

MARIA EMÍLIA BODINI SANTIAGO

Investigação de *Leishmania* sp. em *Didelphis* sp. (Linnaeus, 1756) na cidade de Bauru-São Paulo

Tese de mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Valéria Marçal Félix de Lima

ARAÇATUBA

2007

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo apoio moral, financeiro, pelo grande incentivo e pela construção de algumas armadilhas.

A Prof^a. Dr^a. Valéria Marçal Félix de Lima pela orientação e por todo apoio durante a realização do projeto.

A amiga Evandra que auxiliou em algumas capturas e coletas de material, pelas inúmeras horas de conversa sobre o desenrolar do projeto e o carinho.

A amiga Claudia pelo carinho e fornecimento dos mapas, pelas informações técnicas e pela torcida antes e durante.

Ao 12º grupamento de Bombeiros de Bauru pelo auxílio nas capturas.

Ao IBAMA pelo apoio a pesquisa.

As bibliotecárias do Instituto Lauro de Souza Lima pelo auxílio na obtenção dos trabalhos de pesquisa.

As bibliotecárias da UNESP – Araçatuba por todo o auxílio durante a obtenção das referências bibliográficas.

Aos amigos do Zoológico, Ângela e Donizete que auxiliaram na contenção dos animais e na construção das armadilhas.

A prof^a. Luzia pela ajuda dada na conquista de uma vaga.

Ao técnico de laboratório Almir pelo auxílio no laboratório.

À FAPESP pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

À todos colegas do mestrado.

À todos que auxiliaram neste projeto.

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais por
toda compreensão, amor,
carinho e apoio ao longo de
toda a realização deste
trabalho.

Lista de Figuras

Figura 1 - Produtos da amplificação de DNA, por PCR, em gel de agarose a 2%	25
Figura 2 - Reação sorológica de amostras de soro de <i>Didelphis sp</i>	25

Lista de tabela

Tabela1 - Análise comparativa entre os resultados pareados de PCR e ELISA	24
---	----

SANTIAGO, M. E. B. **Investigação de *Leishmania* sp. em *Didelphis* sp. (Linnaeus, 1756) na cidade de Bauru-São Paulo.** 2007. 6f. Tese (Mestrado) Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2007.

Resumo

No período de março de 2005 a fevereiro de 2006, coletaram-se amostras de sangue e medula óssea de 112 gambás (*Didelphis* sp.) na região urbana da cidade de Bauru, estado de São Paulo, Brasil, com o objetivo de verificar a possibilidade destes animais atuarem como reservatórios de Leishmaniose. Em amostras de soro foram detectados, anticorpos anti – *Leishmania* sp. pela técnica de ensaio imunoenzimático em fase sólida indireto (ELISA) e em medula óssea o DNA de *Leishmania* sp foi amplificado através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) utilizando os primers 13A e 13B. Na reação de ELISA das 107 amostras analisadas 71,02% apresentaram se positivas, no PCR das 112 amostras de medula óssea analisadas 91,56% foram positivas. A evidência de fatores epidemiológicos de risco como, a presença do parasito circulante e dos vetores levam a acreditar que o gambá possa estar incluindo no ciclo da transmissão da Leishmaniose no município de Bauru.

Palavras-chaves: *Leishmania* sp., *Didelphis* sp., ELISA, PCR

SANTIAGO, M. E. B. **Investigation of *Leishmania* sp. infection in *Didelphis* sp. (Linnaeus, 1756) in Bauru city, São Paulo state.** 2007. 62f. Tese (Mestrado) Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2007.

Abstract

Between March 2005 and February 2006, blood and Bone marrow samples were collected from 112 Opossums (*Didelphis* sp.) in the urban region of Bauru city - São Paulo state - Brazil . The objective was to verify the possibilities of these animals to be the reservoir of Leishmaniasis. Anti- *Leishmania* sp. antibodies were detected in serum by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and DNA from *Leishmania* sp was detected in bone marrow through polymerase chain reaction (PCR). The 13A and 13B primers were used to perform the PCR. From 107 samples analysed with ELISA, 71,02% were positive for *Leishmania* sp, and positive outcome of 91,56% was observed by PCR. The evidence of epidemiologic risk factors like, the presence of a circulating parasite and of vectors leads to the conclusion that Opossums might be included in the leishmaniasis transmission cycle in Bauru city.

Keywords: *Leishmania* sp., *Didelphis* sp., ELISA, PCR

SUMÁRIO

1 Introdução	8
1.2 Revisão bibliográfica	10
2 Objetivo	17
3 Material e Métodos	18
3.1 Área de estudo	18
3.2 Captura de animais e obtenção das amostras	18
3.3 Pesquisa do parasita	19
3.4 ELISA indireto (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	19
3.5 Extração e amplificação de DNA	21
3.6 Estatística	22
4 Resultados	23
4.1 Animais capturados	23
4.2 Pesquisa do parasito	23
4.3 ELISA indireto	24
4.4 PCR	23
4.5 Estatística	26
5 Discussão	27
6 Conclusão	30
7 Agradecimentos	30
Referências bibliográficas	31
Anexos	39

1 Introdução

As Leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários digenéticos, pertencentes ao gênero *Leishmania* (família Trypanosomatidae), que pode se apresentar de duas formas: cutânea ou visceral. O número de novos casos da forma cutânea por ano, no mundo, está estimado em torno de 1,5 milhões e a da forma visceral em torno de 500 mil. Atualmente estima-se que 12 milhões de pessoas estão infectadas no mundo (WHO, 2007).

A doença esta presente em oitenta e oito países, com destaque para os continentes Africano, América do Sul, Europa e Ásia (DEDET,).

O gênero *Leishmania* engloba dois subgêneros, *L. (Leishmania)* Ross 1903 e *L. (Viannia)* Lainson e Shaw 1987. O subgênero *Leishmania* inclui as espécies dos complexos *donovani*, *mexicana* e *hertigi* e o *Viannia*, o complexo *braziliensis* (LAINSON e SHAW, 1987).

São duas as formas ou fases evolutivas do parasito, a promastigota, alongada, móvel, com flagelo livre, normalmente encontrada na luz do trato digestivo do hospedeiro invertebrado (vetor), e a forma amastigota, que apresenta forma ovóide, sem flagelo que vive e se multiplica no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (FRANCO, 1990).

O vetor, são insetos hematófagos da ordem *Díptera*, pertencentes a família *Phlebotomidae*, sendo a *Lutzomyia* a principal espécie. O vetor é vulgarmente conhecido por mosquito palha ou cangalhinha.

Em países onde o ciclo completo ocorre, a fonte primária da infecção é quase sempre um animal selvagem e a interação do vetor com o reservatório é o que determina o padrão epidemiológico (SHAW, 1988).

O ciclo do parasito inicia-se com a picada do vetor flebotomíneo contaminado, que injeta no hospedeiro vertebrado uma grande quantidade de parasitos na forma promastigota, os quais são fagocitados por macrófagos. No interior das células ocorre a transformação para a forma amastigota, dando inicio ao processo de multiplicação até o rompimento da membrana da célula hospedeira, liberando milhares de parasitos que iniciam o ciclo em novas células (REY, 2001).

No Brasil tem se observado uma diminuição da notificação de ocorrências de leishmaniose tegumentar e visceral entre os anos de 2000 a 2005. No caso da forma visceral, apesar da diminuição, pode-se observar um aumento do número de óbitos humanos (Ministério da Saúde, 2006).

Alguns municípios apresentam tendência oposta a registrada aos índices nacionais, por exemplo, a cidade de Bauru vem registrando um aumento nos casos humanos de leishmaniose visceral nos últimos cinco anos.

Bauru tem verificado nos últimos anos a perda de áreas verdes nativas e um aumento da ocorrência de animais selvagens no centro urbano, dentre as espécies de maior ocorrência, destaca-se o marsupial *Didelphis* sp.¹.

Com o objetivo de verificar a possibilidade do *Didelphis* sp. estar albergando o parasito *Leishmania* sp., foram coletados 112 espécimes no período de março de 2005 a fevereiro de 2006, na cidade de Bauru- SP, para realizar exames laboratoriais.

¹ SANTIAGO, M. E. (Parque Zoológico Municipal de Bauru) Comunicação pessoal, 2006

1.2 Revisão Bibliográfica

A maioria das leishmanioses são zoonoses e várias espécies de mamíferos são consideradas reservatórios e mantêm, por longos períodos, a *Leishmania* na natureza (ASHFORD, 1996). Os reservatórios podem ser mamíferos domésticos ou selvagens, ou mesmo humanos.

Diferentes métodos têm sido utilizados para identificação dos reservatórios: a identificação direta do parasito (HERRER *et al.* 1973), a hemocultura (ALENCAR *et al.*, 1960, FORATTINI, 1960), cultura de vísceras (LAINSON *et al.*, 1982) a inoculação de macerado de vísceras em hamster (LAINSON *et al.*, 1969; SILVEIRA *et al.*, 1982), métodos sorológicos (SILVEIRA *et al.*, 1991, FALQUETO *et al.* 1998, CANTOLARA *et al.* 1999) e mais recentemente métodos moleculares (FALQUETO *et al.* 1998, TELLEIRA *et al.* 1999, LIMA *et al.*, 2002, BRANDÃO FILHO *et al.*, 2003).

Dentre os métodos sorológicos a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (CABRERA *et al.*, 2003) e teste de aglutinação direta (VOLTARELLI, 2006) vem sendo utilizado na avaliação de animais selvagens. O teste imunoenzimático em fase sólida (ELISA) foi descrito para espécie *Cerdocyon thous*² (GARCEZ *et al.*, 1996). Na espécie *Didelphis*, embora RIFI já tenha sido descrito (CABRERA *et al.*, 2003), o método de ELISA não foi utilizado anteriormente.

Por volta de 1998 a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) passou a ser utilizada com mais frequência para a identificação dos reservatórios de *Leishmania* (TELLEIRA *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2002; BRANDÃO - FILHO *et al.*, 2003; VOLTARELLI, 2006)

² Todos os nomes científicos que aparecem na revisão bibliográfica, foram mantidos conforme aparecem nos trabalhos originais

Estudos recentes de Rodrigues *et al.* (2002) tem mostrado que a reação em cadeia de polimerase (PCR) está ficando mais sensível para detecção da *Leishmania* sp. do que os testes convencionais. Gontijo e Carvalho (2003) mostram que a PCR é dotado de alta sensibilidade, sendo capaz de detectar quantidades tão pequenas quanto 1 fentograma do DNA de uma *Leishmania*, o equivalente a 1/10 do parasita e atualmente é um dos testes mais empregados para busca de reservatórios selvagens de leishmaniose (SILVA *et al.*, 2005, OLIVEIRA *et al.*, 2005, LIMA *et al.*, 2006).

Gontijo e Carvalho (2003) consideram como hospedeiros vertebrados silvestres, da forma tegumentar, os edentadas (xenarthas), marsupiais, procionídeos, primatas e roedores.

Dentro da ordem dos roedores, diferentes espécies selvagens e domésticas têm sido descritas como portadoras da *Leishmania* sp: *Rattus rattus alexandrinus* (rato pardo da casa) (ALENCAR *et al.*, 1960); *Kannabateomys amblyonyx* (rato de taquara), *Cuniculus paca* (paca), *Dasyprocta azarea* (cutia) (FORATTINI *et al.*, 1960); *Akodon arviculoides* (rato da mata), *Oryzomys nigripes* (rato do mato); (FORATTINI *et al.*, 1972); *Oryzomys capillo* (rato do arroz), *Agouti paca* (paca) (HERRER *et al.*, 1973, SILVEIRA *et al.*, 1991), *Olygoryzomys* sp. (rato catingueiro) (TELLEIRA *et al.*, 1999), *Otodylomys phyllotis* (rato pulador de orelha grande), *Otodylomys melanotis* (rato-de-orelha-preta), *Peromyscus yucatanicus* (rato-veado-de-Yucatán) e *Sigmodon hispidus* (rato-de-algodão) (CANTOLARA *et al.*, 1999), *Sigmodon hispidus* (rato-de-algodão) e *Rattus rattus* (rato preto) (LIMA *et al.*, 2002) e *Olygoryzomys aff. Flavescens* (camundongo do mato) (VOLTARELLI, 2006).

Diferentes espécies do gênero *Proechimys* sp. também já foram encontradas infectadas por *Leishmania* sp. (HERRER *et al.*, 1973, SHAW, 1988, FALQUETO *et al.*, 1998).

Além dos roedores o parasito *Leishmania* sp. tem sido encontrado em alguns animais da ordem Carnívora, como, *Cerdocyon thous* (LAINSON *et al.*, 1969, SILVEIRA *et al.*, 1982); *Nasua nasua* (quati); *Potos flavus* (jupará) e *Bassaricyon gabbii* (olingo) (HERRER *et al.*, 1973), ; *Conepatus chinga rex* (cangambá) (TELLEIRA *et al.*, 1999).

Em primatas as espécies *Aotus trivigatus* (macaco da noite), *Saguinus geoffroyi* (sagüi de cara branca) (HERRER *et al.*, 1973); *Cebus apella* (macaco prego), *Chiroptes satanus* (macaco cuxiu) (LAINSONI *et al.*, 1989), também são consideradas reservatórios.

Na ordem dos Xenarthras, *Leishmania* sp. foi encontrada em *Bradypus infuscatus* (preguiça de três dedos), *Choloepus hoffmanni* (preguiça de dois dedos), (HERRER *et al.*, 1973); *Dasypus novemcinctus* (tatu galinha) (LAINSON *et al.*, 1982); *Choloepus didactylus* (preguiça de dois dedos) e *Bradypus tridactylus* (preguiça de três dedos) (LAINSONI *et al.* 1989).

Dentre os marsupiais a espécie *Marmosa robinsoni* (gambasinha) (HERRER *et al.*, 1973) já foi descrita.

O reservatório selvagem *Didelphis* sp (gambá) é descrito, a seguir com maiores detalhes, uma vez que esta espécie foi objeto de pesquisa do presente trabalho.

Os marsupiais atualmente estão restritos as regiões neotropical e australiana, na América do Sul, correspondem a 9,4% do total das espécies de mamíferos (REIG, 1981).

Muitas classificações foram propostas para os marsupiais ao longo dos anos, levando-se em conta as formas fósseis e viventes, o pareamento do esperma epididimal, os caracteres tarsais, entre outras características. Lange e Jablonski (1998) classificam o gambá na Ordem Didelphimorphia (GILL, 1872), família Didelphidae Gray (1821), gênero *Didelphis* Linnaeus (1758), sendo que a família Didelphidae caracteriza-se por apresentar cauda total ou parcialmente desprovida de pêlos, preênsil ou não. Cabeça estreita alongada, rinário nu glandular, boca amplamente fendida até a altura dos olhos. Orelhas de tamanho variável, freqüentemente sem pêlos e membranosas, membros relativamente curtos, pentadáctilos, dedos com unhas encurvadas, sendo o hálux oponível e sem unha, focinho longo, pontudo e afilado com grandes vibrissas.

No Brasil, as primeiras informações sobre o gambá, datam de 1500, época que o explorador espanhol Vicente Yanex Pinzón, descobre uma fêmea lactente e a leva para Granada, onde a mesma é apresentada aos reis (FRANCO, 1990).

Esses animais adquirem hábitos sinantrópicos diante do desmatamento, sendo capturados com freqüência nos peri-domicílios e domicílios, tanto nos meios rurais como urbanos. Apresentam hábitos solitários e noturnos, alimentando-se de pequenos vertebrados, artrópodes, ovos, frutas, portanto, podendo ser classificado como onívoro (MOTTA, 1988). Maywald *et al.* (1996) relatam um aumento da população de marsupiais do gênero *Didelphis* no meio urbano. Investigações recentes mostram o grande poder de adaptação desta espécie em novos meios e a talentosa capacidade de achar alimento e lembrar com precisão do local (AUSTAD, 1988).

A relação dos didelfídeos com os tripanosomatídeos parece ser de longa data, Fernandes *et al.* (1994 apud DEANE *et al.* 1984) mencionam uma evolução

lenta e gradativa do parasitismo nas glândulas anais deste animal, estas glândulas poderiam ter sido um ponto de passagem da forma monogenética para digenética, sendo que a explicação estaria na proteção, que o lúmen das glândulas ofereceria aos parasitos, protegendo-os do sistema imune do hospedeiro. A relação hospedeiro-parasita é tão equilibrada que Lima *et al.* (2006), mostram em *Didelphis marsupialis* uma taxa de contaminação de 57,14% por *Trypanossoma cruzi*, mas a infecção se caracterizou por uma parasitemia extremamente baixa (1 parasito/50 campos de 40X).

Este marsupial foi descrito como possível reservatório para leishmaniose por vários pesquisadores.

Lainson e Shaw (1974) isolaram uma espécie de *Leishmania* em um exemplar de *D. marsupialis* capturado na Amazônia.

Yoshida *et al.* (1979), isolaram *L. mexicana* em *Didelphis marsupialis* capturado no município de Conchas – São Paulo, o isolamento foi realizado através da inoculação de macerado de vísceras em hamster e caracterizaram a espécie pelo método bioquímico, Arias e Naiff (1981) consideram este marsupial como reservatório natural de *L. Vianna guyanensis* na região urbana de Manaus.

Sherlock *et al.* (1984) relata que embora a espécie *Didelphis albiventris* tenha sido encontrada naturalmente infectada com a *Leishmania chagasi* e *L. amazonensis*, o seu papel como reservatório permanece obscuro.

Scorza *et al.* (1984) examinando *D. marsupialis* capturados na Venezuela observaram, por pesquisa direta do parasito, a coinfecção por *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania* sp, sendo o isolamento realizado através de inoculação em hamster.

Corredor *et al.* (1989), utilizando os métodos de cultura e eletroforese, encontraram *L. chagasi* em 32,4% dos animais examinados, sendo que nenhum animal apresentava sinal característico aparente da doença.

Métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase também vem sendo utilizada para a pesquisa de *Leishmania* sp no gênero *Didelphis* sp. Travi *et al.*, 1998 capturou exemplares de *Didelphis* sp. em Colosó e San Andrés de Sotavento na Colômbia e através da utilização os *primers* DB8/AJS3 em amostras de pele ou baço, encontrou animais infectados por *L. chagasi*. Zulueta *et al.*, 1999, trabalhando com os *primers* J51 e J53 em amostras de sangue, fígado, baço de *Didelphis marsupialis* isolou *Leishmania* sp. Brandão-Filho *et al.* (2003), trabalhando com utilizando os *primers* S1/S4 ou S12/S4, em amostras de baço de *Didelphis albiventris*, encontraram animais positivos, em Amaraji-PE.

Através de hemoculturas, Voltarelli (2006) pesquisando *D. albiventris* na cidade de Maringá – Paraná e Lima *et al.* (2006), pesquisando *D. marsupialis* no município de Tovar - Venezuela, não encontraram animais positivos.

O isolamento do parasito através de meios de cultura é uma prática difícil, sendo comum a ocorrência de contaminações, como reporta Garcez *et al.* (1996), Brandão-Filho *et al.*, (2003) e Voltarelli, (2006).

Quanto ao vetor, são insetos hematófagos da ordem *Díptera*, pertencente à família *Phlebotomidae*, sendo a *Lutzomyia* a principal espécie. O vetor é vulgarmente conhecido por mosquito palha ou cangalhinha. Gontijo e Carvalho (2003) descrevem como vetores principais da doença na forma tegumentar: *Lutzomyia whitmani*, *Lu. wellcomei*, *Lu. umbratis*, *Lu. anduzei*, *Lu. paraensis*, *Lu. umbiquitalis*, *Lu. olmeca* e *Lu. intermédia* dentre outras. Gomes *et al.* (1986), consideram a possibilidade do flebotomídeo *Psychodopygus intermedius* atuar na

transmissão na região do Vale do Ribeira. Na forma visceral, Castro (1996) considera a *Lu. Longipalpis* o vetor mais importante, sendo encontrado em lugares rochosos e áreas florestais, no ambiente urbano, invade o peri-domicílio, o interior de residências e abrigo de animais domésticos, adaptando-se a variadas temperaturas. Souza *et al.* (2003) registra que existem casos de doença visceral autóctone em humanos em áreas que não foram encontrados a *Lu. Longipalpis*, sendo que nestas áreas foram encontradas as espécies *Lu. firmatoi* e *Lu. migonei*, sendo levantada a hipótese destas espécies apresentarem importância epidemiológica na transmissão de leishmaniose visceral.

No município de Bauru foram encontradas as espécies: *Lu. longipalpis*, *Lu. neivai*, *Lu. termithophila*, *Lu. cortelezzi*, *Lu. lenti*, *Lu. pessoai* e *Brumptomia* sp.³

A ocorrência da doença na espécie humana em Bauru vem aumentando, em 2003 foram registrados 17 casos, em 2004 foram 29 casos, 2005 registrou-se 37 e em 2006 foram registrados um total de 67 casos, sendo a cidade de Bauru classificada como município em transmissão para Leishmaniose visceral desde 2003⁴.

³ MACORIS, M. L.G. (Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de controle de endemias SR. 11 Marília) informação escrita não publicada, 2006

⁴ GOMIERI, C.C.B. (Secretaria Municipal da Saúde, Centro de Controle de Zoonoses) informação verbal, 2007

2 Objetivo

Avaliar se o marsupial do gênero *Didelphis* sp, encontrado na área urbana e peri-urbana da cidade de Bauru- SP, poderia ser portador do parasita *Leishmania* sp.

3 Material e Métodos

3.1 Área de estudo

A cidade de Bauru localiza-se na região centro-oeste do estado de São Paulo (22° 18' 53" S e 49° 03' 38" W) com uma área total de 702 km² e um perímetro urbano de 120 Km² (17% da área total). A vegetação preservada é formada por cerrado, cerradão e mata secundária, num total de 3.770, 50 hectares, o que representa 14% da área do município. O índice pluviométrico varia de 33 mm (mínima) a 286mm (máxima) e a temperatura média é de 23,6°C (PMB, 2007).

3.2 Captura de animais e obtenção das amostras

As capturas foram realizadas com auxílio de armadilhas de madeira, especialmente construídas para este fim, (73 cm X 28 cm X 35 cm), captura manual além de entrega voluntária realizada pelo Corpo de Bombeiros e pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Como iscas para as armadilhas foram utilizadas banana, pão e carne bovina moída. No período de março de 2005 a fevereiro de 2006, as armadilhas foram montadas, no início da noite, nas áreas de matas, nas ruas, residências, em cima de árvores e perto de lixeiras públicas, e eram checadas no amanhecer. Antes da coleta das amostras, os animais foram examinados quanto à presença de lesões sugestivas para leishmaniose e logo depois receberam o implante do *microchip*, evitando assim, duplicidade na coleta das amostras. A obtenção das amostras foi realizada após anestesia com cloridrato de quetamina (30mg/kg) e cloridrato de xilazina (2 mg/kg), sendo colhido 1,0 ml de sangue da veia caudal e, com auxílio de bloqueio regional (cloridrato de lidocaina), foram colhidos 100µl de medula óssea do fêmur com agulha 40X12 e seringa de 20ml. O material foi depositado em tubo de polipropileno

de 1,5 ml, estéril, contendo EDTA e conservado a – 20°C até o processamento. Após a recuperação, o animal era reconduzido ao local de captura ou a um fragmento de mata. A captura teve a permissão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, licença 113/2005) e foi aprovada pela comissão de ética da Universidade Estadual Paulista, campus Araçatuba.

3.3 Pesquisa do parasito

Aproximadamente 10 µl da medula óssea foram colocadas em tubos contendo meio de cultura Blood Agar Base (BBA) e a mesma quantidade no meio RPMI. Os meios de culturas foram colocados na incubadora BOD a 25°C. As culturas eram checadas com semanalmente, as culturas positivas eram repicadas a cada 15 dias e as negativas a cada 30 dias.

A pesquisa direta do parasito foi através da realização de esfregaços por aposição de medula óssea e corados por panótico rápido.

3.4 ELISA indireto (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

O teste foi padronizado em bloco. O soro de animais com PCR positivo e negativo e o soro anti-IgG de *Didelphis sp* foram diluídos na proporção 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400, a proteína A e G foram diluídas na proporção de 1:50 e 1:100. As diferentes diluições de proteína A e G, foram testados com todas as diluições dos soros. A melhor resposta foi obtida com as seguintes diluições: soro de gambá 1:200 e anti-IgG de gambá e proteína A a concentração 1:100. A proteína G deu resultado inferior ao obtido com proteína A.

O teste teve como base o descrito por Lima *et al.* (2003). As placas de microtitulação (Greiner-bio one microlon 600, German) foram revestidas com 20µg/ml de antígeno total de *Leishmania chagasi* em 100µl de tampão (0,05 M de tampão carbonato, pH 9,6) e incubadas a 4°C por toda a noite. As placas foram lavadas com tampão PBS – 0,05% Tween 20 e bloqueadas por 1 hora, a temperatura ambiente, com 150 µl por poço de uma solução de PBS contendo 10% de soro fetal bovino. Após lavagem com PBS – 0,05% Tween 20[®], 100 µl das amostras de soro de gambá, diluídas em PBS – 10% de soro fetal bovino e 0,05% Tween 20[®] na concentração de 1:200, foram adicionadas a cada poço e incubados por 1:30 horas, a temperatura ambiente. Após a incubação, foi realizada nova lavagem com PBS – 0,05% Tween 20[®], sendo então adicionado a cada poço, 100 µl de soro anti-IgG de gambá, produzido em carneiro e diluído em PBS 0,05% Tween 20[®], na concentração 1:100 e incubadas por 30 minutos. Repetiu-se a lavagem e adicionou 100 µl de proteína A conjugada a peroxidase, diluído na mesma solução anterior, na concentração de 1:100 em cada poço. Após 30 minutos a 37°C, as placas foram novamente lavadas e reveladas com 100 µl o-phenylenediamine (OPD) em tampão de fosfato sódio e ácido cítrico com peróxido de hidrogênio. A reação foi bloqueada com adição de 50µl de ácido clorídrico 1N por poço. A densidade óptica foi avaliada com o auxílio do leitor automático Spectra Count (Packard[®]), com o comprimento de onda de 490 nm. As amostras foram analisadas em duplicata e em todas as placas foi adicionado o branco (solução de PPS 0,05% com Tween 20[®]).

Devido a ausência de reatividade do soro do gambá a proteína A e G, produziu-se anticorpo anti-IgG de gambá, que foi isolado a partir de um *pool* de soro de carneiro previamente imunizado, após precipitação pelo sulfato de sódio,

purificação em cromatografia de troca iônica DEAE, e diálise (Laboratório de zoonoses e doenças transmitidas por vetores – PMSP).

3.5 Extração e amplificação de DNA

O DNA obtido da punção aspirativa da medula óssea foi extraído após lise, por congelamento e descongelamento, repetido por 3 vezes, e lavagem em solução tampão 1x SSC (NaCl 3M, citrato de sódio 0,3M, pH 7,0). Para a digestão adicionaram-se 300 µl de solução de lise (10% SDS em 0,2M de acetato de sódio) e 20 µg/ml proteinase K. As amostras foram incubadas a 56°C, por 2 horas, e o DNA foi extraído seguindo o método do fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) segundo Sambrook, 1989. Após extração o DNA foi re-suspenso em 50 µl de TE (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1nM EDTA pH 8,0) e incubado por 3 minutos a 60°C. O material foi mantido -20°C até o uso. Foram utilizados os iniciadores 13A (3'GTG GGG GAG GGG CGT TCT5') e 13B (3'ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT5') (RODGERS, 1990) que amplificam um fragmento de 120 pares de base do minicírculo do gênero *Leishmania sp.* A reação da PCR foi realizada em 60 µl contendo 30 pmol de cada iniciador (Invitrogen®), 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), 50nM de solução buffer, H₂O milliQ e 100-700 ng de DNA. A amplificação foi realizada em Termociclador Mastercycler gradiente (Eppendorf®) com aquecimento inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 33 ciclos de: 95°C por 1:30 minutos para desnaturação, 57°C por 1:30 minutos para o anelamento e 72°C por 2 minutos para extensão. A extensão final foi a 72°C por 10 minutos e o produto final armazenado a -20°C até análise. Para cada reação adicionou-se um controle negativo (sem DNA), um

controle positivo com DNA extraído da cultura de promastigotas de *Leishmania chagasi* (MHOM/BR00/MER02) e dois pesos moleculares.

O produto amplificado foi analisado por eletroforese em de gel agarose 2%, seguido por coloração com brometo de etídio e visualização em luz UV. As amostras negativas foram reanalisadas em gel de Poliacrilamida após a coloração pela prata (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

3.6 Estatística

O teste não paramétrico de McNemar comparou a positividade dada pelos dois métodos de diagnóstico utilizados, PCR e ELISA, e o índice Kappa a concordância dos métodos. A interpretação da concordância entre os métodos a partir dos valores de Kappa foi realizado de acordo com Pereira (2001).

As análises foram realizadas utilizando o programa “Statistical Analysis System” (SAS) e o gráfico apresentado foi feito com auxílio do programa GraphPad Prism versão 3.00 para Windows, GraphPad Softwear, San Diego, California, USA.

4 Resultados

4.1 Animais capturados

Foram capturados 112 espécimes, sendo 102 da espécie *Didelphis albiventris* e 10 da espécie *D. aurita* abrangendo 83,33% da área pesquisada. Nenhum animal apresentou lesões suspeitas de leishmaniose ao exame clínico. Não foi possível determinar a origem de três animais e dois animais foram capturados em área rural.

4.2 Pesquisa de parasitos

Foram observadas formas flageladas em 18,75% das culturas (21/112) e 16,07% (18/112) de formas amastigotas nas lâminas.

4.3 PCR

Apresentaram - se positivas 91,56% (103/112) e negativas 8,03% (09/112) das amostras de medula óssea na reação. A figura 1 ilustra o resultado da amplificação de algumas amostras.

Tabela 1- Análise comparativa entre os resultados pareados de PCR e ELISA

		PCR		
		Positivo	Negativo	Total
ELISA	Positivo	72	04	76
	Negativo	26	05	31
	Total	98	09	107

4.4 ELISA indireto

Foram analisados 107 soros, sendo o ponto de corte estabelecida através da curva Roc (MedCalc, versão 9.0.1.1) (anexo 1) o ponto de corte estabelecido foi aquele que otimizou a sensibilidade e especificidade do ensaio. O ponto de corte foi estabelecido na densidade óptica de 0,349.

Os resultados do teste ELISA mostraram que 28,97% (31/107) apresentaram valores de densidade óptica abaixo do ponto de corte pré-estabelecido e foram considerados soronegativos, 71,02% (76/107) apresentaram densidade óptica acima do corte e foram considerados soropositivos.

A análise comparativa das 107 amostras pareadas entre PCR e ELISA mostrou que do total das amostras analisadas, 67,28% foram positivas e 4,67% foram negativas pelos dois testes, 24,29% foram positivas somente pela PCR, 3,73% somente pelo ELISA (figura 2).

A análise dos resultados do teste ELISA, considerando a PCR o teste ouro, mostrou sensibilidade de 73,5% e especificidade de 66,7% (Tabela 1).

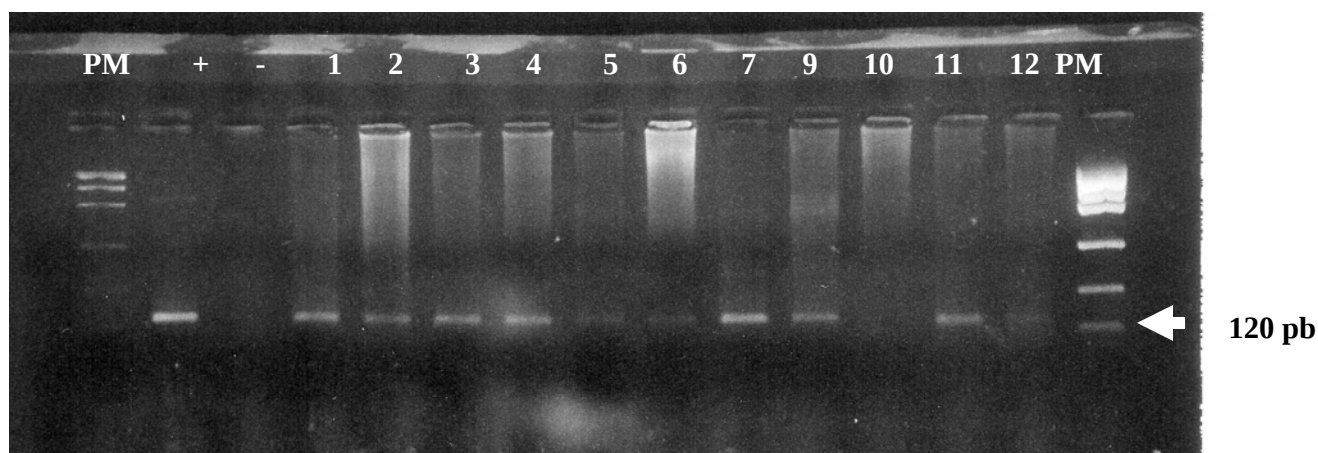


Figura 1 - Produtos da amplificação de DNA, por PCR, em gel de agarose a 2%. Peso Molecular (PM) (Low Mass, Invitrogen); (-) negativo sem DNA; (+): controle positivo contendo DNA de cepa de *L.(L).chagasi* (MHOM/BR00/MER02 – Fiocruz BA); 1 a 12 DNA de amostras de medula óssea de gambá

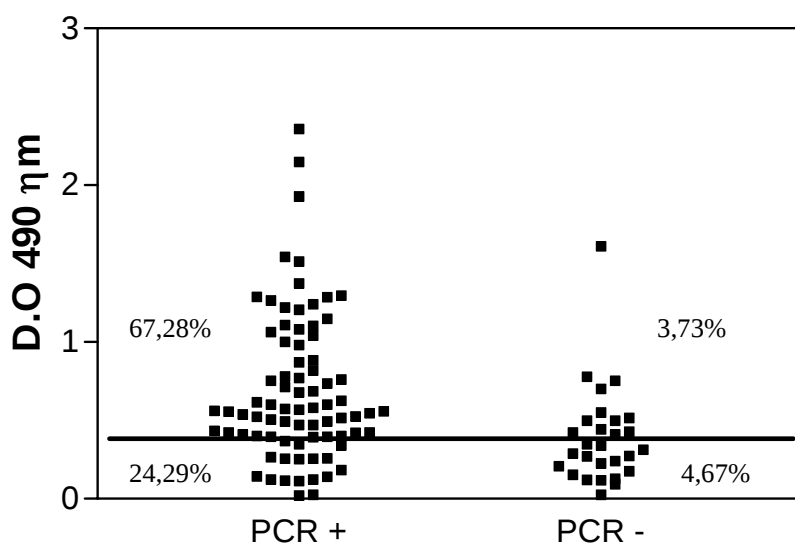


Figura 2 - Reação sorológica de amostras de soro de *Didelphis sp* com resultado para PCR de medula óssea positivo e negativo em ensaio imunoenzimático de fase sólida contra antígeno total de *Leishmania (L.) chagasi*. O ponto de corte da reação está indicado

4.5 Estatística

O teste não paramétrico de McNemar mostrou diferença estatística significativa entre a positividade dada pelos métodos ELISA e PCR ($P < 0,0001$). O valor do Kappa (grau de concordância) foi considerado fraco (0,1951).

5 Discussão

Os animais silvestres são importantes reservatórios para as leishmanioses (JACOBSON *et al.*, 2003) e em várias espécies de mamíferos foi observada a presença de *Leishmania* spp. dentre elas, destacam-se roedores, edentatas, carnívoros, primatas e marsupiais (SHAW e LAINSON, 1987; GRIMALDI e TESH, 1993).

O *Didelphis* sp. (gambá) pode abrigar tanto as cepas viscerotrópicas como as dermatróficas, (FRANCO, 1990). Infecção experimental com *L. chagasi* em *D. marsupialis* mostrou que essa espécie apresenta a doença sub-clínica (TRAVI *et al.*, 1998). Os espécimes coletados na cidade de Bauru, não apresentavam sinais clínicos característicos de leishmaniose.

No meio urbano e peri-urbano de Bauru, foram observados 71,02% de animais positivos no ELISA e 91,56% de positividade na PCR.

O ELISA é um teste comumente empregado em estudos epidemiológicos e também utilizado como apoio no diagnóstico de diversas doenças entre elas a leishmaniose visceral (CAMARGO-NEVES *et al.*, 2006).

O uso deste método para detecção de anticorpos anti-*L. (L.) chagasi* em gambá é inédito. Uma pesquisa utilizando outro ensaio sorológico, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), mostrou cerca de 29% de positividade em Barra de Guaratiba –RJ (CABRERA *et al.*, 2003) e através da cultura Arias e Naiff (1981) encontraram 61,9% de animais infectados em Manaus - AM.

A porcentagem de positividade encontrada no ensaio sorológico realizado nas amostras obtidas em Bauru foi próxima a taxa observada na pesquisa em Manaus.

Embora o método de ELISA possa ser útil para identificação de animais positivos ele apresenta algumas limitações, pois, reações cruzadas entre *Leishmania sp* e *Trypanossoma* (ROSÁRIO *et al.* 2005; RAMI *et al.*, 2005; NUNES *et al.*, 2006) e entre *Leishmania sp* e *Babesia* (ROSÁRIO *et al.* 2005), podem ocorrer gerando falsa positividade no teste ELISA. É sabido que o gênero *Didelphis* pode servir de reservatório para os gêneros de *Trypanossoma* (LEGEY *et al.*, 1999 APUD DEANE *et al.*, 1984, BAR *et al.*, 1999; GRISARD *et al.*, 2000, RUIZ-PINA *et al.* 2002; GURGEL-GONÇALVES *et al.*, 2004) e *Babesia* (HERRERA *et al.*, 1991). Também já foi demonstrada a infecção simultânea por *T. cruzi* e *L. chagasi* em *Didelphis marsupialis* (TRAVI *et al.*, 1994).

Na espécie *Didelphis*, outro inconveniente do ELISA foi a observação de ausência de reatividade da IgG à proteína A e à proteína G conjugada à peroxidase sendo necessário a produção de anti-soro de gambá em carneiros.

Devido às dificuldades dos testes sorológicos métodos moleculares como a técnica da PCR tem sido utilizada com sucesso no diagnóstico de leishmaniose em reservatórios (ZULUETA *et al.*, 1999), caracterizando a presença do DNA do parasito e oferecendo também, uma outra apresentação da epidemiologia da doença, o que é difícil quando meios diagnósticos convencionais são utilizados (TRAUB *et al.*, 2005). A porcentagem de animais positivos em Bauru (82,14%) é muito maior que as porcentagens observadas por outros pesquisadores como Zulueta *et al.* (1999) que observaram 7% de positividade ao PCR em amostras de sangue, fígado e baço de gambás na Venezuela, Telleria *et al.* (1999) que não observaram gambás positivos em Cajuata (Bolívia), e Brandão-Filho *et al.* (2003) que observaram 13,3% em Amaraji - PE pesquisando em baço. A alta positividade observada no presente estudo pode estar associada à escolha da medula óssea,

para pesquisa e não sangue. Mello e Teixeira (1984) observaram que a medula óssea é um dos locais onde se encontra maior quantidade de formas amastigotas.

A análise comparativa dos dois métodos mostrou que existiram amostras positivas na PCR, porém negativas no ELISA, essa observação pode estar associada à baixa carga parasitária presente no tecido analisado, pois correlação positiva entre o título de anticorpos no soro e a carga parasitária já foi relatada em cães (REIS *et al*, 2006). A reação da PCR pode apresentar positividade com a presença de baixo número de parasitas, mas a produção de anticorpos só é estimulada por uma carga antigênica maior. A positividade observada no ELISA em amostras negativas pela PCR pode ser explicada pela reatividade cruzada dos anticorpos a outros antígenos, ainda não avaliada nas amostras utilizadas.

A comparação da positividade dada pelos dois testes mostrou diferença estatística significativa indicando que o método molecular se caracteriza como a melhor técnica para a identificação de animais positivos

A alta positividade de infecção observada em gambás sugere a participação desta espécie no ciclo de transmissão na leishmaniose, a identificação das cepas de *Leishmania* sp circulantes nos gambás, nos cães e no homem por técnicas bioquímicas e moleculares pode confirmar tal hipótese. Tal fato, é ainda ratificada por um estudo que mostrou a preferência alimentar do vetor *Lu. evansi* pelo *Didelphis marsupialis* quando comparado com *Sciurus granatensis*, *Heteromys anomalus* e *Zygodontomys brevicaudata* (ADLER *et al.*, 2003).

A observação de alta frequência de gambás na área urbana sugere que tal espécie poderia estar promovendo a ligação entre o ciclo silvestre e o doméstico da doença devido à convivência próxima ao cão.

Considerando vários fatores como: a presença de grande número de espécies de *Lutzomyia* sp. na cidade; o caráter sinatrópico do gambá; a presença desde 1999 de espécimes no meio urbano de Bauru⁵; o compartilhamento do alimento do cão pelo gambá; e também, que a doença no cão normalmente precede a doença em humanos (NEVES, 2001, ZAPATA, 2002), poderia ser considerada a hipótese que a migração do gambá para o centro urbano de Bauru influenciou a ocorrência da leishmaniose visceral neste meio.

6 Conclusão

Observou-se indícios de alta taxa de infecção por *Leishmania* sp. na espécie *Didelphis* sp., o que sugere a participação desta espécie no ciclo epidemiológico da doença na cidade de Bauru, SP, Brasil

7 Agradecimentos

A FAPESP, 12º grupamento de Bombeiros (Bauru) e IBAMA

⁵ SANTIAGO, M.E.B. (Parque Zoológico Municipal de Bauru) Comunicação pessoal, 2006

Referências bibliográficas

- ADLER, G. H.; BECERRA, M. T.; TRAVI, B. L., 2003. Feeding success of *Lutzomyia evansi* (Díptera: Psychodidae) experimentally exposed to small mammal host in na endemic focus of *Leishmania chagasi* in northern Colombia. Biomédica, vol. 23, p. 396-400, 2003.
- ALENCAR, J. E.; PESSOA, E. P.; FONTENELE, Z. F. Infecção natural de *Rattus rattus alexandrinus* por *Leishmania* (provalvemente *L. Braziliensis*) em zona endêmica de leishmaniose tegumentar do estado do Ceará, Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, vol. 2, p. 347-348, 1960.
- ARIAS, J. R.; NAIFF, R. D. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, central Amazon of Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, vol. 76, p. 279-286, 1981.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Cli. Dermatol., vol.14, p. 523-532, 1996.
- AUSTAD, S. N. The adaptable opossum. Sci. Am. vol. 252, nº 2, 54-59. 1988
- BAR, M. E.; ALVAREZ, B. M.; OSCHEROV, E. B.; DAMBORSKY, J. M.E. Contribucion al conocimiento de los reservorios del *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) em la Provincia de Corrientes, Argentina. Rev. Soc.Bras.Med. Trop., vol. 32, p.271-276, 1999.
- BRANDÃO-FILHO, S. P.; BRITO, M. E.; CARVALHO, F. G.; ISHIKAWA, E. A.; CUPOLILLO, E.; WINTER, L.F.; SHAW, J.J. Wild and synanthropic host of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene, vol. 97, p. 291-296, 2003.
- CABRERA, M. A. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A. B.; MARZOCHI, M. C. A.; XAVIER, S. C.; SILVA, A. V. M. DA; JANSEN, A. M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, vol. 45, p. 79-83, 2003.
- CAMARGO-NEVES, V. L. F.; GLASSEI, C. M.; CRUZ, L. L.; ALMEIDA, R. G. (Ed) Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral no estado de São Paulo, 1. ed. Secretaria do Estado de São Paulo, 2006. 161 pp.

CANTOLARA, S. B.; WYNSBERGHE, N. R. V.; VARGAS-GONZALEZ, A. FARFÁN, F. F. O.; ANDRADE-NARVÁEZ, F. J. Use of monoclonal antibodies for the identification of *Leishmania* spp. Isolated from humans and wild rodents in the state of Campeche, Mexico. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, vol. 94, p. 305-309, 1999.

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

CASTRO, A . G. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (Calazar): Normas técnicas. Brasília: Ministério da Saúde - Fundação Nacional da Saúde. 86p. 1996

DEANE, M. P.; LENZI, H. L.; JANSEN, A., Trypanossoma cruzi: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*.1984. In LEGEY, A. P., PINHO, A. P. S., XAVIER, S. C. C., LEON, L. L., JANSEN, A. M. Humoral Immune Response Kinetics in *Philander opossum* and *Didelphis marsupialis* infected and immunized by *Trypanosoma cruzi* employing na immunofluorescence antibody test. Mem.Inst. Oswaldo Cruz, vol. 94, p. 371-376, 1999.

DEDET, J., P. Current status of epidemiology of leishmaniasis. In FARRELL, J. P. World class parasites: volume 4. Klumer academic publishers. P.1 -10, 2002.

FALQUETO, A.; CUPOLILLO, E.; MACHADO, G. M., C.; CARVALHO-PAES, E.; GRIMALDI JR, G. A new enzymatic variant of *Leishmania (Leishmania) forattinii* isolated from *Proechimys iheringi* (Rodentia, Echimyidae) in Espírito Santo, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, vol. 93, p. 795-798, 1998.

FERNANDES, A. J.; DIOTAIUTI, L.; DIAS, J. C. P.; ROMANHA, A. J.; CHIARI, E. Inter-relações entre os ciclos de transmissão do *Trypanossoma cruzi* no município de banbuí, Minas Gerais, Brasil. Cad. Saúde Públ. vol.10, n.4, p. 473-480, 1994.

FORATTINI, O.P. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo, vol.2, p.195-203, 1960.

FORATTINI, O. P.; PATTOLI, D. B .G.; RABELLO, E. X.; FERREIRA, O. A. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar do estado de São Paulo, Brasil. Rev. Saúde publ., v.6, p. 255-261, 1972.

FRANCO, A. M. R. **Leishmaniose tegumentar em *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758 (Marsupialia:Didelphidae):** estudo da infecção experimental por *Leishmania* spp. Rio de Janeiro,1990.144f. Tese (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz.

GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T. Teste de aglutinação direta no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral no estado do Pará. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Vol. 29, n.2, p. 165-180, 1996.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. Leishmaniose tegumentar americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Vol. 36, n.1, p.71-80, jan-fev, 2003.

GRIMALDI, JR.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clinical Microbiology Review. Vol. 6, p. 230-250, 1993.

GRISARD, E. C.; CARVALHO-PINTO, C. J.; SCHOLZ, A. F.; TOMA, H. K.; SCHLEMPER, B. R.; STEINDEL, M. *Trypanosoma cruzi* infection in *Didelphis marsupialis* in Santa Catarina and Arvoredo Islands, Southern Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, vol. 95,p. 795-800, 2000.

GURGEL-GONÇALVES, R.; RAMALHO, E. D.; DUARTE, M. A.; PALMA, A. R. T.; ABAD-FRANCH, F.; CARRANZA, J. C.; CUBA, C. A. C. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. Rev. Inst. Méd. Trop. S. Paulo, vol. 46, p. 323-330, 2004.

HERRER, A.; CHRISTENSEN, H.A.; BEUMER, R.J. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis among panamanian forest mammals. The american journal of tropical medicine and hygiene. Vol. 22, n 5, 585-591, 1973.

HERRERA, L.; URDANETA-MORALES, S. *Didelphis marsupialis*: reservoir of *Babesia brasiliensis* in the valley of Caracas (Venezuela). Acta cient. venez, vol. 42, p. 45-46, 1991.

JACOBSON, R.L.; EISENBERGER, C.L.; SVOBODOVA, M.; BANETH, G.; SZTERN, J.; CARVALHO, J.; NASREDDIN, A.; EL FARI, M.; SHALOM, U.; VOLF, P.; VOTYPKA, J.; DEDET, J. P.; PRATLONG, F.; SCHONIAN, G.; SCHNUR, L. F.; JAFFE, C. L.; WARBURG, A. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in northern Israel. Journal Infection Disease, vol. 188, p. 1065-1073, 2003.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Las leishmanias y la leishmaniasis del Nuevo mundo, con particular referencia al Brasil. Boletín de la oficina sanitaria panamericana, p. 93-114, 1974.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; LINS, Z. C. Leishmaniasis in Brazil: IV. The fox, *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para state, Brazil. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene. vol. 63, n. 6, p. 741-745, 1969.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; MILES, M. A.; POVOA, M. Leishmaniasis in Brazil: Enzymatic characterization of a *Leishmania* from the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (Edentata), from Pará State. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene. vol. 76, n. 6, p. 810-811, 1982.

LAINSON, R.; SHAW, J., J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W. e KILLICK, R., K. The leishmaniasis in Biology e Medicine. London. Academic Press, v. 1, cap. 1, p. 1-119, 1987.

LAINSON, R.; BRAGA, R. R.; SOUZA, A. A. A.; POVOA, M. M.; ISHIKAWA, E. A. Y.; SILVEIRA, F. T. *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in amazonian Brazil. Ann. Parasitol. Hum. Comp. vol. 64, n. 3, p. 200-207, 1989.

LANGE, R. B.; JABLONSKI, E. F. Mammalia do estado do Paraná - Marsupialia. Estudos de biologia, vol. 43. Número especial, p. 224, 1998.

LIMA, H.; GUGLIELMO, Z.; RODRÍGUEZ, A.; CONVIT, J.; RODRIGUEZ, N. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. In Lara state, Venezuela. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, vol. 97, p. 169-174, 2002.

LIMA, H.; CARRERO, J.; RODRIGUEZ, A.; GUGLIEMEO, Z.; RODRIGUEZ, N. Trypanosomatidae de importância em saúde pública em animais silvestres y sinantrópicos em um área rural del municipio Tovar del estado Mérida, Venezuela. Biomédica, vol. 26, p. 42-50, 2006.

LIMA, V. M. F. DE; BIAZZONO, L.; SILVA, A. C.; CORREA, A. P. F. L.; LUVIZOTTO, M. C. R. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. Pesq. Vet. Bras. Vol. 25, p. 215-218, 2003.

MAYWALD, P. G.; MACHADO, M. I.; COSTA-CRUZ, J. M.; GONÇALVES-PIRES; M. DO R. DE F. Leishmaniose tegumentar, visceral e doença de Chagas caninas em municípios do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. Cad. Saúde Públ., vol. 12, p. 321-328, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: <http://www.saude.gov.br> . Acesso em : 20 dezembro 2006.

MELLO, D. A.; TEIXEIRA, M. L. Infecção experimental de *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae) com *Leishmania donovani chagasi* (Laison, 1982). Rev. Saúde Pública, vol. 18, p. 337-341, 1984.

MOTTA, M. F. D. **Estudo do desenvolvimento extra-uterino de *Didelphis aurita* Wied.** 1988. 105 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro.

NEVES, V. L. F. C.; KATZ, G.; RODAS, L. A. C.; POLETO, D. W.; LAGE, L. C.; SPÍNOLA, R. M. F; CRUZM O. G. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana – Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. Cad. Saúde Pública, vol. 17, p. 1263-1267, 2001.

NUNES, A. G.; PAULA, E. V. DE; TEODORO, R.; PRATA, A.; SILVA-VERGARA, M. L. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em Varzelândia, Minas Gerais, Brasil. Cad. Saúde Pública, vol. 22, p. 1343-1347, 2006.

OLIVEIRA, F. S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M. Q.; BRAZIL, R. P.; PACHECO, R. S. 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, vol.129, p. 219-227, 2005.

PEREIRA, M.G. Epidemiologia teoria e prática. Editora Guanabara koogan, Rio de Janeiro, 596p. 2001.

PMB. Prefeitura Municipal de Bauru. Disponível em: www.bauru.sp.gov.br/dados geograficos. Acesso 30 de outubro de 2006.

RAMI, M.; ATARHOUCHE, T.; DAKKAK, A. Identification of two highly performing *Leishmania infantum* antigens for serodiagnosis of canine leishmaniosis. Vet. Parasitol., vol. 134, p. 25-31, 2005.

REIG, O. Teoria del origen y desarrollo de la fauna de mamíferos de América del Sur. Monografías Naturae, vol. 1, pag. 1-161, 1981.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARVALHO, A. T.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; SILVA, J. C. F.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; OLIVEIRA, R. C. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. Research veterinary science, vol. 81, p. 68-75, 2006.

REY, L. O complexo *Leishmania braziliensis* e as leishmaniases tegumentares americanas. Parasitologia 3º ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, p. 227-239, 2001.

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

RODRIGUES, E. H. G.; BRITO, M. E. F. DE; MENDONÇA, M. G.; WEKHÄUSER, R. P.; COUTINHO, E. M.; SOUZA, W. V.; ALBUQUERQUE, M. DE F. P. M. DE; JARDIM, M.L.; ABATH, F.G.C. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous Leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. Journal of clinical Microbiology, v. p.3572-3576, oct 2002.

ROSÁRIO, E. Y. DO; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T. DA; MAYRINK, W.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. Mem.Inst. Oswaldo Cruz, vol. 100, p. 197-203, 2005.

RUIZ-PIÑA, H. A.; CRUZ-REYES, A. The opossum *Didelphis virginiana* as a Synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilche, Yucatán, México. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, vol. 97, p. 613-620, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SCORZA, J. V.; REZZANO, S.; MARQUEZ, J.C. *Didelphis marsupialis*: reservorio primario de *Leishmania* spp. En la ciudad de Trujillo, Venezuela. Rev. Cub. Med. Trop., vol.36, p.194-200, 1984.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Contribution of molecular techniques to epidemiology of neotropical *Leishmania* species. Trends in Parasitology. Article in press- www.sciencedirect.com, 2005. Acesso em: 10 jan. 2007.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; POVOA, M. M. Leishmaniasis in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* (L) as reservoir of amazonian visceral leishmaniasis. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene, vol 76, n.6, p. 830-832, 1982.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. E. A.; SOUZA, A. A. A. Leishmaniose cutânea na Amazônia: Isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia:Dasyproctidae), no estado de Pará, Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, vol. 23, p. 18-22, 1991.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Ecology and epidemiology: New World. In the leishmaniasis in Biology and Medicine: Biology and Medicine Epidemiology (Peters, W. and Lillick-Kendrick, r, eds), Academic Press., pp.291-351, 1987.

SHAW, J. J. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vol.83, p.486-490, suplemento nov., 1988.

SHERLOCK, I. A.; MIRANDA, J. C.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI JUNIOR, G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vol. 79, n. 4, p.511, out/dez 1984.

SOUZA, M. B.; MARZOCHI, M. C. DE A.; CARVALHO, R.W.; RIBEIRO, P.C.; PONTES, C. DOS S.; CAETANO, J. M.; MEIRA, A. DE M. Ausência da *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no Município do Rio de Janeiro. Cad. Saúde Pública, vol. 19, p.1881-1885, 2003.

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

TRAUB, R. J.; MONIS, P. T.; ROBERTSON, I. D. Molecular epidemiology: A multidisciplinary approach to understanding parasitic zoonoses. Inter. J. of Parasitol., vol. 35, p.1295-1307, 2005.

TRAVI, B. L.; JARAMILLO, C.; MONTROYA, J.; SEGURA, I.; ZEA, A.; GONÇALVES, A. *Didelphis marsupialis*, na important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum)*

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

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

VOLTARELLI, E. M. **Investigação da infecção por *Leishmania* sp. em animais silvestres, no município de Maringá, estado do Paraná, Brasil.** Maringá, 2006. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) - Universidade Estadual de Maringá.

YOSHIDA, E. L. A.; SILVA, R. L.; CORTEZ JR, L. de S.; CORREA, F. M. A. Encontro de espécie do gênero *Leishmania* em *Didelphis marsupialis aurita* no Estado de São Paulo, Brasil, Nota prévia. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, vol. 21, p.110-113, 1979.

WHO. World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.it>. Acesso em 10 março 2007

ZAPATA, M. T. G. Calazar canino como fator de risco para ocorrência de calazar humano. Boletim eletrônico epidemiológico. FUNASA, vol. 6, p. 2-5, 2002.

ZULUETA, A. M.; VILLAROEL, E.; RODRIGUEZ, N.; FELICIANGELI, M. D.; MAZZARRI, M.; REYES, O.; RODRIGUEZ, V.; CENTENO, M.; BARRIOS, R.M.; ULRICH, M. Epidemiologic aspects of american visceral leishmaniasis in na endemic focus in eastern Venezuela. Am. J. Trop. Méd. Hyg, vol. 61, n.6, p. 945-950, 1999.

Anexo : Roc curve

Variable	Test					
Classification variable	Diagnosis					
Positive group						
diagnosis	= 1					
Sample size	98					
Negative group						
diagnosis	= 0					
Sample size	9					
Disease prevalence (%)	unknown					
Area under the ROC curve	0,753					
Standard error	0,071					
95% Confidence interval	0,661 to 0,832					
Significance level P (Area=0.5)	0,0003					
Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
>=0,022	100,0	96,3 - 100,0	0,0	0,0 - 33,8	1,00	
>0,022	99,0	94,4 - 99,8	0,0	0,0 - 33,8	0,99	
>0,026	98,0	92,8 - 99,7	11,1	1,8 - 48,3	1,10	0,18
>0,0925	98,0	92,8 - 99,7	22,2	3,5 - 59,9	1,26	0,09
>0,1235	91,8	84,5 - 96,4	22,2	3,5 - 59,9	1,18	0,37
>0,13	91,8	84,5 - 96,4	33,3	7,9 - 69,9	1,38	0,24
>0,1845	86,7	78,4 - 92,7	33,3	7,9 - 69,9	1,30	0,40
>0,21	86,7	78,4 - 92,7	44,4	14,0 - 78,6	1,56	0,30
>0,274	77,6	68,0 - 85,4	44,4	14,0 - 78,6	1,40	0,51
>0,289	77,6	68,0 - 85,4	55,6	21,4 - 86,0	1,74	0,40
>0,348	73,5	63,6 - 81,9	55,6	21,4 - 86,0	1,65	0,48
>0,349	73,5	63,6 - 81,9	66,7	30,1 - 92,1	2,20	0,40
>0,4945	54,1	43,7 - 64,2	66,7	30,1 - 92,1	1,62	0,69
>0,499	53,1	42,7 - 63,2	77,8	40,1 - 96,5	2,39	0,60
>0,5065	52,0	41,7 - 62,2	77,8	40,1 - 96,5	2,34	0,62
>0,516	51,0	40,7 - 61,3	88,9	51,7 - 98,2	4,59	0,55
>0,546	46,9	36,8 - 57,3	88,9	51,7 - 98,2	4,22	0,60
>0,552 *	46,9	36,8 - 57,3	100,0	66,2 - 100,0		0,53
>2,359	0,0	0,0 - 3,7	100,0	66,2 - 100,0		1,00
+LR:Positive likelihood ratio						
-LR :Negative likelihood ratio						

Investigação de *Leishmania* sp. em *Didelphis* sp. (Linnaeus, 1756) na cidade de Bauru-São Paulo

Investigation of *Leishmania* sp. infection in *Didelphis* sp. (Linnaeus, 1756) in Bauru city – São Paulo state

Trabalho a ser submetido ao periódico Veterinary Parasitology

UNESP - ARAÇATUBA

Investigação de *Leishmania* sp. em *Didelphis* sp. no meio urbano e peri-urbano
de Bauru (São Paulo – Brasil)

Maria Emília Bodini Santiago^a; Valeria Marçal Felix Lima^b

^a Mestre - Pós-graduação em Ciência Animal - Curso de Medicina Veterinária-
Universidade Estadual Paulista, Araçatuba -SP, Brasil ; Zoo Bauru

^b Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de
Odontologia- Curso de Medicina Veterinária- Universidade Estadual Paulista,
Araçatuba -SP, Brasil.

Address for correspondence: Faculdade de Medicina Veterinária - UNESP,

Araçatuba /SP, Brasil. Rua: Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-400. Fone:

(0XX)18 3636 32 01

vmflima@fmva.unesp.br^b

milasantiago@mila.vet.br^a

Resumo

No período de março de 2005 a fevereiro de 2006, coletaram-se
amostras de sangue e medula óssea de 112 gambás (*Didelphis* sp.) na região
urbana e peri-urbana de Bauru, estado de São Paulo, Brasil, com o objetivo de
verificar a possibilidade destes animais atuarem como reservatórios de
Leishmaniose. Foram detectados, anticorpos anti – *Leishmania* sp. em
amostras de soro pela técnica de ensaio imunoenzimático em fase sólida
indireto (ELISA) e através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). A
amplificação de fragmento de DNA de *Leishmanis* sp, utilizando os primers 13A
e 13B, das 112 amostras de medula óssea revelou 91,56% de positividade. Do
total de 107 amostras analisadas no ensaio ELISA, 71,02% apresentaram se

positivas. A evidência de fatores epidemiológicos de risco como, a presença do parasito circulante e dos vetores levam a acreditar que o gambá possa estar incluindo no ciclo da transmissão da Leishmaniose no município de Bauru.

Keywords: *Leishmania* sp., *Didelphis* sp., ELISA, PCR

1. Introdução:

A leishmaniose é causada por um parasito digenético, podendo apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida (Gontijo et al.; 2003). No Brasil, a forma dermatrófica é causada por 6 espécies de *Leishmania* do complexo *Leishmania Vianna* (Basano e Camargo; 2004) e a forma visceral é provocada pela *L. chagasi*, do complexo *L. (Leishmania) donovani* (Gontijo et al.; 2004). Na cidade de Bauru, São Paulo, Brasil, a leishmaniose tegumentar americana foi registrada pela primeira vez em 1908, durante o desmatamento para construção da estrada de ferro noroeste do Brasil (Genaro, 2003), sendo que nesta época recebeu o nome de úlcera de Bauru.

Em 2002, registraram-se os primeiros casos da forma visceral em cães, e em 2003, os primeiros casos humanos. Apesar das medidas de controle adotadas pelo governo municipal, o registro de ocorrências de casos humanos aumentou sendo registrados no ano de 2006 a ocorrência 65 casos com 04 óbitos. Como uma das medidas de controle, a eutanásia foi realizada em 4452 cães, sendo 27% com diagnóstico positivo confirmado laboratorialmente, 55% com sintomas clássicos de leishmaniose visceral e 18% devido a outros agravos (Centro de Controle de Zoonoses, 2006, dados não publicados).

O município apresenta áreas de fragmento florestal que vem sofrendo grande pressão antrópica, ocasionando um aumento da ocorrência de animais selvagens no perímetro urbano, que por sua vez ao encontrar alimento farto e fácil, constituem o meio urbano como seu habitat. Verifica se também em Bauru, a presença de várias espécies de *Lutzomia*, sendo que a *Lu. longipalpis* teve o primeiro registro em 2002.

O marsupial *Didelphis* sp. (Linnaeus, 1758), conhecido como gambá ou mucura, é um animal extremamente adaptado a diferentes ambientes, e considerado um sucesso evolucionário (Legey et al.; 1999). Este animal tem sido frequentemente encontrado no município de Bauru em áreas de mata e no meio urbano, habitando residências, hospitais, indústrias e edifícios.

No Brasil, o *Didelphis* sp. já foi encontrado naturalmente infectado por *Leishmania* sp. em Manaus- AM (Arias et al, 1981), na Barra de Guarituba – RJ (Cabrera et al. 2003) e Amaraji-PE (Brandão-Filho et al.; 2003). No entanto, apesar da ocorrência da doença no estado de São Paulo, nenhum estudo avaliou esta espécie como possível reservatório.

Através da identificação e do conhecimento da biologia dos reservatórios naturais, medidas de controle mais eficientes poderão ser tomadas. O objetivo do presente estudo foi avaliar o gênero *Didelphis* sp. como um possível reservatório de *Leishmania* sp. na área urbana e peri-urbana de Bauru.

2. Material e métodos

2.1. Área de estudo

A cidade de Bauru localiza-se na região centro-oeste do estado de São Paulo (22° 18' 53" S e 49° 03' 38" W) com uma área total de 702 km² e um

perímetro urbano de 120 Km² (17% da área total). A vegetação preservada é formada por cerrado, cerradão e mata secundária, num total de 3.770, 50 hectares, o que representa 14% da área do município. O índice pluviométrico varia de 33 mm (mínima) a 286mm (máxima) e a temperatura média é de 23,6°C (www.bauru.sp.gov.br).

2.2. Captura de animais e obtenção das amostras

As capturas foram realizadas com auxílio de armadilhas de madeira, especialmente construídas para este fim, (73 cm X 28 cm X 35 cm), captura manual além de entrega voluntária realizada pelo Corpo de Bombeiros e pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Como iscas para as armadilhas foram utilizadas banana, pão e carne bovina moída. No período de março de 2005 a fevereiro de 2006, as armadilhas foram montadas, no início da noite, nas áreas de matas, nas ruas, residências, em cima de árvores e perto de lixeiras públicas, e eram checadas no amanhecer. Antes da coleta das amostras, os animais foram examinados quanto à presença de lesões sugestivas para leishmaniose e logo depois receberam o implante do *microchip*, evitando assim, duplicidade na coleta das amostras. A obtenção das amostras foi realizada após anestesia com cloridrato de quetamina (30mg/kg) e cloridrato de xilazina (2 mg/kg), sendo colhido 1,0 ml de sangue da veia caudal e, com auxílio de bloqueio regional (cloridrato de lidocaína), foram colhidos 100µl de medula óssea do fêmur com agulha 40X12 e seringa de 20ml. O material foi depositado em tubo de polipropileno de 1,5 ml, estéril, contendo EDTA e conservado a – 20°C até o processamento. Após a recuperação, o animal era reconduzido ao local de

captura ou a um fragmento de mata. A captura teve a permissão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, licença 113/2005) e foi aprovada pela comissão de ética da Universidade Estadual Paulista, campus Araçatuba.

2.3 Pesquisa do parasito

Aproximadamente 10 μ l da medula óssea foram colocadas em tubos contendo meio de cultura Blood Agar Base (BBA) (Walton et al., 1977) (Difco B45) e a mesma quantidade no meio (RPMI). Os meios de culturas foram colocados na incubadora BOD a 25°C. As culturas eram checadas com semanalmente, as culturas positivas eram repicadas a cada 15 dias e as negativas a cada 30 dias.

A pesquisa direta do parasito foi através da realização de esfregaços por aposição de medula óssea e corados por panótipo rápido (Diff quick).

2.4. ELISA indireto (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

O teste teve como base o descrito por Lima et al (2003). As placas de microtitulação (Greiner-bio one microlon 600, German) foram revestidas com 20 μ g/ml de antígeno total de *Leishmania chagasi* em 100 μ l de tampão (0,05 M de tampão carbonato, pH 9,6) e incubadas a 4°C por toda a noite. As placas foram lavadas com tampão PBS – 0,05% Tween 20 e bloqueadas por 1 hora, a temperatura ambiente, com 150 μ l por poço de uma solução de PBS contendo 10% de soro fetal bovino. Após lavagem com PBS – 0,05% Tween 20[®], 100 μ l das amostras de soro de gambá, diluídas em PBS – 10% de soro fetal bovino e 0,05% Tween 20[®] na concentração de 1:200, foram adicionadas a cada poço e

incubados por 1:30 horas, a temperatura ambiente. Após a incubação, foi realizada nova lavagem com PBS – 0,05% Tween 20[®], sendo então adicionado a cada poço, 100 µl de soro anti-IgG de gambá, produzido em carneiro e diluído em PBS 0,05% Tween 20[®], na concentração 1:100 e incubadas por 30 minutos. Repetiu-se a lavagem e adicionou 100 µl de proteína A conjugada a peroxidase, diluído na mesma solução anterior, na concentração de 1:100 em cada poço. Após 30 minutos a 37°C, as placas foram novamente lavadas e reveladas com 100 µl o-phenylenediamine (OPD) em tampão de fosfato sódio e ácido cítrico com peróxido de hidrogênio. A reação foi bloqueada com adição de 50µl de ácido clorídrico 1N por poço. A densidade óptica foi avaliada com o auxílio do leitor automático Spectra Count (Packard[®]), com o comprimento de onda de 490 nm. As amostras foram analisadas em duplicata e em todas as placas foi adicionado o branco (solução de PPS 0,05% com Tween 20[®]).

Devido a ausência de reatividade do soro do gambá a proteína A e G, produziu-se anticorpo anti-IgG de gambá, que foi isolado a partir de um *pool* de soro de carneiro previamente imunizado, após precipitação pelo sulfato de sódio, purificação em cromatografia de troca iônica DEAE, e diálise (Laboratório de zoonoses e doenças transmitidas por vetores – PMSP).

2.5 Extração e amplificação de DNA

O DNA obtido da punção aspirativa da medula óssea foi extraído após lise, por congelamento e descongelamento, repetido por 3 vezes, e lavagem em solução tampão 1x SSC (NaCl 3M, citrato de sódio 0,3M, pH 7,0). Para a digestão adicionaram-se 300 µl de solução de lise (10% SDS em 0,2M de acetato de sódio) e 20 µg/ml proteinase K. As amostras foram incubadas a

56°C, por 2 horas, e o DNA foi extraído seguindo o método do fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) segundo Sambrook, 1989. Após extração o DNA foi re-suspenso em 50 µl de TE (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1nM EDTA pH 8,0) e incubado por 3 minutos a 60°C. O material foi mantido -20°C até o uso. Foram utilizados os iniciadores 13A (3'GTG GGG GAG GGG CGT TCT5') e 13B (3'ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT5') (Rodgers, 1990) que amplificam um fragmento de 120 pares de base do minicírculo do gênero *Leishmania sp.* A reação da PCR foi realizada em 60 µl contendo 30 pmol de cada iniciador (Invitrogen®), 0,2 mM de DNTPs (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), 50nM de solução buffer, H₂O milliq e 100-700 ng de DNA. A amplificação foi realizada em Termociclador Mastercycler gradiente (Eppendorf®) com aquecimento inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 33 ciclos de: 95°C por 1:30 minutos para desnaturação, 57°C por 1:30 minutos para o anelamento e 72°C por 2 minutos para extensão. A extensão final foi a 72°C por 10 minutos e o produto final armazenado a -20°C até análise. Para cada reação adicionou-se um controle negativo (sem DNA), um controle positivo com DNA extraído da cultura de promastigotas de *Leishmania chagasi* (MHOM/BR00/MER02) e dois pesos moleculares.

O produto amplificado foi analisado por eletroforese em de gel agarose 2%, seguido por coloração com brometo de etídio e visualização em luz UV.

2.6 Estatística

O teste não paramétrico de McNemar comparou a positividade dada pelos dois métodos de diagnóstico utilizados, PCR e ELISA, e o coeficiente Kappa o grau de concordância.

3. Resultados

3.1 Animais capturados

Foram capturados 112 espécimes, sendo 102 da espécie *Didelphis albiventris* e 10 da espécie *D. aurita* abrangendo 83,33% da área pesquisada. Nenhum animal apresentou lesões suspeitas de leishmaniose ao exame clínico. Não foi possível determinar a origem de três animais e dois animais foram capturados em área rural.

3.2 Pesquisa de parasitos

Foram observadas formas flageladas em 18,75% das culturas (21/112) e 16,07% (18/112) de formas amastigotas nas lâminas.

3.3. ELISA indireto

Foram analisados 107 soros, sendo o ponto de corte estabelecida através da curva Roc (MedCalc, versão 9.0.1.1) o ponto de corte estabelecido foi aquele que otimizou a sensibilidade e especificidade do ensaio. O ponto de corte foi estabelecido na densidade óptica de 0,349.

Os resultados do teste ELISA mostraram que 28,97% (31/107) apresentaram valores de densidade óptica abaixo do ponto de corte pré-estabelecido e foram considerados soronegativos, 71,02% (76/107)

apresentaram densidade óptica acima do corte e foram considerados soropositivos.

A análise comparativa das 107 amostras pareadas entre PCR e ELISA mostrou que do total das amostras analisadas, 67,28% foram positivas e 4,67% foram negativas pelos dois testes, 24,29% foram positivas somente pela PCR, 3,73% somente pelo ELISA (figura 2).

A análise dos resultados do teste ELISA, considerando a PCR o teste ouro, mostrou sensibilidade de 73,5% e especificidade de 66,7% (Tabela 1).

3.4. PCR

Apresentaram - se positivas 91,56% (103/112) e negativas 8,03% (09/112) das amostras de medula óssea na reação. A figura 1 ilustra o resultado da amplificação de algumas amostras.

3.5. Estatística

O teste não paramétrico de McNemar mostrou diferença estatística significativa entre a positividade dada pelos métodos ELISA e PCR. O valor do Kappa (grau de concordância) foi considerado pobre (0,1951).

4. Discussão

Os animais silvestres são importantes reservatórios para as leishmanioses (Jacobson *et al.*, 2003) e em várias espécies de mamíferos foi observada a presença de *Leishmania* spp. dentre elas, destacam-se roedores, edentatas,

221 carnívoros, primatas e marsupiais (Shaw & Lainson, 1987; Grimaldi & Tesh,
222 1993).

223 O *Didelphis* sp. (gambá) pode abrigar tanto as cepas viscerotrópicas
224 como as dermatróficas, (Franco, 1990). Infecção experimental com *L. chagasi*
225 em *D. marsupialis* mostrou que essa espécie apresenta a doença sub-clínica
226 (Travi et al, 1998).

227 No meio urbano e peri-urbano de Bauru, foram observados 71,02% de
228 animais positivos no ELISA e 91,56% de positividade na PCR.

229 O ELISA é um teste comumente empregado em estudos
230 epidemiológicos e também utilizado como apoio no diagnóstico de diversas
231 doenças entre elas a leishmaniose visceral (Camargo-Neves et al, 2006).

232 O uso deste método para detecção de anticorpos anti-*L. (L.) chagasi* em
233 gambá é inédito. Uma pesquisa utilizando outro ensaio sorológico, a reação de
234 imunofluorescência indireta (RIFI), mostrou cerca de 29% de positividade em
235 Barra de Guaratiba –RJ (Cabrera et al, 2003) e através da cultura Arias e Naiff
236 (1981) encontraram 61,9% de animais infectados em Manaus - AM.

237 A porcentagem de positividade encontrada no ensaio sorológico
238 realizado nas amostras obtidas em Bauru foi parecida a observada na pesquisa
239 em Manaus.

240 Embora o método de ELISA possa ser útil para identificação de animais
241 positivos ele apresenta algumas limitações, pois, reações cruzadas entre
242 *Leishmania* sp e *Trypanossoma* (Rosário et al.,2005; Rami et al., 2005; Nunes
243 et al., 2006) e entre *Leishmania* sp e *Babesia* (Rosário et al.,2005), podem
244 ocorrer gerando falsa positividade no teste ELISA. É sabido que o gênero
245 *Didelphis* pode servir de reservatório para os gêneros de *Trypanossoma*

(Deane et al, 1984 in Legey et al., 1999, Bar et al., 1999; Grisard et al., 2000, Ruiz-Pina et al. 2002; Gurgel-Gonçalves et al., 2004) e *Babesia* (Herrera et al., 1991). Também já foi demonstrada a infecção simultânea por *T. cruzi* e *L. chagasi* em *Didelphis marsupialis* (Travi et al,1994).

Na espécie *Didelphis*, outro inconveniente do ELISA foi a observação de ausência de reatividade da IgG à proteína A e à proteína G conjugada à peroxidase sendo necessário a produção de anti-soro de gambá em carneiros.

A técnica da PCR tem sido utilizada com sucesso no diagnóstico de leishmaniose em reservatórios (Zulueta et al., 1999), caracterizando a presença do DNA do parasito e oferecendo também, uma outra apresentação da epidemiologia da doença, o que é difícil quando meios diagnósticos convencionais são utilizados (Traub et al., 2005). A porcentagem de animais positivos em Bauru (74,12%) é muito maior que as porcentagens observadas por outros pesquisadores como Zulueta et al. (1999) que observaram 7% de positividade ao PCR em amostras de sangue, fígado e baço de gambás na Venezuela, Telleria et al. (1999) que não observaram gambás positivos em Cajuata (Bolívia), e Brandão-Filho et al. (2003) que observaram 13,3% em Amaraji - PE pesquisando em baço. A alta positividade observada no presente estudo pode estar associada à escolha da medula óssea, para pesquisa e não sangue. Mello e Teixeira (1984) observaram que a medula óssea e o baço são os locais em que se encontra maior quantidade de formas amastigotas.

A análise comparativa dos dois métodos mostrou que existiram amostras positivas na PCR, porém negativas no ELISA, essa observação pode estar associada à baixa carga parasitária presente no tecido analisado, pois correlação positiva entre o título de anticorpos no soro e a carga parasitária já

foi relatada em cães (Reis et al, 2006). A reação da PCR pode apresentar positividade com a presença de baixo número de parasitas, mas a produção de anticorpos só é estimulada por uma carga antigênica maior. A positividade observada no ELISA em amostras negativas pela PCR pode ser explicada pela reatividade cruzada dos anticorpos a outros antígenos, ainda não avaliada nas amostras utilizadas.

A comparação da positividade dada pelos dois testes não mostrou diferença estatística significativa indicando que ambos podem ser úteis para a identificação de animais positivos

A alta positividade de infecção observada em gambás sugere a participação desta espécie no ciclo de transmissão na leishmaniose. Tal hipótese é ratificada por um estudo que mostrou a preferência alimentar do vetor *Lu. evansi* pelo *Didelphis marsupialis* quando comparado com *Sciurus granatensis*, *Heteromys anomalus* e *Zygodontomys brevicaudata* (Adler et al., 2003).

A observação de alta frequência de gambás na área urbana sugere que tal espécie poderia estar promovendo a ligação entre o ciclo silvestre e o doméstico da doença devido à convivência próxima ao cão.

Considerando vários fatores como: a presença de grande número de espécies de *Lutzomyia* sp. na cidade; o caráter sinatrópico do gambá; a presença desde 1999 de espécimes no meio urbano de Bauru (Zoológico Bauru – dado não publicado); o compartilhamento do alimento do cão pelo gambá; e também, que a doença no cão normalmente precede a doença em humanos (Neves, 2001, Zapata, 2002), poderia ser considerada a hipótese que

a migração do gambá para o centro urbano de Bauru influenciou a ocorrência da leishmaniose visceral neste meio.

Em conclusão, observamos índices de alta taxa de infecção por *Leishmania* sp. no *Didelphis* sp. o que sugere que tal espécie estaria participando do ciclo epidemiológico da doença na cidade de Bauru, SP, Brasil.

5. Agradecimentos

FAPESP, IBAMA, 12º Grupamento de Bombeiros (Bauru).

6. Referências.

Adler, G.H., Becerra, M.T., Travi, B.L., 2003. Feeding success of *Lutzomyia evansi* (Díptera: Psychodidae) experimentally exposed to small mammal host in the endemic focus of *Leishmania chagasi* in northern Colombia. *Biomédica* 23, 396-400.

Arias, J.R., Naiff, R.D., 1981. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, central Amazon of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 76, 279-286.

Bar, M.E., Alvarez, B.M., Oscherov, E.B., Damborsky, Jörg, M.E., 1999. Contribucion al conocimiento de los reservorios del *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) en la Provincia de Corrientes, Argentina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 32, 271-276

- 320 Basano, S.de A.,Camargo, L.M.A., 2004. Leishmaniose tegumentar americana:
321 histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Rev.Bras.Epidemiol. 7, 328-
322 337.
- 323
- 324 Brandão-Filho,S.P., Brito, M.E., Carvalho, F.G., Ishikawa, E.A., Cupolillo,E.,
325 Floeter-Winter, L., Shaw, J., 2003. Wild and synanthropic host of *Leishmania*
326 (*Viannia*) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji,
327 Pernambuco State, Brazil. Trans.R. Soc. Trop. Méd. Hyg. 97, 291-296.
- 328
- 329 Cabrera, M.A.A., Paula,A.A.,Camacho, L.A.B., Marzochi, M.C.A., Xavier,
330 S.C.,Silva, A.V.M.da, Jansen,A.M., 2003. Canine visceral leishmaniasis in Barra
331 de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. Rev. Inst. Med.
332 trop. S. Paulo 45, 79-83
- 333
- 334 Camargo-Neves,V.L.F., Glassey, C.M.,Cruz, L.L., Almeida, R.G., (Ed) 2006.
335 Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral no estado de São
336 Paulo, Secretaria do Estado de São Paulo, 161 pp.
- 337
- 338 Deane,M.P., Lenzi, H.L.,Jansen, A., 1984. Trypanossoma cruzi: vertebrate and
339 invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis*
340 *marsupialis*. In Legey,A.P.,Pinho, A.P.S.,Xavier, S.C.C.,Leon,L.L.,Jansen,A.M.,
341 1999. Humoral Immune Response Kinetics in *Philander opossum* and *Didelphis*
342 *marsupialis* infected and immunized by *Trypanosoma cruzi* employing na
343 immunofluorescence antibody test. Mem.Inst. Oswaldo Cruz 94, 371-376.
- 344

- 345 Franco, A.M.R.F. Leishmaniose tegumentar em *Didelphis marsupialis* Linnaeus,
346 1758 (Marsupialia: Didelphidae): Estudo da infecção experimental por
347 *Leishmania* sp. Tese submetida para obtenção de grau de mestre em biologia
348 parasitária. Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Julho 1990.
349
- 350 Genaro, O.,2003. Leishmaniose tegumentar americana. In: Neves, D. P. (Ed),
351 Parasitologia humana. Livraria Atheneu. São Paulo, p. 36.
352
- 353 Gontijo, B., Carvalho, M.L.R., 2003. Leishmaniose tegumentar Americana. Rev.
354 da Soc. Bras. de Med. Trop. 3, 71-80.
355
- 356 Gontijo, C.M.F, Melo, M.N., 2004. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro
357 atual, desafios e perspectivas. Rev. Bras. Epidemiol. 7, 338-349.
358
- 359 Grimaldi, Jr., Tesh, R.B., 1993. Leishmaniasis of the New World: current
360 concepts and implications for future research. Clinical Microbiology Review. 6:
361 230-250.
362
- 363 Grisard, E.C., Carvalho-Pinto, C.J., Scholz, A.F., Toma, H.K., Schlemper, B. R.,
364 Steindel, M., 2000. *Trypanosoma cruzi* infection in *Didelphis marsupialis* in
365 Santa Catarina and Arvoredo Islands, Southern Brazil. Mem. Inst. Oswaldo
366 Cruz 95, 795-800.
367
- 368 Gurgel-Gonçalves, r., Ramalho, E.D.,Duarte, M.A.,Palma, A.R.T., Abad-Franch,
369 F., Carranza, J.C.,Cuba, C.A.C., 2004. Enzootic transmission of *Trypanossoma*

370 *cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. Rev. Inst. Méd. Trop. S.
371 Paulo 46, 323-330.
372
373 Herrera, L., Urdaneta-Morales, S., 1991. *Didelphis marsupialis*: reservoir of
374 *Babesia brasiliensis* in the valley of Caracas (Venezuela). Acta cient. venez, 42,
375 45-46.
376
377 Jacobson, R.L., Eisenberger, C.L., Svobodova, M., Baneth, G., Sztern, J.,
378 Carvalho, J., Nasreddin, A., El fari, M., shalom, U., Volf, P., Votypka, J., Dedet,
379 J. P., Pratlong, F., Schonian, G., Schnur, L.F., Jaffe, C.L., Warburg, A., 2003.
380 Outbreak of cutaneous leishmaniasis in northern Israel. Journal Infection
381 Disease 188: 1065-1073.
382
383
384 Legey, A.P., Pinho, A.P.S., Xavier, S.C.C., Leon, L.L., Jansen, A.M., 1999.
385 Humoral immune response kinetics in *Philander opossum* and *Didelphis*
386 *marsupialis* infected and immunized by *Trypanosoma cruzi* employing an
387 immunofluorescence antibody test. Mem. Inst. Osw. Cruz, 94, 371-376.
388
389 Lima, V.M.F. de, Biazzone, L., Silva, A.C., Correa, A.P.F.L., Luvizotto, M.C.R.,
390 2003. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme
391 immunoassay using protein A in naturally infected dogs. Pesq. Vet. Bras., 25,
392 215-218.
393

394 Mello, D.A., Teixeira, M.L., 1984. Infecção experimental de *Calomys callosus*
395 (Rodentia-Cricetidae) com *Leishmania donovani chagasi* (Laison, 1982). Rev.
396 Saúde Pública, 18, 337-341.

397

398 Neves, V.L.F.C., Katz, G., Rodas, L.A.C, Poletto, D.W., Lage, L.C., Spínola,
399 R.M.F, Cruzm O.G., 2001. Utilização de ferramentas de análise espacial na
400 vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana – Araçatuba, São
401 Paulo, Brasil, 1998-1999. Cad. Saúde Pública 17, 1263-1267.

402

403 Nunes, A.G., Paula, E.V.de, Teodoro, R., Prata, A., Silva-Vergara,M.L., 2006.
404 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em
405 Varzelândia, Minas Gerais, Brasil. Cad. Saúde Pública 22, 1343-1347.

406

407 Rami, M., Atarhouch,T., Dakkak, A., 2005. Identification of two highly
408 performing *Leishmania infantum* antigens for serodiagnosis of canine
409 leishmaniosis. Vet. Parasitol. 134, 25-31.

410

411 Reis, A.B., Martins-Filho,O.A., Carvalho, A.T., Carvalho, M.G., Mayrink, W.,
412 Silva, J.C.F., Giunchetti, R.C., Genaro, O., Oliveira, R.C., 2006. Parasite
413 density and impaired biochemical/hematological status are associated with
414 severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. Reserch veterinary
415 science 81, 68-75

416

- 417 Rodgers, M.R., Popper, S.J., Wirth, D.F., 1990. Amplification of kinetoplast as
418 tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology*
419 71, 267-275.
- 420
- 421 Rosário, E.Y.do, Genaro, O., França-Silva, J.C., Costa, R.T.da, Mayrink,W.,
422 Reis, A.B.,Carneiro, M., 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent
423 assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic
424 marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz* 100, 197-
425 203.
- 426
- 427 Ruiz-Piña, H.A., Cruz-Reyes, A., 2002. The opossum *Didelphis virginiana* as a
428 Synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilche, Yucatán, México.
429 *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 613-620.
- 430
- 431 Shaw, J.J., and Lainson, R.1987. Ecology and epidemiology: New World. In the
432 leishmaniasis in Biology and Medicine: Biology and Medicine Epidemiology
433 (Peters, W. and Lillick-Kendrick, r, eds), pp. 291-351, Academmic Press.
- 434
- 435 Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory
436 manual. Cold spring harbor laboratory press,
- 437
- 438 Telleria, J., Bosseno, M.F., Tarifa,T., Buitrago, R., Martinez,E., Torrez,M.,
439 Pont,F.le, Breniere, S.F., 1999. Putative reservoirs of *Leishmania amazonensis*
440 in a Sub andean focus of Bolívia identified by KDNA-polymerase chain reaction.
441 *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 5-6.

442

443 Traub, R.J., Monis,P.T.,Robertson, I.D., 2005. Molecular epidemiology: A
444 multidisciplinary approach to understanding parasitic zoonoses. Inter. J. of
445 Parasitol.35, 1295-1307.

446

447 Travi, B.L., Jaramillo, C., Montoya,J., Segura, I., Zea, A., Gonçalves, A., 1994.
448 *Didelphis marsupialis*, na important reservoir of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*)
449 *cruzi* and *Leishmania* (*leishmania*) *chagasi* in Colômbia. Am. J. Trop. Méd.
450 Hyg., 50, 557-565.

451

452 Travi, B.L., Osorio, Y., Becerra, M.T., Adler, G.H., 1998. Dynamics of
453 *Leishmania chagasi* infection in small mammals of thr undisturbed and
454 degraded tropical dry forests of northern Colombia. Trans. of the Royal Soc. of
455 trop. medic. and hyg.92, 275-278.

456

457 Voller, A., Bidwell, D.E., Bartlett, A.,1980. Enzyme-linked immunosorbent
458 assay. In: Rose, N, Friedman, H.(ED)., Manual of clinical Immunology.
459 American Society for Microbiology, Washington, p.359-371.

460

461 www.bauru.sp.gov.br/dados geograficos. Acesso 30 de outubro de 2006.

462

463 Zapata, M.T.G., 2002. Calazar canino como fator de risco para ocorrência de
464 calazar humano. Boletim eletrônico epidemiológico. FUNASA, 6. 2-5

465

466 Zulueta, A.M., Villarroel,E.,Rodriguez,N., Feliciangeli,M.D., Mazzari,M.,
467 Reyes,O.,Rodrigues,V.,Centeno,M.,Barrios,R.M.,Ulrich,M.,1999. Epidemiologic
468 aspects of american visceral leishmaniasis in na endemic focus in eastern
469 venezuela. Am. J. Trop. Méd. Hyg. 61, 945-950.

470

471

Tabela 1: Análise comparativa entre os resultados pareados de PCR e ELISA.

		PCR		
ELISA		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	59*	12	71
	Negativo	21	15	36
	Total	80	27	107

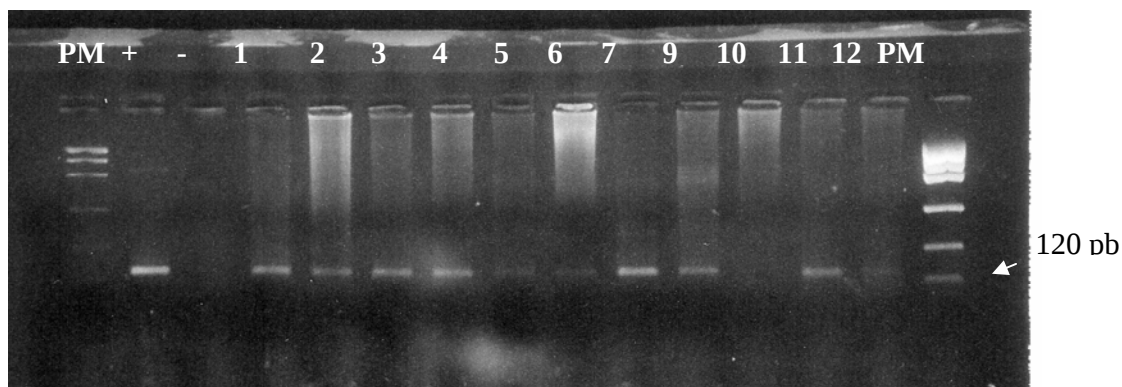


Figura 1: Produtos da amplificação de DNA, por PCR, em gel de agarose a 2%. Peso Molecular (PM) (Low Mass, Invitrogen); (-) negativo sem DNA; (+): controle positivo contendo DNA de cepa de *L.(L).chagasi* (MHOM/BR00/MER02 – Fiocruz BA); 1 a 12 DNA de amostras de medula óssea de gambá.

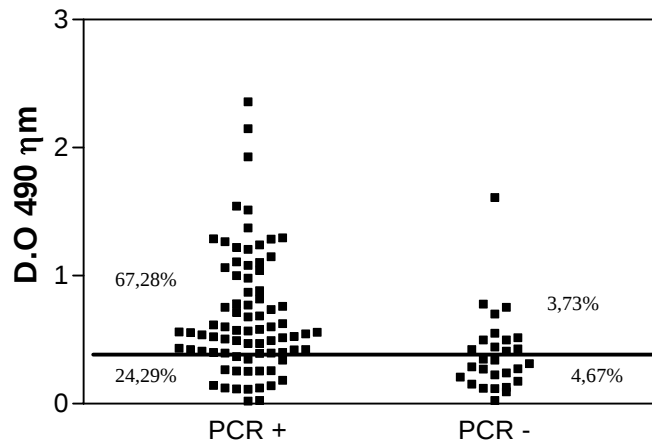


Figura 2: Reação sorológica de amostras de soro de *Didelphis sp* com resultado para PCR de medula óssea positivo e negativo em ensaio imunoenzimático de fase sólida contra antígeno total de *Leishmania (L.) chagasi*. O ponto de corte da reação está indicado.