



EPIDEMIOLOGIA DE HEMOPARASITOSE EM CANÍDEOS E MARSUPIAIS RESERVATÓRIOS NO BIOMA PAMPA

Vinicius Proença da Silveira¹
Francini Paz²
Vagner Ricardo Lunge³
Nilo Ikuta³

RESUMO

As hemoparasitoses são doenças transmitidas por vetores que acometem os cães domésticos. Entre estas se destacam a leishmaniose visceral (causada pelo protozoário *Leishmania infantum*), a erliquiose (causada por bactérias do gênero *Ehrlichia*) e a babesiose (causada pelo protozoário *Babesia*). Algumas espécies de animais silvestres são reservatórios de bactérias e parasitos, servindo como fonte de infecção para o homem e animais domésticos. Esses parasitos também podem causar doenças nesses animais, representando um risco para a conservação da fauna. Especificamente os indivíduos silvestres da família Canidae compartilham inúmeras infecções com os cães domésticos. Além disso, os marsupiais representam outra fonte importante de doenças em cães e até de zoonoses, devido sua adaptação com o perímetro urbano e aproximação com a população. O presente estudo tem como objetivo identificar espécies de animais silvestres que possam ser reservatórios ou mesmo apresentar manifestações clínicas de duas hemoparasitoses importantes em cães domésticos (erliquiose e babesiose), além da leishmaniose, zoonose com elevada disseminação recente no nosso meio. Os métodos envolveram a avaliação de registros de frequência de canídeos e marsupiais em programas de monitoramento da mastofauna morta por atropelamento na RS-040, trecho de Viamão/Pinhal, no estado do Rio Grande do Sul. Também foram realizadas coletas de amostras de animais para realização de análises laboratoriais. Os resultados iniciais demonstraram uma frequência expressiva da espécie *Didelphis albiventris* e a ocorrência de canídeos silvestres nessa região. Amostras biológicas desses animais estão sendo analisadas para detecção das três hemoparasitoses e avaliação da provável ocorrência em ciclo silvestre.

Palavras chave: Mastofauna, Babesiose, Leishmaniose, Erliquiose, Diagnóstico Molecular

INTRODUÇÃO

Os mamíferos silvestres são representados por aproximadamente 701 espécies no Brasil (PAGLIA et al., 2012). Esses animais podem ser importantes na manutenção de agentes infecciosos de animais domésticos e do próprio homem. Muitas hemoparasitoses de canídeos, por exemplo, podem apresentar caráter zoonótico e representar uma ameaça à saúde

¹ Aluno do curso de graduação de Med. Veterinária – Bolsista PIBIC/CNPq – vinicius-dasvilveira@hotmail.com

² Aluna de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

³ Professor do curso de graduação Medicina Veterinária, e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – vagner.lunge@gmail.com

humana (OSTFELD et al., 2014). Entre estas doenças, destacam-se a leishmaniose visceral, causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e transmitida pelo inseto flebotomíneo (AKHOUNDI et al., 2016), e as infecções por *Ehrlichia* e *Babesia* transmitidas por carrapatos (DEMONER et al., 2013; ADAO et al., 2017).

Estudos prévios descrevem os mamíferos (principalmente roedores, canídeos e marsupiais) como reservatório de *Leishmania* no ciclo silvestre (RUAS et al., 2003; FIGUEIREDO et al., 2008; ALMEIDA, 2011; GÓMEZ-HERNÁNDEZ et al., 2017).

O *Cerdocyon thous* (Graxaim-do-mato), já foi descrito relatos de leishmaniose nessas espécies no Brasil (RICHINI-PEREIRA et al., 2014; SOUZA et al., 2014). Entre os marsupiais destacar o *Didelphis albiventris* (Gambá-de-orelha-branca) como reservatório de *Leishmania* (DONALISIO et al., 2017).

O convívio destes animais silvestres com cães domésticos pode aumentar o risco de infecção em 2,6 vezes (SANTOS et al., 1998). Desta maneira, a infecção destes animais pressupõe uma importante contribuição epidemiológica no ciclo de propagação da doença (GÓMEZ-HERNÁNDEZ et al., 2017).

Outros hemoparasitos, como *Babesia* e *Ehrlichia* também infectam animais silvestres. No Rio Grande do Sul, os principais vetores de *Babesia canis* e *Ehrlichia* para cães são os carrapatos dos gêneros *Rhipicephalus* e *Amblyomma* (RUAS et al., 2003).

A dificuldade de monitoramento e principalmente de coleta de amostras de animais de vida livre (com necessidade de captura e geração de estresse) tem limitado os estudos epidemiológicos nas populações de animais silvestres. A principal alternativa de pesquisa nesse caso tem sido o uso de animais mortos por atropelamento e/ou atendidos em clínicas ou centros de triagem. Informações obtidas dessa forma podem ser utilizadas como material para monitoramento de enfermidades circulantes em uma determinada região. O presente estudo tem como objetivo identificar a ocorrência de espécies silvestres que possam ser acometidas por três importantes hemoparasitoses de cães: leishmaniose visceral, babesiose e erliquiose.

METODOLOGIA

Aspectos Éticos

O projeto “DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *BABESIA CANIS VOGELI* E *LEISHMANIA INFANTUM* EM ANIMAIS SILVESTRES NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL”, teve sua aprovação, no início do ano de 2018, para realizar coletar de material biológico em animais silvestres mortos por atropelamento na RS-040, SISBio 61795-1.

Análise de registros, Saídas de Campo e Coleta de Amostras

O projeto de Monitoramento da Fauna Atropelada, realizado pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) do Ibama, de Porto Alegre, está em atividade desde 2015. Possuindo registro da frequência dos atropelamentos dos anos de 2015 a 2017 da rodovia RS-040, trecho de Viamão/Pinhal.

No ano de 2018 novas expedições foram realizadas, também com o intuito de realizar coletas de amostras em animais que podem ser acometidos por hemoparasitoses. As atividades tiveram início em abril, ocorrendo nas segunda-feira, com saída às 8 horas de Porto Alegre, totalizando 5 expedições.

O monitoramento inicia no quilometro 12 da rodovia RS-040, com o veículo em velocidade de aproximadamente de 60 km/h, a fim de possibilitar a visualização dos animais. Com a identificação visual dos animais foram efetuados registros fotográficos e localização por GPS (Global Positioning System). Posteriormente colocados em posição dorsal para a realização da necropsia e coleta, quando possuírem, de ectoparasitas. A necropsia foi efetuada, *in loco*, através de uma incisão com bisturi na linha média, possibilitando a visualização da cavidade abdominal, e com o auxílio de tesoura romba e pinça de dissecação simples para extirpar o fígado, baço. As amostras foram conduzidas ao Laboratório de Diagnóstico Molecular da ULBRA.

Avaliações Laboratoriais

O exame parasitológico foi realizado a partir de impressões de fragmentos de tecidos de baço e fígado serão realizadas em lâminas. As lâminas foram fixadas em metanol no local e em seguida encaminhadas ao laboratório para serem coradas pela técnica Diff-Quik modificada. Posteriormente as lâminas foram observadas em microscópio óptico sob o aumento de 100x, para identificação dos parasitas.

A detecção dos hemoparasitos foi realizada no Laboratório de Diagnostico Molecular da ULBRA. Brevemente o DNA total foi extraído pela metodologia de sílica utilizando o kit comercial NewGene (Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha – Brasil). *Leishmania infantum*, *Babesia canis vogeli* e *Ehrlichia canis* foram detectadas por PCR conforme previamente descrito (FRANCINO et al. 2006; PELEG et al. 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 5 expedições nos meses de maio e abril de 2018 resultaram no registro de 79 animais atropelados entre mamíferos, aves e reptéis. Em comparação com anos anteriores

deste estudo foi observado uma manutenção das frequências das classes dos diferentes organismos. Entre os anos de 2015 a 2018, as classes dos animais apresentaram as seguintes frequências: 47,7% para mamíferos, 31,4% para aves, 18,8% para répteis e 2,2% para anfíbios. De forma estratificada, os mamíferos, as aves, os répteis e os anfíbios foram mais frequentes nos anos de 2018 (47,7%), 2017 (35,0%) 2015 (26,8%) e 2016 (3,7%), respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: Frequências das classes de animais coletadas durante os anos de estudo do CETAS/IBAMA

Classe	Anos				Total
	2015	2016	2017	2018*	
Amphibia	3 (0,7%)	36 (3,7%)	5 (1%)	0 (0%)	44 (2,2%)
Aves	125 (29,4%)	302 (30,7%)	180 (35%)	22 (27,8%)	629 (31,4%)
Mammalia	183 (43,1%)	461 (46,8%)	257 (49,9%)	54 (68,4%)	955 (47,7%)
Reptilia	114 (26,8%)	186 (18,9%)	73 (14,2%)	3 (3,8%)	376 (18,8%)
Total	425 (100%)	985 (100%)	515 (100%)	79 (100%)	2004 (100%)

*amostras do ano de 2018 equivalem a 5 expedições

De acordo com os nossos achados, especificamente no estado do Rio Grande do Sul, já foi identificada uma maior frequência da classe mamíferos entre os animais atropelados, representado por 53,2% dos 419 animais encontrados nas rodovias BR-392 e RS-149 (DARLIANE et al., 2013).

A espécie *Didelphis albiventris* foi a mais frequentemente detectada (n = 438, 21,9%), sendo largamente predominante no período estudado, com maior número de coletas em 2016 (n=209, 21,2%). Além disso, a espécie *Canis familiaris* foi identificada em 56 casos (2,8%), sendo predominante no ano de 2016 (n=26, 2,6%). As espécies *Cerdocyon thous* (0,5%) e *Lycalopex gymnocercus* (0,3%) apresentaram menores frequências, sendo detectadas principalmente em 2017 (n=7, 1,3%) e 2016 (n=3, 0,3%), respectivamente. O maior percentual das amostras (74,5%) pertenceu a outras espécies não especificadas (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuições das espécies coletadas no período de 2015 a 2018

Espécies	Anos				
	2015	2016	2017	2018	Total
<i>Canis familiaris</i>	11 (2,6%)	26 (2,6%)	15 (2,9%)	4 (5%)	56 (2,8%)
<i>Cerdocyon thous</i>	0 (0%)	4 (0,4%)	7 (1,3%)	0 (0%)	11 (0,5%)
<i>Lycalopex gymnocercus</i>	1 (0,2%)	3 (0,3%)	2 (0,4%)	1 (1,2%)	7 (0,3%)
<i>Didelphis albiventris</i>	89 (20,9%)	209 (21,2%)	120 (23,3 %)	20 (25,3%)	438 (21,9%)
Outras espécies	324 (76,2%)	743 (75,4%)	371 (72%)	54 (68,3%)	1492 (74,5%)
Total	425 (100%)	985 (100%)	515 (100%)	79 (100%)	2004 (100%)

A partir disso, é importante destacar que em outro estudo realizado na região central relatou que a espécie com maior número de indivíduos atropelados foi *Didelphis albiventris* (Gambá-de-orelha-branca) com 20% de registros na BR-158 (SOUZA et al., 2017). Esta espécie também apresentou uma relevante prevalência (57,1%) de atropelamentos entre animais da fauna local em um estudo previamente realizado, no período entre 1999 e 2001, na RS-040 (ROSA et al.,2004).

Diagnóstico Molecular por PCR-real time

Para a avaliação inicial dos *primers* utilizados nos estudos, descritos por FANCINO et al., (2006), foi elaborado um ensaio laboratorial, ao qual, utilizou-se uma amostra de sangue sabidamente positiva para leishmaniose *cycle threshold* (Ct) de 22,94 em duplicata, realizando uma cascata de diluição de base 10x, 100x e 1000x, uma amostra positiva para Cinomose com diluição de base 10x, e um controle negativo. Como resultado da amplificação se obteve valores positivos para as amostras de leishmaniose em todas as diluições deslocamento de Cts coerentes e negativas para o controle e a amostra de Cinomose.

Já pra *Babesia canis vogeli* e *Ehrlichia canis*, os *primers* que se mostraram mais sensíveis nos estudos *in silico* estão localizados nos genes *hsp70* para *B. canis vogeli* e 16S rRNA para *E. canis* e foram descritos por PELEG et al. (2010). Os procedimentos para avaliar a sensibilidade e especificidade foram previamente realizados na empresa Simbios Biotecnologia, localizada em Cachoeirinha/RS.

As amostras biológicas coletadas dos animais atropelados, serão submetidas a análise por técnicas de diagnóstico molecular (PCR-Real Time) e exame parasitológico, para detecção das três hemoparasitoses e avaliação da provável ocorrência do ciclo silvestre.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Trabalhos utilizando fauna atropelada demonstram ser uma alternativa viável para estudo epidemiológicos e registro da biodiversidade local, por não haver a necessidade de captura e contenção das espécies silvestres. Este estudo observou uma frequência expressiva da espécie *Didelphis albiventris*, assim como já relatado em outros estudos realizado no bioma pampa do Rio Grande do Sul. Além disso, foi verificado a presença de canídeos silvestres nessa região. Esses animais são sabidamente hospedeiro/reservatório de patologias com as hemoparasitárias e ciclo silvestre é pouco conhecido. As expedições em busca de aumentar o número amostral, tornando assim mais significativo o estudo, estão sendo realizadas semanalmente.

REFERÊNCIAS

ADAO, Davin Edric V. et al. Detection and molecular characterization of Hepatozoon canis, Babesia vogeli, Ehrlichia canis, and Anaplasma platys in dogs from Metro Manila, Philippines. **Korean Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 2, p. 79-88, 2017.

ALMEIDA, Aliny Pontes. **Pesquisa de Rickettsia, Ehrlichia, Anaplasma, Babesia, Hepatozoon e Leishmania em Cachorro-do-mato (Cerdocyon thous) de vida livre do Estado do Espírito Santo**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CORRÊA, Luiz Liberato Costa et al. Monitoramento de vertebrados atropelados em dois trechos de rodovias na região central do Rio Grande do Sul-Brasil. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 7, n. 1, p. 27-36, 2013

DA SILVA OLIVEIRA, Daniela; DA SILVA, Valeska Martins. Vertebrados silvestres atropelados na BR 158, RS, Brasil. **Biotemas**, v. 25, n. 4, p. 229-235, 2012.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 214-221, 2006.

GÓMEZ-HERNÁNDEZ, César et al. Leishmania infection in bats from a non-endemic region of Leishmaniasis in Brazil. **Parasitology**, v. 144, n. 14, p. 1980-1986, 2017.

PELEG, Ofer et al. Multiplex real-time qPCR for the detection of Ehrlichia canis and Babesia canis vogeli. **Veterinary parasitology**, v. 173, n. 3-4, p. 292-299, 2010.

ROSA, André Osório; MAUHS, Julian. Atropelamento de animais silvestres na rodovia RS-040. 2004.

RUAS, J. L. et al. Babesia sp. em graxaim do campo (Lycalopex gymnocercus) no sul do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 1, p. 113-114, 2003.