



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
Mestrado em Saúde Pública

**Bruna Santos Lima**

---

PERFIL EPIDEMIOLOGICO DA LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA EM SÃO VICENTE  
FÉRRER, ZONA DA MATA NORTE DO ESTADO DE  
PERNAMBUCO, BRASIL.

---

RECIFE  
2007

**BRUNA SANTOS LIMA**

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM SÃO VICENTE FÉRRER, ZONA DA MATA NORTE DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública *Stricto sensu* do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Orientador: Dr. Sinval Pinto Brandão Filho

RECIFE  
2007

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

---

- L732p Lima, Bruna Santos  
Perfil epidemiológico da Leishmaniose tegumentar americana em São Vicente Ferrer, Zona da Mata Norte do Estado de Pernambuco, Brasil -- Recife: B. S. Lima, 2007.  
123 f. : il.  
Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, março de 2007.  
Orientador: Sinval Pinto Brandão Filho
1. Leishmaniose tegumentar americana. - epidemiologia. 2. Leishmania braziliensis - epidemiologia. I. Brandão Filho, Sinval Pinto. II. Título.

---

CDU 616.993.161

**BRUNA SANTOS LIMA**

**PERFIL EPIDEMIOLOGICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR  
AMERICANA EM SÃO VICENTE FÉRRER, ZONA DA MATA NORTE DO  
ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL.**

**Orientador:**

\_\_\_\_\_  
Dr. Sinval Pinto Brandão Filho  
(Departamento de Imunologia - CPqAM/FIOCRUZ)

**Examinadores:**

\_\_\_\_\_  
Dr. Valdir Queiroz Balbino  
(Departamento de Genética – UFPE)

\_\_\_\_\_  
Dr<sup>a</sup>. Constança Clara Gayoso Simões Barbosa  
(Departamento de Parasitologia - CPqAM/FIOCRUZ)

**Suplentes:**

\_\_\_\_\_  
Dr. Leucio Câmara Alves  
(UFRPE)

\_\_\_\_\_  
Dr<sup>a</sup>. Zulma Maria de Medeiros  
(Departamento de Parasitologia - CPqAM/FIOCRUZ)

Recife, 2007

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido estar na hora certa, com pessoas certas e poder aproveitar a oportunidade para crescer pessoal e profissionalmente.

Aos meus pais e irmãs pelo amor, companheirismo, sem eles nada disso tinha acontecido.

Ao Dr. Sinval Pinto Brandão Filho, meu orientador, pela competência, ensinamentos e apoio desde a iniciação científica até a conclusão deste trabalho.

À Dra. Edileuza Felinto de Brito pela generosidade em repassar seu conhecimento, sempre amiga em todos os momentos.

Ao Dr. Frederico G. C. Abath (*in memoriam*), pela paciência e orientação, um exemplo de profissional a ser seguido.

Ao Dr. Rômulo Maciel Filho, Diretor do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, onde o trabalho de dissertação foi realizado.

A todos os pesquisadores do Departamento de Imunologia do CPqAM, que direta ou indiretamente contribuíram no meu trabalho.

Ao Francisco Gomes Carvalho, Amilton Lopes da Silva e Fernando José da Silva, equipe experiente na captura dos animais silvestres sendo fundamental na realização deste trabalho.

Ao Francisco de Assis, Hélio França Valença e demais técnicos da Fundação Nacional de Saúde pela colaboração no trabalho de campo e captura dos flebotomíneos.

Ao Dr Leucio Alves pela colaboração e profissionalismo no trabalho com os cães.

Ao Sr Assis, funcionário do biotério, por estar sempre disposto a ajudar e a colaborar no trabalho com os animais.

Aos amigos do mestrado, em especial a Luiza, Andréa, Renata e Filipe, pelos momentos de amizade e apoio que foram de fundamental importância no meu aprendizado.

A todos os amigos do laboratório Edeneide, Lílian, Rosana, Fábio, Eduardo, Ericka, Junior, Simone, Inês, Vanessa, Andresa, Neidinha, Mineo, Ana Lisa, que me apoiaram sempre em todas as horas com muito carinho sendo fundamentais na minha vida para além deste trabalho.

À Secretaria Acadêmica em especial a Nilda e Lindinalva pela atenção.

A todos os moradores da localidade de Mundo Novo, São Vicente Férrer, que contribuíram para esta pesquisa, sem os mesmos não conseguiríamos obter nossos resultados.

À FACEPE e ao CPqAM pelo apoio financeiro na realização desta pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
	1.1 Leishmaniose tegumentar americana.....	13
	1.2 Situação epidemiológica da Leishmaniose tegumentar americana.....	18
	1.3 Reservatórios e vetores.....	23
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
	3.1 Objetivo geral.....	28
	3.2 Objetivos específicos.....	28
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
	4.1 Área de estudo.....	29
	4.2 Inquérito epidemiológico na população humana.....	32
	4.3 Inquérito clínico-parasitológico nos cães.....	33
	4.4 Inquérito parasitológico em roedores silvestres e sinantrópicos.....	35
	4.5 Inquérito entomológico .....	40
	4.6 Análise estatística.....	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
	5.1 Prevalência na população humana e casos notificados.....	43

5.2	Animal Doméstico.....	44
5.3	Roedores silvestres e sinantrópicos.....	46
5.4	Flebotomíneos.....	51
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>REREFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>68</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>76</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Percentual de positividade para o teste de intradermoreação de Montenegro na população da localidade Mundo Novo, São Vicente Férrer.	43
Tabela 2 -	Espécies de mamíferos silvestres que foram capturados em Mundo Novo no período de março a outubro de 2006.	46
Tabela 3 -	Espécies de mamíferos silvestres e sinantrópicos em que foram obtidos fragmentos de baço e pele para realização de PCR visando à detecção de <i>L. (Viannia) braziliensis</i> .	48
Tabela 4 -	Distribuição das espécies de Flebotomíneos coletados em Mundo Novo, no período de dezembro de 2002 a novembro de 2003, de acordo com o local de captura.	51
Tabela 5 -	Distribuição por sexo do total de espécies de flebotomíneos capturados em Mundo Novo, no período de dezembro de 2002 a novembro de 2003.	52
Tabela 6 -	Distribuição de flebotomíneos por sexo de acordo com local e captura, em Mundo Novo, São Vicente Férrer.	53

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Evolução dos casos de leishmaniose tegumentar americana de 1980 a 2005 no Brasil.	19
Figura 2 -	Casos de leishmaniose tegumentar americana notificados em Pernambuco no período de 1980 a 2005.	22
Figura 3 -	Localização da área de estudo, no Estado de Pernambuco.	30
Figura 4 -	Domicílio na área rural de São Vicente Férrer, Mundo Novo.	31
Figura 5 -	Resquícios de Mata Atlântica e plantações na localidade Mundo Novo	31
Figura 6 -	Inquérito populacional realizado em Mundo Novo, São Vicente Férrer.	32
Figura 7 -	Biópsia de medula óssea na crista ilíaca.	33
Figura 8 -	Armadilha do tipo Tomahawk.	36
Figura 9 -	Retirada de ectoparasitas.	37
Figura 10 -	Identificação do Roedor.	37
Figura 11 -	Isolador onde os animais ficam em quarentena	38
.		
Figura 12 -	Estantes ventiladas onde os hamsters ficam acondicionados.	39
Figura 13 -	Armadilha do Tipo CDC instalada em Mundo Novo, São Vicente Férrer.	41
Figura 14-	Gel de agarose (1%) das amostras de MO de cães da localidade Mundo Novo. PM (Peso molecular $\lambda$ + Hind III), C <sup>-</sup> (controle negativo), C <sup>++</sup> (controle positivo 1ng), C <sup>+</sup> (controle positivo 1pg), Linhas 1 a 11( MO de cães), linha 8 (amostra positiva).	44

Figura 15 -	Cão que apresentou exame parasitológico positivo.	45
Figura 16 -	<i>Nectomys squamipes</i> .	47
Figura 17 -	<i>Rattus rattus</i>	47
Figura 18-	Gel de agarose (1%) das amostras de pele dos animais silvestres e sinatrópicos da localidade Mundo Novo. PM (Peso molecular $\lambda$ + Hind III), C <sup>-</sup> (controle negativo), C <sup>++</sup> (controle positivo 1ng), C <sup>+</sup> (controle positivo 1pg), Linhas 1 a 22 (amostras de pele).	49
Figura 19 -	Gel de agarose (1%) das amostras de baço dos animais silvestres e sinatrópicos da localidade Mundo Novo. PM (Peso molecular $\lambda$ + Hind III), C <sup>-</sup> (controle negativo), C <sup>++</sup> (controle positivo 1ng), C <sup>+</sup> (controle positivo 1pg), Linhas 1 a 16 (amostras de baço).	49
Figura 20-	Diagrama representativo da relação dos vetor(s) e reservatório(s) para ocorrer a transmissão da LTA, adapta por Shaw & Lainson, 1987.	50
Figura 21-	Varição mensal de flebotomíneos no período de 12 meses (dezembro de 2002 a novembro de 2003) em Mundo Novo, São Vicente Férrer.	54
Figura 22-	Média da umidade relativa do ar e temperaturas médias observadas durante o período de captura dos flebotomíneos na localidade Mundo Novo, São Vicente Férrer.	55
Figura 23-	Registros dos índices pluviométricos e variação mensal de flebotomíneos no período de 12 meses (dezembro de 2002 a novembro de 2003) em Mundo Novo, São Vicente Férrer.	56
Figura 24-	Comparação do total de espécimes de <i>L. complexa</i> e <i>L. migonei</i> capturados no período de dezembro de 2002 a novembro de 2003, em Mundo Novo, São Vicente Férrer.	57

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo A</b> - Questionário aplicado na população humana.	79
<b>Anexo B</b> - Questionário aplicado na população canina.	81
<b>Anexo C</b> - Parecer do Conselho de ética em Pesquisas (CEP) do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ).	83
<b>Anexo D</b> - Documento da Comissão de ética em Pesquisa com Animais da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).	85
<b>Anexo E</b> - Licença para captura de animais silvestres expedida pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).	87
<b>Anexo F</b> – Artigos relacionados à dissertação.	89

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo caracterizar a eco-epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no município de São Vicente Férrer, Zona da Mata Norte de Pernambuco, visando identificar e incriminar hospedeiros reservatórios silvestres e ou domésticos envolvidos na manutenção da endemia, identificar a(s) espécie (s) de *Leishmania* circulantes e identificar as espécies de flebotomíneos. No período de dezembro de 2002 a novembro de 2003, foram realizadas capturas de flebotomíneos, através de coleta manual, com armadilha de Shannon, e armadilhas luminosas CDC. Os animais silvestres foram capturados com armadilhas do tipo Tomahawk, no período de março a outubro de 2006. Um inquérito epidemiológico foi realizado com cães onde foi aplicado um questionário. Na ocasião foi coletado material de medula óssea para confecção de lâminas e realização da PCR onde obtivemos um cão positivo. Outro inquérito epidemiológico foi realizado na população humana da localidade de Mundo Novo onde de um total de 181 pacientes, 68 (37,6%) foram positivos para IDRM. Um isolado foi obtido de paciente e a cepa caracterizada através de isoenzimas e anticorpos monoclonais como sendo *L. (V.) brazileinsis*. Dos 118 animais silvestres e sinatropicos examinados 22 (9,32%) foram positivos *L. (V.) braziliensis* de três espécies diferentes: *Nectomys squamipes*, *Rattus rattus* e *Holochilus sciureus*. Foi realizado também um isolamento de *L. braziliensis*, caracterizado através de anticorpos monoclonais, obtido através de hamster inoculado com material do animal silvestre *Nectomys squamipes*. 23.156 exemplares de flebotomíneos foram coletados em resquícios de Mata Atlântica, domicílios e peridomicílios, dos quais *L. complexa* obteve predominância com 14.445 (62,5%) do total, seguido de *L. migonei*, com 7.677 (33,2%). *L. whitmani*, vetor de *L. (V.) braziliensis* foi encontrado em baixa densidade nesta região.

Palavras chaves: 1- Leishmaniose tegumentar americana, 2- *L. (V.) braziliensis*, 3- epidemiologia.

## ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the American tegumentary leishmaniasis eco-epidemiology in the municipality of São Vicente Férrer, in Zona da Mata Norte of Pernambuco, with the objective of identifying and considering wild and domestic reservoir hosts involved in the maintenance of the endemic disease, identifying circulating *Leishmania* species, and sand fly species. In the period of December 2002 to November 2003, sand fly catching was carried out, through manual catching using Shannon trap and CD light traps. Wild animals were captured with tomahawk traps, in the period of March to October of 2006. An epidemiological survey was carried out in the canine population where it was used a questionnaire. On the occasion material from bone marrow was collected for slide confection and performance of PCR where we got a positive dog. Another epidemiological survey was carried out in the human population from the settlement of Novo Mundo where a total of 181 patients 68 (37.6%) were positive for IDRM. One sample of *L. braziliensis* was isolated from a patient and identified by isozymes and monoclonal antibodies. A total of 118 wild and synantrophic animals examined 22 (9.32%) were positive to *L. (V.) braziliensis* from three different species: *Nectomys squamipes*, *Rattus rattus* and *Holochilus sciureus*. It was also performed a *L. braziliensis* isolation, characterized through monoclonal antibodies, obtained from hamster inoculated with *Nectomys squamipes* from wild animal material. A total of 23.156 sand flies were collected in remnants of the primitive Atlantic rain forest, domiciliary and peridomiciliary. *L. complexa* was the most abundant species with 14.445 (62.5%) of the total followed by *L. migonei* with 7.677 (33.2%). *L. whitmani*, vector of *L. (V.) braziliensis* was found in low density in this region.

**KEYWORDS:** 1- American tegumentary leishmaniasis, 2- *L. braziliensis*, 3- eco-epidemiology.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1987). Esses protozoários apresentam duas formas durante seu ciclo evolutivo: uma forma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo dos insetos vetores, bem como em meio de cultura; e outra aflagelada ou amastigota, que é a forma intracelular dos hospedeiros vertebrados (REY, 2001). São transmitidas entre os animais e o homem pela picada das fêmeas de diversas espécies de flebótomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (Díptera, Psychodidae, Phlebotominae). Nas Américas existem aproximadamente 40 espécies de *Lutzomyia* com comprovada capacidade de transmitir *Leishmania* spp., podendo existir mais espécies de vetores ainda não identificadas (SHAW *et al.*, 1987).

No Brasil, as espécies de *Leishmania* associadas à doença no homem são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*. As leishmanioses nas Américas apresentam formas clínicas distintas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida, da resposta imune do hospedeiro e de fatores outros ainda não determinados, sendo representadas sob duas formas: a leishmaniose tegumentar americana (LTA) e a leishmaniose visceral americana (LVA) (LAINSON; SHAW, 1998).

A principal característica da LTA é a sua diversidade de aspectos clínicos, as quais permitem classificá-la: leishmaniose cutânea (LC), caracterizada por lesões ulceradas que podem apresentar-se de forma: localizada, a mais freqüente, caracterizada por uma única lesão; disseminada, com presença de várias lesões distribuídas em diversas regiões do corpo;

e a forma difusa, a mais grave, onde as lesões se apresentam de forma nodular, também chamada de forma anérgica da doença, com evolução crônica (REY, 2001).

A leishmaniose mucocutânea (LCM) compreende as formas infiltradas eritematosas, podendo ser úlcero-vegetantes, ulceradas, vegetantes que acometem a região orofaríngea principalmente o septo nasal ou nasofaringe. É de natureza metastática, podendo ou não acompanhar os quadros cutâneos ou apresentar-se muitos anos após a lesão inicial, onde o paciente apresenta uma resposta celular exacerbada levando a destruição de mucosas e cartilagem. Nas lesões mucosas, o diagnóstico diferencial deve ser feito com outras infecções fúngicas (paracoccidioidomicose, esporotricose e cromomicose), bacterianas (tuberculose, sífilis e úlcera tropical) e outras doenças inflamatórias (REY, 2001).

O diagnóstico da LTA é feito a partir de um conjunto de critérios: (1) manifestações clínicas características, associadas à procedência de uma área endêmica; (2) exames parasitológicos; (3) imunodiagnóstico; (4) diagnóstico molecular. A confirmação do diagnóstico se obtém através da demonstração da presença do parasito, utilizando técnicas parasitológicas. 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 rara após um ano, com exceção dos pacientes que desenvolvem a forma difusa da doença, pois neste caso os nódulos presentes na pele são ricos em parasitas (CUBA CUBA *et al.*, 1981). Além do exame direto, pode ser feito o isolamento do parasito *in vivo* ou *in vitro*, inoculando o material obtido em meio de cultura ou em animais susceptíveis como o hamster (*Mesocricetus auratus*) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003; GONTIJO *et al.*, 2003).

Outra ferramenta que auxilia no diagnóstico são os testes sorológicos, que detectam anticorpos anti-leishmanias. Teste imunológico muito utilizado é a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) que avalia a resposta de hipersensibilidade celular tardia, uma vez que,

imunologicamente, a LTA se caracteriza pela resposta celular durante a doença e após o tratamento ou cura espontânea (MARZOCHI, 1992). O teste é positivo durante a doença e após a cura e não diferencia doença atual de pregressa, nem distingue doença de infecção, porém é habitualmente negativo na forma difusa, na forma visceral e nos pacientes imunodeprimidos. A IDRM é de grande valor presuntivo no diagnóstico de LTA, constituindo valioso recurso nos casos em que os parasitos estão escassos ou ausentes, e é também bastante útil nos inquéritos epidemiológicos de prevalência em áreas endêmicas (KAR, 1995; MARZOCHI *et al.*, 1980; SHAW; LAINSON, 1975).

Outro teste sorológico geralmente utilizado é a imunoflorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e o *Western Blotting*, que detectam anticorpos e são de grande utilidade no diagnóstico de formas clínicas com lesões extensas, múltiplas e nas lesões mucosas secundárias e primárias. Porém apresentam reações cruzadas com leishmaniose visceral e doença de Chagas (BRITO *et al.*, 2000; GONTIJO *et al.*, 2003; MARZOCHI *et al.*, 1980).

Com o avanço da tecnologia, o diagnóstico molecular constitui o método mais sensível entre os convencionalmente utilizados no diagnóstico da LTA. O advento da utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a amplificação de seqüências a partir de oligonucleotídeos (iniciadores) pareados especificamente nas margens da região alvo do DNA de diversos patógenos, viabilizando um instrumento específico para o diagnóstico de diversas doenças infecciosas (ANDRESEN *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 1999; RAMOS *et al.*, 1996; SINGH, 1997). O DNA do cinetoplasto (kDNA) representa a informação genética mitocondrial desses parasitos. É constituído por maxicírculos e minicírculos, moléculas que se concatenam formando uma rede compacta. Os minicírculos representam 95% da massa de kDNA. As moléculas contêm uma região conservada de 120 a 150 pares de base, razoavelmente homogênea entre os representantes de um mesmo gênero.

Os minicírculos são também alvos para sondas moleculares (DEGRAVE *et al.*, 1994; SIMPSON *et al.*, 1980). O kDNA, devido a todas essas propriedades, tem sido utilizado como região alvo para produção de vários oligonucleotídeos sintéticos que são utilizados na PCR (DE BRUIJN; BARKER, 1992; FABER *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2000).

Apesar de vários esforços dedicados na tentativa de desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da LTA, há várias décadas são utilizados como droga de primeira escolha os antimonias, entre os quais o mais utilizado é o antimonial pentavalente, disponibilizado sob duas formas: antimoniato de N-metilglucamina e o stilbogluconato de sódio, o primeiro sendo distribuído pelo programa de controle da LTA e LVA do Ministério da Saúde do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). As drogas de segunda escolha são a pentamidina ou anfotericina B, que é um antibiótico de reconhecida ação leishmanicida, porém devem ser empregadas quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial. Essas drogas são tóxicas e muitas vezes causam reações adversas graves, levando em algumas ocasiões a interrupção do tratamento (GONTIJO *et al.*, 2003).

A LTA é uma zoonose de alta prevalência em muitas áreas da América Latina apresentando um incremento do número total de casos e com incidência em todas as faixas etárias, acometendo semelhantemente homens e mulheres com casos de famílias inteiras com a enfermidade e de padrão de transmissão predominantemente doméstico e peridomiciliar. Postula-se que vem ocorrendo um processo de domiciliação gradual da transmissão, especialmente em áreas com história de colonização antiga, onde existe pouca floresta primária remanescente, existindo uma adaptação dos diferentes componentes do ciclo biológico, e provavelmente a presença de hospedeiros reservatórios secundários, o que facilita a transmissão (DESJEUX, 2001).

Diante disto, revestem-se de grande importância as medidas de controle, que são centradas principalmente no diagnóstico e no tratamento precoce, na redução da população de flebotomíneos que apresentam hábitos domiciliares, e em atividades de educação em saúde. Em virtude das características epidemiológicas peculiares da LTA, as estratégias de controle devem ser flexíveis e distintas, adequadas a cada região ou foco particular. A diversidade de agentes etiológicos, hospedeiros, vetores e de características ecológicas, aliadas ao conhecimento ainda insuficiente sobre vários destes aspectos, evidencia a complexidade do controle (GONTIJO *et al.*, 2003).

## 1. 2 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil.

As leishmanioses estão incluídas no rol de doenças de maior prioridade para a Organização Mundial de Saúde (OMS), no seu programa especial de pesquisa e de treinamento em doenças tropicais (TDR) (REMME *et al*, 2002). Aproximadamente 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção e o número estimado de pessoas infectadas é de 12 milhões (DESJEUX, 2001; WHO, 2006).

No período de 1980 a 2004, a LTA no Brasil apresentou coeficientes de detecção que oscilaram entre 3,8 a 22,9 por 100.000 habitantes. Ao longo desse período, observou-se uma tendência ao crescimento, registrando os coeficientes mais elevados nos anos de 1994/1995, quando atingiram níveis de 22,83 e 22,94 por 100.000 habitantes, respectivamente (Figura 1). Vale ressaltar que o ano de 1998 apresentou uma queda significativa neste coeficiente (13,47/100.000 habitantes), fato que pode estar relacionado a problemas operacionais de notificação naquele ano (MINISTERIO DA SAÚDE, 2006).

Ao analisar a evolução da LTA no Brasil, observa-se uma expansão geográfica. No início da década de 80 foram registrados casos em 20 unidades federadas (UF) e a partir de 2001 todas as UF registraram casos autóctones da doença. No ano de 1994 houve um registro de casos autóctones em 1.861 municípios, o que representa 36,9% dos municípios do país; em 2002 houve uma expansão da doença para 2.302 municípios (41,1%). As regiões Nordeste e Norte vêm contribuindo com o maior número de casos registrados no período (cerca de 36,9% e 36,2% respectivamente), e a região Norte com os coeficientes mais elevados (99,8/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (41,8/100.000 habitantes) e Nordeste 26,5/100.000 habitantes (MINISTERIO DA SAÚDE, 2006).

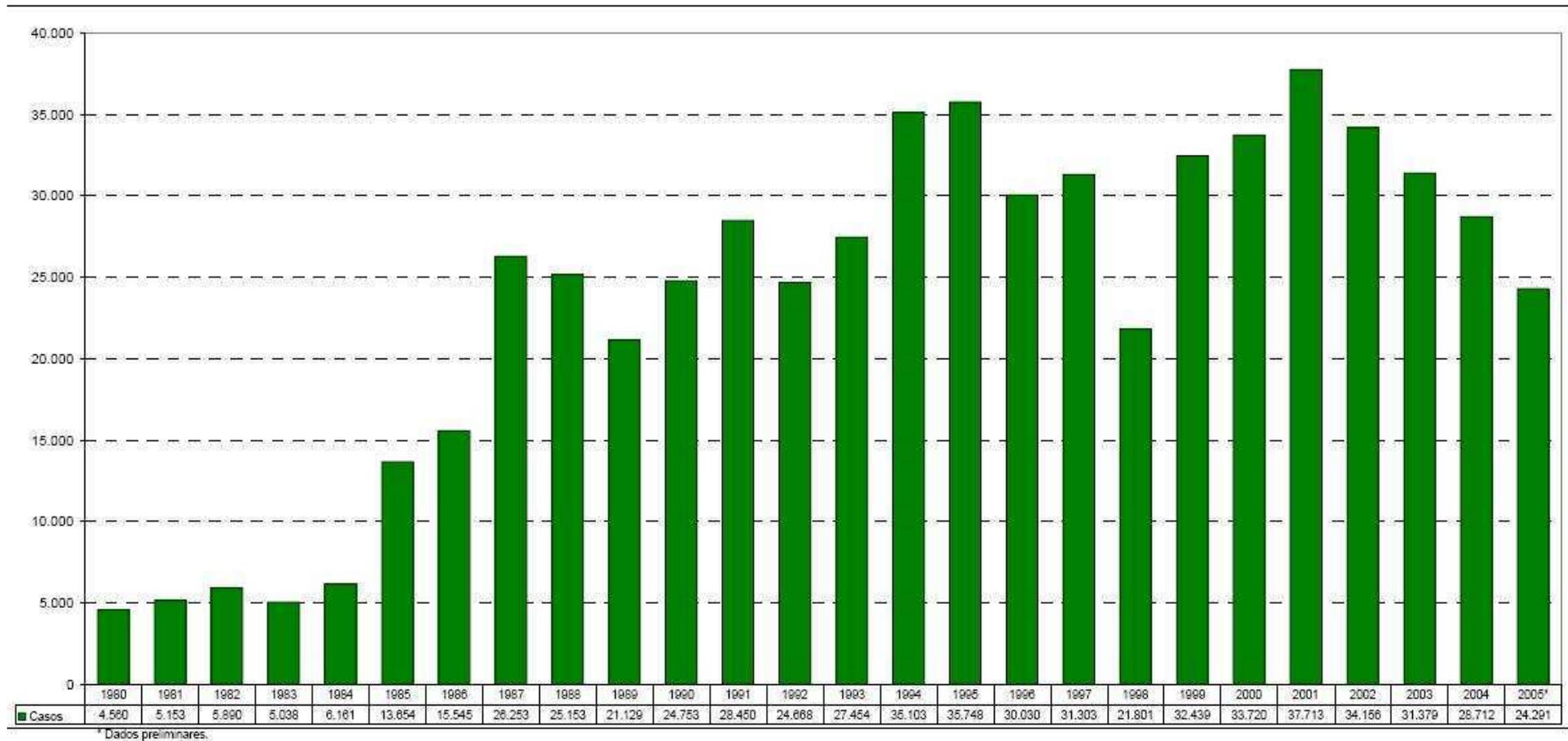


Figura 1 - Evolução dos Casos de Leishmaniose tegumentar americana de 1980 a 2005 no Brasil.

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006.

A LTA apresenta uma importante difusão espacial, demonstrando nas últimas décadas mudanças no comportamento e a coexistência de um duplo perfil epidemiológico, expresso pela manutenção de casos oriundos dos focos antigos e em áreas próximas, e pelo aparecimento de surtos epidêmicos, associados a fatores decorrentes de processos migratórios da população e ocupação de áreas preservadas de floresta (ANDRADE *et al.*, 2005; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1998; LAINSON; SHAW, 1998). Neste contexto, a LTA apresenta importante heterogeneidade, relacionada a diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas em sua etiologia, das quais *L. (V). braziliensis* é a principal espécie, apresentando várias formas clínicas e padrões de transmissão, impondo novas questões e desafios para o controle (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; MARZOCHI, 1992; SHAW; LAINSON, 1987).

Por conta desta heterogeneidade são observados perfis distintos, no que se refere ao ciclo e manutenção desta endemia, que vai depender da área de circulação do parasito, em áreas onde ocorre desmatamento para a construção de estradas e instalações de povoados; extração de madeira, atividades agrícolas e de pecuária, além de áreas com preservação de pequenos trechos de cobertura vegetal, e áreas em que o processo de urbanização criou as condições favoráveis à produção de surtos endêmicos na periferia de cidades e povoados (MINISTERIO DA SAÚDE, 2006).

Nas primeiras décadas do século passado, o padrão epidemiológico que predominou foi o de zoonose de transmissão silvestre, que atinge o homem quando este invade os ambientes florestais. Porém, alterações do meio ambiente em várias estados do Brasil, vêm modificando o perfil epidemiológico da LTA, permitindo a invasão de áreas peridomiciliares por mamíferos silvestres reservatórios de *Leishmania*, onde podem ocorrer espécies de flebotomíneos adaptadas ao ambiente modificado pelo homem. A manutenção da LTA nessas áreas ecologicamente alteradas, encontradas geralmente em áreas rurais das cidades, indica claramente a evolução de um ciclo de transmissão zoonótico ocorrendo no ambiente

peridoméstico (MINISTERIO DA SAÚDE, 2006; LAINSON; SHAW, 1998).

No Nordeste, assim como na maior parte do país, a espécie predominante envolvida com a LTA é a *L. (V.) braziliensis*, principalmente nas áreas de colonização antiga associada com resquícios de floresta de Mata Atlântica, nas quais se verifica ainda vegetação abundante, com matas secundárias e plantações, propícias ao estabelecimento de populações dos flebotomíneos e mamíferos silvestres e sinantrópicos, nas quais os vetores e reservatórios se adaptaram a ambientes modificados, e onde ocorre a transmissão peridomiciliar (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; BRITO *et al.*, 1993, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003; MARZOCHI, 1992). As características epidemiológicas da LTA mostram peculiaridades entre os Estados do Nordeste, embora com alguma similaridade. Na Região de Três Braços, Bahia, região cacaueteira com resquícios de Mata Atlântica, *L. whitmani* é o vetor incriminado (VEXENAT *et al.*, 1986), porém não foram ainda identificados reservatórios e o padrão de transmissão (FRANÇA *et al.*, 1991; JONES *et al.*, 1987; MARSDEN, 1994). No Ceará, os estudos realizados na região de Baturité apresentaram resultados heterogêneos. O vetor possivelmente envolvido na transmissão silvestre é o *L. wellcomei* (READY; RIBEIRO, 1983), enquanto que *L. whitmani* e *L. migonei* estariam associados à transmissão peridomiciliar, tendo grande capacidade de invadir habitações humanas, especialmente no período mais chuvoso (AZEVEDO *et al.*, 1990a; AZEVEDO *et al.*, 1990b; DE QUEIROZ *et al.*, 1994).

Em todo Nordeste, no período de 1980 a 2005, foram notificados 219.910 casos de LTA, tendo 12.239 deles registrados no Estado de Pernambuco, na qual a região da Zona da Mata é a mais atingida, concentrando cerca de 60% dos casos registrados (Figura 2) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Em um estudo longitudinal realizado em Amaraji, município da Zona da Mata Sul de Pernambuco foi demonstrada uma alta prevalência da LTA, através de inquérito populacional utilizando a reação de Montenegro, verificou-se que

a doença acomete tanto os adultos do sexo masculino, como também mulheres e crianças, em alguns casos atingindo todos os indivíduos de uma mesma família, indicando que a transmissão ocorre frequentemente no ambiente peridomiciliar. O aumento da incidência e a persistência da transmissão neste Estado têm revelado um importante problema de saúde pública (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999).

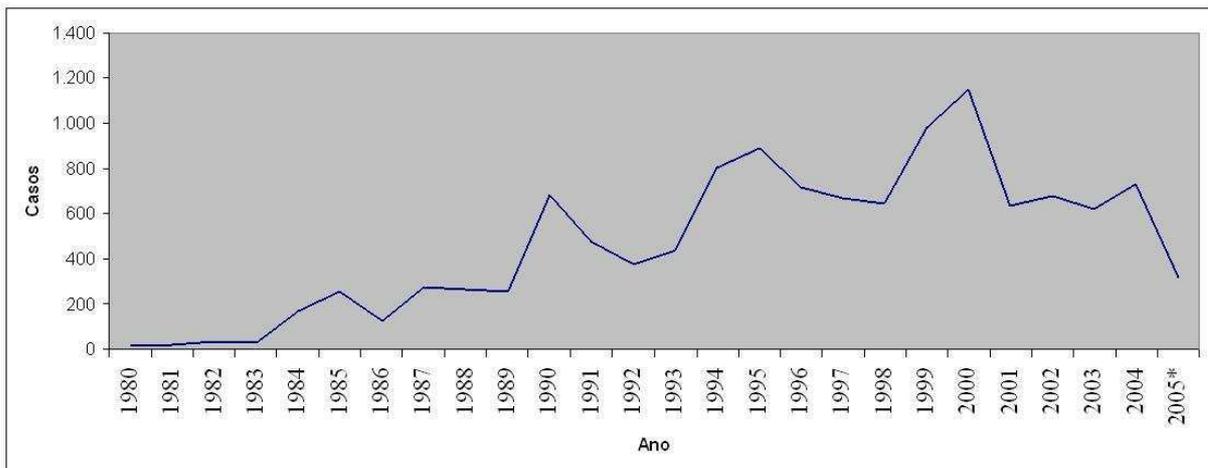


Figura 2 - Casos de leishmaniose tegumentar americana notificados em Pernambuco no período de 1980 a 2005.

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006.

Nesta mesma área, também foi estudada a infecção natural de animais silvestres e domésticos, onde foram identificados alguns roedores sinantrópicos e silvestres infectados por *L. (V). braziliensis*. Foram isoladas e caracterizadas amostras do parasito em *Nectomys squamipes*, *Rattus rattus* e *Bolomys lasiurus*, que representou uma grande evidência para a incriminação categórica de um reservatório, envolvido na manutenção do ciclo zoonótico da LTA. *L. whitmani* apresentou evidências que o apontam como a principal espécie envolvida na transmissão do ciclo zoonótico nesta área, com predominância importante e infecção natural confirmada (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2001 e 2003; CAMPBELL-LENDRUM *et al.*, 1999 e 2000).

### 1.3 Reservatórios e vetores

Todas as formas de LTA são conhecidas como zoonoses, isto é, os parasitos associados à doença no homem, têm primariamente como hospedeiros os animais silvestres, porém a participação de animais silvestres como reservatórios de LTA foi comprovada pela primeira vez somente em 1957, quando foi isolada *Leishmania* em roedores silvestres naturalmente infectados no Panamá (HERTIG *et al.*, 1957).

Forattini *et al.* (1960, 1972 e 1973) conseguiram demonstrar, no Brasil, infecção natural de roedores por isolamento do parasito em cultura de sangue e pele, levantando a hipótese de que espécies de *Leishmania* que circulavam em hospedeiros naturais em seu hábitat florestal primitivo teriam se adaptado a outros animais ali existentes e se expandido para o homem e animais domésticos, e que o tipo da lesão pode funcionar como índice desta adaptação do parasito ao hospedeiro, de modo que quanto maior fosse à adaptação, menor a gravidade da lesão, podendo atingir um estado de equilíbrio em que estas não se manifestariam mais, de tal maneira que estes hospedeiros poderiam passar a desempenhar a função de reservatório categórico do parasito. 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 hospedeiro - parasita.

A partir da década de 60 diversos estudos passaram a ser desenvolvidos a fim de elucidar a epidemiologia relacionada às diversas formas de LTA, cujos resultados contribuíram sobremaneira para o atual conhecimento da ecologia e epidemiologia desta parasitose, com a descoberta de novas espécies de *Leishmania*, identificação e incriminação de seus reservatórios primários e dos vetores envolvidos.

Até o início do século XXI nem um animal silvestre ou sinantrópico tinha sido incriminado categoricamente como reservatório primário de *L. (V.) braziliensis*, estudos

ocasionalmente relataram em alguns destes mamíferos, entre os quais roedores de diferentes gêneros, como *Akodon* (FORATTINI *et al.*, 1972), *Proechimys* (LAINSON; SHAW, 1973), *Rattus* (LAINSON; SHAW *et al.*, 1979; VASCONCELLOS *et al.*, 1994; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1994), *Oryzomys* (LAINSON *et al.*, 1981), *Nectomys*, *Bolomys* (BRANDÃO-FILHO, *et al.*, 1994); e no marsupial *Didelphis* (LAINSON; SHAW, 1973). Somente em 2001, Brandão-Filho, incriminou o pequeno roedor *Bolomys lausiurus* como reservatório primário, constituindo a primeira incriminação clássica e inequívoca de um hospedeiro reservatório desta espécie do parasito. Outro achado deste estudo foi o isolamento de *L. (V.) braziliensis* do roedor sinantópico *Rattus rattus*, sendo incriminado como reservatório secundário envolvido no ciclo zoonótico doméstico da LTA na região da Zona da Mata de Pernambuco.

Evidências epidemiológicas têm demonstrado que a maioria das zonas endêmicas está intimamente relacionada às áreas florestais, via de regra, de pouca densidade populacional, sugerindo ainda mais que a moléstia deve ser primariamente de alguma ou algumas espécies de animais silvestres (FALQUETO, 1986). 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 flebótomos peridomiciliários e tendo como reservatório secundário o cão e talvez até o próprio homem”.

Mudanças ambientais devido à utilização de terras florestais para desenvolvimento e exploração de novos recursos naturais e agricultura modificam a epidemiologia da doença e novas áreas endêmicas são relatadas. Brito *et al.* (1993) registraram uma variante de *L. (V.) braziliensis* ocorrida no Estado de Pernambuco, onde a característica geográfica e ecologia da região são similares às já descritas para outras áreas endêmicas de LTA, nas quais o ambiente florestal original vem sendo alterado e a LTA pode ocorrer em comunidades antigas e bem estabelecidas. Nesse sentido, Brandão-Filho *et al.* (2003) observaram, através

de isolamento em meio de cultura, que roedores silvestres e sinatrópicos capturados na área estavam infectados com *L. (V.) braziliensis*, com o mesmo zimodemo que também foi verificado em pacientes.

Nos reservatórios naturais os parasitas induzem lesões discretas, com nódulos cutâneos de tamanho reduzido, placas ou ulcerações nas extremidades, principalmente na cauda (GRIMALDI, 1982). Sabe-se que as leishmanias do subgênero *Viannia*, parasitos dermatotrópicos, podem se localizar na pele sadia de roedores silvestres, de edentados *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e de cão doméstico (*L. peruviana*) (GRIMALDI, 1982). Sabe-se que os roedores são fundamentais no ciclo enzoótico da leishmaniose tegumentar, mas a participação desses mamíferos na circulação dos parasitos precisa ser esclarecida.

Um grande número de espécies de flebotomíneos está envolvido na transmissão das leishmanioses. Estes insetos possuem peculiaridades em seu ciclo biológico que garantem a preservação e reprodução do parasita em questão. Nas Américas, estão envolvidos na transmissão flebotomos do gênero *Lutzomyia*, subgêneros *Nyssomyia* e *Psychodopygus*. Em todo mundo são conhecidos, cerca de 800 espécies de flebotomíneos, sendo 60% na região Neotropical. No Brasil, tem-se conhecimento, de 229 espécies, representando 28,6% do total e 47,7% das espécies que ocorrem na Região Neotropical (RANGEL; LAINSON, 2003).

Cerca de dezenove espécies de flebotomíneos são incriminadas na veiculação de leishmânias ao homem e animais no Brasil segundo Young e Ducan (1994), representando 8,4% do total. *L. intermedia*, *L. migonei* e *L. whitmani* possuem ampla distribuição, sendo capturadas nas cinco regiões brasileiras (RANGEL; LAINSON, 2003).

As diferentes espécies de flebotomíneos possuem habitats preferenciais. Algumas vivem nas partes altas das árvores, com ecologia arbórea definida. Outras espécies estão mais presentes ao nível do solo, demonstrando uma ecologia própria. Evidentemente, em cada um

desses níveis temos faunas de mamíferos diferentes que vão servir como fonte alimentar do inseto (RANGEL; LAINSON, 2003).

As considerações feitas por Lainson e Shaw (1987), acerca dos efeitos do desmatamento na ecologia das leishmanioses no Novo Mundo, estão relacionadas à forma de adaptação dos flebótomos ao ambiente modificado e a presença de animais (fontes alimentares). Os insetos de hábitos arbóreos teriam maior dificuldade de adaptação, assim como os animais que ali vivem. Já os vetores cujos criadouros naturais se encontram no nível do solo teriam, assim como os animais reservatórios, uma adaptação facilitada por maior oferta de alimento e abrigo. Desta forma, essas espécies estariam mais envolvidas com a transmissão periurbana ou peridomiciliar.

## **2 JUSTIFICATIVA**

Existem lacunas no conhecimento sobre a eco-epidemiologia da LTA no município de São Vicente Férrer que consistem em barreiras para a construção de uma base teórica que permita o planejamento de estratégias de controle desta endemia na região.

Sendo assim, se justifica um estudo que objetiva caracterizar o perfil de transmissão da LTA no Município de São Vicente Férrer, Zona da Mata Norte de Pernambuco.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

- Estudar a eco-epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana na Zona da Mata Norte de Pernambuco, visando identificar o padrão de transmissão.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Identificar a (s) espécie (s) de *Leishmania* circulante (s);
- Identificar possíveis hospedeiros reservatórios silvestres e/ou domésticos envolvidos na manutenção da endemia;
- Identificar as espécies de flebotomíneos envolvidos na transmissão e a frequência mensal e sazonal;
- Compilar os casos humanos autóctones da localidade.

## 4 MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 Área de estudo

O estudo foi realizado no município de São Vicente Férrer, situado na Zona da Mata Norte de Pernambuco (Figura 3), limítrofe com a mesorregião Agreste, distante 130,5 Km da capital, Recife. O município possui 120,2 Km<sup>2</sup> e está localizado nas coordenadas geográficas 07°35'28''; 35°29'29'' W, a uma altitude de 419m do nível do mar. Faz limite ao norte com o município de Macaparana, ao sul com Machados, ao leste com Vicência e a oeste com Orobó e o Estado da Paraíba (FIDEM, 2004). O clima é predominantemente quente e úmido, com temperatura média de 25° C, a vegetação local é de floresta subperenifólia e as vias de acesso são através da BR-232/408; PE-90/089 (FIDEM, 2004).

A taxa de urbanização é de 55,6%, e a densidade demográfica de 133,7 hab/km<sup>2</sup>; com média de moradores por domicílio de 4,3. Sua economia local é predominantemente baseada no cultivo da banana, o que lhe rende o título de “Terra da Banana”. Outras culturas exploradas são as lavouras de tomate, mandioca, fava em grão e cana-de-açúcar. Na área da pecuária predominam a criação de aves e bovinos, com produção de derivados do leite, ovos de galinha e mel de abelha. De acordo com o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), a população residente é de 15.265 habitantes, dos quais 8.160 residentes na zona urbana e 7.105 na zona rural (IBGE, 2006).

O município de São Vicente Férrer apresenta a incidência de ambas as formas de leishmaniose, foram registrados 140 casos autóctones de LTA, no período compreendido entre 1998 e o primeiro semestre de 2006; também foram registrados 13 casos de leishmaniose visceral no período de 1999 a 2005, sendo seis destes na localidade Mundo Novo, onde realizamos o nosso estudo (Figuras 4 e 5).

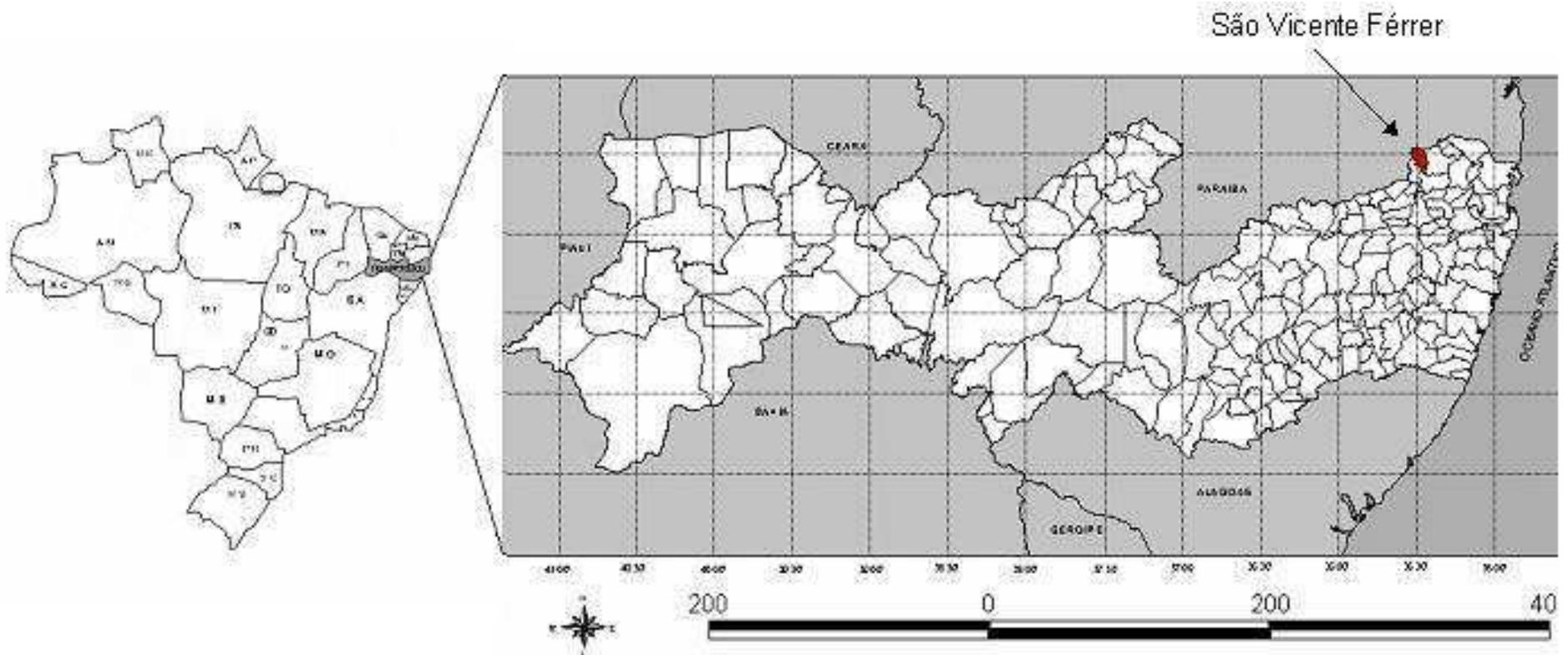


Figura 3 - Localização da área de estudo, no Estado de Pernambuco



Figura 4 – Domicílio na área rural de São Vicente Férrer, Mundo Novo.



Figura 5 - Resquícios de Mata Atlântica e plantações na localidade Mundo Novo.

#### 4.2 Inquérito epidemiológico na população humana

A amostra foi constituída por 181 moradores de Mundo Novo, localidade com grande incidência de casos, no município. Essa amostra foi obtida através de uma demanda voluntária, após os moradores terem recebido informações sobre o estudo através do agente de saúde do Programa da Saúde da Família da localidade de Mundo Novo. Foi realizado um inquérito epidemiológico de prevalência através da aplicação do teste de intradermoreação de Montenegro (IDRM), utilizando antígeno leishmanina preparado e fornecido por Biomanguinhos/FIOCRUZ (Figura 6). Nesta mesma ocasião foi aplicado um questionário para coleta de informações para análise da prevalência da infecção e da doença na população (Anexo A). A pesquisa foi autorizada pelo comitê de ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Anexo C e D).

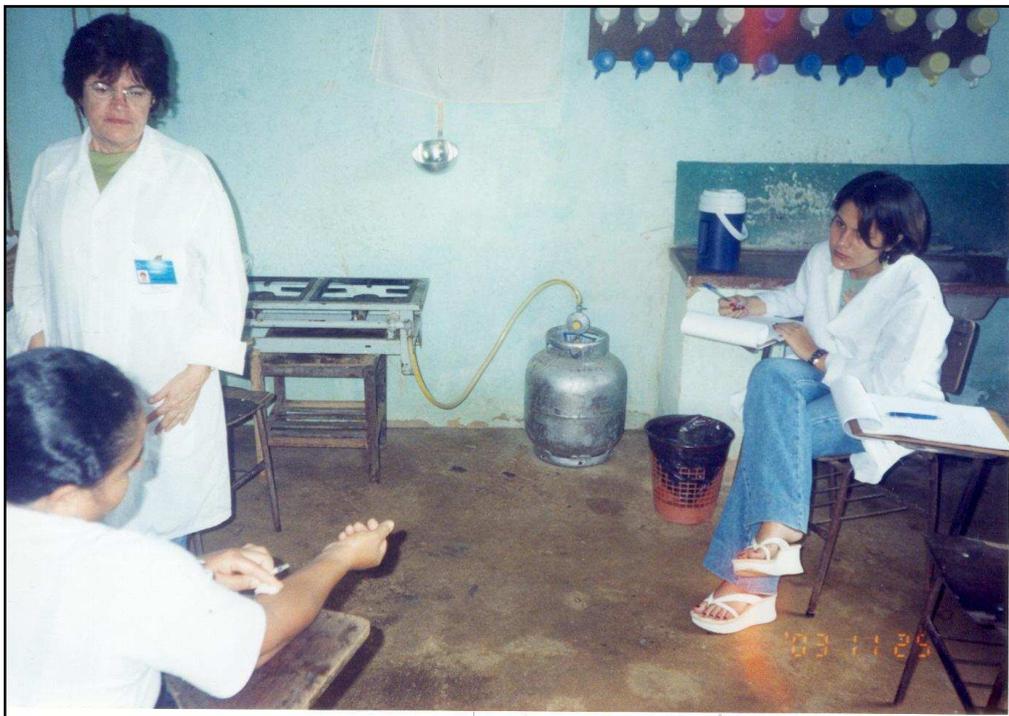


Figura 6 - Inquérito populacional realizado em Mundo Novo, São Vicente Férrer.

### 4.3 Inquérito clínico-parasitológico nos cães

#### 4.3.1 Exame clínico e epidemiológico

Os cães dos domicílios da localidade de Mundo Novo foram examinados, através de exame clínico para verificação de lesões, hepatoesplenomegalia e outros sintomas característicos associados às leishmanioses, além da aplicação de um questionário aos donos dos animais para coleta de dados (Anexo B), onde foram obtidas as seguintes informações: sexo, idade, raça, endereço, nome do dono e procedência.

#### 4.3.2 Biópsia

Foram realizadas punção de crista ilíaca e esternal em cães assintomáticos (Figura 7), o aspirado foi realizado através de punção medular na crista do osso esterno, utilizando-se seringas descartáveis de 20 mililitros (ml) acopladas a agulhas de tamanho 40x12 milímetros (mm). Para este procedimento foram utilizados Xilazina e Atropina como anestésicos (ALVAR *et al*, 2004).



Figura 7 - Biópsia de medula óssea na crista ilíaca.

### 4.3.3 Diagnóstico parasitológico

#### 4.3.3.1 Pesquisa direta, isolamento *in vivo* e *in vitro*

Com material de medula óssea (MO) puncionado dos cães, foram realizados esfregaços em lâminas de vidro para microscopia, que após secagem, foram fixadas com álcool metílico, coradas pelo método de coloração rápida Panótico e examinadas em microscópio óptico com objetiva de 100x para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* (LEÍLA *et al.*, 2006).

Parte do material de MO foi inoculada em hamsters (*Mesocricetus auratus*) para o cultivo *in vivo*, sendo inoculado no peritônio e também utilizado para cultivo *in vitro*, utilizando o meio NNN modificado (WALTON *et al.*, 1977).

#### 4.3.3.2 Diagnóstico Molecular

Uma alíquota da MO foi armazenada em tubo de criopreservação acondicionado em baixas temperaturas (-72°C) e posteriormente realizada a purificação de DNA utilizando o GenomicPrep Blood DNA Isolation Kit® (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fornecedor. O DNA contido nas amostras foi submetido à amplificação em um termociclador automático (Modelo Px2 /Termo Electron Corporation), utilizando um sistema de PCR que permite a amplificação de kDNA de parasitas pertencentes ao complexo *Leishmania (V.) braziliensis* (subgênero *Viannia*) utilizando os seguintes primers: 5'-GGGGTTGGTGTAATATAGTGG- 3' e 5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG- 3' (BRUIJIN; BARKER, 1992).

A PCR foi realizada em um volume final de 25µl contendo Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, gelatina 0,1mg/ml, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, dNTP 0,2mM, 25pmoles de cada um dos primers e 2,5 U de Taq DNA Polimerase. A essa mistura eram adicionados 2µl da amostra a ser analisada. A amplificação foi constituída de 35 ciclos: 94°C (1 min), 65°C (1 min) e 72 °C (1 min), precedidos de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C. Foram utilizados controles positivos de *L. (V.) braziliensis* extraído de cepa de referência (MHOM/BR/75/M2903).

Após amplificação, 10µl dos produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1% para o alvo de 750pb com tampão TAE (Tris-Acetato 40mM, EDTA 1mM) corados pelo brometo de etídio. As bandas de DNA separadas eletroforeticamente foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta e fotografados utilizando o Kodak Molecular Imaging Software v..4.0.0.

#### **4.4 Inquérito parasitológico em roedores silvestres e sinantrópicos**

##### **4.4.1 Capturas**

Foram realizadas capturas mensais (março a outubro de 2006) de roedores silvestres e sinantrópicos na fauna de Mundo Novo, localidade que apresentou um grande número de casos humanos autóctones recentes, com autorização do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (Anexo E).

As capturas foram realizadas, em diversos ecótopos, utilizando as armadilhas do tipo Tomahawk (Figura 8) padronizadas para animais de pequeno porte, compreendendo resquícios de Mata Atlântica remanescente, plantações e abrigos de animais domésticos no

peridomicílio, tendo como referência as casas onde ocorreram casos humanos. A equipe permanecia no campo uma semana em cada mês, onde era realizada a retirada dos ectoparasitas e a identificação dos animais (Figuras 9 e 10).

Os roedores capturados eram encaminhados para o biotério de nível de biossegurança 3 (NA 3), localizado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, onde foram eutanasiados para a tentativa de isolamento e/ou detecção de *Leishmania* spp.



Figura 8 - Armadilha do tipo Tomahawk.



Figura 9 – Retirada de ectoparasitas.



Figura 10 – Identificação do Roedor.

#### 4.4.2 Diagnóstico parasitológico

##### 4.4.2.1 Pesquisa direta

Os roedores vindos do campo ficavam instalados em um isolador de pressão negativa até que fossem eutanasiados (Figura 11). O procedimento de eutanásia foi realizado em Câmara de CO<sub>2</sub> (ANDRADE, *et al*, 2002). Para cada roedor foram confeccionados imprint de baço e esfregaço de sangue do fígado, em laminas de vidro para microscopia, que após secagem, foram fixadas com álcool metílico, coradas pelo Giemsa e examinadas em microscópio óptico com objetiva de 100x para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

#### 4.4.2.2 Isolamento *in vivo* e *in vitro*

Era retirado um fragmento de baço dos animais, posteriormente submetidos a lavagens com salina e antibiótico e macerados em 1000 $\mu$ l da mesma solução; sendo 100  $\mu$ l desse homogenato utilizado para o cultivo *in vivo*, através de inóculo em hamsters e os 900  $\mu$ l restantes eram utilizados para cultivo *in vitro*, utilizando o meio NNN modificado (WALTON *et al.*, 1977).

Os hamsters inoculados ficaram instalados em estantes ventiladas (Figura 12) durante três meses, e após este período foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, para a tentativa de isolamento de *Leishmania* spp. Os meios de culturas foram acompanhados durante um mês, com exames a cada cinco dias para observação das formas promastigotas do parasito.

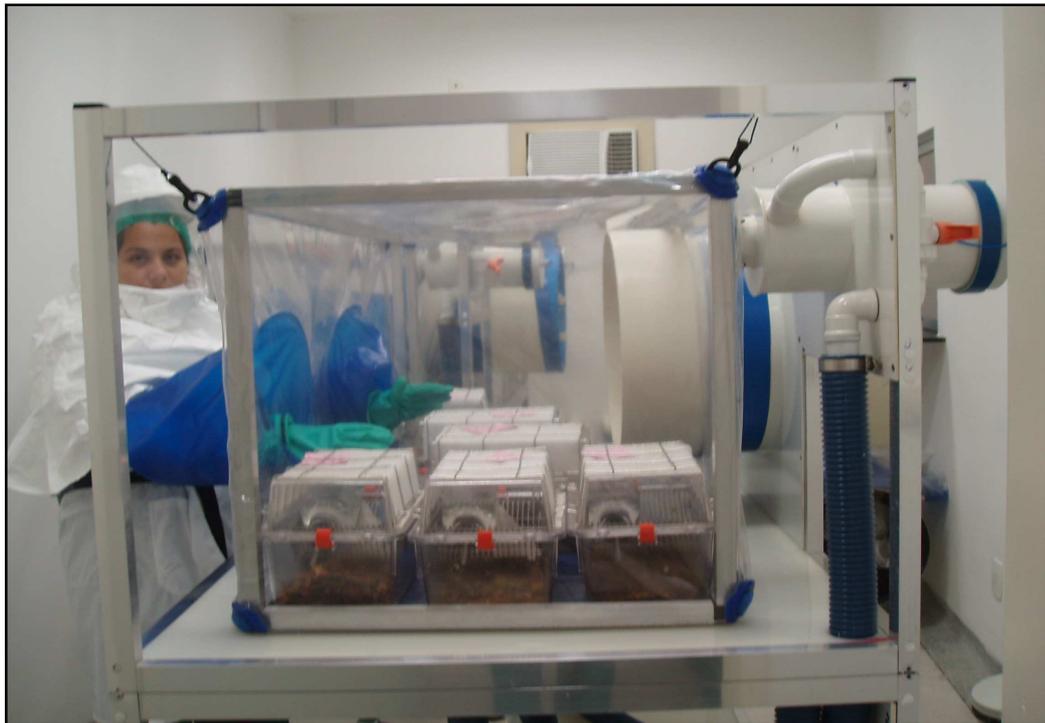


Figura 11 - Isolador onde os animais ficam em quarentena.



Figura 12 - Estantes ventiladas onde os hamsters ficam acondicionados.

#### 4.4.2.3 Diagnóstico Molecular

Amostras de baço e pele da orelha direita dos roedores foram armazenados em tubo de criopreservação e acondicionados em nitrogênio líquido, posterior purificação de DNA utilizando o GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit<sup>®</sup> (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fornecedor.

A DNA contido nas amostras foi submetido à amplificação em um termociclador automático (Modelo Px2 /Termo Electron Corporation), utilizando um sistema de PCR que permite a amplificação de kDNA de parasitas pertencentes ao complexo *Leishmania* (V.)

*braziliensis* (subgênero *Viannia*), utilizando os seguintes primers: 5'-GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG-3' e 5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3' (BRUIJIN; BARKER, 1992).

A PCR foi realizada em um volume final de 25µl contendo Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, gelatina 0,1mg/ml, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, dNTP 0,2mM, 25pmoles de cada um dos primers e 2,5 U de Taq DNA Polimerase. A essa mistura eram adicionados 2µl da amostra a ser analisada. A amplificação foi constituída de 35 ciclos: 94°C (1 min), 65°C (1 min) e 72 (1 min), precedidos de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C. Foram utilizados controles positivos de *L. (V.) braziliensis* extraídos de cepa de referência (MHOM/BR/75/M2903).

Após amplificação, 10µl dos produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1% para o alvo de 750pb, com tampão TAE (Tris-Acetato 40mM, EDTA 1mM) e corados pelo brometo de etídio. As bandas de DNA separadas eletroforeticamente foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta e fotografados utilizando software da Kodak®.

## 4.5 Inquérito entomológico

### 4.5.1 Captura, dissecação e identificação.

Foram realizadas capturas mensais na fauna de flebotomíneos na localidade de Mundo Novo, em áreas correspondentes aos domicílios e anexos, plantações e resquícios de Mata Atlântica. As capturas foram realizadas no período crepuscular e noturno, entre as 17 e 6h da manhã seguinte, durante quatro noites seguidas em cada mês, utilizando armadilhas

luminosas do tipo CDC, com altura de um metro do solo (Figura 13) e capturas manuais com capturador de Castro, com auxílio da armadilha de Shannon. Informações sobre o microclima foram obtidas através do monitoramento da umidade e temperatura nos locais de coleta e registros de índices pluviométricos da região, durante o período de estudo.



Figura 13 - Armadilha CDC instalada em Mundo Novo, São Vicente Férrer.

No laboratório as fêmeas foram dissecadas em salina, observando o tubo digestivo para pesquisa de infecção natural. Os exemplares machos foram preservados em álcool a 70% e montados em solução Berlese. A identificação dos exemplares por espécies foi realizada levando-se em consideração as características morfológicas, baseando-se na sistemática corrente proposta por Young & Duncan, 1994.

#### **4.6 Análise Estatística**

Os dados obtidos foram processados e analisados através do programa estatístico EpiInfo versão 6.0 com o qual realizamos uma análise de distribuição de frequência e Excel (Microsoft) para a construção de gráficos e tabelas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Prevalência da infecção na população humana e casos notificados

Um total de 181 pessoas, da localidade Mundo Novo, foi submetida ao teste de Intradermoreação de Montenegro (IDRM) e 37,6% (68/181) foram reagentes (Tabela 1).

Tabela 1 - Percentual de positividade para o teste de intradermoreação de Montenegro na população da localidade Mundo Novo, São Vicente Férrer.

<b>Teste IDRM</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
<b>Número</b>	68	113	181
<b>%</b>	37,60%	62,40%	100%

Foram notificados 14 casos de LTA no município de São Vicente Férrer, durante o estudo, sendo onze deles no ano de 2005 e três no primeiro semestre de 2006. Os pacientes do sexo masculino foram os mais acometidos representando 64,3% (9/14) do total de registros e a média de idade dos doentes foi de 35,3 anos, segundo registros do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

## 5.2 Animais Domésticos

Foram coletadas amostras de medula óssea (MO) em 11 cães, da localidade Mundo Novo, para a realização do diagnóstico parasitológico clássico e molecular utilizando a PCR, dos quais apenas um foi positivo (Figura 14). Todos os cães apresentavam-se assintomáticos.

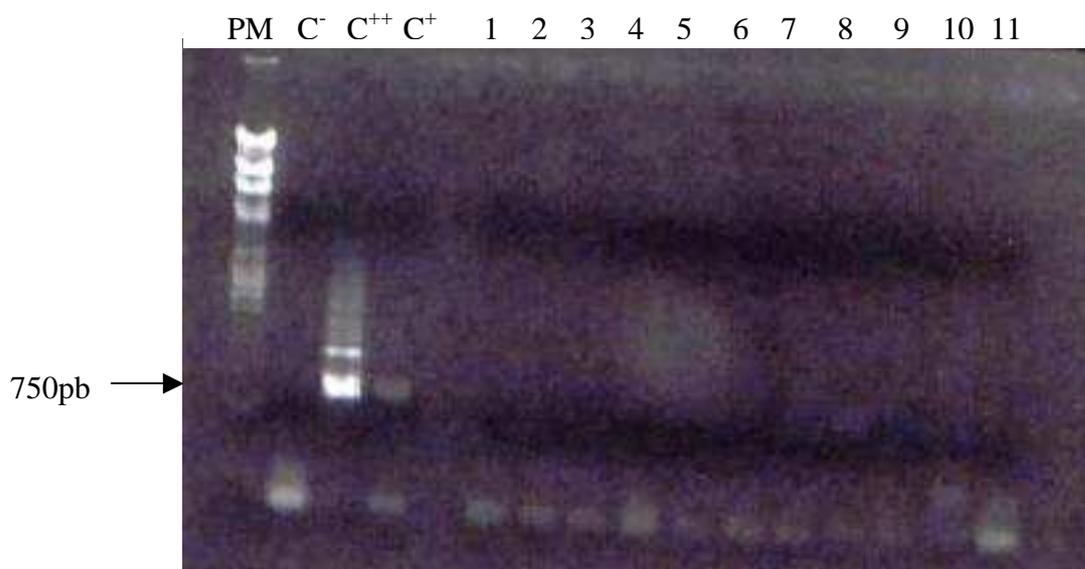


Figura 14 – Gel de agarose (1%) das amostras de MO de cães da localidade Mundo Novo. PM (Peso molecular  $\lambda$  + Hind III), C<sup>-</sup> (controle negativo), C<sup>++</sup> (controle positivo 1ng), C<sup>+</sup> (controle positivo 1pg), Linhas 1 a 11 (MO de cães), linha 8 (amostra positiva).

As amostras de MO também foram inoculadas em hamsters e em meio de cultura para tentativa de isolamento do parasito. Destas, quatro foram positivas com isolamento de *Leishmania*, identificadas através de anticorpos monoclonais específicos como *Leishmania (L.) chagasi*.

No exame parasitológico direto de um dos cães foram visualizadas formas amastigotas (Figura 15), porém, o animal veio a óbito antes que pudéssemos realizar outros procedimentos complementares para confirmação de qual espécie de *Leishmania* o animal estava infectado.



Figura 15 – Cão que apresentou exame parasitológico positivo.

### 5.3 Roedores silvestres e sinantrópicos

Foram capturados na localidade Mundo Novo um total de 120 animais, pertencentes a seis diferentes espécies, sendo 72 machos e 48 fêmeas (Tabela 2). Dentre as espécies capturadas a mais abundante foi *Nectomys squamipes* (Figura 16) com 46 exemplares e *Rattus rattus* (Figura 17) com 36 exemplares. Todos os animais foram eutanasiados, com exceção de dois exemplares da espécie *Galea spiixi*, que morreram em cativeiro. A coleta das biópsias de baço e pele para o diagnóstico parasitológico direto e molecular foi realizada em 118 animais, perfazendo 236 amostras testadas (Tabela 3).

Tabela 2 - Espécies de mamíferos silvestres que foram capturados em Mundo Novo no período de março a outubro de 2006.

<b>Espécie</b>	<b>Macho</b>	<b>Fêmea</b>	<b>Total</b>
<i>Nectomys squamipes</i>	31	15	46
<i>Rattus rattus</i>	23	13	36
<i>Holochilus sciureus</i>	9	10	19
<i>Oryzomys subflavus</i>	4	5	9
<i>Bolomys lasiurus</i>	3	4	7
<i>Galea spiixi</i>	2	1	3
<b>TOTAL</b>	<b>72</b>	<b>48</b>	<b>120</b>



Figura 16 – Rato d'água - *Nectomys squamipes*  
Fonte: <http://eco.ib.usp.br/>



Figura 17 – Rato preto - *Rattus rattus*.  
Fonte: [www.taiko.org.nz/Taikotuku.html](http://www.taiko.org.nz/Taikotuku.html)

Foi obtida uma positividade de 9,32% (22/236) através da PCR sendo positivas apenas amostras de pele, provenientes de três diferentes espécies: *Rattus rattus* (10), *Nectomys squamipes* (9) e *Holochillus sciureus* (3). Os animais positivos, em sua maioria, 72,7% (16/22), eram machos adultos. Todas as amostras de baço foram negativas (Tabela 3 e Figura 18 e 19).

Tabela 3 – Espécies de mamíferos silvestres e sinantrópicos em que foram obtidos fragmentos de baço e pele e resultado da PCR visando à detecção de *L. (Viannia) braziliensis* em amostras de pele e baço.

<b>Espécie</b>	<b>Baço</b>	<b>Resultado da PCR</b>	<b>Pele</b>	<b>Resultado da PCR</b>	<b>Total</b>	<b>% de positividade</b>
<i>Nectomys squamipes</i>	46	0	46	9/46	92	9,78
<i>Rattus rattus</i>	36	0	36	10/46	72	13,88
<i>Holochilus sciureus</i>	19	0	19	3/19	38	7,89
<i>Oryzomys subflavus</i>	9	0	9	0	18	0,00
<i>Bolomys lasiurus</i>	7	0	7	0	14	0,00
<i>Galea spiixi</i>	1	0	1	0	2	0,00
<b>TOTAL</b>	118	0/118	118	22/118	236	9,32

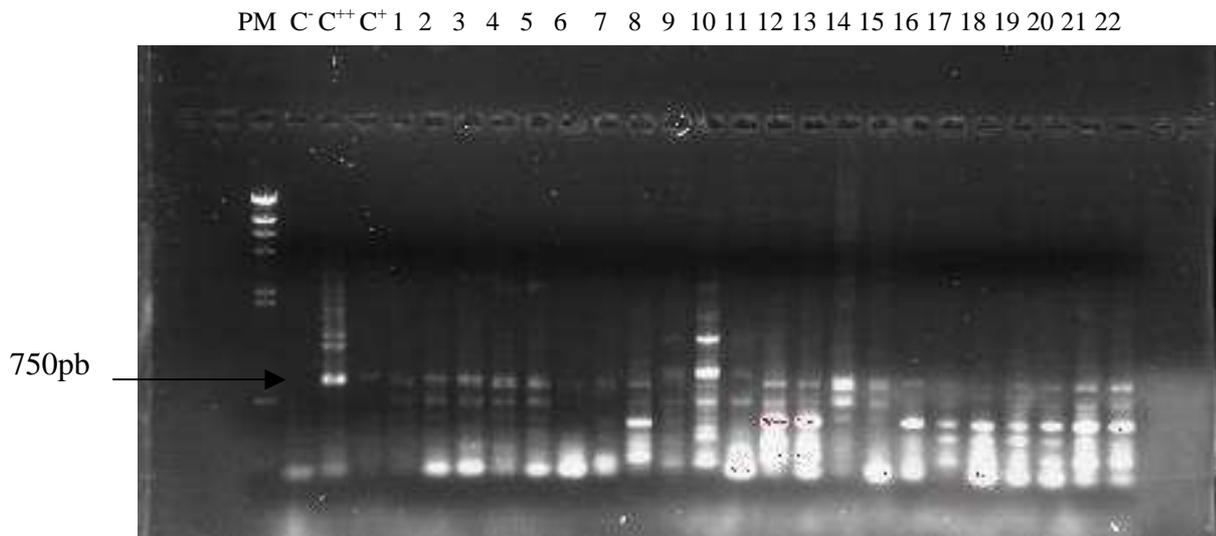


Figura 18 - Gel de agarose (1%) das amostras de pele dos animais silvestres e sinatropicos da localidade Mundo Novo. PM (Peso molecular  $\lambda$  + Hind III), C<sup>-</sup> (controle negativo), C<sup>++</sup> (controle positivo 1ng), C<sup>+</sup> (controle positivo 1pg), Linhas 1 a 22 (amostras de pele).

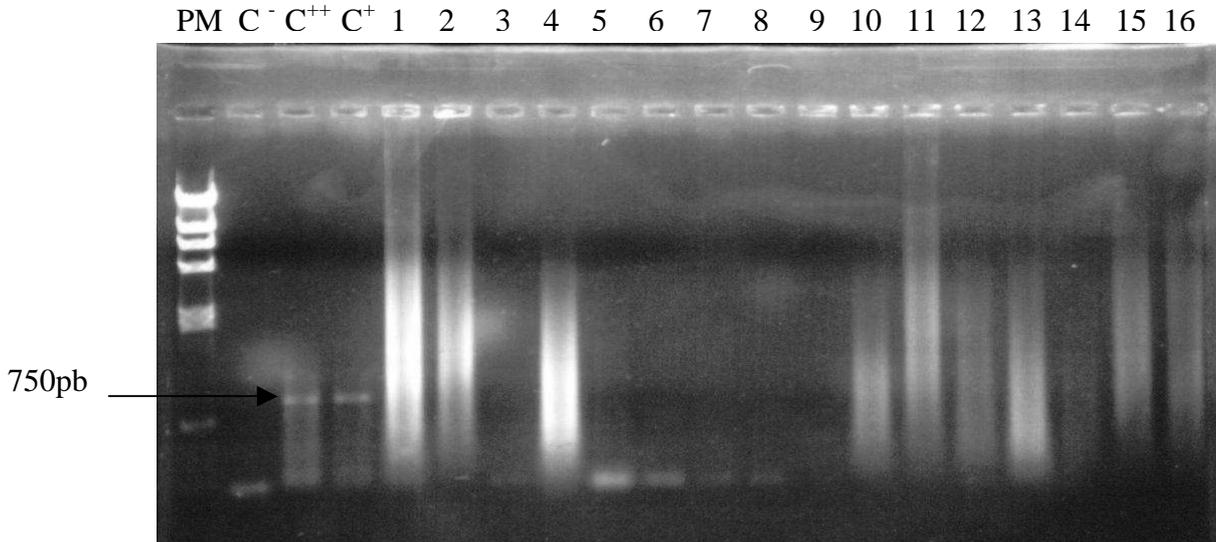


Figura 19 - Gel de agarose (1%) das amostras de baço dos animais silvestres e sinatropicos da localidade Mundo Novo. PM (Peso molecular  $\lambda$  + Hind III), C<sup>-</sup> (controle negativo), C<sup>++</sup> (controle positivo 1ng), C<sup>+</sup> (controle positivo 1pg), Linhas 1 a 16 (amostras de baço).

Outro resultado obtido foi um isolamento proveniente de um exemplar de *Nectomys squamipes*, capturado no ano de 2003, e que através de inoculo do material de baço deste animal em hamster (*M. auratus*) obtivemos o isolado que foi caracterizado através de anticorpos monoclonais, como sendo *L. (V.) braziliensis*, e também confirmada por PCR.

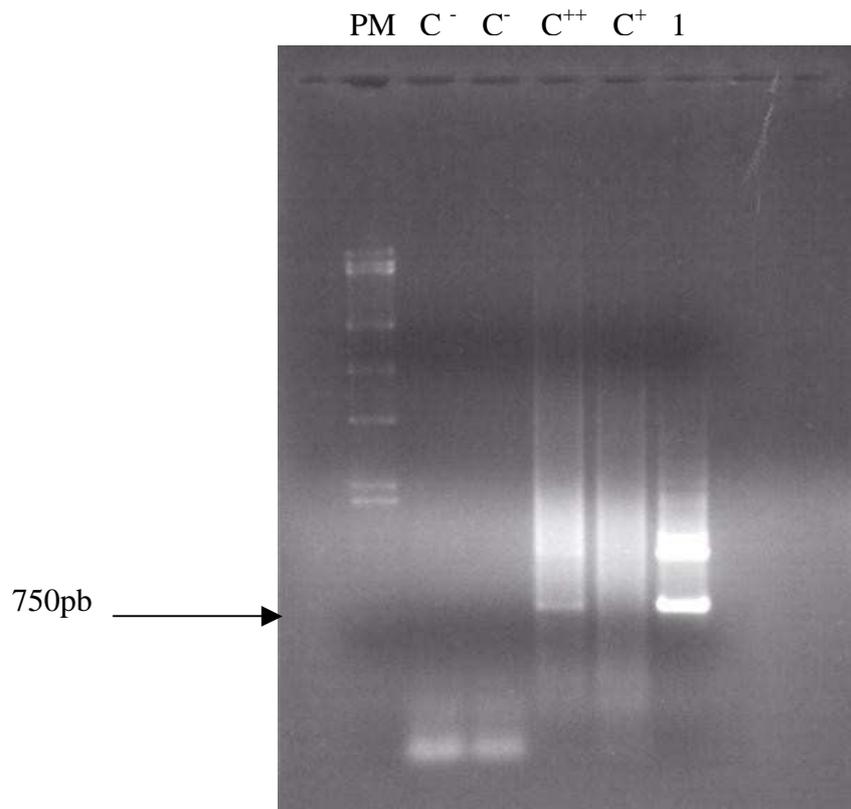


Figura 20 - Gel de agarose (1%) das amostras de baço de hamster inoculado com material de *Nectomys squamipes*. PM (Peso molecular  $\lambda$  + Hind III), C<sup>-</sup> (controle negativo), C<sup>++</sup> (controle positivo 1ng), C<sup>+</sup> (controle positivo 0,1pg), Linha 1 amostra positiva (*Nectomys squamipes*).

### 5.4 Flebotomíneos

Um total de 23.156 exemplares de dezessete espécies foi capturado entre dezembro de 2002 a novembro de 2003 (Tabela 4). *L. complexa* foi a espécie predominante, com 62,5% (14.481), seguida de *L. migonei* com 33,2% (7.677). Em abrigos de animais e casas predominou *L. migonei*, com 75,6% (5.803) e 21,6% (1.658), respectivamente. Nas capturas em mata primária, *L. complexa* foi a espécie mais abundante, com 99,8% (14.445).

Em relação à distribuição por sexo (Tabela 5), *L. complexa* teve 55,7% (5.549) de machos e 67,7% (8.932) de fêmeas, seguida por *L. migonei*, com 40,4% (4.024) de machos e 27,7% (3.653) de fêmeas.

Tabela 4 - Distribuição das espécies de Flebotomíneos coletados em Mundo Novo, no período de dezembro de 2002 a novembro de 2003, de acordo com o local de captura.

Espécies	Local de Captura							
	Abrigos de animais		Casas		Mata Primária		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>L. complexa</i>	28	0,2	8	0,1	14.445	99,8	14.481	62,5
<i>L. migonei</i>	5.803	75,6	1.658	21,6	216	2,8	7.677	33,2
<i>L. evandroi</i>	121	37,2	169	52	35	10,8	325	1,4
<i>L. sordelli</i>	47	15,6	5	1,7	250	82,8	302	1,3
<i>L. naftalekatzi</i>	-	-	-	-	170	100	170	0,7
<i>L. shannoni</i>	-	-	-	-	38	100	38	0,2
<i>L. capixaba</i>	-	-	-	-	38	100	38	0,2
<i>L. whitmani</i>	34	91,9	3	8,1	-	-	37	0,2
<i>L. tupinambai</i>	-	-	-	-	23	100	23	0,1
<i>L. quinquefer</i>	14	63,6	7	31,8	1	4,5	22	0,1
<i>L. furcata</i>	-	-	-	-	14	100	14	0,1
<i>L. fischeri</i>	-	-	-	-	10	100	10	<0,1
<i>L. walkeri</i>	-	-	-	-	6	100	6	<0,1
<i>L. brasiliensis</i>	2	50	-	-	2	50	4	<0,1
<i>L. oswaldoi</i>	-	-	-	-	4	100	4	<0,1
<i>L. choti</i>	-	-	1	50	1	50	2	<0,1
<i>L. schreiberi</i>	-	-	1	50	1	50	2	<0,1
<b>Total</b>	6.049	26,1	1.852	8	15.255	65,9	23.155	100

Tabela 5 - Distribuição por sexo do total de espécies de flebotomíneos capturados em Mundo Novo, no período de dezembro de 2002 a novembro de 2003.

Espécie	Machos		Fêmeas		Total	
	N	%	N	%	N	%
<i>L. migonei</i>	4024	40,37	3653	27,69	7677	33,15
<i>L. whitmani</i>	18	0,18	19	0,14	37	0,15
<i>L. evandroi</i>	167	1,67	158	1,19	325	1,40
<i>L. sordellii</i>	71	0,71	231	1,75	302	1,30
<i>L. walkeri</i>	5	0,05	1	< 0,01	7	0,03
<i>L. quinquefer</i>	8	0,08	14	0,10	22	0,09
<i>L. furcata</i>	6	0,06	8	0,06	14	0,06
<i>L. complexa</i>	5549	55,67	8932	67,72	14481	62,53
<i>L. oswaldoi</i>	1	0,01	3	0,02	4	0,01
<i>L. shannoni</i>	11	0,11	27	0,20	38	0,16
<i>L. naftalekatzi</i>	92	0,92	78	0,59	170	0,73
<i>L. tupyngambai</i>	4	0,04	19	0,14	23	0,09
<i>L. choti</i>	1	0,01	1	< 0,01	2	< 0,01
<i>L. capixaba</i>	5	0,05	33	0,25	38	0,16
<i>L. brasiliensis</i>	2	0,02	2	0,01	4	0,01
<i>L. schreiberi</i>	0	0,00	2	0,01	2	< 0,01
<i>L. fischeri</i>	2	0,02	8	0,06	10	0,04
<b>Total</b>	<b>9966</b>	<b>100</b>	<b>13189</b>	<b>100</b>	<b>23155</b>	<b>100</b>

Tabela 6 - Distribuição de flebotomíneos por sexo de acordo com local e captura, em Mundo Novo, São Vicente Férrer.

	ABRIGO DE ANIMAIS				DOMICÍLIO				MATA PRIMÁRIA				TOTAL			
	Macho		Fêmea		Macho		Fêmea		Macho		Fêmea		Macho		Fêmea	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>L. migonei</i>	2926	50,42	2877	49,58	999	60,25	659	39,75	99	45,83	117	54,17	4024	52,42	3653	47,58
<i>L. whitmani</i>	16	47,06	18	52,94	2	66,67	1	33,33	0	0,00	0	0,00	18	48,65	19	51,35
<i>L. evandroi</i>	62	51,24	59	48,76	90	53,25	79	46,75	15	42,86	20	57,14	167	51,38	158	48,62
<i>L. sordellii</i>	8	17,02	39	82,98	2	40,00	3	60,00	61	24,40	189	75,60	71	23,51	231	76,49
<i>L. walkeri</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	5	83,33	1	16,67	5	83,33	1	16,67
<i>L. quinquefer</i>	6	42,86	8	57,14	1	14,29	6	85,71	1	100,00	0	0,00	8	36,36	14	63,64
<i>L. furcata</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	6	42,86	8	57,14	6	42,86	8	57,14
<i>L. complexa</i>	12	42,86	16	57,14	1	12,50	7	87,50	5536	38,32	8909	61,68	5549	38,32	8932	61,68
<i>L. oswaldoi</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	25,00	3	75,00	1	25,00	3	75,00
<i>L. shannoni</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	11	28,95	27	71,05	11	28,95	27	71,05
<i>L. naftalekatzi</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	92	54,12	78	45,88	92	54,12	78	45,88
<i>L. tupynamboi</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	4	17,39	19	82,61	4	17,39	19	82,61
<i>L. choti</i>	0	0,00	0	0,00	1	100,00	0	0,00	0	0,00	1	100,00	1	50,00	1	50,00
<i>L. capixaba</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	5	13,16	33	86,84	5	13,16	33	86,84
<i>L. brasiliensis</i>	2	100,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	100,00	2	50,00	2	50,00
<i>L. schreiberi</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	100,00	0	0,00	1	100,00	0	0,00	2	100,00
<i>L. fischeri</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	20,00	8	80,00	2	20,00	8	80,00
<b>TOTAL</b>	<b>3032</b>	<b>50,12</b>	<b>3017</b>	<b>49,88</b>	<b>1096</b>	<b>59,18</b>	<b>756</b>	<b>40,82</b>	<b>5838</b>	<b>38,27</b>	<b>9416</b>	<b>61,73</b>	<b>9966</b>	<b>43,04</b>	<b>13189</b>	<b>56,96</b>

Em relação à variação mensal e sazonalidade, foi observada entre os meses de abril e julho, a maior densidade de flebotomíneos (Figura 21), correspondendo ao período de maior umidade relativa do ar, onde foi registrado 66,5%. A temperatura média neste período variou de 28 °C em abril a 23,6 °C em julho, sendo meses de temperaturas mais baixas (Figura 22).

Figura 21 - Variação mensal de flebotomíneos no período de 12 meses (dezembro de 2002 a novembro de 2003) em Mundo Novo, São Vicente Férrer.

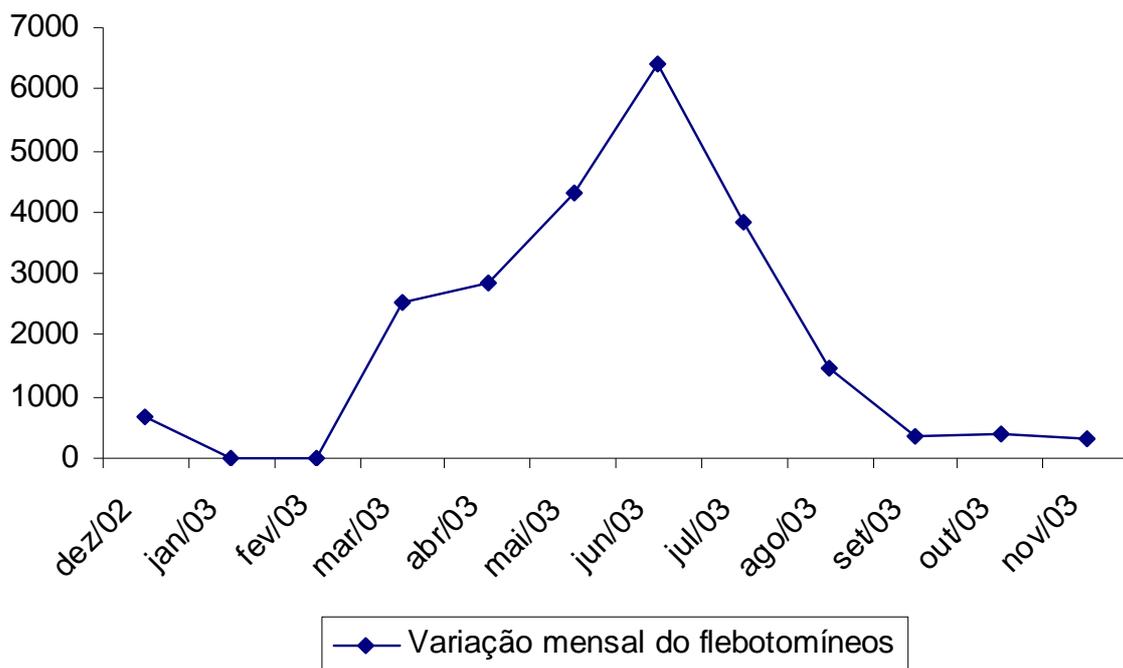
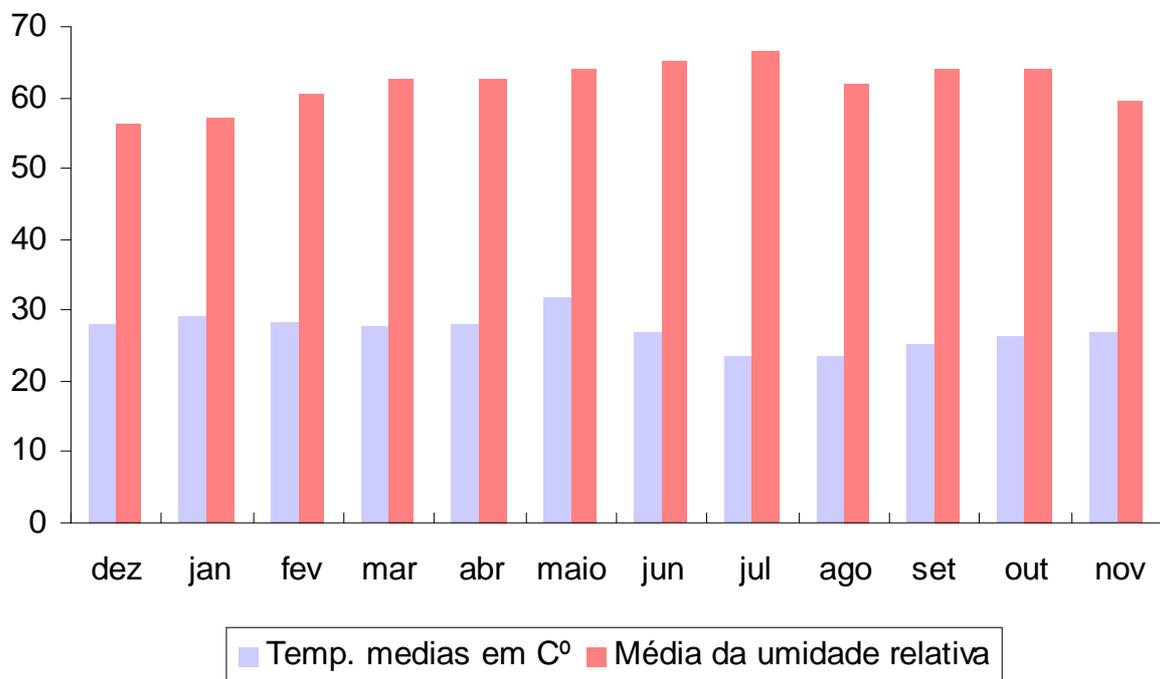


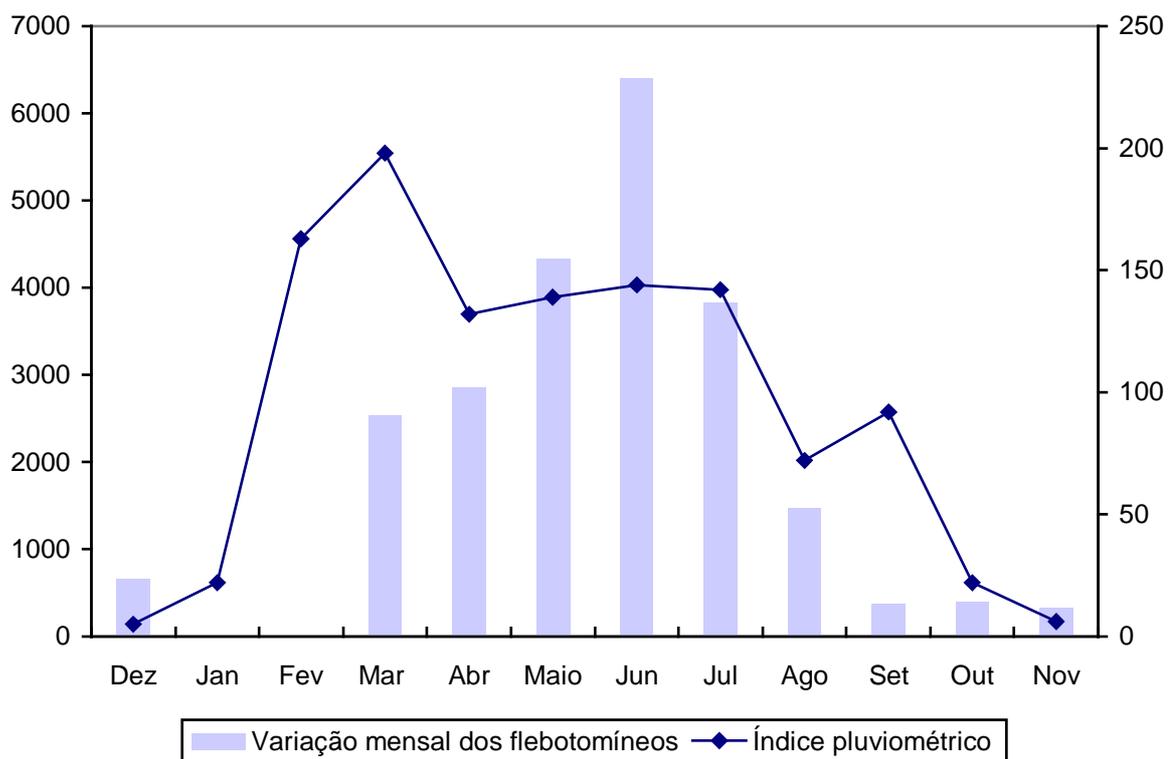
Figura 22 – Média da umidade relativa do ar e temperaturas médias observadas durante o período de captura dos flebotomíneos na localidade Mundo Novo, São Vicente Férrer.



Fonte: Instituto Tecnológico de Pernambuco / Laboratório de Meteorologia de Pernambuco (ITEP/LAMEPE).

A maior densidade de flebotomíneos coincidiu com os meses mais chuvosos, onde os índices pluviométricos variaram de 132 mm<sup>3</sup> em abril e 142 mm<sup>3</sup> em julho. No mês de junho obtivemos o maior número de flebotomíneos capturados, mês de maiores precipitações de chuvas, registrando um índice pluviométrico de 144mm<sup>3</sup> (Figura 23).

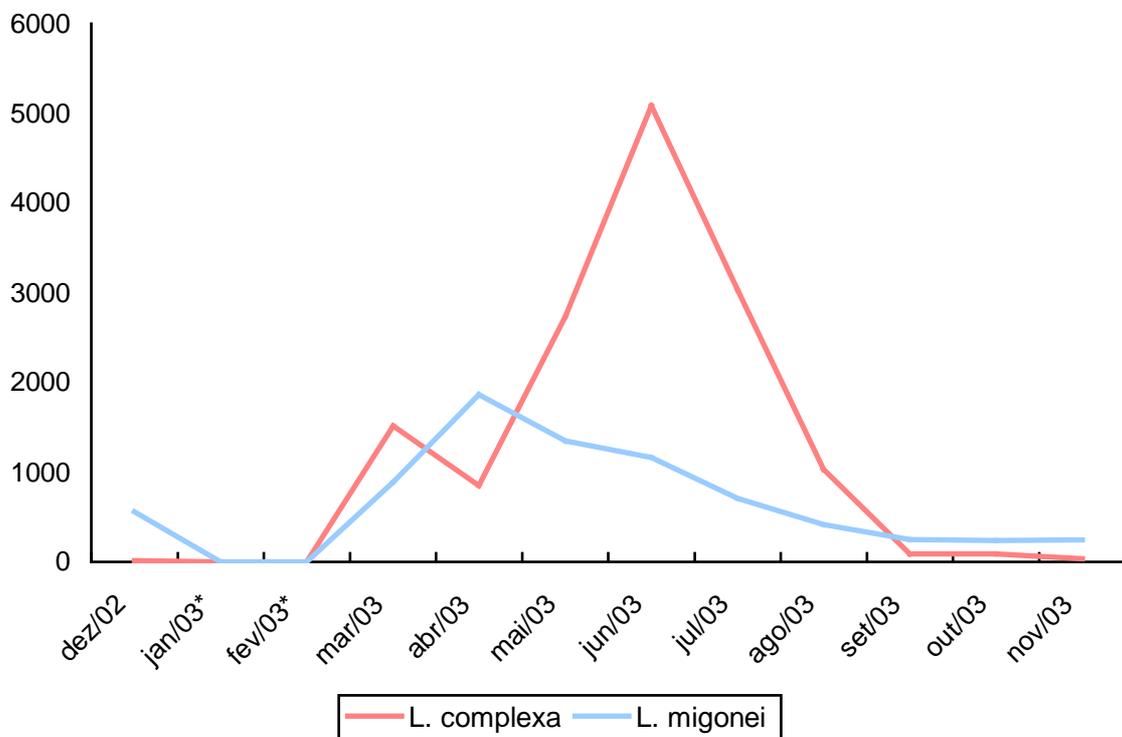
Figura 23 - Registros dos índices pluviométricos e variação mensal de flebotomíneos no período de 12 meses (dezembro de 2002 a novembro de 2003) em Mundo Novo, São Vicente Férrer.



Fonte: Instituto Tecnológico de Pernambuco / Laboratório de Meteorologia de Pernambuco (ITEP/LAMEPE).

Os meses compreendidos de maio a julho foi o período em que a espécie *L. complexa* foi mais abundante enquanto a *L. migonei* foi mais freqüente entre os meses de março e abril (Figura 24).

Figura 24 - Comparação do total de espécimes de *L. complexa* e *L. migonei* capturados no período de dezembro de 2002 a novembro de 2003, em Mundo Novo, São Vicente Férrer.



## 6 DISCUSSÃO

A complexidade da LTA causada por *L. (V.) braziliensis* está, representada pelas diversas manifestações clínicas relacionadas a esta espécie, limitações de tratamento e pela 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. Neste sentido, os resultados obtidos neste estudo auxiliam na identificação do padrão de transmissão envolvido em uma importante região endêmica de colonização antiga, na Mata Atlântica do Nordeste, onde ocorrem as duas formas de leishmaniose.

Verifica-se uma grande expansão geográfica da área de ocorrência da LTA, a qual atualmente encontra-se presente em grande parte do território pernambucano, compreendendo todas as regiões, tendo metade de todos os casos concentrados na Zona da Mata (BRANDÃO-FILHO *et al*, 1999). No município de São Vicente Férrer, foram notificados 14 casos de LTA, durante o desenvolvimento deste trabalho, sendo onze deles no ano de 2005 e três no primeiro semestre de 2006. Os pacientes do sexo masculino foram os mais acometidos, representando 64,3% (9/14) do total de registros; indivíduos de todas as faixas etárias foram atingidos, inclusive crianças, sugerindo a domiciliação desta endemia no município estudado.

O inquérito de prevalência da infecção realizado na população humana da localidade de Mundo Novo através da IDRM apresentou um percentual de positividade de 37,6%, corroborando com outros trabalhos que relatam uma positividade que varia de 18,6% a 78,2% (ANDRADE *et al*, 2005; ARLENE *et al*, 2001; COSTA *et al*, 1998; NUNES *et al*, 2006; SILVEIRA *et al*, 1999).

A intradermoreação de Montenegro (IDRM) é um teste diagnóstico muito útil na leishmaniose tegumentar, tendo sido mencionada sensibilidade variando entre 80 e 100% e especificidade chegando a 100%. Na leishmaniose visceral, a IDRM tem outro comportamento, sendo negativa durante a doença ativa e tornando-se positiva após semanas ou até dois anos do tratamento (CUBA CUBA *et al*, 1985; MELO *et al*, 1977; PAMPIGLIONE *et al*, 1975).

Um dos fatores que limita a compreensão da epidemiologia das leishmanioses é a identificação de hospedeiros reservatórios que mantem o ciclo de transmissão. Os reservatórios naturais são geralmente desconhecidos devido às dificuldades na captura destes animais silvestres, mas principalmente devido às dificuldades para o isolamento e identificação dos parasitos, particularmente *L. braziliensis*. Achados ocasionais referidos com *L. braziliensis sensu lato* em diversos mamíferos silvestres e sinantropicos foram registrados em várias regiões das Américas durante o século XX, mas todos baseados apenas em características morfológicas do parasito ao microscópio óptico ou apenas no comportamento do crescimento deste em meio de cultura e ou em animais de experimentação, como o hamster (FORATTINI *et al*, 1972; LAINSON; SHAW, 1979; MAYRINK *et al*, 1979).

Neste estudo os isolados obtidos de material humano e de animal silvestre foram caracterizados através de anticorpos monoclonais e representaram ambos os primeiros isolados de *L. (V.) braziliensis* nesta área da Zona da Mata no Estado de Pernambuco, comprovando, classicamente, o envolvimento deste parasito no município estudado.

O teste da PCR constitui uma valiosa ferramenta para estudos epidemiológicos, pois se pode detectar o DNA do parasito em vários tipos de amostras clínicas de pacientes, animais hospedeiros e vetores, sem a necessidade de isolar o parasito, sendo utilizado na identificação da

infecção natural em mamíferos silvestres em várias áreas endêmicas de LTA. (ALEXANDER *et al*, 1998; BRANDÃO-FILHO *et al*, 2003; DE LIMA *et al*, 2002; KERR *et al*, 1999; TELLERIA *et al*, 1999).

No presente estudo, foi obtida através da PCR, uma positividade de 9,32% (22/236) para os animais silvestres e sinantrópicos examinadas, sendo positivas apenas amostras de pele, provenientes de três diferentes espécies: *Rattus rattus*, *Nectomys squamipes* e *Holochillus sciureus*. Os animais positivos, em sua maioria, 72,7%, eram machos adultos e todas as amostras de baço foram negativas. A detecção de DNA de *Leishmania* sp em amostras de pele de animais silvestres no presente estudo corrobora com os achados de um trabalho realizado no Estado de Minas Gerais, onde foi obtida uma positividade de 6,4%, sendo detectados DNA de *Leishmania* dos complexos *braziliensis* e *donovani* em amostras de pele de algumas espécies de roedores silvestres assintomáticos (OLIVEIRA *et al*, 2005).

A infecção por *Leishmania* em *R. rattus*, espécie comensal abundante no ambiente doméstico, parece ser muito comum em áreas endêmicas de LTA no Brasil. Entretanto, poucos estudos investigaram o papel deste roedor sinantrópico no ciclo de transmissão da doença. No Brasil, Vasconcelos *et al* (1994) e Brandão-Filho *et al* (2003) verificaram que esse roedor poderia agir como reservatório secundário natural no ciclo de transmissão da leishmaniose cutânea associada a *L. (V.) braziliensis*. Outros estudos que também utilizaram diagnóstico molecular por PCR, relatam à presença de DNA de parasitos do complexo *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana* em espécimes de *R. rattus* (ALEXANDER *et al*, 1998; DE LIMA *et al*, 2002). No nosso trabalho foi detectado em *R. rattus* através da PCR, uma positividade de 13,88%, a maior entre os animais estudados. Este dado reforça os estudos precedentes que mostram a presença de DNA de *L. (V.) braziliensis* em amostras deste roedor sinantrópico.

O roedor silvestre *N. squamipes* também apresenta evidências consistentes para sua incriminação como provável reservatório primário da LTA, sobretudo pelo significativo índice de infecção natural na detecção de DNA de *Leishmania (Viannia)* spp, demonstrado por Brandão-Filho *et al* (2003), o que reforça seu envolvimento na manutenção do ciclo de transmissão na Zona da Mata Sul de Pernambuco. O presente estudo detectou DNA de *Leishmania (Viannia)* spp. em 9,78% dos exemplares desta espécie silvestre, e 7,89% em animais da espécie *H. sciurus*.

Originalmente uma zoonose de áreas de florestas, o ciclo da transmissão da LTA tem-se adaptado nas últimas décadas ao ambiente doméstico em pelo menos nove países latino-americanos. Diversos estudos têm sugerido que o cão doméstico (*Canis familiaris*), que já é incriminado como reservatório no ciclo zoonótico da leishmaniose visceral, pode ter um papel de reservatório secundário na transmissão doméstica da LTA causada por *L. braziliensis*, *L. panamensis* e por *L. peruviana* (ALEXANDER *et al*, 1995; CHRISTENSEN *et al*, 1983; DAVIES *et al*, 1997; DE QUIEROZ *et al*, 1994; FELICIANGEL *et al*, 1994; LE PONT *et al*, 1989; MORALES *et al*, 1981; RANGEL *et al*, 1984; SALOMOM *et al*, 1992; VILLASECA *et al*, 1993).

A partir da primeira evidência da participação do cão doméstico na transmissão da LTA no Brasil, assinalada por Pedroso (1913), somente na década de 80 intensificaram-se estudos para melhores esclarecimentos deste novo perfil. O diagnóstico para a detecção da infecção em cães é normalmente realizado mediante exames clínicos, demonstração do parasita e identificação de anticorpos específicos, através de testes sorológicos como RIFI e ELISA, sendo estes considerados os de melhor especificidade e de maior sensibilidade, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Para Falqueto *et al* (1986), a possibilidade da manutenção do ciclo zoonótico doméstico entre o homem e animais domésticos pode ser independente do ciclo entre animais silvestres e a eventual infecção humana. Segundo o autor, o cão seria o elo essencial para a disseminação dessa zoonose em alguns municípios do Sudeste brasileiro. A presença das formas clínica/subclínica da LTA na população canina sugere que o cão pode atuar como possível fonte de infecção ao vetor e conseqüentemente na disseminação da doença para o homem, dependendo da espécie de flebotomíneo envolvido e da competência vetorial.

O ciclo de transmissão de leishmaniose tegumentar apresenta características peculiares a cada região endêmica, o que nem sempre permite extrapolar dados de uma região para outra. Por outro lado, muitas áreas endêmicas apresentam características ambientais semelhantes, coincidindo detalhes do ciclo de transmissão, tais como: a presença das mesmas espécies de parasitos, mamíferos silvestres e insetos vetores (Falqueto, 1995). Este autor ainda se refere às duas áreas endêmicas de LTA por ele estudadas na Região Sudeste do Brasil, onde a *L. migonei* foi a espécie que apresentou maior afinidade pelo cão. Aguiar *et al.* (1993), realizando pesquisas também no Sudeste, no litoral sul do Estado do Rio de Janeiro, no município de Paraty, já havia observado preferência alimentar da espécie *L. migonei* por cães.

Em nosso estudo, o teste de PCR específico para o subgênero *Viannia*, detectou um cão positivo dos onze espécimes examinados, representando um percentual de positividade de 9 %. Todos os animais apresentavam-se assintomáticos, mostrando a importância do diagnóstico molecular neste tipo de estudo.

A importância epidemiológica das leishmanioses impulsiona os estudos dos flebotomíneos vetores de *Leishmania*. São conhecidas mais de 800 espécies destes insetos no mundo e estima-se que 81 delas são capazes de transmitir este parasita (KILLICK-KENDRICK

*et al*, 1990). Nas Américas já foram identificadas mais de 400 espécies das quais cerca de trinta são vetores comprovados. No Estado de Pernambuco os casos de LTA humana ocorreram, com incidência crescente na última década, na Zona da Mata geralmente associada a *L. whitmani* como vetor principal (BRANDÃO-FILHO *et al*, 1999).

No Nordeste do Brasil existe uma grande riqueza de espécies de flebotomíneos. Os estados do Maranhão, Ceará e Bahia apresentam uma fauna bastante diversificada, constituída por um grande número de espécies (REBÊLO *et al.*, 2000 e SHERLOCK *et al*, 1996). Em Pernambuco, a fauna flebotomínica ainda é pouco conhecida, mas já se verifica também um grande número de espécies (ANDRADE *et al*, 2005; BALBINO *et al*, 2005; BRANDÃO-FILHO *et al*, 1998; BRANDÃO-FILHO *et al*, 1994).

O presente trabalho acrescenta informações relevantes em relação à fauna flebotomínea da região da Zona da Mata Norte de Pernambuco, onde foi encontrada uma baixa densidade de *L. whitmani*, vetor comprovado da transmissão da LTA e incriminado como vetor da LTA na Zona da Mata Sul do estado e ausência de *L. longipalpis*, incriminado na literatura como vetor transmissor da LVA.

Souza *et al*, (2003), encontrou a ausência do *L. longipalpis* em seis localidades diferentes do Rio de Janeiro com casos humanos autóctones de LVA, associada à presença de *L. firmatoi* e *L. migonei*, que segundo o autor, apresentam um estreito grau de parentesco no grupo parafilético do subgênero *Lutzomyia* e sugere a possibilidade dessas espécies apresentarem importância epidemiológica na transmissão da LVA nessas áreas onde não foi observada a presença da *L. longipalpis*.

Os resultados encontrados neste trabalho com as capturas realizadas em diferentes locais representativos de habitats/ecótopos (intradomicílio, estábulos e resquícios de mata primária),

apresentam *L. complexa* com maior densidade em mata primária e *L. migonei* predominou nas capturas realizadas em abrigos de animais e casas com 75,6% e 21,6% respectivamente (CARVALHO *et al*, 2007, em anexo).

*L. complexa* é incriminado como vetor de *L. (V.) braziliensis* na região Norte, onde foi encontrado naturalmente infectado com esta espécie no Estado do Pará e é reconhecidamente antropofílico (DE SOUZA *et al*, 1996). Em um estudo realizado em Paudalho, Zona da Mata Norte de Pernambuco foi encontrada *L. complexa* em maior densidade em uma área de mata onde era realizado treinamento com os militares e onde ocorreram vários casos de LTA em indivíduos após estes treinamentos na mata (ANDRADE *et al*, 2005). Neste sentido, mesmo não tendo encontrado infecção natural nesta espécie durante o nosso estudo, o fato de apresentar predominância relativa nas capturas realizadas na Mata primária remanescente, reforça a hipótese de este constituir-se o vetor primário de *L. (V.) braziliensis*, envolvido na transmissão do ciclo enzoótico silvestre.

*L. migonei* e *L. whitmani*, relatados por Azevedo e Rangel, (1991), no município cearense de Baturité, situado na Serra de Baturité, como espécies que poderiam invadir os habitats peridomésticos e domésticos, onde *L. migonei* foi encontrada naturalmente infectada com *L. braziliensis* e junto com *L. whitmani* foram incriminadas como transmissoras da LTA (AZEVEDO *et al*, 1990 a e b). Semelhante quadro foi verificado em Afonso Cláudio, município de Espírito Santo, situado a 650m do nível do mar, onde *L. migonei*, *L. whitmani* e *L. intermedia*, foram as espécies vetoradas da *L. braziliensis* no ambiente domiciliar, sendo que a primeira e a segunda espécies estariam fazendo a ponte entre o ambiente silvestre e domiciliar (FALQUETO, 1995).

Em nosso estudo devido a maior densidade de *L. migonei* em ambientes domésticos e peridomésticos sugere-se também que este vetor está envolvido no ciclo zoonótico da LTA na região, já que nesta localidade a *L. whitmani* foi encontrado em menor densidade.

Baseado nos dados obtidos podemos extrapolar e tentar definir o perfil de transmissão da LTA na região, adaptando os nossos resultados para o diagrama ( Figura 20) proposto por Shaw & Laison (1987), elaborado para representar a relação entre o(s) vetor (es) e reservatório (s) envolvidos em ciclos enzoóticos e zoonóticos. Logo podemos enquadrar a situação encontrada nesta região em duas possíveis representações esquemáticas: uma representada por um ciclo enzoótico silvestre envolvendo (*N. squamipes*) reservatório primário, com o possível vetor primário representado por *L. complexa* (Diagrama iii,iv ou v); e outra representado o ciclo zoonótico ( situação vi ou vii), onde no esquema vi, há a interface de ligação na transmissão entre os habitats do reservatório primário (*N. squamipes*) e secundário (*R. rattus* e o cão) desempenhado por um vetor comum, *L. migonei*.

Diante do exposto pode-se sugerir que *L. migonei* seria o vetor envolvido no ciclo zoonótico da LTA nesta região, devido a sua maior densidade e a seu comportamento tanto zoofílico quanto antropofílico, conseqüentemente haveria maior chance de se infectar em reservatórios primários e em animais domésticos como o cão (FALQUETO, 1995; FALQUETO *et al*, 1986). Mesmo assim, fazem-se necessários novos estudos sobre a infecção natural e o hábito alimentar destas espécies na tentativa de elucidar esta hipótese.

Finalmente, é consistente a evidência do envolvimento de mais de uma espécie de vetor na transmissão da leishmaniose tegumentar neste município da Zona da Mata Norte, nos ciclos zoonótico e enzoótico mantidos por pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos.

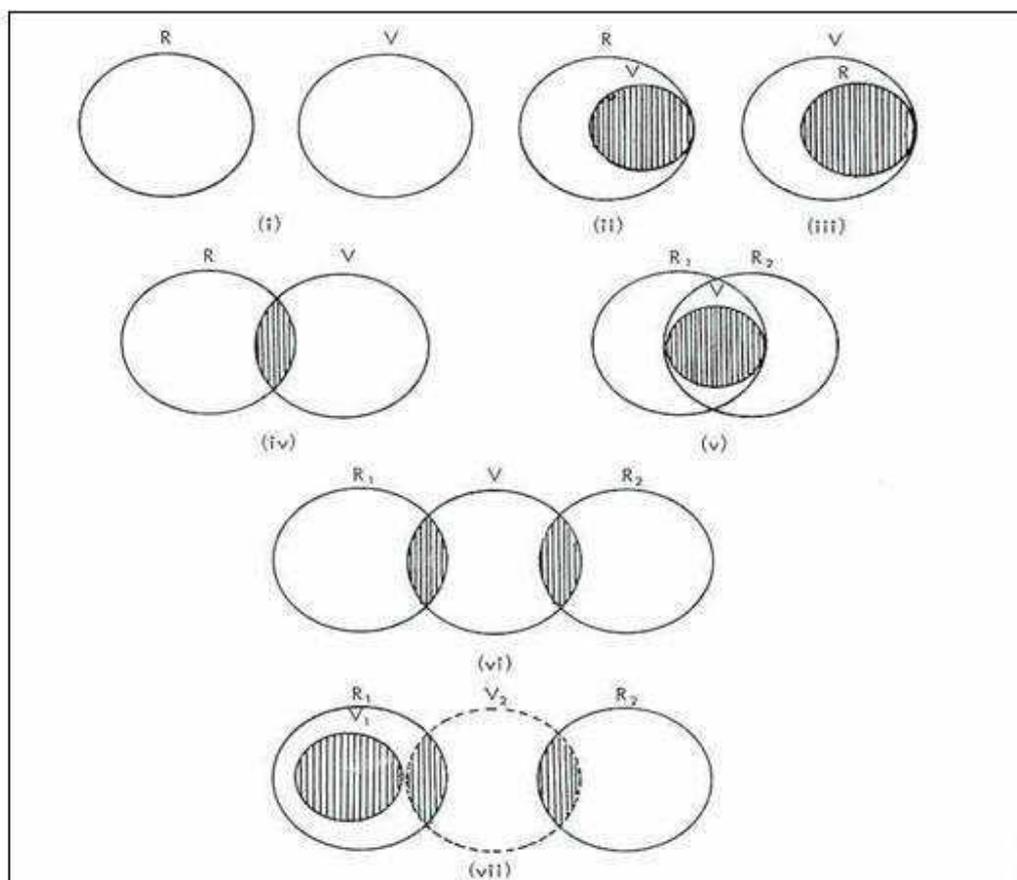


Figura adaptada de Shaw and Lainson, capítulo Ecology and epidemiology : New World, in The Leishmaniosis in Biology and Medicine – Volume I, 1987.

Figura 20 - Diagrama representativo da relação do vetor(s) e reservatório(s) para ocorrer a transmissão (área rachurada). (i) Nenhuma sobreposição entre habitats: ausência de transmissão; (ii) Transmissão através do habitat do vetor; (iii) Transmissão através do habitat do reservatório; (iv) Transmissão limitada a uma pequena área de sobreposição de habitats; (v) Transmissão para dois hospedeiros com diferentes preferências por habitats, através do habitat do vetor; (vi) Transmissão para dois diferentes hospedeiros de diferentes habitats pelo mesmo vetor; (vii) Transmissão por um vetor secundário para hospedeiro secundário fora do habitat do reservatório primário e do vetor. R (reservatório), V (vetor), R<sub>1</sub> (reservatório primário), R<sub>2</sub> (reservatório secundário), V<sub>1</sub> (vetor primário), V<sub>2</sub> (vetor secundário).

(i)-(iv) representam ciclos enzoóticos e (v) – (vii) representam possíveis ciclos zoonóticos, nos quais o homem é um hospedeiro acidental (R<sub>2</sub>).

## 7 CONCLUSÕES

1. A circulação de *L. (V.) braziliensis* foi comprovada nesta região.
2. O animal silvestre *N. squamipes* (rato da água) é um provável hospedeiro reservatório de *L. (V.) braziliensis*, estando envolvido no ciclo enzoótico da LTA nesta região.
3. O *R. rattus*, animal sinantrópico, pode estar envolvido no ciclo zoonótico da LTA, representando um hospedeiro secundário na localidade de Mundo Novo.
4. O cão (*Canis familiaris*) pode representar uma fonte de infecção para os flebotomíneos na região do peridomicílio e domicílio, podendo, também está envolvido no ciclo zoonótico da LTA nesta localidade.
5. *L. migonei* apresenta evidências indiretas de constituir-se vetor da LTA, envolvido no ciclo zoonótico, nesta região da Zona da Mata Norte de Pernambuco, onde foi encontrada baixa densidade de *L. whitmani*, principal vetor comprovado na transmissão da LTA no Brasil.
6. *L. complexa* possivelmente está envolvido no ciclo enzoótico da LTA nesta região.
7. O número de casos humanos durante o estudo ficou dentro da média histórica, onde predominou a forma cutânea da doença.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, G. M., *et al.* Ecology of sandflies in a recent focus of cutaneous Leishmaniasis in Paraty, litoral of Rio de Janeiro state (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, p.339-340, Abr.-Jun, 1993.
- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. Animais de Laboratório: criação e experimentação. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, 2002.
- ANDRADE, M. S., *et al.* Sandfly fauna in a military training area endemic for American tegumentary leishmaniasis in the Atlantic Rain Forest region of Pernambuco, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.21(6), p.1761-1767, Nov-Dec., 2005.
- ANDRESEN, K., *et al.* Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* : a comparison with direct microscopy of smears and sections from lesions. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 90, p. 133-135, 1996.
- ALENCAR, N.X.; *et al.* Mielograma. Parte I: indicações e colheita do material. **Revista Educação Continuada. CRMV-SP.**, v.5, n.2, p.157-163, 2002.
- ALEXANDER B, *et al.* Phlebotomine sandflies associated with a focus of cutaneous leishmaniasis in Valle del Cauca, Colombia. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 9, p. 273– 278, Jul.,1995.
- ALEXANDER, B. *et al.* Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. **Acta Tropica**, Cambridge, v. 69, p. 41-50, Mar, 1998.
- ALVAR, J., *et al.* Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p.1- 88, Oct., 2004.
- AZEVEDO, A.C.R., *et al.* Natural infection of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* by *Leishmania* of the *Braziliensis* complex in Baturité, Ceará State, Northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, p. 251, Apr-Jun, 1990b.
- AZEVEDO, A.C.R., RANGEL E. F., QUEIROZ, R.G. *Lutzomyia migonei* naturally infected with peritrypan flagellates in Baturité, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, p. 199, Apr-Jun,1990a.
- AZEVEDO, A.C.R, Rangel E. F. A study of sandfly species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in focus of cutaneous Leishmaniasis in the municipality of Baturité, Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 405-410, Oct.-Dec, 1991.
- BALBINO, V.Q., *et al.* Sand flies (Diptera: Psychodidae) in Pernambuco State, northeastern Brazil: The presence of species incriminated as vectors of cutaneous leishmaniasis in the Amazon region. **Zootaxa**, New Zealand, v. 1078, p.25-32, Nov., 2005.

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, Jul-Sep, 1994.

BRANDÃO-FILHO *et al.* Leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.31, p. 575-578, Nov.-Dec1998.

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, Sep-Oct, 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. Tese de Doutorado, **Universidade de São Paulo**, São Paulo, Brasil, 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, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 97, p.291-296, May- June, 2003.

BRITO, M.E.F., *et al.* Domesticity of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) populations: field experiments indicate behavioural differences. **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 90, p. 41-48, 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, p. 318-321, Mar, 2000.

CAMPBELL-LENDRUM, D.H., *et al.* Experimental comparison of anthropophily between geographically dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae). **Medical e Veterinary Entomology**, Oxford, v. 13, p. 299, Jul., 1999.

CAMPBELL-LENDRUM, D.H., *et al.* Domesticity of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: psychodidae) populations: field experiments indicate behavioural differences. **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 90, p. 41-48, Feb., 2000.

CHRISTENSEN, H.A., *et al.* The ecology of cutaneous leishmaniasis in the Republic of Panama. **Journal of Medical Entomology**, s.l., v. 20, p. 463-484, Oct., 1983.

CUBA CUBA, C. A. *et al.* Parasitologic and immunologic diagnosis of American (mucocutaneous) leishmaniasis. **Epidemiological Bulletin Pan American Health Organization**, Washington, v. 15, p. 249-259, 1981.

CUBA CUBA, C. A., *et al.* The use of different concentrations of leishmanial antigen in skin testing to evaluate delayed hypersensitivity in american cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 18, p. 231-236, 1985.

CUPOLILLO E., GRIMALDI G., MOMEN H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, s.l., v. 50, p. 296-311, 1994.

DAVIES C.R., *et al.* Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: risk factors identified from a village cohort study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, s.l., v. 56, p. 85-95, Jan., 1997.

DE LIMA, H., *et al.* Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. In Lara State. Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v 97, p. 169-174, Mar, 2002.

DE SOUZA *et al.* *Psychodopygus complexus*, a new vector of *Leishmania braziliensis* to human in Pará State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 90, p. 112-113, Mar.-Apr., 1996.

DEGRAVE, W., *et al.* Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89(3), p. 463-469, Jul-Sep, 1994.

DE QUEIROZ, R., *et al.* Cutaneous leishmaniasis in Ceará State in Northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.50, p. 693-698, 1994.

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, May.-Jun., 2001.

DE BRUIJIN 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**, Cambridge, v. 52, p. 45-58, Set., 1992.

FABER W. R., *et al.* Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Schaumburg, v. 49, p. 70- 74, Jul., 2003.

FELICIANGELI M.D., *et al.* Vectors of cutaneous leishmaniasis in north-central Venezuela. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 8, p. 317-324, Oct., 1994.

FIDEM, Agência Estadual de Planejamento e Pesquisa de Pernambuco. Disponível em: <http://www.condepefidem.pe.gov.br>. Acesso em janeiro de 2004.

FALQUETO, A., *et al.* Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.81(2), p. 155-163, Abr.-Jun, 1986.

FALQUETO, A. Especificidade Alimentar de Flebotomíneos em Duas Áreas Endêmicas de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Espírito Santo. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 1995.

FRANÇA F., *et al.* An outbreak of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p.169-174, Apr-Jun,1991.

FORATTINI, O.P. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 2(4), p. 195-203,1960.

FORATTINI, O.P., *et al.* Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 6, p. 255-261, Sep., 1972.

FORATTINI, O.P., *et al.* Nota sobre a 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, Jun.1973.

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

GOMES, M.L., *et al.* Chagas disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular and serologic methods. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 60, p. 205-210, 1999.

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(2), p. 151-168, 1968.

GRIMALDI, G. Jr. Leishmanioses tegumentares: aspectos clínicos e imunopatológicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 77(2), p. 195 – 215, Apr- Jun., 1982.

HERTIG M., FAIRCHILD G. B., JOHNSON C. M. Leishmaniasis transmission-reservoir project. **Ann. Rep. Gorgas Memorial Laboratory**, s.l., v.1956, p. 9-11, 1957.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em janeiro de 2006.

JONES, T.C., *et al.* Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Journal Infectious Diseases**, Chicago, v. 156, p. 73-83, Jul., 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Leishmanias and Leishmaniasis of the New World, with particular reference to Brazil. **Epidemiological Bulletin 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. **Lumsden W.H.R and D.A. Evans, Eds.** Biology of the kinetoplastida. Academic Press: London v. 2, p. 1-116, 1979.

LAINSON R., SHAW J.J., POVOA M. The importance of edentates (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, 1981a.

LAINSON, R., *et al.* Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *Leishmania braziliensis guyanensis*, causative agent of “pian bois”. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 75, p. 530-536, 1981b.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. *In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Peters & Killick Kendrick Eds.* p. 1-119. London: Academic Press, 1987.

LAINSON, R.; SHAW J.J. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In Collier L, Balows A & Sussman M (Eds). **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases, 9<sup>th</sup> Ed.**, Arnold, London, v. 5, p. 241-266, 1998.

LAINSON, R., SHAW, J.J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Journal of the Brazilian Association for Advancement of Science**, s.l., v. 44, p. 2-3, 1992.

LEÍLA, I.A.R. *et al.* Diagnóstico Parasitológico de Leishmanioses por Método de Coloração Alternativo. **NewsLab.** ed 75, p. 184-188, 2006.

LE PONT F., MOUCHET J., DESJEUS P. Leishmaniasis in Bolivia. VI. Observations on *Lutzomyia nuneztovari anglesi* Le Pont & Desjeux, 1984 the presumed vector of tegumentary leishmaniasis in the Yungas focus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, p. 277-278, Abr.-Jun, 1989.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**. Boca Raton, v. 21, p. 123-152, 1995.

KERR, S.F., MCHUGH, C.P. MERKELZ, R. Short report: a focus of *Leishmania mexicana* near Tucson. Arizona. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 61, p.378-379, Sep, 1999.

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

MARSDEN P. D. Personal experience with diagnostic and therapeutic aspects of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Três Braços. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, p.485-487, Jul.-Set 1994.

MARZOCHI, M. C. A., COUTINHO, S.G., SABROSA, P. C. Reação de imunofluorescência indireta e intradermoreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.22, p. 149-155, 1980.

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

MAYRINK, W., *et al.* Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, England, v. 73, p. 123-137, 1979.

MELO, M.N., *et al.* Padronização do antígeno de Montenegro. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 19, p.161-164, 1977.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Controle da Leishmaniose tegumentar americana. Brasília, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação da Prevenção e Controle das Doenças Transmissíveis no Brasil. Brasília: Fundação Nacional de Saúde/Centro Nacional de Epidemiologia, p 28-29, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Lesihmaniose Visceral**. Ed. MS, Brasília, 2003.

MORALES A., *et al.* Aislamiento de tres cepas de *Leishmania* a partir de *Lu. trapidoi* en Colombia. **Biomédica**, Bogotá, v. 1, p. 198–207, 1981.

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**, Oxford, v. 129, p. 219-227, 2005.

PAMPIGLIONE S., *et al.* Studies on Mediterranean leishmaniose. 3. The leishmanin skin test in kala-azar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 69, p. 447-453, 1975.

RAMOS, S.A., *et al.* Detection and identification of human pathogenic *Leishmania* and *Trypanosoma* species by hybridization of PCR-amplified mini-exon repeats. **Experimental Parasitology**, Virginia, v. 82, p.242-250, 1996.

RANGEL, E.F., *et al.* Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v. 79, p. 395–396, Jul.-Set. ,1984.

RANGEL, E. F.; LAISON, R. Flebotomíneos do Brasil, 1ª edição. **Editora Fiocruz**, Rio de Janeiro, 2003.

REBÊLO, J.M.M., *et al.* Phlebotominae (Díptera: Psychodidae) de Lagoas, município de Buriticupu, Amazônia Maranhense. I – Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização recente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, p. 11-19, 2000.

REMME, J.H.F., *et al.* Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. **Trends in Parasitology**, v. 18, p.:421-426, Oct., 2002.

REY, L. Parasitologia, 2ª edição. **Editora Guanabara Koogan**, 2001.

RODRIGUES, E. H. G., *et al.* Evaluation of PCR for diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of endemicity in Northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 3572-3576, Oct., 2000.

READY, P. D.; RIBEIRO, A. L. Presence of *Psychodopygus welcomei*: a proven vector of *Leishmania braziliensis* in Ceará State. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.78, p. 235-236, Apr-Jun., 1983.

SALOMON O.D., *et al.* Sandflies associated with a tegumentary leishmaniasis focus in Salta, Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 8, p.223,1992.

SHAW, J. J., LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil X. Some observations on intradermal reaction to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. London, v. 69, p.323, 1975.

SHAW J.J., *et al.* Leishmaniasis in Brazil XXIII. The identification of *Leishmania braziliensis braziliensis* in wild-caught sandflies, using monoclonal antibodies. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 81, p. 69-72, 1987.

SHAW, J. J., ISHIKAWA, LAINSON, R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 83, p. 783-784, Nov-Dec.,1989.

SHERLOCK, I.A., MAIA, H., DIAS-LIMA, A.G. Resultados preliminares de um projeto sobre a ecologia dos flebotomíneos vetores da leishmaniose tegumentar no Estado da Bahia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 29, p. 207-214, Mar.-Abr, 1996.

SIMPSON, L., MOREL, C., SIMPSON, A. M. Biological role of extrachromosomal DNA. *In: Modern Genetic Concepts and Techniques in the Study of Parasites*. Ed. Frank Michal, **Tropical Disease Research Series**, v. 4, p. 65 – 82, 1980.

SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, Australia, v.27, p. 1135-1145, 1997.

SOUZA, M.B. *et al.* Ausência da *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no Município do Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 1881-1885, 2003.

TELLERIA, J., *et al.* Putative reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a su-andean focus of Bolivia identified by kDNA-polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p.5-6, Jan- Fev,1999.

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 Baturité, northeastern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.50 (2), p. 158-164, Feb., 1994.

VEXENAT *et al.* Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar Americana em uma região endêmica do estado da Bahia. III. Fauna flebotomínica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, p. 293-301, Jul.-Set, 1986.

VILLASECA P., *et al.* A comparative field study on the importance of *Lutzomyia peruensis* and *Lutzomyia verrucarum* as vectors of cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 49, p. 260-269, Aug., 1993.

WALTON B. C., SHAW, J. J., LAINSON R. Observations on the *in vitro* cultivation of *Leishmania braziliensis*. **Journal Parasitology**, Lincoln, v. 63, p. 1118-1119, Dec., 1977.

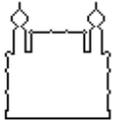
WHO. World Health Organization. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>. Acesso em janeiro de 2006.

YOUNG, D.; DUNCAN, M. Guide to the Identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sand Flies in Mexico, The West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **American Publishers**, USA, p. 881, 1994.

## **9. ANEXOS**

**ANEXO A**

**Questionário aplicado na população humana**



**Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ**  
**Ficha para Intradermoreação (Teste de Montenegro)**

Número de Ordem (Registro):

Data do inquérito:

Localidade e Município:

Nome:

Idade:

Sexo:

Endereço (Número/RG da Casa):

Atividade de Trabalho/Profissão (agricultor, estudante, dona de casa, criança, outro):

Localidade de Nascimento:

Quanto Tempo de Moradia na presente localidade? :

Morou em qual localidade antes? :

Teve ou tem alguma lesão característica de Leishmaniose? :

Há quanto tempo?:

Onde morava (Localidade) quando teve a infecção (aparecimento da lesão) ?:

Teve a doença mais de uma vez? Quantas vezes e em que épocas (mes/ano) ? Em qual (is)

localidade (s) morava na época?:

Número de Lesão (ões) ou Cicatriz (es) :

Localização da (s) Lesão (ões) ou Cicatriz (es) :

Lesão Mucosa? Lesão Recidivante (mesma localização)?:

Se Tratado, Município onde recebeu tratamento. Lembra quantas ampolas/dias tomou? :

Intradermoreação (Medida da Reação/mm):

IFI (positivo ou negativo):

## **ANEXO B**

**Questionário para inquérito parasitológico na população canina.**



## INQUÉRITO PARASITOLÓGICO EM CÃES

Número de Ordem (Registro):

Data do inquérito:

Localidade e Município:

Nome do Cão:

Idade:

Sexo:

Nome do dono:

Endereço (número/RG da casa):

Caso de LVA ou LTA humana na casa?

Há quanto tempo?

Caso de LTA ou LVA canina?

Há quanto tempo?

Aspecto clínico do animal:

Material coletado:

Sangue:

Biopsia de medula:

Biopsia de pele:

Sorologia (IFI):

Isolamento em cultura:

Deteção de DNA por PCR:

Inoculo em Hamster:

Informações complementares sobre procedimentos realizados:

## **ANEXO C**

**Parecer do Conselho de ética em Pesquisas (CEP) do Centro de  
Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ).**



## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CPqAM/FIOCRUZ

**Título do Projeto:** "Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Americana na Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil"

**Pesquisador responsável:** Maria Rosimery de Carvalho

**Instituição onde se realizará o projeto:** CPqAM – FIOCRUZ

**Data de apresentação ao CEP:** 09.02.04

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 03/04

### PARECER

A Comissão avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, resolução CNS 196/96, e complementares.

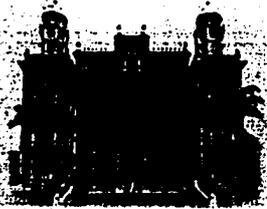
Recife, 07 de abril de 2004

*Ana Maria A. Santos*

D<sup>ra</sup> Ana Maria Aquiar dos Santos  
Médica  
Coordenação  
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

## **ANEXO D**

**Documento da Comissão de ética em Pesquisa com Animais da  
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).**



**MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**  
**CEUA-FIOCRUZ**

## **CERTIFICADO**

**C**ertificamos que o Programa nº **P.0174-03**, intitulado **"Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil: Incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão"** sob a responsabilidade da **Dr(a). Sinval Pinto Brandão Filho, CPqAM - Fiocruz**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ)** em 25/04/05.

Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade até 25 de Abril de 2008.

Rio de Janeiro, 28 de Abril de 2005.

  
**Dr. Hugo Caire Castro Faria Neto**  
Coordenador da CEUA-FIOCRUZ

## **ANEXO E**

**Licença para captura de animais silvestres expedida pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).**



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE,  
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS  
RENOVÁVEIS - IBAMA  
NÚCLEO DE FAUNA – SUPERINTENDÊNCIA EM PERNAMBUCO.  
LICENÇA PARA CAPTURA / COLETA / TRANSPORTE / EXPOSIÇÃO

NÚMERO DA  
LICENÇA  
13/2006

Nº DE REGISTRO NO  
IBAMA  
xxxxxxxxxxxxxxxxxxx

PERÍODO DE  
VALIDADE  
16/08/2006 a  
16/08/2007

PROCESSO IBAMA Nº ---

OBJETO:

FAVORECIDO:

(X) COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO  
(X) TRANSPORTE DE ANIMAIS  
SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO  
( ) COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL  
BOTÂNICO (PESQUISA  
CIENTÍFICA)  
( ) TRANSPORTE DE PRODUTOS E  
SUBPRODUTOS DA FAUNA  
( ) EXPOSIÇÃO DE ANIMAIS/PLANTAS  
SILVESTRES  
( ) OUTROS (TRANSPORTE DE ANIMAIS  
SILVESTRES)

( ) ZOOLOGICO  
( ) INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA/CRIADOURO  
CIENTÍFICO  
(X) PESQUISADOR  
( ) EXPOSITOR  
( ) CRIADOURO COMERCIAL  
( ) CRIADOR CONSERVACIONISTA  
( ) OUTROS

FAVORECIDO – ESPECIFICAÇÃO:

NOME: Dr. Sinval Pinto Brandão Filho

ENDEREÇO: Av. Moraes Rego, s/nº - Campus da UFPE

INSTITUIÇÃO: Centro de Pesquisa AGGEU MAGALHÃES-CPAM/FIOCRUZ

RESPONSÁVEL PELA EXPEDIÇÃO (NO CASO DE COLETA/CAPTURA): Francisco Gomes de Carvalho

PROCEDÊNCIA / LOCAL DA CAPTURA / LOCAL DA PESQUISA: São Vicente Férrer e Vicência/PE

DESTINO: CPAM/FIOCRUZ-Ministério da Saúde/PE

QUANTIDADE DE  
ESPÉCIMES/TIPO

NOME CIENTÍFICO

NOME COMUM

10

*Bolomys lasiurus*

Rato silvestre

10

*Rattus rattus*

Rato silvestre

10

*Nectomys squamipes*

Rato silvestre (não d'água)

10

*Akodon arviculoides*

Rato silvestre

LOCAL E DATA DE EMISSÃO  
Recife, 16/08/2006.

ASSINATURA E CARIMBO / AUTORIDADE EXPEDIDORA

Marisol Menezes Pessanha  
Mat. 0686174

Analista Ambiental  
Núcleo de Fauna  
SUPESABAMA-PE

OBS: Ao término desta, encaminhar o relatório da pesquisa para que a mesma seja enviada ao Núcleo de Fauna

• VÁLIDA EXCLUSIVAMENTE NO TERRITÓRIO BRASILEIRO.

• ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA:

CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO, SALVO QUANDO ESPECIFICADO.

CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS

SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO DO CONAMA DE Nº 237 DE 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO.

CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE EM ÁREAS DE DOMÍNIO PRIVADO SEM O CONSENTIMENTO EXPRESSO OU TÁCITO DO PROPRIETÁRIO NOS TERMOS DOS ARTIGOS 594, 595, 596, 597 E 598 DO CÓDIGO CIVIL;

CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSENTIMENTO DO ÓRGÃO COMPETENTE LOCAL;

• SÃO ISENTAS DE COBRANÇA DE TAXA (RECOLHIMENTO DE DR) INSTITUIÇÕES CIENTÍFICAS, PESQUISADORES E ZOOLOGICOS PÚBLICOS.

• VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS

MOD. 09.008 1ª VIA - INTERESSADO 2ª VIA - IBAMA / PROCESSO

## **ANEXO F**

**Publicações relacionadas à dissertação.**

## Phlebotomine sandfly species from an American visceral leishmaniasis area in the Northern Rainforest region of Pernambuco State, Brazil

A fauna de flebotomíneos envolvida em área de incidência de leishmaniose visceral americana na Zona da Mata de Pernambuco

Maria Rosimery de Carvalho <sup>1</sup>  
 Bruna Santos Lima <sup>1</sup>  
 José Ferreira Marinho-Júnior <sup>1</sup>  
 Fernando José da Silva <sup>1</sup>  
 Hélio França Valença <sup>2</sup>  
 Francisco de Assis Almeida <sup>2</sup>  
 Amilton Lopes da Silva <sup>2</sup>  
 Sinval Pinto Brandão-Filho <sup>1</sup>

### Abstract

*The aim of this study was to identify the fauna of phlebotomine sandflies in an area with incidence of American visceral leishmaniasis (AVL) in São Vicente Férrer, a municipality (county) located in the northern Zona da Mata in Pernambuco State, Brazil. Sandfly captures were conducted monthly for four nights/month from December 2002 to November 2003, by means of manual captures (with a Shannon trap) and by CDC light traps. A total of 23,156 specimens of phlebotomines sandflies were collected in a remnant of the Atlantic rainforest, houses, and animal shelters. Lutzomyia complexa was the most prevalent species, with a frequency of 62.5% (14,445/23,156), followed by Lutzomyia migonei, with 33.2% (7,677/23,156). No Lutzomyia longipalpis (the main vector of Leishmania chagasi in Brazil and the Americas) was found in the target area. Some specimens were dissected, but no Leishmania parasites were found.*

*American visceral leishmaniasis; phlebotomine sandflies; Lutzomyia spp.*

### Introduction

American visceral leishmaniasis (AVL) is a zoonosis of domestic and wild canids and probably other wild mammals such as opossums and rodents. The disease is caused by *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) and transmitted by the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae), the main vector species incriminated in Brazil and the Americas <sup>1</sup>. Until the 1970s, the zoonotic cycle of AVL was commonly associated with rural areas <sup>2,3</sup>. However, in the past 25 years there has been an urbanization of this disease in important cities of Northeast and Southeast Brazil, like Teresina (Piauí), São Luiz (Maranhão), Natal (Rio Grande do Norte), Campo Grande (Mato Grosso do Sul), and Belo Horizonte (Minas Gerais), and it has become a more important public health problem than ever before. Approximately 3,000 new cases of AVL are currently reported per year in Brazil, particularly in the Northeast, with some 77% of the cases <sup>4</sup>.

In Pernambuco, AVL is now present in almost all regions of the State, although most cases are from the Sertão (backlands) <sup>5,6</sup>. In 1999 and 2000, twelve human cases of AVL were reported in São Vicente Férrer, a municipality (county) located in the northern Zona da Mata region near the Agreste region. Based on current knowledge, in the Zona da Mata in Pernambuco State, American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania*

<sup>1</sup> Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife-PE.

<sup>2</sup> Fundação Nacional de Saúde, Recife-PE

#### Correspondence

S. P. Brandão-Filho  
 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Moraes Rego s/n, Recife, PE 50670-420, Brasil.  
 sinval@cpqam.fiocruz.br

(*Viannia braziliensis*) is the predominant form of leishmaniasis<sup>7,8</sup>. Until recently, no autochthonous cases of the visceral form of leishmaniasis had been observed in the municipalities comprising the Zona da Mata region. In the coastal region, however, autochthonous cases of AVL have frequently been reported in municipalities like Ilha de Itamaracá, Paulista, Ipojuca, Tamandaré, and Rio Formoso, the first three located in Greater Metropolitan Recife (capital of Pernambuco State). This article presents data from a study on the phlebotomine sandfly fauna in Mundo Novo, a locality that recorded six of the 12 cases of AVL reported in São Vicente Férrer in 1999 and 2000. The aim is to identify species involved in the disease transmission in this region of Pernambuco, Northeast Brazil.

### Material and methods

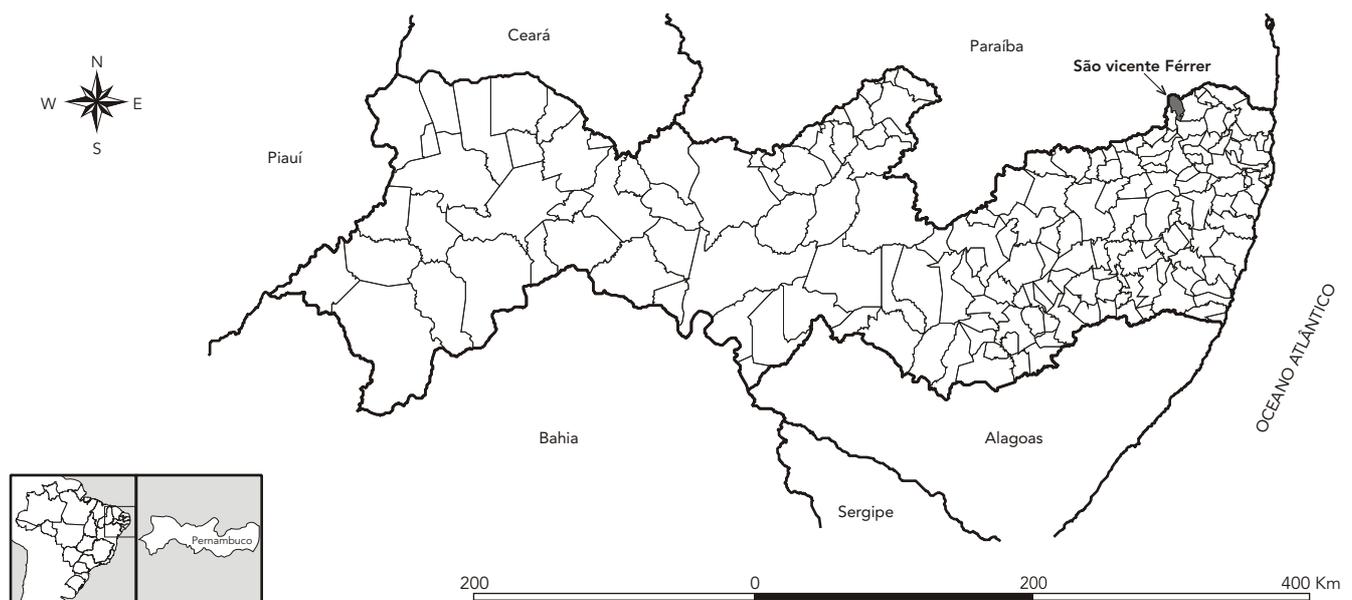
The study was carried out in the locality of Mundo Novo, municipality of São Vicente Férrer, located in the northern Zona da Mata region of Pernambuco, some 110km from the State capital, Recife (Figure 1). The municipality has an area of 120.2

sq km, with a plant cover consisting predominantly of banana plantations, hence the area's nickname "Land of the Banana". Other crops like grapes and sugar cane have also been grown. There is also some remaining primary Atlantic rainforest. The climate, according to Köppen's classification, is As' type (tropical rain forest climate), with the dry season from September to February and the rainy season from March to August<sup>9</sup>. According to the most recent census data, São Vicente Férrer has some 25,000 inhabitants. To date, six human cases of AVL have been reported in Mundo Novo, including one infant death. American cutaneous leishmaniasis has also been reported in São Vicente Férrer, including in Mundo Novo.

From December 2002 to November 2003, sandfly captures were performed monthly for four nights/month in households with reported human AVL cases, animal shelters near the houses, plantations, and remnants of the Atlantic rainforest. Captures were performed at dusk and during the night, from 6:00 PM to 6:00 AM the following day, using ten CDC light traps and manual captures with Castro aspirators and a Shannon trap, from 6:00 to 9:00 PM.

Figura 1

Location of the study area in the State of Pernambuco, Northeast Brazil.



Specimens captured manually were kept in specific cages and transported to the laboratory, where they were dissected and identified. Female specimens were dissected in saline and the gut was examined to verify natural infection with *Leishmania* parasites. The specimens captured with light traps and males captured manually were preserved in 70% alcohol for identification, according to the classical Young & Duncan systematics<sup>10</sup>. Data were processed with Microsoft Excel for analysis of frequency distribution.

## Results

A total of 23,156 specimens were collected, representing 16 species (Table 1). *Lutzomyia complexa* was the predominant species, with 62.5% (14,481/23,156), followed by *Lutzomyia migonei*, with 33.1% (7,677/23,156). The latter species predominated in the houses and animal shelters with frequencies of 21.6% (1,658/7,677) and 75.6% (5,803/7,677), respectively, while *L. complexa* predominated in the remnants of Atlantic rainforest. *Lutzomyia longipalpis*, the proven main vector of AVL, was not found in this study. In relation to monthly sandfly density, the period

with the greatest overall abundance of sandflies was from April to July. In relation to the main species, *L. complexa* was the most abundant from May to July, as was *L. migonei* from March to April (Figure 2). A total of 1,860 female specimens of different species were dissected during the study, but no natural infection with *Leishmania* parasites was observed.

## Discussion

In the State of Pernambuco, AVL incidence has expanded in the last 15 years, with an increase in the number of reported cases, including those recently verified in the northern Zona da Mata, where no autochthonous cases had been recorded previously. The Zona da Mata has the majority of cases of American cutaneous leishmaniasis in the State, with some 60% of the total<sup>7</sup>. The phlebotomine sandfly fauna observed in the municipality of São Vicente Férrer presents an important diversity of species as compared to Amaraji, southern Zona da Mata, where *L. whitmani*, the main vector of *L. (V.) braziliensis* in Brazil, is the most prevalent sandfly species<sup>11,12,13</sup>. American cutaneous leishmaniasis is the only form of leish-

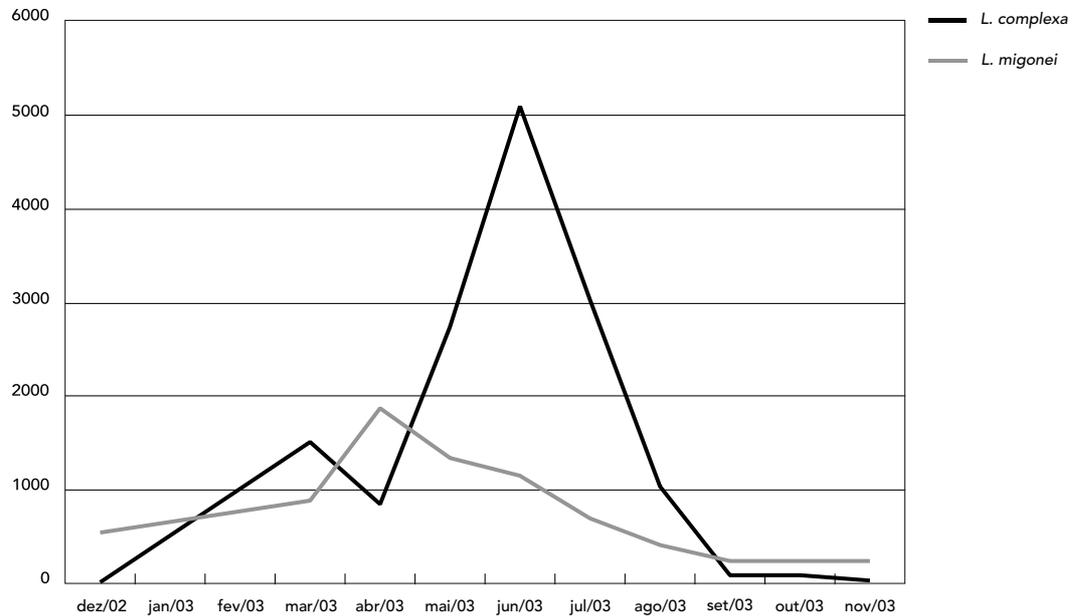
Table 1

Distribution of phlebotomine sandfly species according to capture site in Mundo Novo, São Vicente Férrer, Pernambuco, Brazil, from December 2002 to November 2003.

Species	Capture site						Total	
	Animal shelters		Houses		Forest remnants		n	%
	n	%	n	%	n	%		
<i>Lutzomyia complexa</i>	28	0.2	8	0.1	14,445	99.8	14,481	62.5
<i>Lutzomyia migonei</i>	5,803	75.6	1,658	21.6	216	2.8	7,677	33.2
<i>Lutzomyia evandroi</i>	121	37.2	169	52.0	35	10.8	325	1.4
<i>Lutzomyia sordelli</i>	47	15.6	5	1.7	250	82.8	302	1.3
<i>Lutzomyia naftalekatzi</i>					170	100.0	170	0.7
<i>Lutzomyia shannoni</i>					38	100.0	38	0.2
<i>Lutzomyia capixaba</i>					38	100.0	38	0.2
<i>Lutzomyia whitmani</i>	34	91.9	3	8.1			37	0.2
<i>Lutzomyia tupinamboi</i>					23	100.0	23	0.1
<i>Lutzomyia quinquefer</i>	14	63.6	7	31.8	1	4.5	22	0.1
<i>Lutzomyia furcata</i>					14	100.0	14	0.1
<i>Lutzomyia fescheri</i>					10	100.0	10	< 0.1
<i>Lutzomyia walkeri</i>					7	100.0	7	< 0.1
<i>Lutzomyia brasiliensis</i>	2	50.0			2	50.0	4	< 0.1
<i>Lutzomyia oswaldoi</i>					4	100.0	4	< 0.1
<i>Lutzomyia choti</i>			1	50.0	1	50.0	2	< 0.1
<i>Lutzomyia schreiberi</i>			1	50.0	1	50.0	2	< 0.1
<b>Total</b>	6,049	26.1	1,852	8.0	15,255	65.9	23,156	100.0

Figura 2

Monthly variation in the density of *Lutzomyia complexa* and *Lutzomyia migonei* in Mundo Novo, São Vicente Férrer, Pernambuco, Brazil, from December 2002 to November 2003.



\* No captures were performed from January to February 2003.

maniasis observed in this municipality, where we conducted a longitudinal study for some ten years<sup>7,8,11</sup>. The sandfly fauna in São Vicente Férrer is more similar to that in a military training area located in the central Zona da Mata. This area presents a more preserved plant cover than the remnant of Atlantic rainforest and has reported some outbreaks of cutaneous leishmaniasis<sup>14,15</sup>.

A study on the prevalence of *Leishmania* infection in the human population in Mundo Novo using the delayed hypersensitivity test with *Leishmania (Leishmania) amazonensis* leishmanin produced by Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, showed 35% of positive reactions (unpublished data). Moreover, four strains of *L. (L.) chagasi* were obtained from dogs in this locality, whose samples were characterized by monoclonal antibodies and isoenzymes<sup>16</sup>. These data corroborate evidence regarding the high transmissibility and maintenance of both zoonotic cycles, i.e., American cutaneous leishmaniasis and American visceral leishmaniasis, in this region.

The most important finding from São Vicente Férrer is the absence of *L. longipalpis*, the prin-

cipal vector incriminated in the AVL zoonotic transmission cycle<sup>17</sup>. Other sandfly species are suspected of acting as vectors in different areas of Brazil, such as *L. cruzi* in sites in Mato Grosso do Sul State<sup>18</sup> and *L. migonei* and *L. firmatoi* in the municipality of Rio de Janeiro<sup>19</sup>. However, the presence of *L. longipalpis* has been recorded concomitantly in the same sites in Mato Grosso do Sul.

Our results show indirect evidence of the possible involvement of *L. migonei* and *L. complexa* as vectors in this area of Pernambuco, due to their abundance in the domiciliary environment and animal shelters in the peridomestic area (*L. migonei*) and remnants of Atlantic rainforest near plantations (*L. complexa*), although with no parasitological confirmation of natural infection (one of the main criteria for incriminating a given species as a proven vector). Our hypothesis is that *L. migonei* may be involved in the transmission of AVL and American cutaneous leishmaniasis in the domestic zoonotic cycle, while *L. complexa*, a proven vector of *L. (V.) braziliensis*<sup>20</sup>, could be involved in the forest environment.

In conclusion, this study contributes to the knowledge of the phlebotomine sandfly fauna in the Zona da Mata region. We are developing further studies to reinforce the hypotheses presented above. These studies include the identification of reservoir hosts involved in maintaining

the zoonotic and enzootic cycles in order to complement the characterization of the transmission pattern for both AVL and American cutaneous leishmaniasis in this endemic area of Northeast Brazil.

## Resumo

*Este estudo teve como objetivo identificar a fauna de flebotomíneos envolvida em área de incidência de leishmaniose visceral americana no Município de São Vicente Férrer, localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. Capturas de flebotomíneos foram realizadas mensalmente durante quatro noites, entre dezembro de 2002 e novembro de 2003, através de capturas manuais com auxílio da armadilha de Shannon, e armadilhas luminosas modelo CDC. O total de 23.156 exemplares de flebotomíneos foi coletado em resquícios de Mata Atlântica, casas e abrigos de animais. Lutzomyia complexa apresentou predominância de 62,5% (14.445/23.156), seguida por Lutzomyia migonei, 33,2% (7.677/23.156). Lutzomyia longipalpis, principal vetor de Leishmania chagasi no Brasil e nas Américas, não foi encontrado nesta região. Alguns exemplares foram dissecados para a pesquisa de infecção natural, mas não foram detectadas formas características de Leishmania.*

*Leishmaniose Visceral Americana; Flebotomíneos; Lutzomyia spp.*

## Contributors

M. R. Carvalho prepared the table and figures. B. S. Lima checked the bibliographic references. J. F. Marinho-Júnior participated in the sandfly identification. H. F. Valença participated in the sandfly dissection to investigate for natural infection. A. L. Silva, F. A. Almeida and E. J. Silva participated in the sandfly captures and identification of specimens. S. P. Brandão-Filho coordinated the study and wrote the article.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Filipe Dantas-Torres for assisting with the initial review of the English draft and Carlos Luna for preparing the figures.

## References

- Lainson R, Shaw JJ. New World leishmaniasis: the neoptropical *Leishmania* species. In: Collier L, Balows A, Sussman M, editors. Topley & Wilson's microbiology and microbial infectious diseases. 9th Ed. London: Arnold/New York: Oxford University Press; 1998. p. 241-66.
- Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária; 1956.
- Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77:569-96.
- Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2006; 48:151-6.
- Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. A leishmaniose visceral é uma doença endêmica em Recife, Pernambuco? *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38:361-2.
- Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. *Rev. Soc Bras Med Trop* 2006; 39:352-6.
- Brandão-Filho SP, Campbell-Lendrum DH, Brito MEF, Shaw JJ, Davies CR. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in Northeast Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93:488-94.
- Brandão-Filho SP, Brito MEF, Carvalho FG, Ishikawa EA, Floetter-Winter LM, Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 97:291-6.
- Pietrobom MR, Barros ICL. Pteridófitas de um remanescente de floresta Atlântica em São Vicente Férrer, Pernambuco, Brasil: Pteridaceae. *Acta Bot Bras* 2002; 16:457-79.
- Young D, Duncan M. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Gainesville: Associated Publishers; 1994.
- Brandão-Filho SP, Carvalho FG, Brito MEF, Almeida FA, Nascimento LA. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: eco-epidemiological aspects in "Zona da Mata" region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89:445-9.
- Campbell-Lendrum DH, Brandão-Filho SP, Ready P, Davies CR. Host and/or site loyalty of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in Brazil. *Med Vet Entomol* 1999; 13:209-11.
- Brandão-Filho SP. Eco-epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana associada a *Leishmania (Viannia) braziliensis* na Zona da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil [PhD dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2001.
- Brandão-Filho SP, Brito MEF, Martins CAP, Sommer IB, Valença HF, Almeida FA, et al. Leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1988; 31:575-8.
- Andrade MS, Valença HF, Silva AL, Almeida FA, Almeida EL, Brito MEF, et al. Sandfly fauna in a military training area endemic for American tegumentary leishmaniasis in the Atlantic Rain Forest region of Pernambuco, Brazil. *Cad Saúde Pública* 2005; 21:1761-7.
- Carvalho MR. Eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil [Master's thesis]. Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz; 2005.
- Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:811-27.
- Santos SO, Arias JR, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1998; 12:315-7.
- Souza MB, Marzochi MCA, Carvalho RW, Ribeiro PC, Pontes CS, Caetano JM, et al. Ausência da *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no Município do Rio de Janeiro. *Cad Saúde Pública* 2003; 19:1881-5.
- Souza A, Ishikawa E, Braga R, Silveira F, Lainson R, Shaw JJ. *Psychodopygus complexus*, a new vector of *Leishmania braziliensis* to humans in Pará State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90:112-3.

Submitted on 29/Mar/2006

Final version resubmitted on 24/Jul/2006

Approved on 11/Aug/2006

**Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar americana em São Vicente Férrer, Zona da Mata Norte do Estado de Pernambuco, Brasil.**

**Bruna S. Lima<sup>1</sup>, Maria E. F. Brito<sup>1</sup>, Éricka L. Almeida<sup>1</sup>, José F. Marinho Junior<sup>1</sup>, Maria R. Carvalho<sup>1</sup>, Frederico G. Coutinho Abath<sup>1</sup>, Hélio F. Valença<sup>2</sup>, Francisco de Assis Almeida<sup>2</sup>, Francisco Gomes<sup>1</sup>, Amilton Lopes da Silva<sup>2</sup>, Leucio C. Alves<sup>3</sup> e Sinval P. Brandão Filho<sup>1</sup>.**

**1. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, 2. Fundação Nacional de Saúde, 3. Universidade Federal Rural de Pernambuco.**

Resumo

O presente estudo teve como objetivo geral caracterizar o perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar americana no Município de São Vicente Férrer, Zona da Mata Norte de Pernambuco, visando identificar e incriminar hospedeiros reservatórios silvestres e ou domésticos envolvidos na manutenção da endemia, identificar a(s) espécie (s) de *Leishmania* circulante e identificar as espécies de flebotomíneos. No período de dezembro de 2002 a novembro de 2003, foram realizadas capturas de flebotomíneos, através de coleta manual, com armadilha de Shannon, e a armadilhas luminosas modelo CDC. Os animais silvestres foram capturados com armadilhas do tipo Tomahawk, no período de março a outubro de 2006. Um inquérito epidemiológico foi realizado com cães onde foi aplicado um questionário. Na ocasião foi coletado material de medula óssea para confecção de lâminas e realização da PCR onde obtivemos um cão positivo. Outro inquérito epidemiológico foi realizado na população humana da localidade de Mundo Novo onde de um total de 181 pacientes 68 (37,6%) foram positivos para IDRM. Um isolado foi obtido de paciente e a cepa caracterizada através de isoenzimas e anticorpos monoclonais como sendo *L. (V.) braziliensis*. Dos 118 animais silvestres e sinatrópicos

examinados 22 (9,32%) foram positivos para *L. (V.) braziliensis* através da PCR pertencendo a três espécies diferentes: *Nectomys squamipes*, *Rattus rattus* e *Holochilus sciureus*. Foi realizado também um isolamento de *L. braziliensis*, caracterizado através de anticorpos monoclonais, obtido de hamster inoculado com material do animal silvestre *Nectomys squamipes*. 23.156 exemplares de flebotomíneos foram coletados em resquícios de Mata Atlântica, domicílios e peridomicílios, dos quais *L. complexa* obteve predominância com 14.445 (62,5%) do total, seguido de *L. migonei*, com 7.677 (33,2%). *L. whitmani*, vetor de *L. braziliensis* foi encontrado em baixa densidade nesta região.

Correspondência: Dr. Sinval Pinto Brandão-Filho, CPqAM/ FIOCRUZ. Av. Moraes Rego, S/N, Cidade Uniersitária, Rewcife, PE, Brasil. CEP 50670-420. E-mail: sinval@cpqam.fiocruz.br.

## Abstract

The aim of this study was to characterize the American tegumentary leishmaniasis eco-epidemiology in the municipality of São Vicente Férrer, in Zona da Mata Norte of Pernambuco, with the objective of identifying and considering wild and domestic reservoir hosts involved in the maintenance of the endemic disease, identifying circulating *Leishmania* species, and sand fly species. In the period of December 2002 to November 2003, sand fly catching was carried out, through manual catching using Shannon trap and CD light traps. Wild animals were captured with tomahawk traps, in the period of March to October of 2006. An epidemiological survey was carried out in the canine population where it was used a questionnaire. On the occasion material from bone marrow was collected for slide confection and performance of PCR where we got a positive dog. Another epidemiological survey was carried out in the human population from the settlement of Novo Mundo where a total of 181 patients 68 (37.6%) were positive for IDRM. One sample of *L. braziliensis* was isolated from a patient and identified by isozymes and monoclonal antibodies. A total of 118 wild and synantrophic animals examined 22 (9.32%) were positive to *L. (V.) braziliensis* from three different species: *Nectomys squamipes*, *Rattus rattus* and *Holochilus sciureus*. It was also performed a *L. braziliensis* isolation, characterized through monoclonal antibodies, obtained from hamster inoculated with *Nectomys squamipes* from wild animal material. A total of 23.156 sand flies were collected in remnants of the primitive Atlantic rain forest, domiciliary and peridomiciliary. *L. complexa* was the most abundant species with 14.445 (62.5%) of the total followed by *L. migonei* with 7.677 (33.2%). *L. whitmani*, vector of *L. braziliensis* was found in low density in this region.

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1987). No Brasil, as espécies de *Leishmania* associadas à doença no homem são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia)*

*braziliensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *shawi*, *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*, *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* e *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (LAINSON; SHAW, 1998).

As leishmanioses estão incluídas no rol de doenças de maior prioridade para a Organização Mundial de Saúde (OMS), no seu programa especial de pesquisa e de treinamento em doenças tropicais. TDR (<http://www.who.int/tdr>). Aproximadamente 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção e o número estimado de pessoas infectadas é de 12 milhões (DESJEUX, 2001; WHO, 2006).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresenta uma importante difusão espacial, demonstrando nas últimas décadas mudanças no comportamento e a coexistência de um duplo perfil epidemiológico, expresso pela manutenção de casos oriundos dos focos antigos e em áreas próximas, e pelo aparecimento de surtos epidêmicos, associados a fatores decorrentes de processos migratórios da população e ocupação de áreas preservadas de floresta (ANDRADE *et al*, 2005; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1998; LAINSON; SHAW, 1998). Neste contexto, a LTA apresenta importante heterogeneidade, relacionada a diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas em sua etiologia, das quais *L. V. braziliensis* é a principal espécie, as formas clínicas associadas e o padrão de transmissão, impondo novas questões e desafios para o controle desta endemia no Brasil (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; MARZOCHI, 1992; SHAW; LAINSON, 1987).

Em todo Nordeste, no período de 1980 a 2005, foram notificados 219.910 casos de LTA, tendo 12.239 deles registrados no Estado de Pernambuco, na qual a região da Zona da Mata é a mais atingida, concentrando cerca de 60% dos casos registrados. Este estudo foi realizado no Município de São Vicente Férrer localizado na Zona da Mata Norte do estado de Pernambuco, onde são registrados casos de ambas as formas de leishmaniose. O município de São Vicente Férrer apresenta a incidência de ambas às formas de leishmaniose, o que constitui uma excelente área para o estudo destas endemias em Pernambuco. Foram registrados 140 casos autóctones de LTA, no período compreendido entre 1998 e o primeiro semestre de 2006, também foi registrado 13 casos de leishmaniose visceral no período de 1999 a 2005, sendo seis destes na localidade Mundo Novo, onde realizamos o nosso estudo.

## **Material e Métodos**

**Área de estudo:** O estudo foi realizado no município de São Vicente Férrer, a 130,5 Km do Recife (Figura 1). O município possui 120,2 Km<sup>2</sup> a vegetação local é de floresta subperenifólia e a economia local é predominantemente baseada no cultivo da banana, o que lhe tornou conhecida como a “terra da banana”. Porém, outras culturas são exploradas como cultivo de uvas e cana-de-açúcar.

**População estudada:** A amostra foi constituída de 181 indivíduos oriundos da localidade de Mundo novo (São Vicente Férrer). Foi realizado um inquérito epidemiológico de prevalência na população humana, através da realização do teste de intradermoreação de Montenegro (IDRM).

**Animais domésticos:** Os cães dos domicílios da localidade de Mundo Novo foram examinados, por veterinário, através de exame clínico para verificação de lesões, hepatoesplenomegalia e outros sintomas característicos associados às leishmanioses, além da aplicação de um questionário aos donos dos animais para coleta de dados, onde foram obtidas as seguintes informações: sexo, idade, raça, endereço, nome do dono e procedência. Foram coletadas amostras de medula óssea (MO) de cães, da localidade Mundo Novo, para a realização do diagnóstico parasitológico clássico e molecular utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

**Roedores silvestres e sinantrópicos:** Foram realizadas capturas mensais (março a outubro de 2006) de roedores silvestres e sinantrópicos na fauna da localidade de Mundo Novo, localidade que apresentou um grande número de casos humanos autóctones recentes, com autorização do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. As capturas foram realizadas, em diversos ecótopos, utilizando as armadilhas do

tipo Tomahawk padronizadas para animais de pequeno porte, compreendendo resquícios de Mata Atlântica remanescente, plantações e abrigos de animais domésticos no peridomicílio, tendo como referência as casas onde ocorreram casos humanos. A equipe permanecia no campo uma semana em cada mês, onde foi realizada a retirada dos ectoparasitas e a identificação dos animais por biólogo especializado que colabora com a equipe. Os roedores capturados eram encaminhados para o biotério de nível de biossegurança 3 (NA 3), localizado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, onde foram eutanasiados para a tentativa de isolamento e/ou detecção de *Leishmania* spp.

**Diagnóstico Parasitológico:** A pesquisa direta foi realizada em animais domésticos e silvestres através de esfregaço em lâmina com material proveniente de medula óssea de cães e de baço e pele de animais silvestres. A punção aspirativa de material medular na crista ilíaca e external em cães assintomáticos para LTA, isolamento *in vitro* de *Leishmania* spp. Em meio de cultivo NNN modificado e inóculos em golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) para isolamento *in vivo*. A identificação do parasito foi realizada através de reações com painel de anticorpos monoclonais específicos. Foi utilizado um sistema de PCR que permite a amplificação de kDNA de parasitas pertencentes ao complexo *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* (subgênero *Viannia*) utilizando os seguintes primers: 5'-GGGGTTGGTGTAATATAGTGG- 3' e 5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG- 3' (BRUIJIN; BARKER, 1992). O material do aspirado de medula óssea, biopsia de baço e pele dos animais, foi inoculado diretamente em meio de cultivo Blood Agar base (WALTON *et al*, 1977). Os tubos foram examinados semanalmente durante quatro semanas seguidas. As amostras também foram inoculadas na pata e via intraperitoneal em hamsters para tentativa de isolamento *in vivo*. Foram realizados esfregaços e “imprints” dos tecidos em lâmina visando à visualização de formas amastigotas em microscópio óptico.

**Inquérito de prevalência:** Foi realizado um inquérito epidemiológico de prevalência através da aplicação do teste de intradermoreação de Montenegro (IDRM), utilizando antígeno leishmanina preparado e fornecido por Biomanguinhos/FIOCRUZ. Nesta mesma ocasião foi aplicado um questionário para coleta de informações para análise da

prevalência da infecção e da doença na população. A pesquisa foi autorizada pelo comitê de ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

**Flebotomíneos:** Foram realizadas capturas mensais na fauna de flebotomíneos na localidade de Mundo Novo, em áreas correspondentes aos domicílios e anexos, plantações e resquícios de Mata Atlântica. As capturas foram realizadas no período crepuscular e noturno, entre as 17 e 6h da manhã seguinte, durante quatro noites seguidas em cada mês, utilizando armadilhas luminosas do tipo CDC, com altura de um metro do solo e capturas manuais com capturador de Castro e com auxílio da armadilha de Shannon. Informações sobre o micro clima foram obtidas através do monitoramento da umidade e temperatura nos locais de coleta e registros de índices pluviométricos da região, durante o período de estudo.

**Análise Estatística:** Os dados obtidos foram processados e analisados através do programa estatístico EpiInfo, versão 6.0 e Excel (Microsoft) para a construção de gráficos e tabelas.

## **Resultados**

**População estudada:** Um total de 181 pessoas, da localidade Mundo Novo, selecionadas através de demanda voluntária, foram submetidas ao teste de Intradermoreação de Montenegro (IDRM), sendo excluídos os resultados inferiores a 5mm. O resultado obtido da positividade para IDRM foi de 37,6% (68/181). Um isolamento foi obtido de paciente residente no município estudado através de biópsia de uma lesão em processo de cicatrização de paciente, a cepa isolada foi caracterizada através de anticorpos monoclonais e isoenzimas e foi identificada como *Leishmania (Viannia) braziliensis*, sorodemo 1.

**Reservatório doméstico:** Foram coletadas amostras de medula óssea (MO) em 11 cães, da localidade Mundo Novo, para a realização do diagnóstico parasitológico clássico e molecular utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), dos quais apenas um foi positivo (Figura 2). Todos os cães apresentavam-se assintomáticos. As amostras de MO também foram inoculadas em hamsters e em meio de cultura para tentativa de isolamento do parasito. Destas, quatro foram positivas com isolamento de *Leishmania*, identificadas através de anticorpos monoclonais específicos como *Leishmania (L.) chagasi*.

**Roedores silvestres e sinantrópicos:** Foram capturados um total de 120 animais, pertencentes a seis diferentes espécies, sendo 72 machos e 48 fêmeas. Dentre as espécies capturadas a mais abundante foi *Nectomys squamipes* com 46 exemplares e *Rattus rattus* com 36 exemplares. Todos os animais foram eutanasiados, com exceção de dois exemplares da espécie *Galea spiixi*, que morreram em cativeiro. A coleta das biópsias de baço e pele para o diagnóstico parasitológico direto e molecular foi realizada em 118 animais, perfazendo 236 amostras testadas (Tabela 1). Foi obtida uma positividade de 9,32% (22/236) através da PCR sendo positivas apenas amostras de pele, provenientes de três diferentes espécies: *Rattus rattus* (10), *Nectomys squamipes* (9) e *Holochillus sciureus* (3) (Figura 2). Os animais positivos, em sua maioria, 72,7% (16/22), eram machos adultos. Todas as amostras de baço foram negativas. O material do baço de todos os animais foi inoculado em hamster (*M. auratus*) de onde obtivemos um isolamento de um exemplar de *Nectomys squamipes* (rato da água), essa amostra foi caracterizada através de anticorpos monoclonais, como sendo *Leishmania (Viannia) braziliensis*, e também confirmada por PCR.

**Flebotomíneos:** Das 17 espécies capturadas (Tabela 3), *L. complexa* foi a espécie predominante com 62,5%, seguida da *L. migonei* com 33,2%. Na ocasião do estudo foi encontrada uma baixa densidade de *L. whitmani* vetor comprovado de *L. braziliensis*, o que levanta a hipótese de que *L. migonei* pode ser um provável vetor da LTA na região.

Com relação à variação mensal, foi observado que entre os meses de abril a julho foi o período de maior captura de flebotomíneos (Gráfico 1), entre os meses de maio a julho, a espécie *L. complexa* foi a mais abundante e entre março e abril a espécie *L. migonei* predominou.

## **Discussão**

A LTA é uma zoonose de alta prevalência em muitas áreas tropicais e subtropicais, tendo na América Latina desde o início da década de noventa, um incremento do número total de casos, uma distribuição por grupo etário mais amplo, acometimento semelhante entre homens e mulheres, e casos de famílias inteiras com a enfermidade o que mostra um padrão de transmissão intra e peridomicilar. Postula-se que vem ocorrendo um processo de domiciliação gradual da transmissão, especialmente em áreas com grande história de colonização onde existe pouca floresta primária remanescente, existindo uma adaptação dos diferentes componentes do ciclo, e provavelmente a presença de novos reservatórios secundários o que facilita este tipo de transmissão (DESJEUX, 2001).

Os resultados deste trabalho contribuem para identificação do padrão de transmissão da LTA no Município de São Vicente Férrer, localizado na Zona da Mata Norte do estado de Pernambuco.

O diagnóstico da LTA na população humana e canina oriundas da localidade de Mundo Novo foi confirmado pela realização da pesquisa direta do parasito e pelo teste de IDRM utilizados também por outros autores que confirmam a qualidade destes testes.

A PCR específica para o subgênero *Viannia* foi aplicada em amostras provenientes de cães e animais silvestres do qual um cão foi positivo dos onze cães examinados, obtivemos assim um percentual de positividade de 9 % e todos os animais eram assintomáticos, mostrando a importância do diagnóstico molecular neste tipo de estudo. Para os animais silvestres obtivemos um percentual de positividade de 9,32% quando utilizamos a PCR que apenas foi positiva para as amostras de pele destes animais; as espécies onde obtivemos resultados positivos foram: *Rattus rattus*, *Nectomys squamipes* e *Holochillus sciureus*.

A infecção por *Leishmania* em *Rattus rattus*, espécie comensal abundante no

ambiente doméstico, parece ser muito comum em áreas endêmicas de LTA no Brasil. Entretanto, poucos estudos investigaram o papel deste roedor sinantrópico no ciclo de transmissão da doença. No Brasil, Vasconcelos *et al* (1994) e Brandão-Filho *et al* (2003) verificaram que esse roedor poderia agir como reservatório secundário natural no ciclo de transmissão da leishmaniose cutânea associada a *L. (V.) braziliensis*, também encontrado em estudo da mesma natureza, relatam à presença de DNA de parasitos do complexo *L. braziliensis* e *L. (L.) mexicana* em espécimes de *Rattus rattus*. No nosso trabalho foi detectado em *Rattus rattus* pela PCR, uma positividade de 13,88 % a maior entre os animais estudados, este dado corrobora e reforça os estudos precedentes que mostram a presença de DNA de *L. (V.) braziliensis* em amostras deste roedor sinantrópico (ALEXANDER *et al*,1998; DE LIMA *et al*, 2002).

O roedor silvestre *Nectomys squamipes* também apresenta evidências consistentes para sua incriminação como provável reservatório primário da LTA, sobretudo pelo significativo índice de infecção natural na detecção de DNA de *Leishmania (Viannia) spp*, demonstrado por Brandão-Filho *et al* (2003), estando envolvido na manutenção do ciclo enzoótico na região da Zona da Mata Sul de Pernambuco. O presente estudo detectou DNA de *Leishmania (Viannia) spp*. em 9,78% dos exemplares desta espécie silvestre, e 7,89% em animais da espécie *Holochilus sciurus*.

O presente trabalho acrescenta informações relevantes em relação à fauna flebotomínea da região da Zona da Mata Norte de Pernambuco, onde foi encontrada uma baixa densidade de *Lutzomyia whitmani*, vetor comprovado da transmissão da LTA e incriminado como vetor da LTA na Zona da Mata Sul do estado. Os resultados encontrados com as capturas realizadas em diferentes locais representativos de habitats/ecótopos (intradomicílio, estábulos e resquícios de mata primária), apresentam *L. complexa* com maior densidade em mata primária e *Lutzomyia migonei* predominou nas capturas realizadas em abrigos de animais e casas com 75,6% e 21,6% respectivamente.

*L. complexa* é incriminado como vetor de *L. (V.) braziliensis* na região Norte, onde foi encontrado naturalmente infectado com esta espécie no Estado do Pará e é reconhecidamente antropofílico (DE SOUZA *et al*, 1996). Neste sentido, mesmo não tendo encontrado infecção natural nesta espécie durante o nosso estudo, o fato de apresentar

predominância relativa nas capturas realizadas na Mata primária remanescente, reforça a hipótese de este constituir-se o vetor primário de *L. (V.) braziliensis*, envolvido na transmissão do ciclo enzoótico silvestre.

*L. migonei* e *L. whitmani*, relatados por Azevedo e Rangel, (1991), em município cearense, situado na Serra de Baturité, como espécies que infectadas com *Leishmania* poderiam invadir os habitats peridomésticos. Semelhante quadro foi verificado em Afonso Cláudio, município de Espírito Santo, situado a 650m do nível do mar, onde *L. migonei*, *L. whitmani* e *L. intermedia*, foram as espécies vetoradas da *L. braziliensis* no ambiente domiciliar, sendo que a primeira e a segunda espécies estariam fazendo a ponte entre o ambiente silvestre e domiciliar (FALQUETO, 1995). Em área simpátrica de serra, no Estado do Ceará, *L. migonei* foi encontrada naturalmente infectada com *L. braziliensis* e junto com *L. whitmani* foram incriminadas como transmissoras da LTA (AZEVEDO *et al*, 1990 a e b). No presente estudo devido a maior densidade de *L. migonei* em ambientes domésticos e peridomésticos sugere-se que este é o principal vetor que está envolvido no ciclo zoonótico da LTA na região, já que nesta região a presença de *L. whitmani* foi encontrado em menor densidade.

## Referências Bibliográficas

ANDRADE, M. S., *et al.* Sandfly fauna in a military training area endemic for American tegumentary leishmaniasis in the Atlantic Rain Forest region of Pernambuco, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.21(6), p.1761-1767, Nov-Dec., 2005.

LAINSON, R.; SHAW J.J. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In Collier L, Balows A & Sussman M (Eds). **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases**, 9<sup>nd</sup> Ed., Arnold, London, v. 5, p. 241-266, 1998.

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.

WHO. World Health Organization. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>. Acesso em janeiro de 2006.

BRANDÃO-FILHO *et al.* Leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.31, p. 575-578, 1998.

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, Sep-Oct, 1999

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

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. *In*: The Leishmaniasis in Biology and Medicine. **Peters & Killick Kendrick eds.** p. 1-119. London: Academic Press, 1987.

SHAW J.J., *et al.* Leishmaniasis in Brazil XXIII. The identification of *Leishmania braziliensis braziliensis* in wild-caught sandflies, using monoclonal antibodies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 81, p. 69-72, 1987.

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 Baturité, northeastern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.50 (2), p. 158-164, Feb., 1994.

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

ALEXANDER, B. *et al.* Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. **Acta Tropica**, Cambridge, v. 69, p. 41-50, Mar, 1998.

DE LIMA, H., *et al.* Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. In Lara State. Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v 97, p. 169-174, Mar, 2002.

DE SOUZA *et al.* *Psychodopygus complexus*, a new vector of *Leishmania braziliensis* to human in Pará State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 90, p. 112-113, 1996.

AZEVEDO A.C.R, Rangel E. F. A study of sandfly species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in focus of cutaneous Leishmaniasis in the municipality of Baturité, Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 405-410, Oct.-Dec, 1991.

FALQUETO, A. Especificidade Alimentar de Flebotomíneos em Duas Áreas Endêmicas de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Espírito Santo. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 1995.

AZEVEDO, A.C.R., *et al.* Natural infection of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* by Leishmania of the *Braziliensis* complex in Baturité, Ceará State, Northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, p. 251, Apr-Jun, 1990b.

AZEVEDO A.C.R., RANGEL E. F., QUEIROZ, R.G. *Lutzomyia migonei* naturally infected with peripylarian flagelates in Baturité, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, p. 199, Apr-Jun, 1990a.

## Anexos

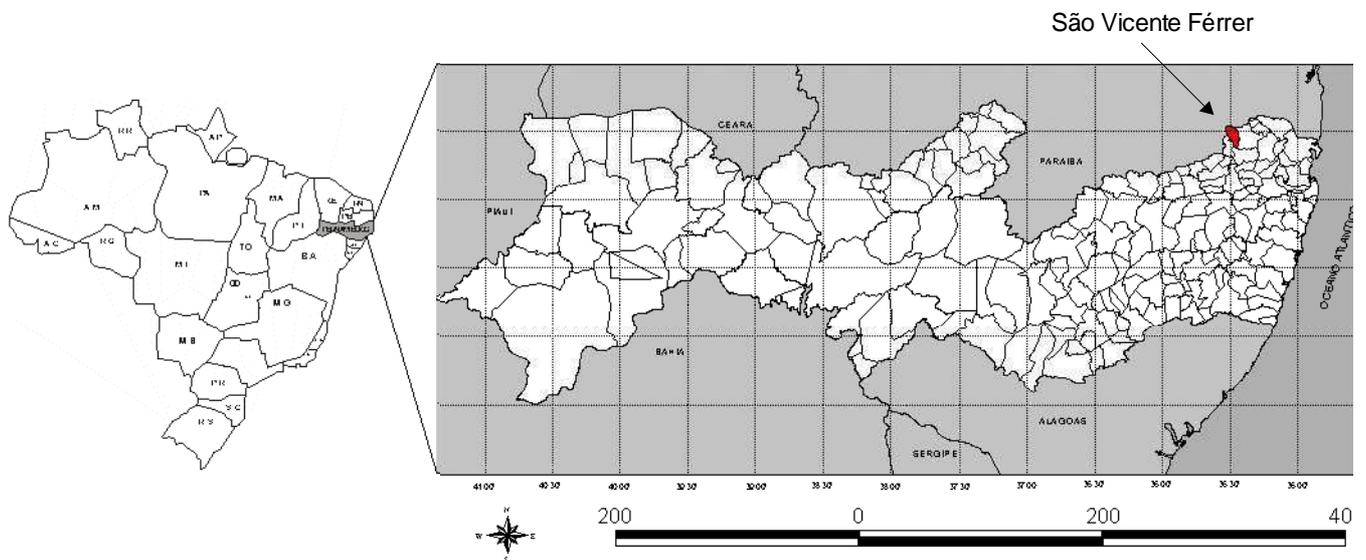


Figura 1 - Localização da área de estudo, no Estado de Pernambuco.

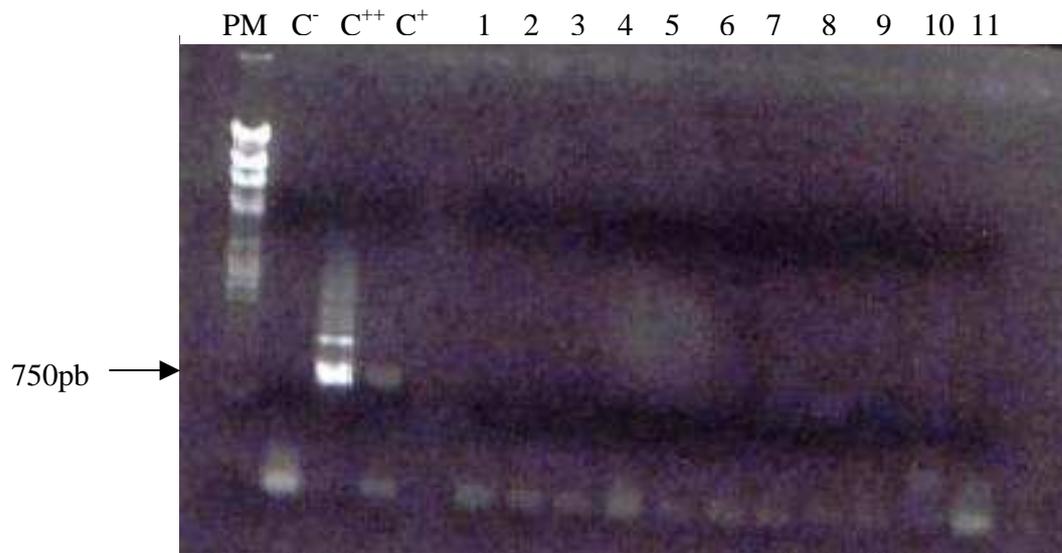


Figura 2 – Gel de agarose (1%) das amostras de MO de cães da localidade Mundo Novo. PM (Peso molecular  $\lambda$  + Hind III), C<sup>-</sup> (controle negativo), C<sup>++</sup> (controle positivo 1ng), C<sup>+</sup> (controle positivo 1pg), Linhas 1 a 11 (MO de cães), linha 8 (amostra positiva).

Tabela 1 – Espécies de mamíferos silvestres e sinantrópicos em que foram obtidos fragmentos de baço e pele e resultado da PCR visando à detecção de *L. (Viannia) braziliensis* em amostras de pele e baço.

Espécie	Baço	Resultado da PCR	Pele	Resultado da PCR	Total	% de positividade
<i>Nectomys squamipes</i>	46	0	46	9/46	92	9,78
<i>Rattus rattus</i>	36	0	36	10/46	72	13,88
<i>Holochilus sciureus</i>	19	0	19	3/19	38	7,89
<i>Oryzomys subflavus</i>	9	0	9	0	18	0,00
<i>Bolomys lasiurus</i>	7	0	7	0	14	0,00
<i>Galea spiixi</i>	1	0	1	0	2	0,00
<b>TOTAL</b>	118	0/118	118	22/118	236	9,32

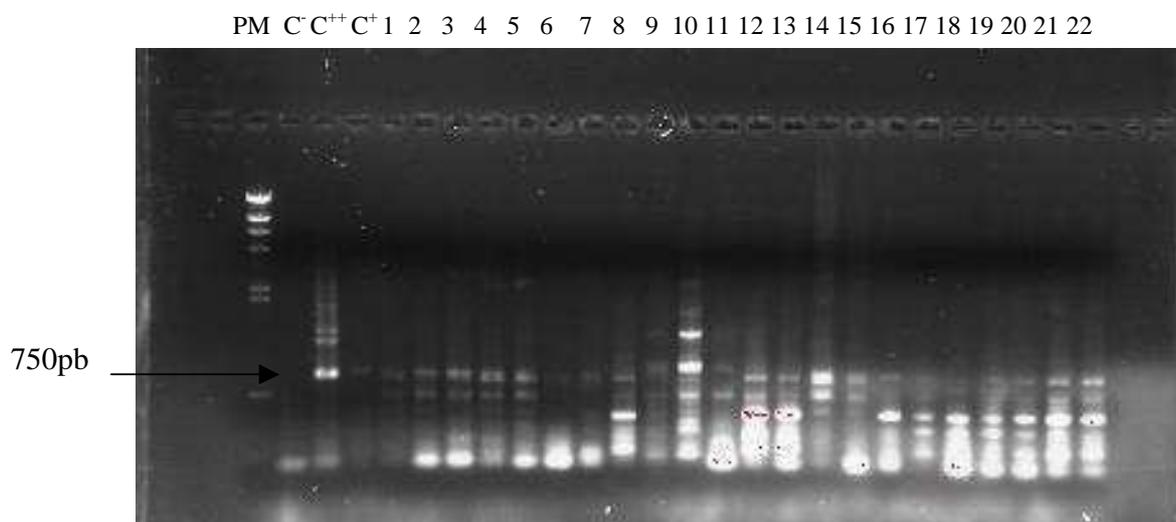


Figura 2 – Gel de agarose (1%) das amostras de pele dos animais silvestres e sinantrópicos da localidade Mundo Novo. PM (Peso molecular  $\lambda$  + Hind III), C<sup>-</sup> (controle negativo), C<sup>++</sup> (controle positivo 1ng), C<sup>+</sup> (controle positivo 1pg), Linhas 1 a 22 (amostras de pele).

Tabela 3 - Distribuição das espécies de Flebotomíneos coletados em Mundo Novo, no período de dezembro de 2002 a novembro de 2003, de acordo com o local de captura.

Espécies	Local de Captura							
	Abrigos de animais		Casas		Mata Primária		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>L. complexa</i>	28	0,2	8	0,1	14.445	99,8	14.481	62,5
<i>L. migonei</i>	5.803	75,6	1.658	21,6	216	2,8	7.677	33,2
<i>L. evandroi</i>	121	37,2	169	52	35	10,8	325	1,4
<i>L. sordelli</i>	47	15,6	5	1,7	250	82,8	302	1,3
<i>L. naftalekatzi</i>	-	-	-	-	170	100	170	0,7
<i>L. shannoni</i>	-	-	-	-	38	100	38	0,2
<i>L. capixaba</i>	-	-	-	-	38	100	38	0,2
<i>L. whitmani</i>	34	91,9	3	8,1	-	-	37	0,2
<i>L. tupinambai</i>	-	-	-	-	23	100	23	0,1
<i>L. quinquefer</i>	14	63,6	7	31,8	1	4,5	22	0,1
<i>L. furcata</i>	-	-	-	-	14	100	14	0,1
<i>L. fischeri</i>	-	-	-	-	10	100	10	<0,1
<i>L. walkeri</i>	-	-	-	-	6	100	6	<0,1
<i>L. brasiliensis</i>	2	50	-	-	2	50	4	<0,1
<i>L. oswaldoi</i>	-	-	-	-	4	100	4	<0,1
<i>L. choti</i>	-	-	1	50	1	50	2	<0,1
<i>L. schreiberi</i>	-	-	1	50	1	50	2	<0,1
<b>Total</b>	6.049	26,1	1.852	8	15.255	65,9	23.155	100

Gráfico 1 - Variação mensal de flebotomíneos no período de 12 meses (dezembro de 2002 a novembro de 2003) em Mundo Novo, São Vicente Férrer.

