considerando a probabilidade de infecção de fêmeas de *L. whitmani* nos xenodiagnósticos com a carga parasitária dos roedores no momento dos ensaios, essa associação foi negativa ( $z = -15.62$ ,  $P < 0.001$ ) (Tabela 17, Gráfico 7).

**Tabela 17** - Análise da associação entre carga parasitária dos roedores e fêmeas de *L. whitmani* infectadas no xenodiagnóstico.

	Odds Ratio	Desvio padrão	Z	p-valor	95%	Intervalo de confiança
Inload	-1.060548	.0678751	-15.62	0.000	-1.19358	-.9275148
lposneg	3.7478610	.2721677	13.77	0.000	3.214422	4.2813000
cons	.5505331	.1412710	3.90	0.000	.273647	.8274192

Fonte: o autor, 2015.

**Gráfico 7.** Associação entre carga parasitária dos roedores e fêmeas de *L. whitmani* infectadas no xenodiagnóstico



Fonte: o autor, 2015.

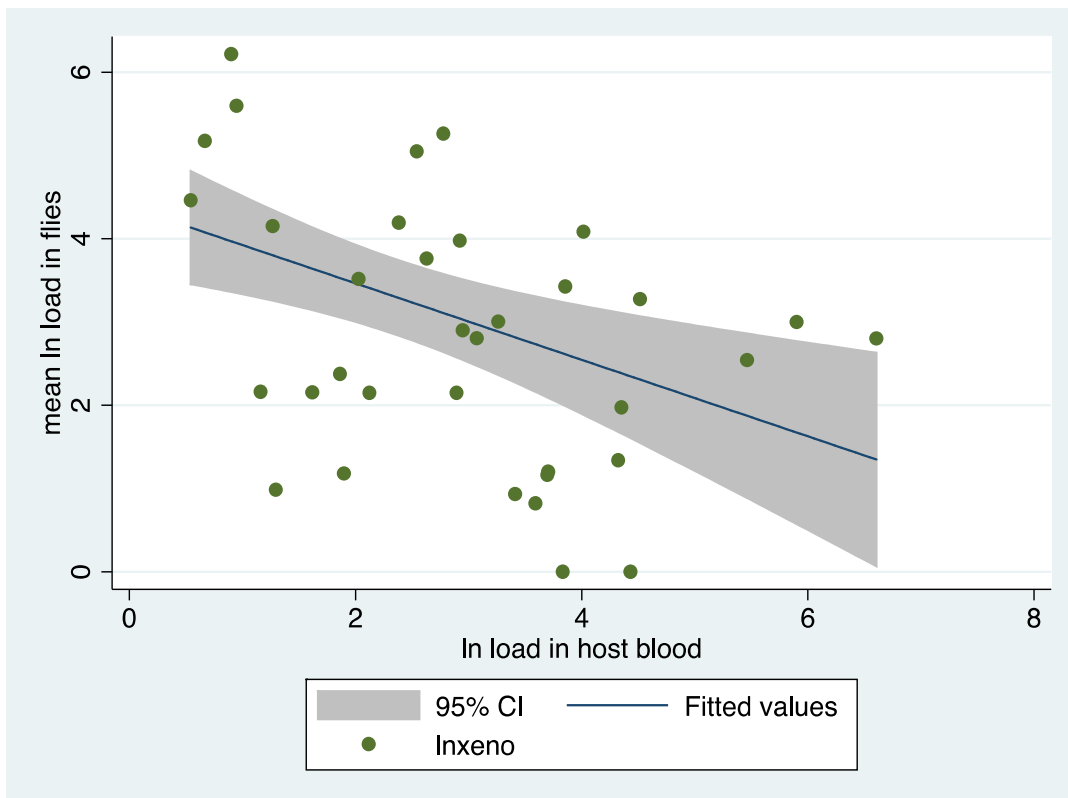
Considerando a associação entre a média (ln) de carga de infecção em *L. whitmani*, com o estado de carga (ln) de infecção no sangue do animal no momento da xenodiagnóstico, foi negativa a associação com pouca correlação ( $z = -2,32$ ,  $P = 0,02$ ). (Tabela 18 e Gráfico 8).

**Tabela 18.** Associação entre a média (ln) de carga de infecção em *L. whitmani*, com o estado de carga (ln) de infecção no sangue do animal no momento da xenodiagnóstico.

	Odds Ratio	Desvio padrão	Z	p-valor	95%	Intervalo de confiança
Inload	-.414209	.1784986	-2.32	0.020	-.7640598	-.0643581
Iposneg	1.44846	.752539	1.92	0.054	-.0264889	2.92341
cons	2.627319	.4682119	5.61	0.000	1.70964	3.544997

Fonte: o autor, 2015.

**Gráfico 8.** Associação entre a média (ln) de carga de infecção em *L. whitmani*, com o estado de carga (ln) de infecção no sangue do animal no momento da xenodiagnóstico.



Fonte: o autor, 2015.

Na análise dos ensaios realizados com fêmeas de *L. longipalpis* a probabilidade das fêmeas infectarem-se nos xenodiagnóstico foi negativamente correlacionada com a média de parasitos (fg) detectados por qPCR ( $z = -2,19$ ,  $p = 0,028$ ). (Tabela 19). Não houve associação entre flebotomíneos infectados com a carga de infecção do animal ( $= -7,90$ ,  $P < 0,001$ ). (Tabela 20)

**Tabela 19.** Análise da proporção de *L. longipalpis* infectados nos xenodiagnósticos em relação à média de parasitos (fg).

	Odds Ratio	Desvio padrão	Z	p-valor	95%	Intervalo de confiança
Inxeno	.266185	.1213586	-2.19	0.028	-.5040434	-.0283265
Iposneg	-1.433798	.4224539	-3.39	0.001	-2.261792	-.6058034
cons	2.70946	.4597873	5.89	0.000	1.808293	3.610626

Fonte: o autor, 2015.

**Tabela 20.** Análise da proporção de *L. longipalpis* infectados nos xenodiagnósticos em relação à carga de infecção no roedor.

	Odds Ratio	Desvio padrão	Z	p-valor	95%	Intervalo de confiança
Inload	-.508031	.0643208	-7.90	0.000	-.6340974	-.3819645
Iposneg	.1803261	.4570846	0.39	0.693	-.7155432	1.076195
cons	2.065455	.3538299	5.84	0.000	1.371961	2.758949

Fonte: o autor, 2015.

Comparando os resultados dos xenodiagnósticos realizados com as diferentes espécies de flebotomíneos utilizadas (*L. longipalpis* e *L. whitmani*) em associação com as espécies de roedores *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus*, não foi observada diferença significativa com p-valor >0,05 em ambas análises. (Tabelas 21 e 22, Gráfico 9). Também não foi verificada diferença entre as médias de carga parasitária nos flebotomíneos infectados em relação à espécie do roedor p-valor >0,05 em ambas análises. (Gráfico 10)

**Tabela 21.** Análise da probabilidade *Nectomys squamipes* infectar flebotomíneos (*L. longipalpis* ou *L. whitmani*) nos xenodiagnósticos (z=0.01, P=0.994).

	Odds Ratio	Desvio padrão	Z	p-valor	95%	Intervalo de confiança
Lfly	21.001733	.2135361	0.01	0.994	.6596362	1.521248
Inload	.57449	.0216034	-14.74	0.000	.5336709	.6184313
cons	11.15826	2.885193	9.33	0.000	6.722045	18.52217

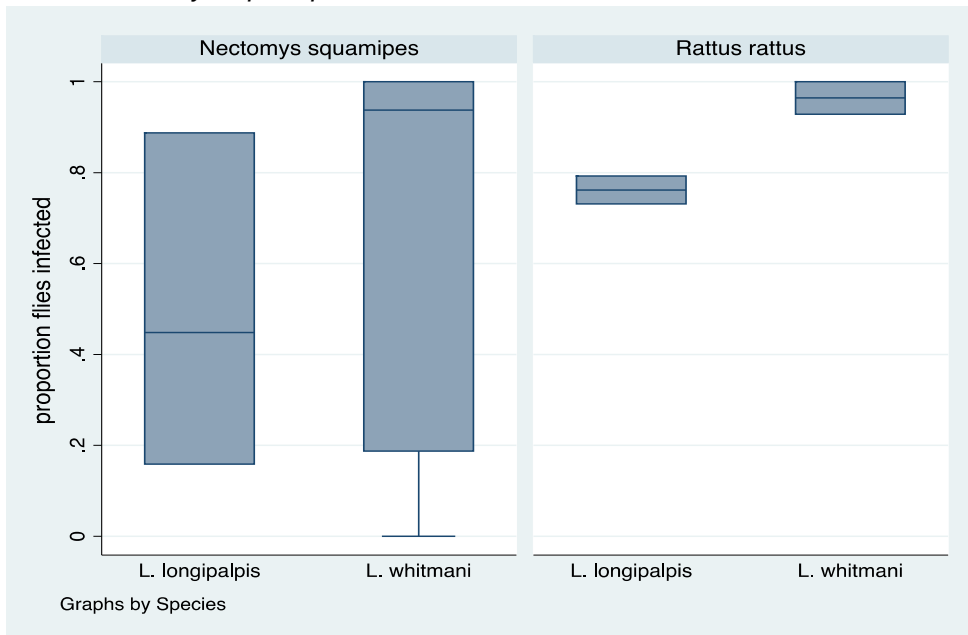
Fonte: o autor, 2015.

**Tabela 22.** Análise da probabilidade *Rattus rattus* infectar flebotomíneos (*L. longipalpis* ou *L. whitmani*) nos xenodiagnósticos (z=-0.84, P=0.399).

	Odds Ratio	Desvio padrão	Z	p-valor	95%	Intervalo de confiança
Lfly	2.0101147	.0551222	-0.84	0.399	2.32e-07	440.2871
Lnload	16.1155	38.49361	1.16	0.245	.1492993	1739.522
Cons	.0046894	.0259878	-0.97	0.333	8.99e-08	244.532

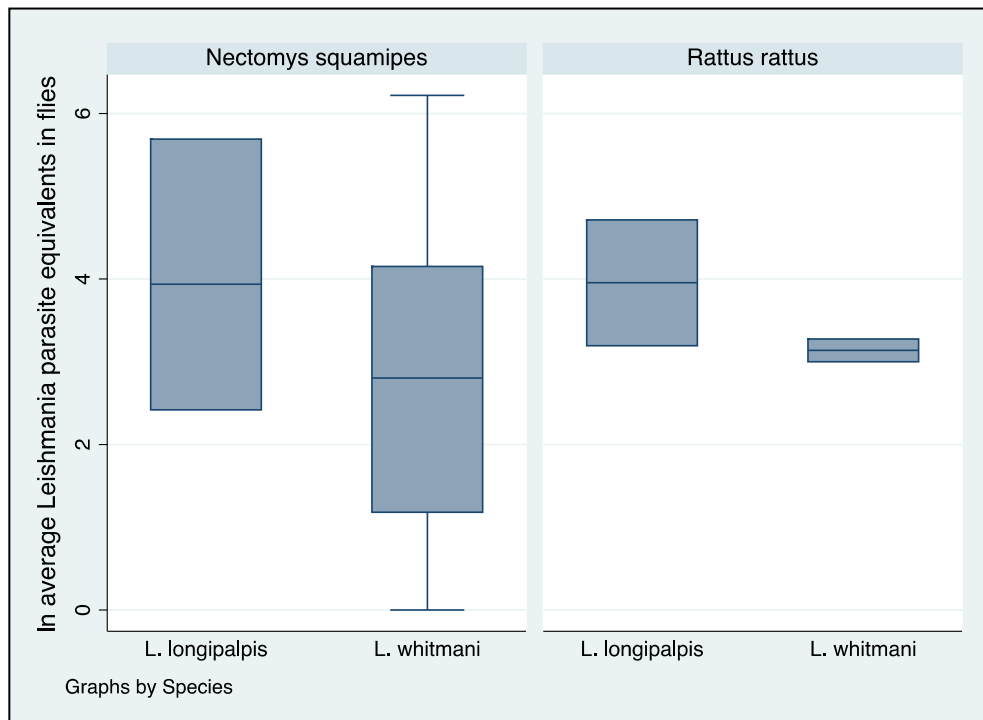
Fonte: o autor, 2015.

**Gráfico 9.** Propabilidade de infecção de flebotomíneos em xenos realizados com *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus*



Fonte: o autor, 2015.

**Gráfico 10.** Média das cargas parasitárias de flebotomíneos infectados nos xenodiagnósticos realizados com *Nectomys squamipes* ( $z=-1.29$ ,  $P=0.196$ ) e *Rattus rattus*. ( $z=-0.17$ ,  $P=0.866$ ).



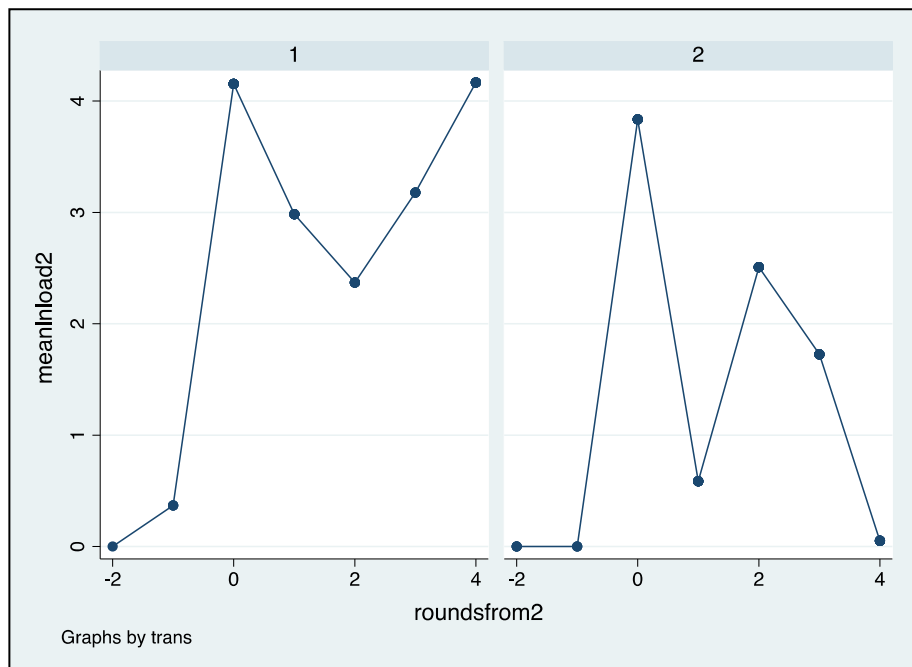
Fonte: o autor, 2015.

## 7.5 Avaliação da interrupção de exposição à transmissão em roedores

Entre março/2015 e julho/2015, foram coletadas amostras sangue e pele de 13 animais pertencentes a quatro espécies diferentes (5 *Nectomys squamipes*, 4 *Necromys lasiurus*, 3 *Akodon arviculoides* e 1 *Rattus rattus*) para avaliação da infecção por *Leishmania (Viannia)* spp., através da qPCR, e, para comparação com resultados de infecção de roedores que permaneceram expostos a infecção. Todas as amostras de pele dos animais foram negativas.

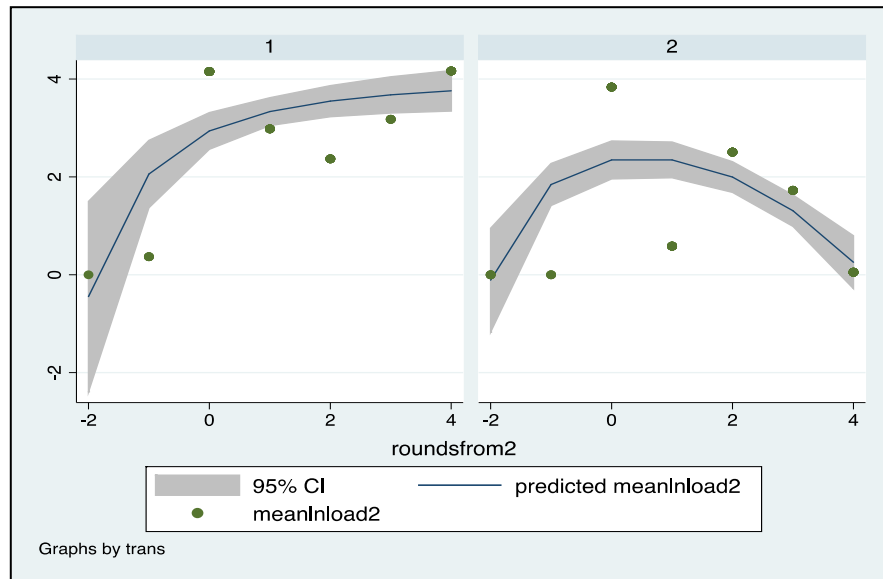
Analisando as médias das cargas parasitárias em sangue, verificou-se um aumento significativo ao longo do tempo das cargas em roedores mantidos no campo. No entanto houve uma diminuição significativa em cargas com o tempo após os roedores serem translocados para o laboratório ( $z = -4,18$ ,  $p < 0,001$ ), em comparação com aqueles que permaneceram no campo sob condições de exposição natural ( $z = -2,19$ ,  $p = 0,028$ ). (Gráficos 11 e 12)

**Gráfico 11.** Evolução das cargas parasitárias de roedores com exposição contínua e com interrupção da exposição à transmissão.



**Fonte:** o autor, 2015.

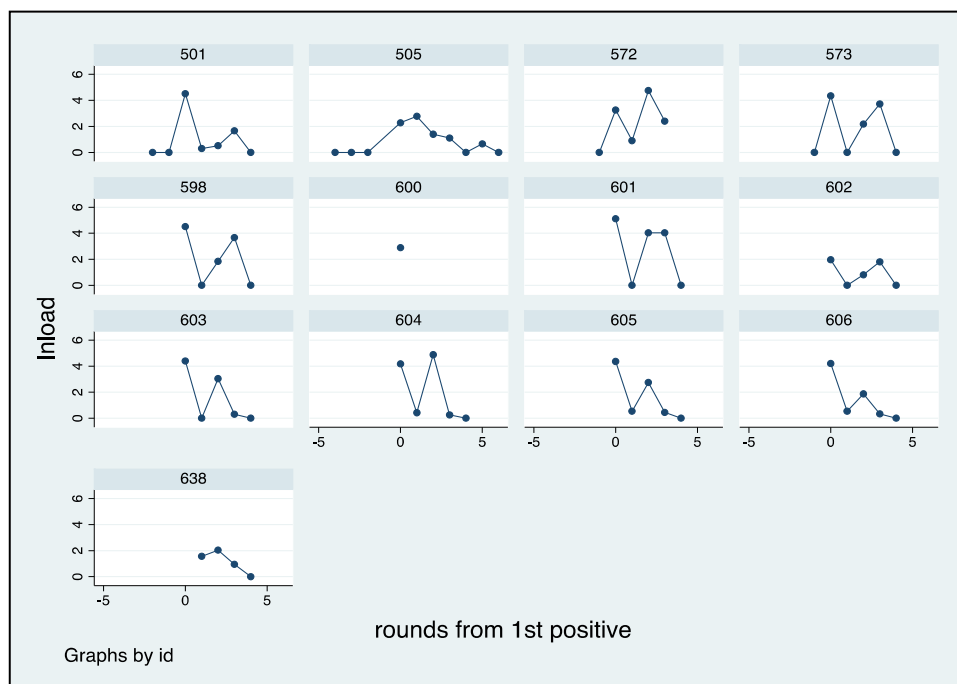
**Gráfico 12.** Dispersão das cargas parasitárias de roedores com exposição contínua e com interrupção da exposição à transmissão.



**Fonte:** o autor, 2015.

Considerando os resultados a partir da 1ª detecção de infecção nos animais, foram observados desvios destas tendências médias entre os animais, embora, em todos, tenha se verificado diminuição das cargas parasitárias. (Gráfico 13)

**Gráfico 13.** Evolução das cargas parasitárias dos roedores com interrupção da transmissão após detecção da infecção por *Leishmania (Viannia) spp.*



**Fonte:** o autor, 2015.

## 8 DISCUSSÃO

Alguns estudos realizados em todo o mundo, têm demonstrado a importância de se identificar e caracterizar nas diferentes regiões endêmicas, os hospedeiros reservatórios que participam dos ciclos de transmissão das leishmanioses, fazendo com que, em muitas regiões, a prevalência da infecção, e, principalmente da doença, persista em populações (KAWA; SABROZA, 2002; MONTEIRO *et al.*, 2008). Essa persistência tem impulsionado grupos de pesquisa a investigar e tentar elucidar quem são os agentes etiológicos, os vetores e reservatórios envolvidos nos diversos ciclos de transmissão para LTA.

No Brasil, grupos de pesquisa tem trabalhado com o objetivo de identificar quais de fato são os reservatórios silvestres da *L. (V.) braziliensis*, no entanto nessa incriminação carece de resultados conclusivos. A diversidade de *Leishmania* spp. e flebotomíneos envolvidos nas diferentes áreas endêmicas, resulta numa grande variedade de hospedeiros vertebrados naturalmente infectados envolvidos, indicando diferenças nos padrões de transmissão no Brasil.

Obter conhecimentos aprofundados sobre a ecologia e epidemiologia das leishmanioses são de suma importância para o gerenciamento e planejamento de controle da doença. A pesquisa ecoepidemiológica é um componente importante para o combate contra a doença. Vários achados ecopidemiológicos e, incluindo dados sobre a antropofilia e a infecção natural de flebotomíneos com a mesma espécie de *Leishmania* encontrada em pacientes sugere a incriminação catagórica dessas espécies de flebotomíneos como vetor (KILLICK-KENDRICK, 1990; OSHAGHI *et al.* 2009b) .

Nossos achados em relação à fauna de roedores silvestres e sinantrópicos encontrada em Amaraji, Zona da Mata Sul de Pernambuco, evidenciam o importante papel dos roedores na transmissão. Os resultados obtidos corroboram com outros estudos realizados na região, apresentando como principais espécies, *N. squamipes*, *R. rattus* e *N. lasiurus*. Entretanto, em nosso estudo, destacamos o aparecimento da espécie *Oxymycterus angularis*, sendo a quarta principal espécie capturada, não evidenciada em estudos anteriores em Amaraji, Zona da Mata Sul (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003), e em estudos na Zona da Mata Norte de Pernambuco (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; , LIMA *et al.*, 2013; MARINHO-JÚNIOR, 2010).



Além da diversidade na fauna roedores, foi verificada uma importante taxa de infecção nas espécies *N. squamipes* e *N. lasiurus*, quando comparada a *R. rattus*, indicando probabilidades maiores de encontrar infecção nas espécies silvestres, em relação à espécies sinantrópicas. Esses achados corroboram com evidências anteriores (ANDRADE, 2010; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2013; MARINHO-JÚNIOR, 2010) que também apontaram os roedores silvestres como prováveis reservatórios primários, e, *R. rattus*, como provável reservatório secundário. Por outro lado, Svobodová *et al.* (2003), avaliando a persistência parasitária de *Leishmania tropica* em *R. rattus*, em estudo realizado na Turquia, verificou que, após 24 meses de um inóculo experimental, essa espécie ainda era infectiva aos flebotomíneos. Gradoni *et al.* (1983), em estudo realizado na região de Tuscany na Itália, analisando a persistência parasitária de *R. rattus*, evidenciou essa persistência mesmo em baixas parasitemias de *L. infantum*.

Diversos estudos têm demonstrado a importância do roedor sinantrópico *R. rattus*, como provável hospedeiro reservatório de espécies de *Leishmania* (BRANDÃO-FILHO, 2001; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1994, 2003; FERREIRA, *et al.*, 2015; HELHAZAR *et al.*, 2013; LAINSON; SHAW, 1979; LIMA *et al.*, 2013; MARINHO-JÚNIOR, 2010; VASCONCELLOS *et al.*, 1994). Em estudo realizado na região urbana de Belo Horizonte-MG, Ferreira *et al.* (2015), verificou alto índice de infecção desta espécie por *Leishmania*, além de detectar *R. rattus* co-infectado por *L. donovani* e *L. braziliensis*. Na Zona da Mata Norte de Pernambuco, município de São Vicente Férrer, Lima *et al.* (2013) detectou co-infecção por *Leishmania* do subgênero *Viannia* e *L. (L.) chagasi* em *R. rattus*, evidenciando sua importância no ciclo de transmissão daquela região.

Os resultados obtidos neste estudo principalmente referentes à infecção natural, à infecciosidade, predominância na fauna de roedores, reforçam que os roedores silvestres das espécies *N. squamipes* e *N. lasiurus*, possivelmente atuam como reservatórios primários no ciclo de transmissão, corroborando essas evidências com outros estudos que também já apontaram *N. squamipes* (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2013; MARINHO-JÚNIOR, 2010; PETERSON *et al.*, 1988) e *N. lasiurus* (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; CARDOSO *et al.*, 2015; DE FREITAS *et al.*, 2012; MARINHO-JÚNIOR, 2010) como hospedeiros reservatórios primários de *L.(V) braziliensis*.

Também encontrado com infecção natural, a espécie *Hollochillus sciureus* pode ser apontada como potencial hospedeiro reservatório participante do ciclo de transmissão da LTA. Estudos anteriores na Zona da Mata de Pernambuco detectaram exemplares com infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp. (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2013; MARINHO-JÚNIOR, 2010). Embora outras espécies não tenham sido encontradas infectadas por *Leishmania* em nosso estudo, não se descarta a participação dessas na transmissão, visto que, exemplares do gênero *Olygoryzomys* (TELLERIA *et al.*, 1999), bem como da espécie *Oryzomys subflavus*, possuem relatos de infecção natural por *Leishmania* spp. em outras áreas endêmicas do Brasil (FORATINNI *et al.*, 1973; LAINSON *et al.*, 1981; LAINSON; SHAW, 1989; OLIVEIRA, *et al.*, 2005a).

Com relação aos espécimes do gênero *Akodon*, alguns estudos já descreveram exemplares deste gênero como infectados naturalmente por *Leishmania* spp (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; FORATINNI *et al.*, 1972), o que indica uma provável participação de espécies desse gênero no ciclo de transmissão da LTA. Quanto aos marsupiais pertencentes aos gêneros *Didelphis*, *Marmosa* e *Monodelphis*, embora tenham-se capturados poucos exemplares e, não tenhamos realizado estudos com estes animais, não se descarta uma possível participação destes no ciclo de transmissão, principalmente, relacionado ao ciclo peridomiciliar, tendo em vista que outros estudos evidenciaram animais destes gêneros infectados naturalmente por *L. (V.) braziliensis* (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; LAINSON; SHAW, 1973; LIMA *et al.*, 2013; QUARESMA *et al.*, 2011).

Destaca-se a relevante participação na fauna, bem como, o importante índice de infecção natural (16,3%) por *Leishmania (Viannia)* spp no roedor *Oxymycterus angularis*, que aponta esta espécie silvestre como provável hospedeiro reservatório envolvido no ciclo de transmissão da LTA. Essa espécie possui distribuição pelo extremo leste do Brasil sendo encontrada em Alagoas, Ceará e Pernambuco. (MUSSER, CARLETON, 2005; PATTON *et al.*, 2015). Relatos de infecção pelo tripanossomatídeo *Trypanosoma cruzi* foram descritos em *Oxymycterus judex*, demonstrando que espécimes do mesmo gênero *Oxymycterus*, podem ser reservatórios naturais de agentes causadores de doenças em humanos (OLIVEIRA *et al.*, 2005b; PEÇANHA, 2015). Esse achado constitui primeiro relato de infecção por *Leishmania (Viannia)* spp. descrito em *O. angularis* na mesorregião da Zona da Mata Sul de Pernambuco.

Com relação ao índice de infecção natural apresentado nos roedores (29,2%), importante destacar a técnica utilizada, a qPCR, que se trata de um método de diagnóstico mais sensível e específico, tornando-se importante ferramenta para realização de estudos com reservatórios, tendo em vista, que, em reservatórios, via de regra, detectam-se baixas parasitemias (PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2013).

Para comparar a confiabilidade de qPCR de amostras de sangue como método potencial de xenodiagnóstico (potencial de transmissão para flebotomíneos), foi aplicado qPCR para kDNA extraído de amostras de sangue total periférico e fêmeas de *L. whitmani* alimentadas imediatamente após alimentação no xenodiagnóstico. Os resultados indicam uma associação positiva significativa entre os equivalentes de parasitas por ml de sangue e por flebotomíneo, embora com fraca correlação. A detecção do parasita por qPCR do tecido da pele da orelha provou ser de pouca sensibilidade neste estudo. Esses animais, como típicos de pequenos mamíferos hospedeiros naturalmente infectados com *L. braziliensis*, eram assintomáticos. Isso difere da forma clínica de outros modelos animais, como na leishmaniose visceral em cães, onde as cargas parasitárias em pele são detectadas para verificar o limiar de infecciosidade para flebotomíneos (COURTENAY, 2014). Em hospedeiros de *L. tropica*, a correlação foi melhor, mas não confiável (VOLF *et al.*, 2003). Os resultados do presente estudo sugerem que qPCR pode não ser um marcador alternativo viável da infecciosidade em estudos de transmissão utilizando amostras de pele.

O xenodiagnóstico realizado em dois hospedeiros com infecção natural (*N. squamipes* e *Rattus rattus*) utilizando o vetor incriminado na região *L. whitmani* (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003) e com *L. longipalpis*, confirmam que roedores naturalmente infectados podem ser infecciosos para *L. longipalpis*. Os resultados também sugerem que existe uma probabilidade semelhante para cada espécie de um flebotomíneo ser infectado por cada espécie de roedor, pelas médias estimadas de cargas parasitárias no sangue e que a carga média de infecção das espécies de flebotomíneos são semelhantes.

Nossos resultados apontam que em futuros experimentos, animais devem ser utilizados para infectar cada uma das espécies de vetores, o que neste estudo foi limitante devido a falta uma colônia de *L. whitmani*. Neste estudo, não obtivemos roedores alimentados em ambos os vetores. *L. whitmani* coletados no campo, enquanto que *Lu longipalpis* foram da colônia estabelecida em nosso insetário no

CPqAM/Fiocruz com exemplares coletadas em Passira, área endêmica de Pernambuco. A proporção de *L. whitmani* naturalmente infectados foi de 5,4% (15/280), estimado em exemplares não alimentados dos xenodiagnósticos. Como já observado em outros estudos, a proporção de flebotomíneos naturalmente infectados é baixa, mesmo em áreas de endemicidade de LTA (GALATI *et al.*, 1996, OLIVEIRA-PEREIRA *et al.*, 2006).

Avaliando a interrupção da exposição à transmissão, obtivemos resultados que indicam que roedores naturalmente infectados tendem a diminuir a parasitemia quando protegidos de nova exposição à transmissão, diferentemente do observado com roedores mantidos no campo que, provavelmente, ao se re-infectarem tendem a manter níveis de parasitemia mais elevados. Estes dados indicam que estudos laboratoriais envolvendo um único inóculo experimental podem não ser um bom modelo para estudos com hospedeiros reservatórios de *L.(Viannia) braziliensis*. Nossos achados diferem dos estudos de laboratório recentes que mostraram cura espontânea (ANDRADE, 2010). Em contraste com esse estudo, não observamos quaisquer lesões clínicas nos 603 animais de campo, e, nos 13 roedores mantidos em laboratório. Esses resultados corroboram com achados de Lainson e Shaw (1992) e, com os achados de Lainson, Shaw e Pova (1981) que apontam um caráter benigno da infecção em reservatórios.

Nestes casos, a infecciosidade do hospedeiro vertebrado ao vetor, portanto, não estaria ligada para a fase sintomática da infecção. Essa falta de correlação entre os sintomas clínicos e infecciosidade para flebotomíneos foi relatado anteriormente para *L. infantum* em estudo com cães em área endêmica para leishmaniose visceral na Ilha de Marajó, Pará (COURTENAY *et al.*, 2002). Em outra avaliação da infectividade de *L. infantum* para *P. perniciosus*, verificou-se que era independente da extensão dos sintomas no hospedeiro. Em um grupo assintomático, três de cinco cães foram infectivos para flebotomíneos (COURTENAY *et al.*, 2002). Esses achados corroboram com nossos resultados, que indicam que não há correlação entre a carga parasitária do roedor e a proporção de infecção dos flebotomíneos.

Cada vez mais tem-se verificado que técnicas moleculares baseadas em PCR têm sido empregadas para incriminação de flebotomíneos vetores (OSHAGHI *et al.* 2009a, 2009b, RASSI *et al.* 2009). Esta técnica altamente sensível tem sido usado para detectar *Leishmania* em flebotomíneos em várias áreas endêmicas do mundo,

como o Irã e a Índia (AZIZI *et al.*, 2006; DE BRUIJN; BARKER, 1992; MUKHERJEE *et al.*, 1997; OSHAGHI *et al.*, 2008, 2009a, 2009b; RASSI *et al.* 2006, 2007).

No que se refere a localidade, embora tenhamos realizados mais capturas nas localidades do engenho Raiz de Dentro em relação a Refrigério, as análises estatísticas apontam que em Raiz de Dentro a probabilidade de encontrar roedores naturalmente infectados é aumentada em mais de 11 vezes pelo índice Odds Ratio (=11,294). Esse resultado indica que Raiz de Dentro pode ser uma área “hot spot” de transmissão.

Sabe-se que a detecção de infecção natural por *Leishmania* spp. em um roedor é uma forte evidência para suspeitá-lo como um hospedeiro reservatório, porém isto não é suficiente para incriminá-lo. De acordo com Ashford (1996), considera-se reservatório a espécie ou o conjunto de espécies que garantem a circulação de um determinado parasito na natureza dentro de um recorte de tempo e espaço. Para se definir uma determinada espécie como reservatório, é necessário estabelecer também certos parâmetros, como a distribuição geográfica do hospedeiro e do parasito dentro da área de distribuição da espécie do hospedeiro, e a dinâmica populacional das espécies durante um recorte de tempo, necessitando de estudos longitudinais para identificar os efeitos de um determinado parasito na população e/ou indivíduo, sua flutuação sazonal, e estabilidade da infecção e a transmissibilidade.

A dificuldade de se estabelecer medidas efetivas de controle da LTA é, sobretudo, resultado de uma complexa associação desta endemia, relacionada com as diferentes manifestações clínicas, as limitações da terapêutica existente e à diversidade de vetores e reservatórios envolvidos nos ciclos de transmissão, nas diferentes regiões estudadas. Essa dificuldade torna-se ainda mais clara, no que se refere à LTA causada por *L. (V.) braziliensis*, espécie presente em todas as regiões brasileiras, que tem apresentado a cada região estudada distintos padrões de transmissão.

## 9 CONCLUSÕES

- a) Os resultados indicam os roedores *Nectomys squamipes* e *Necromys lasiurus* como prováveis hospedeiros reservatórios primários do ciclo de transmissão da LTA, bem como, *Rattus rattus* – roedor sinantrópico – como hospedeiro reservatório secundário do ciclo de transmissão da LTA;
- b) A infecção natural por *Leishmania (Viannia)* spp. detectada na espécie *Oxymycterus angularis* constitui primeiro relato de infecção nessa espécie, indicando probabilidade desta atuar como hospedeiro reservatório no ciclo de transmissão da LTA;
- c) A detecção de kDNA de *Leishmania (Viannia)* spp. nas amostras de DNA dos espécimes dos flebotomíneos analisadas por PCR em tempo real, indicam que os roedores naturalmente infectados provavelmente atuam como hospedeiros reservatórios no ciclo de transmissão da LTA;
- d) Os resultados dos xenodiagósticos confirmam que *Lutzomyia longipalpis* como vetor permissivo à infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*;
- e) A localidade de Engenho Raiz de Dentro apresenta probabilidade 11,294 vezes maior de infecção em roedores quando comparada ao Engenho Refrigério;
- f) A contínua exposição à transmissão contribui para a manutenção de níveis de parasitemia em roedores.

## REFERÊNCIAS

- AFONSO, M. M. S. *et al.* Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (N.) intermedia* (Diptera, Psychodidae), vector of cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 1816-1820, 2005.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, p. 552-557, 2006.
- ANDERSON, R. M.; MAY, R. M.; ANDERSON, B. **Infectious diseases of humans: dynamics and control**. Oxford: Oxford University, 1992.
- ANDRADE, M. S. **Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana em centro de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil**. 2004. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2004.
- ANDRADE, M.S. **Avaliação da infecciosidade experimental de pequenos roedores silvestres e sinantrópicos como hospedeiros reservatórios de *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2010. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.
- ARIAS, J. *et al.* **Epidemiología y control de la leishmaniasis en las Américas, por país o territorio**. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1996. 52p. (Cuaderno tecnico, n. 44).
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia. v. 14, p. 523-532, 1996.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, p. 1269-1281, 2000.
- BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. São Paulo. v.7, n.3, p. 328-337, 2004.
- BRANDÃO-FILHO S.P. *et al.* American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: Eco-epidemiological aspects in 'Zona da Mata' region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 89, p. 445-449, 1994.
- BRANDÃO-FILHO, S.P. *et al.* Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London. v. 93, p. 488-494, 1999.
- BRANDÃO-FILHO, S.P. **Ecoepidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis* na Zona da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil**. 2001. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BRANDÃO-FILHO, S.P. *et al.* Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brasil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. London. v. 97, p. 291-296, 2003.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; SHAW, J.J. Molecular tools versus parasite isolation for evaluating the hosts of *Leishmania braziliensis*. **Trends in Parasitology**. Oxford. v. 22, n. 11, p. 500-501, 2006.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. atual. Brasília,DF: Ed. do Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2010. 444p.

BRAZIL, R. P.; RODRIGUES, A. A. F.; ANDRADE FILHO, J. D. Sand Fly Vectors of *Leishmania* in the Americas - A Mini Review. **Entomology, Ornithology & Herpetology**, Sunnyvale, v. 4, n. 2, 2015. Disponível em:<  
<http://www.omicsonline.org/open-access/sand-fly-vectors-of-leishmania-in-the-americas--a-mini-review-2161-0983-1000144.php?aid=48365>>. Acesso em: 23 ago. 2015.

BRITO, M.E.F.*et al.* Human cutaneous leishmaniasis due to a new enzymatic variant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* occurring in Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 88, p. 633-634, 1993.

BRITO, M.E.F. *et al.* Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. Washington. v.7, n.2, p.318-321, 2000.

BRITO, M. E. F. *et al.* Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical Medicine and International Health**. Oxford. v. 14, p. 1278-1286, 2009.

CARDOSO, R.M., *et al.*. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. **Parasites & Vectors**. London, v. 171. p. 1-8. 2015.

CARINI, A.; PARANHOS, U. Identification de "l'Ulcera de Bauru" avec le Bouton d'Orient. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris. v.2, p.255-257, 1909.

COURTENAY, O. *et al.* Epidemiology of canine leishmaniasis: a comparative serological study of dogs and foxes in Amazon Brazil. **Parasitology**, London, v. 109, p. 273-279, 1994.



COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J.; CHALMERS, W.S.K. Contact rates between wild and domestic canids: no evidence of parvovirus or canine distemper virus in crab-eating foxes. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam. v.81. p.9-19. 2001.

COURTENAY, O. *et al.* Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. **Parasitology**. London. v. 125, p. 407-414. 2002a.

COURTENAY, O. *et al.* Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **Journal of Infectious Diseases**. Chicago. v.186, p.1314-1320. 2002b.

CRUZ, M. A. *et al.* Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 84, p. 19-28, 1989.

CUBA-CUBA, C. A. *et al.* A focus of mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia, Brazil: characterization and identification of *Leishmania* stocks isolated from man and dogs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 79, p. 500-507, 1985.

DE BRUIJN, M.; BARKER, D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 52, p. 45-58, 1992.

DE FREITAS, T.P. *et al.* Natural infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Mus musculus* captured in Mato Grosso, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis**. Larchmont. v.12, p.81-83. 2012.

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

DEANE, M.P.; DEANE, L.M. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de Calazar, no Ceará. **Hospital**. Rio de Janeiro. v.4. p.: 79-98. 1955.

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

DYE, C. *et al.* Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basic reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. **Parasitology**. London. v. 105, n. 01, p. 35-41, 1992.

DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiology and Infection**. Cambridge. v. 110, n. 3, p. 647-656, 1993.

FALQUETO, A. *et al.* Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado de Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 81, p. 155-163, 1986.

FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L. Reservatórios e Transmissão de Leishmânias. *In*: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 739-752.

FERREIRA, E.C. *et al.* Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. **BMC Veterinary Research**. London. v.11, n. 71, p.1-7. 2015.

FORATTINI, O.P. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo. v. 2, p. 195-203, 1960.

FORATTINI, O.P. *et al.* Infecção natural de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo. v.6, p.255-261, 1972.

FORATTINI, O.P. *et al.* Nota sobre infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo. v.7, p. 181-184. 1973.

FREITAS, T.P.T. **A Ecoepidemiologia das Leishmanioses: levantamento de flebotomíneos em Cuiabá e investigação quanto a participação de roedores e marsupiais em Rondonópolis, Mato Grosso**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2010.

GALATI, EAB *et al.* Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar no Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo. v.30, n.2, p. 115-128. 1996.

GARCEZ, L.M. *et al.* Etiology of cutaneous leishmaniasis and anthropophilic vectors in Juruti, Pará State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.25, n.10, p. 2291-2295, 2009.

GARRETT-JONES, C. Prognosis for the interruption of malaria transmission through the assessment of the mosquito's vectorial capacity. **Nature**. London. v.204. p.1173-1175. 1964.

GONTIJO, C.M.F. *et al.* Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta Tropica**. Amsterdam. v. 81, p. 143-150, 2002.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Uberaba, v. 36, p.71-80, 2003.

GRIMALDI-Jr., G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington. v. 6, p. 230-250, 1993.

GUIMARÃES, F. N.; AZEVEDO, M.; DAMASCENO, R. Leishmaniose tegumentar - zoonose de roedores silvestres na Amazônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 66, n.2, p. 151-168, 1968.

HASIBEDER, G.; DYE, C.; CARPENTER, J. Mathematical modelling and theory for estimating the basic reproduction number of canine leishmaniasis. **Parasitology**. London. v. 105, n. 01, p. 43-53, 1992.

HAYDON, D.T. *et al.* Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. **Emerging Infectious Diseases**. Atlanta. v.8. p. 1468-1473, 2002.

HELHAZAR *et al.* Natural infection of synanthropic rodent species *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra – Portugal **Parasites & Vectors**. London. 6:88, 2013.

HERRER, A.; CHRISTENSEN, H. A.; BEUMER, R. J. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis among Panamanian forest mammals. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Baltimore. v. 22, p. 585-591, 1973.

HERRER, A.; CHRISTENSEN, H. A. Infrequency of gross skin lesions among Panamanian forest mammals with cutaneous leishmaniasis. **Parasitology**. London. v. 71, p. 87-92, 1975.

HERTIG, M.; FAIRCHILD, G. B.; JOHNSON, C. M. Leishmaniasis transmission-reservoir project. **Annual report / Gorgas Memorial Laboratory**, Washington, p. 9-11, 1957.

IBGE. Diretoria de Pesquisas. Coordenação de População e Indicadores Sociais. **Estimativas da população residente com data de referência 1º de julho de 2014**. Rio de Janeiro, 2014.

<[ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas\\_de\\_Populacao/Estimativas\\_2014/nota\\_metodologica\\_2014.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2014/nota_metodologica_2014.pdf)>. Acesso em: 23 ago. 2015.

KAWA, H., SABROZA, P.C. Espacialização da leishmaniose tegumentar na cidade do Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.18, n. 3, p.853-865, 2002.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**. Boston. v.4. p. 1-24. 1990.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Leishmanias and leishmaniasis fo the New World, with particular reference to Brazil. **Bulletin of the Pan American Health Organization**. Washington. v.7, p.1-19,1973.

LAINSON, R.; SHAW J. J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: LUMSDEN, W. H.R.; EVANS, D. (Ed.). **Biology of the Kinetoplastida**. London: Academic Press, 1979. v. 2, p. 1-116.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; POVOA, M. The importance of edendates (sloths, anteaters) as primary reservoirs of *Leishmania braziliensis guyanensis*, a causative agent of “pian bois” in north Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. London. v.75, p.611-612, 1981.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**. Paris. v.64, p.3-9, 1989.

LAINSON, R., SHAW, J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Ciência e Cultura**. São Paulo, v. 44, n. 2/3, p. 94-106, 1992.

LAINSON, R. *et al.* Amazonian visceral leishmaniasis-distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 85, n. 1, p. 135-137, 1990.

LAINSON, R. *et al.* Further observations on *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae), the sandfly vector of *Leishmania (Viannia) lainsoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 87, p. 437-439, 1992.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In: COLLIER, L.; BALOWS, A., SUSSMAN, M. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases**. London. 9. ed., v.5, p. 241-266. 1998.

LIMA, B.S. *et al.* Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in north-eastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. London. v. 107, p. 592-597, 2013.

LINDENBERG, A. L'ulcere de Bauru ou le bouton d'Orient au Brésil. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**. Paris. v.2, p.252-254, 1909.

MACDONALD, G. **The Epidemiology and Control of Malaria**. London: Oxford University, 1957.

MADEIRA, M. F. *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis* in naturally infected dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo. v. 36, p. 551-555, 2003.

MARINHO-JÚNIOR, J. F. **Infecção natural por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos envolvidos na manutenção da leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil**. 2010. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde

Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

MARZOCHI, M.C.A. Leishmanioses no Brasil: As leishmanioses tegumentares. **Jornal brasileiro de medicina**. Rio de Janeiro. v. 63, p. 82-104, 1992.

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

MELO, L. A. **Detecção de *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos no município de Belo Horizonte, MG**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2008.

MICHALICK, M. S. M.; NEVES, D. P.; MELO, A. L. Gênero leishmania. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**. 11ª Edição. São Paulo: Atheneu, p. 41-83, 2005.

MONTEIRO, W. M. *et al.* Distribuição geográfica e características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em áreas de colonização antiga do Estado do Paraná, Sul do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro. v. 24, n. 6, p.1291-1303, 2008.

MUSSER, G. G.; CARLETON, M. D. Superfamily Muroidea. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Ed.). **Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference**. 3. ed. Baltimore: John Hopkins University Press, v. 2, p. 894-1531, 2005.

NOYES, H.A. Implications of a neotropical origin of the genus *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 93, p. 657-663, 1998.

OLIVA, G., *et al.* Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington. v. 44, n. 4, p. 1318-1322, 2006.

OLIVEIRA, F. S. *et al.* PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**. Chichester. v. 129, p. 219-227, 2005a.

OLIVEIRA, J.A. *et al.* Ordem Rodentia. In: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; MARIÑO, H.F.; ROCHA, V.J. (Ed). **Mamíferos da Fazenda Monte Alegre - Paraná**. Londrina. Eduel: Editora da Universidade Estadual de Londrina, p.161-191, 2005b.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y.N. *et al.*, Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, Lutzomyia) por *Leishmania* sp na Amazônia maranhense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Rio de Janeiro. v. 39, n.6, p. 540-543, 2006.

- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Geographical distribution**. Geneve, 2015. Disponível em: <[www.who.int/emc/diseases/leish/leishgeo1.html](http://www.who.int/emc/diseases/leish/leishgeo1.html)> . Acesso em: 23ago 2015.
- OSHAGHI, M.A. *et al.* *Phlebotomus perfiliewi* transcaucasicus is circulating both *Leishmania donovani* and *L. infantum* in northwest Iran. **Experimental Parasitology**. East Lansing. v.123, p.218–225. 2009a.
- OSHAGHI, M.A. *et al.* Vector incrimination of sand flies in the most important visceral leishmaniasis focus in Iran. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Baltimore. v.81, p. 572–577. 2009b
- PAIVA-CAVALCANTI, M. *et al.* Quantitative real time PCR assays for the detection *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in animals and humans. **Molecular and Cellular Probes**. London. p. 1-7, 2013.
- PASSOS, V. *et al.* Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 88, p. 103-110, 1993.
- PATTON, J. *et al.* *Oxymycterus angularis*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2008**: e.T15783A5155068. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/15783/0>>. Acesso em: 25 ago. 2015.
- PEÇANHA, W. T. **Inferências filogenéticas do gênero *Oxymycterus* (Cricetidae: Sigmodontinae) de algumas localidades do Sul do Brasil, com base em seqüências de DNA mitocondrial**. 2015. Dissertação. (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.
- PETERSON, N. E. *et al.* Isolation of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from the rodent *Nectomys squamipes* captured in Bahia, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 83, n. supl. 1, p. 39, 1988.
- QUARESMA, P.F. *et al.* Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. London. v.105, p. 579–585. 2011
- QUINNELL, R.J. *et al.* The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. **Parasitology**. London. v.115. p.143-156. 1997.
- QUINNELL, R. J., COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, London. v. 136, n. 14, p. 1915-1934, 2009.
- REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence.

**American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** Baltimore. v. 61, p. 530-541, 1999.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. American cutaneous leishmaniasis in domestic dogs: an example of the use of the polymerase chain reaction for mass screening in epidemiological studies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** London. v. 96, suppl. 1, p. 123-126, 2002.

REITHINGER, R. *et al.* Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). **Journal of Clinical Microbiology.** Washington. v. 41, p. 1486-1493, 2003.

REY, L. Leishmaníases. In: \_\_\_\_\_. **Parasitologia Médica.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 227-239.

RODRIGUES, E.H.G. *et al.* Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in a area of endemicity in northeastern Brazil. **Journal of clinical microbiology.** Washington. v. 40, n. 10, p. 3572-3576, 2002.

ROQUE, A.L.R. *et al.* *Thrichomys laurentis* (Rodentia; Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: Patterns of Experimental Infection. **PLoS Neglected Tropical Disease**, San Francisco, v.4, n. 2, p.1-8, 2010.

SCHUBACH, T. M. P. *et al.* American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Transactions of the Royal Society and Tropical Medicine Hygiene**, London. v. 98, p. 165-167, 2004.

SHAW, J.J.; LAINSON, R. Ecology and epidemiology: New World. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.) **The Leishmaniasis in Biology and Medicine.** Academic Press Inc, London, v. I, p. 291-363, 1987.

SHAW, J.J. The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro. v. 102, p. 541-547, 2007.

SILVEIRA, F.T. *et al.* Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp.n., a new parasite from the State of Pará. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro. v. 82, p. 289-292, 1987.

SILVEIRA, F.T. *et al.* Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae), no Estado do Pará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** São Paulo. v. 33, p. 18-22, 1991.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina,** Belém, v. 22, n. 1, p. 9-20, 2008.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, Bombay, v. 49, n. 1, p. 55-60, 2003.

SILVA, O. *et al.* Leishmaniose visceral americana (LVA) no Município de São Vicente Ferrer, Estado de Pernambuco: Com o papel do cão doméstico como reservatório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 38, supl.1, Anais. p.402-403, 2005.

SOARES-BEZERRA, R.J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 40, p. 139-149, 2004.

SOLANO, P. *et al.* Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). **Acta tropica**, Amsterdam, v. 65, n. 3, p. 175-180, 1997.

VASCONCELOS, I.A.B. *et al.* The identity of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturite, Northeast Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 50, p. 158-164, 1994.

VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (*nota preliminar*). **Brasil-médico**. Rio de Janeiro, v.25, p.411, 1911.

WEIGLE, K.A. *et al.* Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: A comparison of seven methods. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v.36, n.3, p.489-496, 1987.

YOSHIDA, E. L. A. *et al.* Human, canine and Equine (*Equus calallus*) leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in the south-west region of São Paulo State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.85, p. 133-134, 1990.

YOUNG, D.; DUNCAN, M. **Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera:Psychodidae)**. Gainesville: Associated Publishers, 1994. 881p.



## ANEXO A - Parecer Comitê Ética em Uso com Animais – CEUA/FIOCRUZ-PE



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
 Fundação Oswaldo Cruz  
 Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

### Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/CPqAM)

Recife, 17 de outubro de 2011

Carta - Resposta

Projeto nº 17/2011

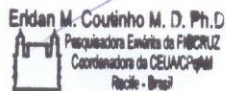
Ao pesquisador: **SINVAL PINTO BRANDÃO FILHO.**

Informo que o projeto **ESTUDOS INTEGRADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE HOSPEDEIROS RESERVATÓRIOS E FLEBOTOMÍNEOS VETORES ENVOLVIDOS NO CICLO ZOONÓTICO DAS LEISHMANIOSES EM ÁREA ENDÊMICA DE PERNAMBUCO E AVALIAÇÃO DE NOVAS ABORDAGENS PARA O DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO RÁPIDO.**

proposto por V.S. foi aprovado pela CEUA/CPqAM em reunião do dia 28/07/2011, seguindo, anexo o respectivo Certificado de Aprovação.

Cordialmente,

Dr.<sup>a</sup> Eridan Medeiros Coutinho  
 Coordenadora/CEUA/CPqAM.



Aprovado ( X )



Miraflores de Iguazú

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS


### Certificado de Aprovação

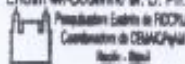
Certificamos que o Projeto intitulado: "ESTUDOS INTEGRADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE HOSPEDEIROS RESERVATÓRIOS E FLEBOTOMÍNEOS VETORES ENVOLVIDOS NO CICLO ZOONÓTICO DAS LEISHMANIOSES EM ÁREA ENDÊMICA DE PERNAMBUCO E AVALIAÇÃO DE NOVAS ABORDAGENS PARA O DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO RÁPIDO" protocolado sob o Nº 17/2011, coordenado pelo (a) pesquisador (a) Sinval Pinto Brandão Filho está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-CPqAM) em reunião 28/07/2011. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até mês de março 2015.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie - linhagem	Nº de Animais
Hamster	500/ano Macho adulto 100g
<b>TOTAL</b>	<b>500</b>

We certify that the project entitled "ESTUDOS INTEGRADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE HOSPEDEIROS RESERVATÓRIOS E FLEBOTOMÍNEOS VETORES ENVOLVIDOS NO CICLO ZOONÓTICO DAS LEISHMANIOSES EM ÁREA ENDÊMICA DE PERNAMBUCO E AVALIAÇÃO DE NOVAS ABORDAGENS PARA O DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO RÁPIDO" (CEUA Protocol Nº 17/2011), coordinated by SINVAL PINTO BRANDÃO FILHO according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz on July 28, 2011. In the present version this project is licensed and valid until March 2015.

Recife (PE, Brazil) October 17, 2011.

  
**Dra. Eridan de Medeiros Coutinho**  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ



Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE  
Recife - PE - CEP: 50.670-420  
Telefones: (81) 2101-3500/2101-3500 Fax: (81) 3453-1911  
www.miraflores.fiocruz.br



Ministério da Saúde

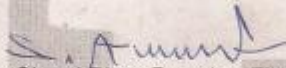
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

Ao  
Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública  
Curso de Doutorado em Saúde Pública

Declaro para os devidos fins que o projeto de tese do doutorando José Ferreira Marinho Júnior, intitulado "Caracterização da infecciosidade de roedores silvestres e sinantrópicos como hospedeiros reservatórios envolvidos no ciclo zoonótico da leishmaniose tegumentar associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis*", sob minha orientação, está inserido no projeto maior que tem como título "Estudos integrados para identificação de hospedeiros reservatórios e flebotomíneos vetores envolvidos no ciclo zoonótico das leishmanioses em área endêmica de Pernambuco e avaliação de novas abordagens para o diagnóstico parasitológico rápido", sob minha coordenação, o qual possui aprovação junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/CPqAM) sob o número 017/2011.

Recife, 19 de agosto de 2015.

  
Dr Sinval Pinto Brandão Filho  
Orientador

Dr. Sinval Pinto Brandão Filho, PhD  
Pesquisador Titular  
Mat. SIAPE 0464781  
CPqAM / FioCruz

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE  
Recife - PE - CEP: 50.740-465  
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2500 Fax: (81) 3453-1911  
www.cpqam.fiocruz.br



## ANEXO B - Autorização para atividades com finalidade científica – IBAMA/MMA



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 12749-3	<b>Data da Emissão:</b> 09/08/2013 18:36	<b>Data para Revalidação*:</b> 08/09/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Sinval Pinto Brandão Filho	CPF: 160.932.754-34
Título do Projeto: Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata de Pernambuco: incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão.	
Nome da Instituição: FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0007-20

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Colonização de <i>Bolomys lasiurus</i> , <i>Nectomys squamipes</i> , <i>Gale a spixii</i> e <i>Rattus rattus</i>	08/2007	08/2012
2	Colonização de <i>Lutzomyia migonei</i> , <i>Lutzomyia whitmani</i> e <i>Lutzomyia longipalpis</i>	08/2007	08/2012
3	Realização de ensaios de infecciosidade	08/2007	08/2012
4	Coleta de pequenos roedores e flebotomíneos	02/2011	08/2012

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Francisco Gomes de Carvalho	Biólogo responsável pela capturas	125.053.664-20	405657 SSP-CE	Brasileira
2	Gerlane Tavares de Souza Chioratto	Médica Veterinária	027.420.304-92	4881818 SSP-PE	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO VICENTE FERRER	PE	Mundo Novo	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 42246384**





Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 12749-3	<b>Data da Emissão:</b> 09/08/2013 18:36	<b>Data para Revalidação*:</b> 08/09/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Sinval Pinto Brandão Filho	CPF: 160.932.754-34
Título do Projeto: Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata de Pernambuco: incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão.	
Nome da Instituição : FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0007-20

2	VICENCIA	PE	Imbu	Fora de UC Federal
3	AMARAJI	PE	Refrigério	Fora de UC Federal
4	PAUDALHO	PE	CIMNC	Fora de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Rodentia, Lutzomyia
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Lutzomyia (*Qtde: 100)
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de invertebrados silvestres em cativeiro	Lutzomyia

\* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Invertebrados Terrestres)	Ectoparasita
2	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Armadilha luminosa, Captura manual
3	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	criadouro científico
2	FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	Instituição de pesquisa

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 42246384**



Página 2/4





Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 12749-3	<b>Data da Emissão:</b> 09/08/2013 18:36	<b>Data para Revalidação*:</b> 08/09/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Sinval Pinto Brandão Filho	CPF: 160.932.754-34
Título do Projeto: Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata de Pernambuco: incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão.	
Nome da Instituição : FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0007-20

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 42246384**



Página 4/4