



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ - UESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL – PPGCA

GRAZIELA BARONI DE SOUZA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma* spp. E *Leishmania*
spp. EM PEQUENOS MAMÍFEROS NÃO-VOADORES (RODENTIA E
DIDELPHIMORPHIA) NA REGIÃO SUDOESTE DA BAHIA**

ILHÉUS – BAHIA
2020

GRAZIELA BARONI DE SOUZA

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma* spp. E *Leishmania* spp. EM PEQUENOS MAMÍFEROS NÃO-VOADORES (RODENTIA E DIDELPHIMORPHIA) NA REGIÃO SUDOESTE DA BAHIA

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Clínica e Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dra. Fabiana Lessa Silva

**ILHÉUS – BAHIA
2020**

S729

Souza, Graziela Baroni de.

Diagnóstico molecular da infecção por Trypanosoma spp. E Leishmania spp. em pequenos mamíferos não-voadores (Rodentia e Didelphimorphia) na região sudoeste da Bahia / Graziela Baroni de Souza . – Ilhéus, BA: UESC, 2020.

101f.: il.; anexo.

Orientadora: Fabiana Lessa Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCA.

Inclui referências e apêndice.

1. Chagas, Doença de. 2. Leishmaniose. 3. Animais silvestres. 4. Mamíferos. 5. Reservatórios. 6. Reação em cadeia de polimerase. I. Título.

CDD 616.9363

GRAZIELA BARONI DE SOUZA

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma spp.* E *Leishmania spp.* EM PEQUENOS MAMÍFEROS NÃO-VOADORES (RODENTIA E DIDELPHIMORPHIA) NA REGIÃO SUDOESTE DA BAHIA

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal

Ilhéus – BA, 27/02/2020

Alexandre Dias Munhoz – Dr.
UESC/ DCAA

Anaiá da Paixão Sevá – Dr.
UESC/ DMCCT

Fabiana Lessa Silva – Dr.
UESC/ DCAA - Orientador

Fábio Santos Carvalho – Dr.

George Rêgo Albuquerque – Dr.
UESC/ DCAA - Coorientador

DEDICATÓRIA

À Deus, que é o Senhor e Salvador da minha vida.

Ao meu marido, meu melhor amigo e maior incentivador.

Aos meus pais e meu irmão, por tudo o que sou.

Ao meu cachorrinho Fly, pelos momentos de alegria e distração.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por ser presença constante em todos os momentos, me guiando, me capacitando e não me deixando desistir.

Ao meu marido Léo Barcelos Ferreira, agradeço pelo amor, companheirismo e paciência durante esses anos. Obrigada por me incentivar, por acreditar em mim e por me fazer feliz desde o primeiro dia.

Aos meus pais Ramiro Antônio Seidel de Souza e Leila Maria Baroni de Souza, meu eterno agradecimento por todo amor, dedicação e por priorizarem uma educação de qualidade, desde quando eu era criança. Ao meu irmão Douglas Baroni Seidel de Souza, pelo amor, pela compreensão em meus momentos de ausência e pelo incentivo que foram essenciais para que eu conquistasse mais essa vitória.

Aos meus sogros Evaldo Ramos Ferreira e Elza Terezinha Barcelos Ferreira por torcerem por mim desde sempre e por me amarem como se eu fosse uma filha. Vocês são bênçãos em minha vida.

À Roberto Miranda Ramos e Regina Ramos por terem sido minha segunda família ao longo dessa caminhada. Obrigada pelo acolhimento, dedicação e amor. Vocês foram imprescindíveis para que eu chegasse até aqui.

Aos amigos da célula, obrigada pelas orações e palavras de carinho. Esse suporte me manteve firme na caminhada.

Aos amigos que cultivei ao longo do doutorado, cada um à sua maneira, ajudou a tornar a caminhada mais leve e prazerosa. Em especial agradeço à amiga Ana Graziela de Jesus Deiró pelo apoio, conselhos, carinho e amizade. Agradeço também às minhas grandes amigas Paula Elisa Brandão Guedes e Hllytchaikra Ferraz Fehlberg (Hellen), por me “carregarem no colo” quando eu não tinha mais forças para caminhar. Minha eterna gratidão pelas infinitas risadas, pelos conselhos, pelas orações, por acreditarem no meu potencial e pelo apoio emocional.

Aos colegas dos demais laboratórios da Universidade Estadual de Santa Cruz, obrigada pela amizade, pelos conhecimentos transmitidos, pelas resenhas e pela parceria em todos os momentos, em especial agradeço à Aisla Nascimento, Philipe Brito, Pedro Alcântara, Gabriela Mota e Beatris Rosa.

Aos alunos da Iniciação Científica que não mediram esforços para me ajudar em todas as etapas desta jornada. De maneira especial, agradeço pela prontidão e excelente trabalho das alunas Camila e Cássia.

À minha querida orientadora, amiga e, muitas vezes, mãe. Agradeço por toda dedicação, paciência, pelos conhecimentos transmitidos, pelas palavras de incentivo e por ter acreditado em mim desde o princípio.

Ao meu co-orientador George Rego Albuquerque, que não mediu esforços para que eu chegasse até aqui. Agradeço pela paciência, praticidade e prontidão para sanar minhas dúvidas ao longo dessa jornada cheias de desafios. Gratidão!

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, pelos ensinamentos transmitidos, em especial ao professor Alexandre Dias Munhoz e à professora Bianca Mendes Maciel que inúmeras vezes me aconselharam e sanaram minhas dúvidas, contribuindo muito com o trabalho.

Aos demais funcionários da UESC, obrigada por contribuírem com esta conquista através dos diversos serviços prestados, em especial ao técnico do Laboratório de Histopatologia, Ivo Arouca, que esteve sempre pronto a ajudar.

Aos membros da banca por colaborarem para o enriquecimento do trabalho.

À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal por possibilitar a realização e execução do projeto de pesquisa. Neste ambiente tive a honra de conhecer pessoas maravilhosas e adquirir uma bagagem de conhecimentos com professores e colegas ilustres.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão de bolsa de doutorado.

Ao Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio) por providenciar as permissões de coleta.

À todos aqueles que participaram de alguma forma na concretização deste sonho que hoje se torna uma realidade, meus sinceros agradecimentos!

GRATIDÃO!

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma* spp. E *Leishmania* spp. EM PEQUENOS MAMÍFEROS NÃO-VOADORES (RODENTIA E DIDELPHIMORPHIA) NA REGIÃO SUDOESTE DA BAHIA

RESUMO

Objetivou-se identificar as espécies de *Trypanosoma* e de *Leishmania*, bem como quantificar a carga parasitária de *Leishmania* em pequenos mamíferos não-voadores capturados em fragmentos de Floresta Semidecidual da Mata Atlântica e pastagens localizados na região Sudoeste do estado da Bahia. Foram capturados 454 animais dos quais foram coletados fragmentos de fígado, baço, rim, coração e pulmão para posterior realização do diagnóstico molecular. A amplificação do DNA do *Trypanosoma* spp. foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com posterior sequenciamento e identificação das espécies. Para a amplificação do kDNA de *Leishmania* spp. foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR). Posteriormente, quantificou-se a carga parasitária presente nas amostras positivas para *Leishmania* spp. através da qPCR. Para identificação das espécies *Leishmania* realizou-se a *nested*-PCR, com posterior sequenciamento. Foram encontrados animais infectados por *Trypanosoma cruzi* (2,6%; 12/454), *T. lewisi* (1,0%; 5/454) e *T. lainsoni* (0,8%; 4/454). A infecção por *Leishmania* spp. foi detectada em 2,8% (13/454) dos animais. Após o sequenciamento das 13 amostras, detectou-se que três animais estavam infectados por *L. infantum* e não foi possível detectar as espécies dos demais animais. A quantificação de promastigotas das amostras positivas variou de $2,30 \times 10^1$ a $1,30 \times 10^7$ promastigotas/mL. Os resultados deste estudo permitem concluir que espécies de *Trypanosoma*, incluindo *T. cruzi*, e *Leishmania*, bem como seus respectivos vetores encontram-se presentes na região estudada e, mais especificamente, acometendo a fauna silvestre, fato este evidenciado através da presença do DNA do parasito nos animais estudados, os quais podem ser meros hospedeiros ou atuarem como reservatórios da doença na região.

Palavras – chave: Doença de Chagas. Leishmanioses. Mamíferos silvestres. Reservatório. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma* spp. E *Leishmania* spp. EM PEQUENOS MAMÍFEROS NÃO-VOADORES (RODENTIA E DIDELPHIMORPHIA) NA REGIÃO SUDOESTE DA BAHIA

ABSTRACT

The study aimed to identify *Trypanosoma* and *Leishmania* species, as well as to quantify the parasitic load of *Leishmania* in small non-flying mammals captured in fragments of Semideciduous Forest of the Atlantic Forest and pastures located in the Southwest region of the State of Bahia. For this, 454 animals were captured, from which fragments of liver, spleen, kidney, heart and lung were collected for further molecular diagnosis. The amplification of *Trypanosoma* spp. was carried out through the Polymerase Chain Reaction (PCR), with subsequent sequencing and identification of species. For amplification of *Leishmania* spp., Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) was performed. Subsequently, the parasite load present in the positive samples for *Leishmania* spp. were quantified through qPCR. To identify *Leishmania* species, nested-PCR was performed, with subsequent sequencing. Animals infected with *T. cruzi* (2.6%; 12/454), *T. lewisi* (1.0%; 5/454) and *T. lainsoni* (0.8%; 4/454) were found. Infection with *Leishmania* spp. was detected in 2.8% (13/454) of the animals. After sequencing, the positive three animals were detected infected with *L. infantum*. It was not possible to detect the *Leishmania* specie involved in the infection of the other ten animals. The quantification of promastigotes from positive samples ranged from 2.30×10^1 to 1.30×10^7 promastigotes / mL. The results of this study allow us to conclude that *Trypanosoma* species, including *T. cruzi*, and *Leishmania*, as well as their respective vectors are present in the studied region and more specifically, affecting wild fauna, a fact evidenced by the presence the parasite DNA in the animals studied, which can be hosts or act as reservoirs of the disease in the region.

Keywords: Chaga's disease. Leishmaniasis. Wild mammals. Reservoir. Real Time Polymerase Chain Reaction.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo Geral	13
2.2	Objetivos Específicos	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	Mata Atlântica e fauna silvestre avaliada no estudo	14
3.2	Diversidade de <i>Trypanosoma</i> spp. que acometem pequenos mamíferos silvestres.....	16
3.3	A doença de Chagas	19
3.3.1	Agente etiológico e vetor.....	19
3.3.2	Ciclo biológico e transmissão	22
3.3.3	Epidemiologia	23
3.3.4	Diagnóstico	24
3.4	As leishmanioses.....	26
3.4.1	Aspectos gerais.....	26
3.4.2	Agente etiológico e vetores	27
3.4.3	Ciclo biológico e transmissão	28
3.4.4	Reservatórios.....	29
3.4.5	Epidemiologia	31
3.4.6	Diagnóstico	35
4	CAPÍTULO 1: Detecção de <i>Trypanosoma</i> spp. em pequenos mamíferos não-voadores (Rodentia e Didelphimorphia) capturados no estado da Bahia, Nordeste do Brasil	37
4.1	Introdução	38
4.2	Material e métodos	40
4.2.1	Área de estudo.....	40
4.2.2	Captura de animais	42
4.2.3	Colheita de material biológico	43
4.2.4	Extração de DNA	44

4.2.5	Amplificação do DNA de <i>Trypanosoma</i> spp. por PCR	44
4.2.6	Análise estatística.....	45
4.3	Resultados	45
4.4	Discussão	47
4.5	Conclusão.....	51
5	CAPÍTULO 2: Detecção e quantificação de <i>Leishmania infantum</i> em pequenos mamíferos não-voadores (Rodentia e Didelphimorphia) capturados no estado da Bahia, Nordeste do Brasil	52
5.1	Introdução	53
5.2	Material e Métodos	54
5.2.1	Área de estudo.....	54
5.2.2	Captura de animais.....	56
5.2.3	Colheita de material biológico	57
5.2.4	Extração de DNA	58
5.2.5	Amplificação do DNA de <i>Leishmania</i> spp. por PCR em tempo real (qPCR)	58
5.2.6	Quantificação do número de cópias do DNA de <i>Leishmania</i> spp. por qPCR.....	59
5.2.7	Identificação das espécies de <i>Leishmania</i> por PCR.....	59
5.2.8	Análise estatística.....	61
5.3	Resultados	61
5.4	Discussão	66
5.5	Conclusão.....	69
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXOS	100
	APÊNDICES.....	101

1 INTRODUÇÃO

Os tripanossomatídeos são hematozoários flagelados e parasitas obrigatórios que infectam invertebrados e todas as classes de vertebrados (VIOLA et al., 2008; LEMOS et al., 2015; COOPER et al., 2017; SPODAREVA et al., 2018). O gênero *Trypanosoma* caracteriza-se por possuir mais de 500 espécies descritas (SPODAREVA et al., 2018; JANSEN et al., 2018), sendo algumas espécies citadas infectando pequenos mamíferos, como: *T. lewisi*, *T. lainsoni*, *T. rangeli*, *T. evansi*, *T. cruzi*, dentre outras, sendo a *T. cruzi* uma das mais estudadas, responsável por provocar a doença de Chagas (HERRERA et al., 2005; MAIA DA SILVA et al., 2004; COURA; DIAS, 2009; NAIFF et al., 2013; CARDOSO et al., 2015; ORTIZ et al., 2018; JANSEN et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019).

A leishmaniose é causada por protozoários digenéticos (REY, 2001) pertencentes ao gênero *Leishmania*, subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (GOTO; LINDOSO, 2010), possuindo mais de 20 espécies descritas que podem provocar doenças com diferentes características clínicas e epidemiológicas, a depender da espécie de *Leishmania* envolvida (CARDOSO et al., 2015; BENASSI et al., 2018).

A doença de Chagas e a leishmaniose são doenças debilitantes e potencialmente fatais quando não tratadas, estando incluídas dentre os principais problemas de Saúde Pública no mundo (CÁSSIA-PIRES et al., 2014; WHO, 2018, WHO, 2019a). No passado, a doença de Chagas e a leishmaniose eram consideradas como doenças enzoóticas, acometendo apenas animais silvestres (COURA; VIÑAS, 2010; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). No entanto, com o passar dos anos, houve um crescimento da população, intensificou-se o desmatamento, a caça de animais silvestres, a construção de moradias próximas ao habitat dos hospedeiros e, conseqüentemente, as doenças passaram a ser transmitidas para os humanos e animais domésticos, passando a serem consideradas antropozoonoses (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Atualmente, estima-se que ocorram, anualmente, 700 mil a um milhão de novos casos de leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) no mundo, com cerca de 26.000 a 65.000 mortes (WHO, 2019a). Já a doença de Chagas acomete cerca de 8 a 14 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente na América Latina onde estima-se que mais de 100 milhões de pessoas estejam sob o risco de contraírem a infecção (RIBEIRO et al., 2009; FIDALGO et al., 2018). O estado da Bahia é considerado endêmico para as leishmanioses, com franca expansão dos casos de leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT)

(SESAB, 2016; SESAB, 2018b). Além disso, possui um número expressivo de casos de doença de Chagas, apresentando a quarta maior taxa de mortalidade entre as unidades federadas, totalizando, em média, 624 óbitos anuais entre os anos de 2008 à 2017 (SESAB, 2019).

Pequenos roedores e marsupiais são considerados bons bioindicadores da contaminação humana e ambiental (COSTA et al., 2015). Isso se deve ao fato deles possuírem ciclo de vida curto, serem encontrados em todos os biomas e habitats (naturais e modificados, sendo eles silvestres e peridomésticos), responderem rapidamente a alterações ambientais, possuírem abundância e diversidade de espécies, serem reservatórios de importantes patógenos que acometem animais e humanos e ainda por participarem da cadeia alimentar, atuando como presas da maioria dos carnívoros de pequeno e médio porte, potencializando a transmissão de tripanossomatídeos (EPSTEIN et al., 1997; CABRERA et al., 2003; COSTA et al., 2018).

Diversos animais selvagens atuam como reservatórios do *T. cruzi* e *Leishmania* spp., entretanto, devido às dificuldades de se obter um grande número amostral de espécies variadas e de amplas e distintas regiões geográficas, ainda são escassas as informações a respeito da ecologia e epidemiologia da doença de Chagas e leishmaniose nesses animais (CURTIS-ROBLES et al., 2016; PEREIRA et al., 2017; WHO, 2019a).

Apesar dos relatos da ocorrência da doença de Chagas e de leishmaniose em pequenos roedores silvestres e marsupiais no mundo (PAPADOGIANNAKIS et al., 2010; ROJO et al., 2017) e no Brasil (XAVIER et al., 2012; CÁSSIA-PIRES et al., 2014; COSTA et al., 2018), ainda são escassos os estudos a respeito dessas enfermidades acometendo esses animais no estado da Bahia. Desta forma, pesquisas realizadas em remanescentes de Mata Atlântica fornecem informações a respeito da biodiversidade de parasitas presentes no local e de seus respectivos hospedeiros (ACOSTA et al., 2014), contribuindo com o conhecimento da epidemiologia de doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a presença do DNA de *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos não-voadores (Rodentia e Didelphimorphia) capturados em fragmentos de Floresta Semidecidual da Mata Atlântica e pastagens localizados na região de Itambé e Itapetinga, BA, Brasil.

2.2 Objetivos específicos

I) Identificar a ocorrência das espécies de Trypanosomatídeos que acometem os pequenos mamíferos não-voadores (Rodentia e Didelphimorphia) capturados na região de Itambé e Itapetinga, BA.

II) Identificar os genótipos de *T. cruzi* que acometem os pequenos mamíferos não-voadores (Rodentia e Didelphimorphia) capturados na região de Itambé e Itapetinga, BA.

III) Identificar as espécies de *Leishmania* que acometem os pequenos mamíferos não-voadores (Rodentia e Didelphimorphia) capturados na região de Itambé e Itapetinga, BA.

IV) Quantificar a carga parasitária presente nas amostras que forem positivas para *Leishmania* spp.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Mata Atlântica e fauna silvestre avaliada no estudo

A Mata Atlântica ocupa uma área de 1.110.182 Km², correspondente a 13,04% do território brasileiro, sendo considerada a segundo maior floresta tropical da América do Sul. Localiza-se, em sua maior parte, em região costeira que se estende do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul (RIBEIRO et al., 2011; IBF, 2019, SOS MATA ATLÂNTICA, 2018).

É uma floresta mundialmente reconhecida pela diversidade de espécies de plantas e animais que abriga, sendo cerca de 570 espécies de vertebrados endêmicos e aproximadamente 8000 espécies de plantas endêmicas (MYERS et al, 2000). Além disso, a Mata Atlântica contribui com a economia do Brasil por permitir a realização de atividades como agricultura, pesca, extrativismo, turismo, geração de energia e lazer (SOS MATA ATLÂNTICA, 2018).

Apesar de ser mundialmente reconhecida pela sua biodiversidade, a Mata Atlântica encontra-se reduzida a cerca de 10% de sua cobertura vegetal natural, que é composta por áreas em regeneração e florestas degradadas espalhadas em pequenos fragmentos, cercadas por terras agrícolas (RIBEIRO et al., 2011; INPE 2013; ACOSTA et al., 2014). Devido à intensa degradação e fragmentação, muitas espécies de animais encontram-se ameaçadas de extinção por terem seus habitats restritos a pequenos fragmentos de mata (RIBEIRO et al., 2011). Dentre as espécies de pequenos mamíferos não-voadores que habitam a Mata Atlântica, destacam-se: *Marmosops incanus*, *Necromys lasiurus*, *Calomys expulsus*, *Olygorizomys nigripes*, *Gracilinanus microtarsus*, *Didelphis albiventris*, dentre outras (PÁGLIA et al., 2012).

Marmosops incanus (Lund, 1840) é um didelfídeo endêmico do Brasil, abundante em fragmentos florestais de diversos biomas, dentre eles a Mata Atlântica, o Cerrado e a Caatinga encontrados nos estados da Bahia, Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Minas Gerais e Paraná (CÂMARA et al., 2003; GARDENER, 2008; PÁGLIA et al., 2012). Esse marsupial possui hábito arbóreo e terrestre, ocupando principalmente o solo e o sub-bosque como estrato florestal (VIEIRA; CAMARGO, 2012; PÁGLIA et al., 2012). Apresenta dieta insetívora e onívora, composta por insetos e frutas (PÁGLIA et al., 2012).

A espécie *N. lasiurus* possui hábito alimentar frugívoro/onívoro, apresentando locomoção exclusivamente terrestre (solo), localizando-se em diferentes tipos de biomas (Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado, Pantanal, Amazônia e Pampa) (PAGLIA et al., 2012), preferencialmente em áreas abertas, sendo casualmente encontrados em fragmentos de matas

alteradas (BONVICINO et al. 2002) e dificilmente em matas densas (PARDINI; UMETSU, 2006; ROCHA et al., 2011).

Calomys expus são roedores de locomoção terrestre e hábito frugívoro e granívoro (BONVICINO et al., 2008; PAGLIA et al., 2012). No Brasil, encontram-se distribuídos principalmente em formações florestais abertas do Cerrado, ocorrendo também na Caatinga, Pantanal e na Mata Atlântica (BONVICINO et al., 2003; BONVICINO et al., 2008; PAGLIA et al., 2012).

Olygorizomis nigripes habita formações abertas da Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Pantanal (BONVICINO et al., 2008; PAGLIA et al., 2012). Apresenta locomoção terrestre e hábitos alimentares frugívoro/ granívoro (BONVICINO et al., 2008; PAGLIA et al., 2012).

A espécie *G. microtarsus* ocorre na Mata Atlântica, desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, e possui hábito alimentar predominantemente insetívoro (GEISE; ASTÚA, 2009; PAGLIA et al., 2012; VIEIRA; CAMARGO, 2012). É um marsupial arborícola, ocupando principalmente as camadas superiores da floresta, embora possa ocorrer no sub-bosque ou até mesmo no solo (VIEIRA; CAMARGO, 2012).

Didelphis albiventris é um marsupial que ocorre na Mata Atlântica e em sua locomoção utiliza tanto o solo quanto o sub-bosque e o dossel (VIEIRA; CAMARGO, 2012). Possui hábito alimentar frugívoro e onívoro, sendo frequentemente associado à predação de aves domésticas, além de consumir roedores e aves de pequeno porte, rãs, lagartos, insetos, caranguejos e frutos (PÁGLIA et al., 2012; ROSSI et al., 2006).

As práticas agropecuárias são rotineiramente encontradas no estado da Bahia e contribuem de maneira expressiva com a degradação, dominando os resquícios da Mata Atlântica presentes neste estado (COSTA et al. 2000; MYERS et al., 2000; INEMA 2014). Por fim, o desmatamento, fragmentação florestal e ocupação humana alteram as comunidades naturais e podem causar: 1) extinção local de mamíferos em remanescentes da Mata Atlântica (OLIFIERS et al., 2005; CANALE et al., 2012), 2) mudanças climáticas, 3) alterações na biologia de vetores e 4) ocorrência de infecções pelos agentes da doença de Chagas e da leishmaniose em animais e seres humanos.

3.2 Diversidade de *Trypanosoma* spp. que acometem pequenos mamíferos silvestres

A biodiversidade e biologia de *Trypanosoma* spp. que infecta os seres humanos e animais silvestres em todo o mundo ainda é um enigma, assim como questões sobre especificidade do hospedeiro, distribuição geográfica, relação filogenética entre os clados, variedade de ecossistemas e nichos ecológicos, dentre outros (HOARE, 1972; COOPER et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019).

Nas últimas décadas houve um aumento do número de descrições de espécies de *Trypanosoma* e de novas DTU's (*Discrete Typing Units*) que infectam vertebrados de todo o mundo. Isso está relacionado ao surgimento de técnicas moleculares inovadoras e de maior poder analítico (RODRIGUES et al., 2019). O gênero *Trypanosoma* é composto por espécies que diferem em relação aos hospedeiros e vetores. Diversos estudos descrevem a infecção de pequenos mamíferos por espécies de *Trypanosoma*, como: *T. lewisi*, *T. lainsoni*, *T. rangeli*, *T. evansi*, *T. cruzi*, dentre outras (HERRERA et al., 2005; MAIA DA SILVA et al., 2004; NAIFF et al., 2013; CARDOSO et al., 2015; ORTIZ et al., 2018; JANSEN et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019). *Trypanosoma lewisi* é uma espécie de parasita não patogênica e transmitida por pulgas de ratos (HOARE, 1972), cujos principais reservatórios são os ratos domésticos (*Rattus* spp.) (ORTIZ et al., 2018). De maneira oportunista, também infecta os seres humanos sendo considerada uma zoonose emergente, cujo principal vetor em áreas tropicais e subtropicais são as pulgas da espécie *Xenopsylla cheops* (LINARDI; BOTELHO, 2002; ORTIZ et al., 2018). Os roedores e, eventualmente, outros animais se infectam ao ingerirem as pulgas infectadas ou as fezes de pulgas contendo tripomastigotas metacíclicas (MARAGUI et al., 1995). Os sintomas e a gravidade da infecção relacionados ao *T. lewisi* em humanos ainda não foram esclarecidos (ORTIZ et al., 2018). Os impactos ambientais causados pelo homem associados à pobreza urbana propiciam um maior contato entre os seres humanos, os roedores sinantrópicos e as pulgas, contribuindo com a transmissão desse parasita (BORDES et al., 2015; MORAND et al., 2015). Apesar disso, até o momento não há relatos da infecção por *T. lewisi* em humanos no Brasil.

Trypanosoma lainsoni pode ser encontrado em mamíferos arbóreos e terrestres (NAIFF; BARRET, 2013; ORTIZ et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019), não sendo patogênicos para os seus hospedeiros naturais (HOARE, 1972). Até o momento não existem estudos que comprovem as espécies de vetores e o ciclo de transmissão desse parasita (RODRIGUES et al., 2019).

Trypanosoma rangeli é um parasita que infecta humanos, porém acredita-se que não seja capaz de provocar a doença (HAMILTON et al., 2010). Possui diversos hospedeiros mamíferos, sendo transmitido por triatomíneos do gênero *Rhodnius* (MAIA DA SILVA et al., 2007). Foi descrito infectando pequenos mamíferos silvestres (JANSEN et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019), bem como primatas e humanos na região amazônica (MAIA DA SILVA et al., 2004a; HAMILTON et al., 2010).

Apesar de não ser um parasita zoonótico, o *Trypanosoma evansi* é importante agente causador de doenças em todas as áreas tropicais e subtropicais do mundo, infectando equinos, bovinos, cães, capivaras, quatis e pequenos roedores silvestres (HERRERA et al., 2004; HERRERA et al., 2005). Os principais vetores são moscas do gênero *Tabanus*, entretanto, esse protozoário não infecta o hospedeiro invertebrado, sendo estes responsáveis apenas pela transmissão mecânica (HERRERA et al., 2005; DESQUESNES et al., 2013).

Trypanosoma cruzi é um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastea, subordem Trypanosomatina, gênero *Trypanosoma* e subgênero Schizotrypanum, sendo uma das espécies mais estudadas do gênero *Trypanosoma*. É o agente etiológico da doença de Chagas, que é uma zoonose responsável por um grave problema de saúde pública mundial infectando milhares de pessoas, principalmente na América Latina (COURA; DIAS, 2009; LOPES et al., 2018). O quadro 1 destaca a prevalência de *Trypanosoma* spp. em roedores e marsupiais no Brasil e no Mundo, diagnosticados a partir da técnica de PCR.

Quadro 1. Prevalência de *Trypanosoma* spp. em roedores e marsupiais por PCR.

Localidade	Hospedeiros	Positivos/N (%)	Espécie	Referência
São Paulo	<i>Didelphis albiventris</i>	1/11 (9,09%)	<i>T. cruzi</i>	Tenório et al., 2014
Paraíba	<i>Didelphis albiventris</i>	12/17 (%)	<i>T. cruzi</i> (2); <i>T. cascavelli</i> (6); <i>T. janseni</i> (4)	Rodrigues et al., 2019
Rio de Janeiro	<i>Didelphis aurita</i>	5/5 (100%)	<i>T. janseni</i> (2); <i>Trypanosoma</i> sp. (3)	
Acre	<i>Didelphis marsupialis</i>	3/3 (100%)	<i>T. cruzi</i>	
Goiás	<i>Gracilinanus agilis</i>	33/33 (100%)	<i>T. cruzi</i> (2); <i>T. cruzi/T. dionisii</i> (1); <i>T. cruzi/T. dionisii/ T. lainsoni</i> (1);	

Localidade	Hospedeiros	Positivos/N (%)	Espécie	Referência
			<i>T. dionisii</i> (6); <i>T. lainsoni</i> (21); <i>T. lainsoni/ T. gennarii</i> (1); <i>T. rangeli</i> A (1)	
Paraíba	<i>Marmosa demerarae</i>	1/1 (100%)	<i>T. cascavelli</i> (1)	
Paraíba	<i>Marmosa murina</i>	1/1 (100%)	<i>T. cruzi</i>	
Espírito Santo	<i>Marmosops incanus</i>	1/2 (50%)	<i>T. cruzi</i>	
Espírito Santo	<i>Metachirus nudicaudatus</i>	1/3 (33,3%)	<i>T. dionisii</i> (1)	
Acre	<i>Metachirus</i> sp.	1/1 (100%)	<i>T. cruzi</i>	
Espírito Santo	<i>Micoureus paraguayanus</i>	1/1 (100%)	<i>T. lainsoni</i>	
Espírito Santo	<i>Monodelphis americana</i>	1/1 (100%)	<i>T. cruzi</i>	
Acre	<i>Philander</i> sp.	4/4 (100%)	<i>T. cruzi</i> (2); <i>T. rangeli</i> A (2)	
Bahia	<i>Didelphis</i> sp.	8/22 (36,36%)	<i>T. cruzi</i>	Trüeb et al., 2018
Mato Grosso do Sul	<i>Didelphis albiventris</i>	13/40 (32,5%)	<i>T. cruzi</i>	Nantes et al., 2019
Pantanal	<i>Thrichomys</i> sp.	7/46 (15,2%)	<i>T. evansi</i>	Herrera et al., 2004
	<i>Clyomys</i> sp.	2/11 (18,2%)	<i>T. evansi</i>	
	<i>Oecomys</i> sp.	3/7 (42,8%)	<i>T. evansi</i>	
	<i>Dasyprocta</i> sp.	2/3 (66,7%)	<i>T. evansi</i>	
	<i>Monodelphis</i> sp.	1/2 (50%)	<i>T. evansi</i>	
México	<i>Didelphis marsupialis</i>	6/36 (16,7%)	<i>T. cruzi</i>	Galaviz-Silva et al., 2017
	<i>Neotoma micropus</i>	5/35 (14,3%)	<i>T. cruzi</i>	
Argentina	<i>Didelphis albiventris</i>	4/11 (36,4%)	<i>T. cruzi</i>	Alvarado-Otegui et al., 2012
Chile	<i>Octodon degus</i>	40/57 (75%)	<i>T. cruzi</i>	Rojo et al., 2017

Localidade	Hospedeiros	Positivos/N (%)	Espécie	Referência
México	<i>Ototylomys phylloti</i>	4/11 (36%)	<i>T. cruzi</i>	Hernández-Cortazar et al., 2018
Louisiana (EUA)	<i>Peromyscus gossypinus</i>	40/59 (67,8%)	<i>T. cruzi</i>	Herrera et al., 2015
	<i>Mus musculus</i>	4/59 (6,8%)	<i>T. cruzi</i>	
	<i>Neotoma floridana</i>	15/59 (25,4%)	<i>T. cruzi</i>	

Legenda: N: Total de indivíduos coletados

3.3 A Doença de Chagas

3.3.1 Agente etiológico e vetor

Trypanosoma cruzi caracteriza-se por ser um parasita intracelular obrigatório que apresenta em seu ciclo de vida três estágios evolutivos: tripomastigota metacíclico, amastigota e epimastigota (DIAS; COURA, 1997; SOUZA et al., 2010). É considerado um parasito versátil, podendo circular nos ambientes doméstico, peridoméstico e silvestre (GARCIA et al., 2007). Tem como reservatórios o homem, todos os mamíferos domésticos, como cães e gatos, e os mamíferos silvestres arbóreos e terrestres (DIAS, 1992; COURA; DIAS, 2009; BERN et al., 2011).

Esse agente é caracterizado pela grande diversidade biológica, genética e fenotípica intraespecífica (ROCHA et al., 2013; BRENIÈRE et al., 2016), bem como diferentes distribuições geográficas com associações eco-epidemiológicas distintas (ZINGALES et al., 2012). Isso se dá porque, ao longo do tempo, diferentes espécies de mamíferos foram introduzidas no ciclo de transmissão do *T. cruzi*, exercendo diferentes pressões seletivas no parasita, tendo como consequência o surgimento das diversas subpopulações encontradas atualmente (JANSEN et al., 2017).

Desde a sua descoberta (CHAGAS, 1909), diversos autores propuseram variadas subdivisões intraespecíficas em nível biológico e genético, visando estabelecer o número de subgrupos do parasito a partir da caracterização de sua estrutura populacional (ZINGALES et al., 2009). Com o avanço dos estudos e o desenvolvimento de diferentes técnicas laboratoriais com maior poder de discriminação, diferentes subgrupos de *T. cruzi* foram descobertos,

surgindo diferentes classificações (ZINGALES, 2011). No ano de 2009, optou-se por padronizar sua nomenclatura no intuito de facilitar a comunicação entre os pesquisadores e correlacionar questões inerentes à biologia básica, às características eco-epidemiológicas e à patogenicidade dos subgrupos (ZINGALES, 2011). Sendo assim, atualmente as cepas do parasita são classificadas em seis importantes genótipos ou seis DTU's denominadas TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI (ZINGALES et al., 2009), além do genótipo TcBat/TcVII, descrito pela primeira vez em morcegos (MARCILI et al., 2009; SPICKLER, 2017). Cada genótipo ou DTU é constituído por cepas geneticamente semelhantes que podem ser caracterizadas pelos mesmos marcadores moleculares ou imunológicos (TIBAYRENC, 1998; ZINGALES et al., 2012).

Todos os genótipos (DTU's) de *T. cruzi* são encontrados no Brasil e estão aptos a provocarem a doença de Chagas (ZINGALES et al., 2011; ZINGALES et al., 2012; JANSEN et al., 2018). O TcI é considerado o mais abundante e amplamente disperso nas Américas, estando frequentemente associado ao ciclo de transmissão silvestre, sendo também encontrado no ciclo de transmissão doméstico da enfermidade (LIMA et al., 2008; ZINGALES et al., 2011; ZINGALES et al., 2012; TESTON et al., 2016). Frequentemente o marsupial arbóreo da espécie *Didelphis marsupialis* e triatomíneos do gênero *Rhodnius*, que se alojam em ecótopos de palmeiras, são encontrados parasitados pela cepa TcI (MILES et al., 2009; ACOSTA et al., 2017). Por isso, Miles et al. (2009) afirmam que este genótipo está predominantemente relacionado aos ciclos de transmissão arbórea, entretanto, esse genótipo também foi encontrado em ecótopos rochosos presentes no Piauí (HERRERA et al., 2005).

O genótipo TcII é isolado principalmente em ciclos domésticos, porém tem sido encontrado de maneira crescente infectando mamíferos silvestres em diferentes biomas na América do Sul (ZINGALES et al., 2012). O marsupial sinantrópico e arborícola facultativo da espécie *D. marsupialis* é considerado hospedeiro natural dos genótipos TcI e TcII (MILES et al., 2009; ARAÚJO et al., 2011; ZINGALES et al., 2012). As diferenças na patogenicidade entre TcI e TcII ainda não foram totalmente estabelecidas (YEO et al., 2005), mas sugere-se que TcII seja mais patogênico que TcI (DI NOIA et al., 2002).

Por sua vez, os genótipos TcIII e TcIV possuem um padrão similar de distribuição na América do Sul, estando o TcIII associado principalmente ao ciclo silvestre no Brasil (ZINGALES et al., 2012), entretanto, esse genótipo já foi encontrado infectando tatus, didelfídeos terrestres, roedores e cães domésticos (MARCILI et al., 2009a). O TcIV é

encontrado em ambos os ciclos, doméstico e silvestre, havendo evidências que sugerem que este genótipo tem um ecótopo arbóreo (ZINGALES et al., 2012).

Segundo Zingales et al. (2011), os genótipos TcII e TcIV possuem maior patogenicidade, acarretando sintomatologia cardíaca e digestiva. As DTU's TcV e TcVI são consideradas híbridas por serem derivadas de trocas genéticas entre TcII e TcIII, estando atualmente associadas ao ciclo de transmissão doméstico (ZINGALES et al., 2012; BRENIÈRE et al., 2016). Por fim, é importante ressaltar que, apesar de as DTUs serem classificadas de acordo com suas características genéticas e biológicas (ZINGALES et al., 2009), elas podem coexistir em um único hospedeiro e em um mesmo vetor (DEVILLERS et al., 2008; JANSEN et al., 2018).

Análises filogenéticas classificam o genótipo Tcbat como um cluster distinto dos outros genótipos, apresentando afinidade com o TcI (MARCILI et al., 2009). Diferentemente das demais DTU's, o genótipo Tcbat possui vetor desconhecido, não se desenvolvendo nos triatomíneos comumente encontrados, como o *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (ZINGALES et al., 2012). Cavazzana et al. (2010) sugerem que os possíveis vetores desse genótipo sejam espécies de triatomíneos encontradas em refúgios de morcegos.

Os vetores responsáveis pela transmissão do *T. cruzi* são insetos hematófagos pertencentes à família Reduviidae, conhecidos como triatomíneos (LENT; WYGODZINSKY, 1979), os quais possuem hábitos noturnos e se infectam pelo *T. cruzi* durante o repasto sanguíneo nos mamíferos infectados (DIAS; COURA, 1997). A adaptação dos triatomíneos silvestres ao ambiente doméstico ocorreu devido ao desmatamento e consequente extinção de mamíferos em remanescentes florestais (CANALE et al., 2012), o que ocasionou a escassez de sua fonte original de alimento, levando-os a buscarem fontes alternativas, perpetuando a transmissão da infecção para o homem e animais domésticos (RIBEIRO JR et al., 2015). As principais espécies de triatomíneos domiciliadas na América do Sul são: *T. infestans*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *T. pseudomaculata*, *P. megistus*, e *R. prolixus* (DIAS, 1992; COURA; DIAS, 2009).

3.3.2. Ciclo biológico e transmissão

O ciclo biológico do *T. cruzi* envolve vários estágios de desenvolvimento, que são encontrados no hospedeiro vertebrado e invertebrado (SOUZA et al., 2010). Os insetos da família Reduviidae (hospedeiros invertebrados) sugam o sangue do hospedeiro vertebrado infectado com as formas tripomastigotas presentes na corrente sanguínea (DIAS; COURA, 1997). Em poucos dias, as tripomastigotas ingeridas passarão por sucessivas transformações ao longo do tubo digestivo do inseto, chegando ao estágio de epimastigotas, as quais colonizam preferencialmente o intestino médio (COURA et al., 2012). As epimastigotas não infecciosas se aderem à membrana do epitélio intestinal desencadeando, na porção final do tubo digestivo, sua transformação em tripomastigotas metacíclicas, altamente infecciosas (ALVES et al., 2007; SOUZA et al., 2010). Esta transformação é denominada metaciclogênese e as tripomastigotas metacíclicas resultantes são encontradas principalmente no reto do vetor (COURA et al., 2012). Por fim, as tripomastigotas metacíclicas são eliminadas junto com as fezes e urina do inseto durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado.

Os seres humanos se infectam através da inoculação do agente diretamente no orifício da picada (BERN et al., 2011), bem como através de transfusão sanguínea, transplante de órgãos, infecção laboratorial, congênita, sexual e por via oral, através da ingestão acidental do inseto infectado ou de suas fezes (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; BERN et al., 2011; SESAB, 2019), sendo esta última a principal forma de transmissão da doença no Brasil nos últimos anos (DIAS et al., 2011; MORENO, 2017).

Os gambás são marsupiais didelfídeos que possuem hábitos onívoros, favorecendo sua infecção por via oral através da predação de pequenos mamíferos ou insetos infectados (JANSEN et al., 2017). Da mesma forma, pequenos mamíferos silvestres com hábitos insetívoros se infectam principalmente por via oral, através da ingestão dos triatomíneos infectados (DIAS, 1992; BERNER et al., 2011), bem como pela ingestão de sementes contaminadas por fezes do barbeiro ou pelo material da glândula anal de marsupiais didelfídeos infectados, uma vez que essas glândulas mantêm o ciclo extracelular do *T. cruzi*, liberando as formas infectantes do agente (DEANE et al., 1984). Outra possível forma de transmissão do agente para os animais silvestres é a que ocorre durante a alimentação dos vetores, os quais defecam após o repasto sanguíneo e, assim como ocorre em humanos, essas fezes contendo os parasitas podem adentrar o organismo do hospedeiro através de uma ferida ou membrana mucosa (BERNER et al., 2011). A transmissão transplacentária foi documentada em

camundongos e ratos de laboratório, sendo demonstrado que o percentual de transmissão pode variar de acordo com o genótipo de *T. cruzi* e com o grau de parasitemia (HALL et al., 2010).

Ao adentrarem o organismo do hospedeiro vertebrado, as tripomastigotas metacíclicas penetram nas células do sistema fagocitário mononuclear, fibras musculares esqueléticas, cardíacas e lisas (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010), sistema nervoso central e periférico, transformando-se em amastigotas (COURA et al., 2012). As formas amastigotas iniciam o processo de multiplicação intracelular através da divisão binária (BRENER, 1997) e, ao preencherem a célula parasitada, reassumem a forma flagelada, transformando-se em tripomastigotas, as quais rompem a célula, atingem a corrente sanguínea, disseminando-se para novos tecidos e órgãos, penetrando novas células e repetindo o ciclo (BRENER, 1997; ARGOLLO et al., 2008; COURA et al., 2012).

3.3.3. Epidemiologia

A doença de Chagas é uma enfermidade tropical de elevada prevalência e morbimortalidade em países endêmicos, principalmente nos países da América Latina (DIAS et al., 2016; SESAB, 2018a). Com o aumento da globalização e da mobilidade das populações entre as áreas rurais e urbanas dentro de seus países, bem como para diferentes regiões no mundo, a doença passou ser uma preocupação de saúde pública mundial, sendo encontrada atualmente se estendendo do sul do Estados Unidos até o Sul da Argentina e Chile, no Canadá, em muitos países europeus e em alguns países do Pacífico Ocidental (COURA; DIAS, 2009; MONTGOMERY et al., 2014; WHO, 2018).

Atualmente, estima-se que cerca de 15 a 16 milhões de pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi* na América Latina e 75 a 90 milhões estejam expostas a infecções (COURA; DIAS, 2009). De acordo com a Suvisa (2020a), entre os anos de 2007 e 2019, foram registrados 4 e 2 casos de doença de Chagas aguda nos municípios de Itambé e Itapetinga, respectivamente, localizados no estado da Bahia, Brasil.

Além de poderem atuar como biomarcadores da degradação ambiental, os didelphídeos do gênero *Didelphis*, conhecidos como gambás, são um dos mais antigos reservatórios conhecidos de *T. cruzi* e desempenham um relevante papel na epidemiologia da infecção chagásica, uma vez que esses animais circulam entre os ambientes silvestres, peridomésticos e domésticos, à procura por alimento (COURA; BORGES PEREIRA, 2010; JANSEN et al.,

2017). Isso acontece devido à destruição do ecossistema, o que provoca restrições alimentares às populações de mamíferos selvagens e, conseqüentemente, aumenta gradativamente o contato com os seres humanos (XAVIER et al., 2012).

É importante salientar que os gambás, além de terem o parasita circulante, podem abrigá-lo e eliminá-lo, em todas as suas formas, através de suas glândulas de cheiro, atuando não só como reservatórios, mas também como transmissores de *T. cruzi* (DEANE et al., 1984; JANSEN et al., 1999; COURA; BORGES PEREIRA, 2010). Adicionalmente, Jansen et al. (2018) descrevem que os marsupiais do gênero *Didelphis* são capazes de abrigar diversas espécies de tripanossomas e unidades taxonômicas (DTU'S), sendo considerados bioacumuladores de espécies de *Trypanosoma*. No ambiente silvestre, marsupiais do gênero *Didelphis* spp. possuem como característica a ocupação de todos os estratos ecológicos, sendo encontrados na copa das árvores e também no solo, o que possibilita que esses animais sejam um elo entre os ciclos de transmissão de *T. cruzi* que ocorrem nos diferentes estratos ecológicos (JANSEN et al., 1999; JANSEN et al., 2017).

Um estudo realizado por Xavier et al. (2012), utilizando análises geoespaciais, indicou que a redução da fauna de mamíferos (riqueza e abundância) tem sido associada à maior parasitemia por *T. cruzi* em pequenos mamíferos silvestres bem como à maior exposição de cães ao agente. O aumento na transmissibilidade do parasito também pode estar associado à seleção positiva de *Didelphis* e de alguns roedores caviomorfos, que são espécies generalistas que se adaptam com facilidade a diferentes tipos de ambientes, amplificando o ciclo de transmissão do parasito (XAVIER et al., 2012). O parasito encontra-se descrito em diversos animais silvestres (JANSEN et al., 2018), entretando, até o momento, somente um estudo a respeito desse parasita nesses animais foi desenvolvido no estado da Bahia (TRÜEB et al., 2018).

3.3.4 Diagnóstico

A detecção da infecção por *Trypanosoma* em mamíferos silvestres é frequentemente realizada por meio de hemocultura e exame do esfregaço de sangue fresco (ARAÚJO et al., 2011; VIETTRI et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019). Entretanto, outros métodos também auxiliam no diagnóstico da doença de Chagas como, por exemplo, a investigação

epidemiológica (LUQUETTI; RASSI, 2000), exames laboratoriais, parasitológicos, moleculares e/ou sorológicos (COURA et al., 2012).

A técnica de PCR é considerada sensível e específica, permite a identificação de espécies conhecidas e desconhecidas, sendo muito útil no diagnóstico ou confirmação de infecções na fase crônica, bem como em estágios iniciais, principalmente nos casos em que os testes sorológicos fornecerem resultados inconclusivos (BRITO; MOREIRA, 2017; HUTCHINSON; STEVENS, 2018). Além de ser uma técnica molecular, também é considerada como um exame parasitológico direto enriquecido, uma vez que detecta fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA), que são partes constitutivas dos parasitos (JANSEN; ROQUE, 2010). A PCR pode ser realizada a partir de DNA extraído de uma ampla variedade de tecidos e fluidos corporais, como sangue, linfonodos, ossos, medula óssea, baço, dentre outros (MIRÓ et al., 2008).

A técnica de PCR convencional permite identificar a presença ou ausência do parasito, bem como identificá-lo quanto ao gênero ou espécie fornecendo, portanto, um diagnóstico qualitativo (COURA et al., 2012). Em contrapartida, a técnica de PCR em tempo real quantitativa (qPCR) possibilita, além da identificação do parasito, a mensuração da carga parasitária em tempo real, sendo esta informação muito importante para correlacionar com a progressão da doença, avaliar o prognóstico e a eficácia terapêutica (BRITO; MOREIRA, 2017).

Ao longo do tempo, diferentes alvos moleculares foram utilizados nas reações de PCR a fim de classificar as populações de *T. cruzi*. As primeiras metodologias utilizadas para reconhecer a diversidade genética do parasito foram: MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*) (MILES et al., 1978; TIBAYRENC et al., 1986), RADP (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (STEINDEL et al., 1993), análises de restrição do DNA (MOREL et al., 1980), RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) (STURM et al., 1989), gel de eletroforese em campo pulsado (HENRIKSSON et al., 1990) e DNA *fingerprint* (MACEDO et al., 1992).

Atualmente, dentre as técnicas utilizadas para realizar a identificação dos genótipos de *T. cruzi*, ressaltam-se os métodos baseados na caracterização dos genes do ribossomo, 24S α -rRNA e 18S rRNA (FERREIRA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019). O 18S rRNA é um RNA estrutural da subunidade menor ribossômica (SSU), sendo considerado um gene ideal para reconstruir relações filogenéticas, por ser altamente conservado e possuir regiões flanqueadas conservadas (AKHOUNDI et al., 2017).

3.4. As leishmanioses

3.4.1. Aspectos gerais

As leishmanioses são doenças debilitantes causadas por protozoários digenéticos intracelulares obrigatórios (REY, 2001; CHAPPUIS et al., 2007). Esses parasitos pertencem ao gênero *Leishmania*, subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (GOTO; LINDOSO, 2010), família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastida, na qual estão inseridos organismos que possuem uma organela denominada cinetoplasto, que se localiza no interior da mitocôndria e contém inúmeras cópias de DNA (kDNA) (RODGERS et al., 1990).

A principal forma de transmissão da infecção para o homem e demais mamíferos se dá pela picada de fêmeas de dípteros hematófagos, conhecidos como flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) (REITHINGER; DAVIES, 1999; REY, 2001). No continente americano, a doença se apresenta basicamente de duas formas clínicas: leishmaniose visceral (LV) ou calazar e leishmaniose tegumentar (LT), que são distintas nas manifestações clínicas, agentes etiológicos, epidemiologia, vetores e reservatórios (GRIMALDI; TESH, 1993; DESJEUX, 2004).

A LV é uma doença sistêmica que acomete frequentemente a medula óssea, fígado e baço, sendo considerada como uma enfermidade de evolução crônica e fatal quando não tratada (DESJEUX, 2004; MEDKOUR et al., 2019). Constitui um grave problema de saúde pública e também na medicina veterinária, uma vez que o cão doméstico é o principal reservatório em locais onde a doença apresenta caráter zoonótico. (QUINNELL; COURTENAY, 2009; MEDKOUR et al., 2019). Mais de 90% dos casos de LV ocorrem em três focos geográficos: 1) Bangladesh, Índia e Nepal; 2) Etiópia, Quênia e Sudão; 3) nordeste do Brasil (ALVAR et al., 2012).

A LT é causada por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* que provocam lesões na pele e mucosas, sendo considerada uma doença incapacitante (DESJEUX, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A enfermidade é endêmica em mais de 98 países localizados nos trópicos, subtropicais e bacia do Mediterrâneo (AKHOUNDI et al., 2017) e tem como reservatórios mamíferos silvestres, como os roedores, marsupiais, edentados e primatas (GRIMALDI; TESH, 1993).

3.4.2 Agentes etiológicos e vetores

Na América Latina, as espécies que causam a LT pertencem aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* e incluem as espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis* (GOTO; LINDOSO, 2010). As espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* já foram identificadas em estados das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil (CÁSSIA- PIRES et al., 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

No Brasil, a LT é provocada principalmente pela *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* (GONTIJO; CARVALHO, 2003; VALE; FURTADO, 2005), sendo a *L. (V.) braziliensis* a espécie mais prevalente no território brasileiro e na América Latina, estando geralmente associada à presença de animais domésticos (GONTIJO; CARVALHO, 2003; ALVAR et al., 2012). A *L. (L.) amazonensis* tem como reservatórios roedores e marsupiais e encontra-se distribuída na floresta da Amazônia legal nos estados do Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Paraná (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019c). Por fim, a *Leishmania (V.) guyanensis* tem como reservatórios desdentados e marsupiais, sendo encontrada em florestas da Amazônia legal localizada nos estados do Amazonas, Acre, Amapá, Roraima e Pará (GONTIJO; CARVALHO, 2003; ROQUE; JANSEN, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017)

Quanto à LV, no mundo há duas espécies de *Leishmania* que atuam como agentes etiológicos: *L. infantum* e *L. donovani*. A *L. donovani* é encontrada somente em países do Velho Mundo, como a África e a Ásia, e sua transmissão é antroponótica (READY, 2014). Nas Américas, a LV é uma zoonose causada pela espécie *L. (L.) infantum chagasi*, que se encontra distribuída na América do Sul em países como a Venezuela, grande parte do Brasil, Paraguai, norte da Argentina, oeste da Bolívia, leste do Peru e demais focos menores ao norte desses países (MILLÁN et al., 2016).

A leishmaniose possui como vetores os flebotomíneos, que são insetos dípteros hematófagos pertencentes à Ordem Díptera, Família Psychodidae e Subfamília Phlebotominae (DESJEUX, 2004). No Brasil, as principais espécies responsáveis pela transmissão de LT são a *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. Wellcomei* e *Lu. migonei* (BASANO; CAMARGO, 2004; RANGEL; LAINSON, 2009). *Lutzomyia longipalpis* é considerada o principal vetor da LV no Brasil (FERREIRA et al., 2009), embora as espécies

Lu. cruzi e *Lu. migonei* também estejam envolvidas na transmissão de *L. infantum* (CARVALHO et al., 2010; BENASSI et al., 2018; MARIALVA, 2019). Outras espécies de flebotomíneos também já foram encontradas naturalmente infectadas por *L. infantum*, como *Lu. neivai*, *Lu. sallesi*, *Lu. forattinii* e *Lu. Almerioi*, entretanto, ainda não foi comprovado o seu papel como vetores (PITA-PEREIRA et al., 2008; SARAIVA et al., 2009; SAVANI et al., 2009).

Um estudo realizado em todo o estado da Bahia-BR identificou 31 espécies de flebotomíneos, sendo quatro de importância médica, como *Lu. intermedia*, *Lu. longipalpis*, *Lu. migonei* e *Lu. whitmani* (RODGERS et al., 2019). Segundo os resultados desse estudo, a espécie *Lu. longipalpis* encontra-se distribuída em quase todas as regiões do estado da Bahia, tendo sido a espécie mais prevalente (42,78%) entre os anos de 2009 à 2012 (RODGERS et al., 2019). Adicionalmente, relata-se a captura de flebotomíneos das espécies *Lu. intermedia*, *Lu. migonei* e *Lu. whitmani* no peridomicílio e extradomicílio no município de Ilhéus-BA (AZEVEDO et al., 1996; CARVALHO et al., 2010), de *Lu. longipalpis* no município de Jequié-BA (AFONSO et al., 2012), *Lu. longipalpis* e *Lu. whitmani* em Lençóis-BA (DOURADO et al., 1989), *Lu. whitmani* e *L. ayrozai* em Três Braços-BA (VEXENAT et al., 1986), *Lu. longipalpis* em Itapetinga-BA (LIMA, 2010), *Lu. whitmani* e *Lu. intermedia* no município de Ituberá-BA (COVA et al., 2015), dentre outros. Foi encontrado somente um estudo com flebotomíneos no município de Itapetinga, não havendo, até o momento, estudos no município de Itambé, BA.

3.4.3 Ciclo biológico e transmissão

O ciclo biológico de *Leishmania* spp. envolve dois estágios de desenvolvimento, sendo a forma flagelada promastigota encontrada no intestino do inseto vetor e a forma amastigota encontrada no interior das células dos hospedeiros mamíferos (CHAPPUIS et al., 2007).

O ciclo se inicia quando as fêmeas dos flebotomíneos realizam o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado, ingerindo os macrófagos parasitados com amastigotas presentes na pele, bem como as próprias formas amastigotas presentes no sangue do hospedeiro (BATES, 2007). No intestino do vetor, as amastigotas iniciam o estágio pró-cíclico, no qual se diferenciam em promastigotas flageladas, fracamente móveis e começam sua replicação (RODGERS et al., 2002; BATES, 2007). Após alguns dias, as promastigotas adquirem forma migratória, reduzindo a replicação, tornando-se alongadas, fortemente móveis e migrando para a parte anterior do intestino do vetor (BATES, 2007). Em seguida, algumas dessas

promastigotas passam por uma etapa denominada metaciclogênese, diferenciando-se em promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes do parasito (ROGERS et al., 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). As promastigotas metacíclicas migram então para a faringe e cavidade bucal do vetor que, ao realizar um novo repasto sanguíneo em outro mamífero, inocula as promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro, transmitindo a infecção (BATES, 2007; CHAPPUIS et al., 2007).

Estudos demonstram que pode haver transmissão de *L. infantum* independente do flebotômíneo, como a transmissão vertical (congênita) (QUINNELL; COURTENAY, 2009; BOGGIATTO et al., 2011; DAVAL et al., 2016), por meio de transfusão de sangue (OTERO et al., 2000; QUINNELL; COURTENAY, 2009) e através de artrópodes, como carrapatos e pulgas, que apesar de não estar comprovada, é sugerida por alguns estudos (FERREIRA et al., 2009; DANTAS-TORRES, 2011; MILLÁN et al., 2016). Adicionalmente, cita-se em cães a ocorrência de transmissão através de mordida, contato sexual e contato com agulhas contaminadas (QUINNELL; COURTENAY, 2009; SILVA et al.; 2009; BOGGIATTO et al., 2011).

No Brasil, a LT apresenta três padrões epidemiológicos de transmissão: silvestre, ocupacional/lazer e rural/peri-urbano. No ciclo silvestre, a LT é considerada uma zoonose especialmente de animais silvestres, acometendo o ser humano que adentra o ambiente silvestre. No ciclo ocupacional/lazer, a transmissão está vinculada à exploração desordenada de florestas e ecoturismo. No ciclo rural e periurbano, a transmissão está associada à ocupação desordenada de centros urbanos devido ao processo migratório (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A transmissão da infecção por *Leishmania* spp. é considerada um sistema complexo devido à diversidade de espécies envolvidas, diferentes hospedeiros mamíferos e ambientes distintos em que a ela ocorre (CÁSSIA-PIRES et al., 2014; ROQUE; JANSEN, 2014).

3.4.4 Reservatórios

Animais considerados reservatórios são aqueles que garantem a sobrevivência e circulação do parasita de maneira ilimitada (ASHFORD, 2000). Para tanto, algumas características inerentes ao reservatório são importantes na manutenção do parasita no ambiente, como abundância populacional, longevidade, estado imunológico após a cura, ter a pele como órgão parasitado a fim de favorecer a infecção do vetor e duração da infecção (ASHFORD, 1997, 2000).

As espécies de *Leishmania* que causam a LT acometem diversas espécies de pequenos mamíferos, tendo como principal reservatório os roedores silvestres (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; ROQUE; JANSEN, 2014; AKHOUNDI et al., 2017). Os animais domésticos (canídeos, felídeos e equídeos) desempenham um papel ainda pouco esclarecido na epidemiologia dessa doença, sendo considerados hospedeiros acidentais (AKHOUNDI et al., 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Alguns estudos relataram inúmeros casos de cavalos naturalmente infectados e positivos para *L. braziliensis*, sugerindo que esses animais podem estar envolvidos no aumento da transmissão de leishmaniose tegumentar, sendo fontes de infecção de flebotomíneos no ambiente peridomiciliar, entretanto, seu papel como reservatório ainda não está definido (SOARES et al., 2013; GAMA et al., 2014; TRUPPEL et al., 2014).

Os roedores são abundantes e compreendem mais de duzentas espécies distribuídas em habitats distintos (CÁSSIA-PIRES et al., 2014), sendo encontradas na natureza espécies semi-aquáticas, terrestres e semi-fossoriais, o que possibilita maior interação com os vetores de doenças (BONVICINO et al., 2008). Por essas razões, diversas espécies de roedores foram apontadas como potenciais reservatórios de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, por demonstrarem competência para manter esses parasitas (ROQUE; JANSEN, 2014).

Os gambás (*Didelphis* sp.) apresentam dieta onívora e são capazes de viver tanto em florestas quanto em habitações humanas, proporcionando um elo entre os ambientes silvestre e peridoméstico, sendo capazes de infectarem e serem infectados tanto pelas populações de flebotomíneos que transmitem a LV como por aquelas que transmitem a LT (CABRERA et al., 2003). Esta característica tem sido apontada como principal motivo para explicar a exposição desses animais aos diferentes ciclos de transmissão das várias espécies de *Leishmania* na natureza, contribuindo com a disseminação dos parasitas (CÁSSIA-PIRES et al., 2014).

Os cães domésticos são considerados os principais hospedeiros reservatórios de *L. infantum*, uma vez que esses animais representam uma ligação entre os ciclos silvestre e doméstico da doença (PETERSEN; BARR, 2009; MEDKOUR et al., 2019), apresentam elevada prevalência de infecção e infecciosidade, possuem infecções duradouras, além de serem frequentemente encontrados no ambiente peridomiciliar, local de estreita relação com os seres humanos, onde se concentra a transmissão do agente (QUINNELL; COURTENAY, 2009; MAIA, CAMPINO, 2011). Embora os cães sejam considerados os principais reservatórios de *L. infantum*, o papel de marsupiais da espécie *Didelphis* spp. como reservatórios é sugerido por diversos autores, destacando-se que a sinantropia desses animais auxilia no estabelecimento de

conexão entre os ambientes silvestres e peridomésticos (QUINTAL et al., 2011; CARREIRA et al., 2012; HUMBERG et al., 2012).

Estudos recentes evidenciam a ocorrência de infecção natural de morcegos por *L. infantum* (MEDKOUR et al., 2019) e *Leishmania* spp. em diversas regiões do Brasil e do mundo, apontando estes animais como potenciais reservatórios *L. infantum* (GÓMEZ-HERNANDEZ et al., 2017; REZENDE et al., 2017). Adicionalmente, outros estudos demonstram a presença de gatos domésticos e equinos naturalmente infectados por *L. infantum*, sugerindo a possibilidade de que outros animais domésticos, além do cão, possam também atuar como reservatórios do parasita (MAIA; CAMPINO, 2013; METZDORF et al., 2017; BENASSI et al., 2018).

3.4.5 Epidemiologia

As leishmanioses são consideradas problemas de saúde pública em mais de 98 países localizados em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia) (AKHOUNDI et al., 2017), com, aproximadamente, 350 milhões de pessoas em risco e 12 milhões de casos registrados, com incidência anual mundial de 0,7 a 1,2 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 0,2 a 0,4 milhões de casos de LV (ALVAR et al., 2012). A partir de dados globais coletados entre 2007 e 2011, foi estimado que a maioria dos casos de LT (>70%) ocorreu em dez países, sendo eles: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, República Islâmica do Irã, Peru, Sudão e República Árabe da Síria. Nesse mesmo período, a maioria (90%) dos casos de LV ocorreram em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (CHAPPUIS et al., 2007; ALVAR et al., 2012; WHO, 2016).

No Brasil, o maior número de casos da LT concentra-se nas regiões norte e centro-oeste, seguidas das regiões sudeste e nordeste (VASCONCELOS et al., 2018), com distribuição em vários municípios de todos os estados brasileiros, com cerca de 21.000 novos casos anuais registrados e coeficiente de incidência de 8,6 casos por 100.000 habitantes nos últimos cinco anos (BRASIL, 2019).

O estado da Bahia possui focos de LT em, aproximadamente, 86% de seu território, com média de 2.362 casos novos notificados entre os anos de 2014 e 2015 e, segundo a classificação por coeficiente de detecção de 2016, possui 137 municípios (32,8%) com risco de transmissão da doença, dentre eles, o município de Itapetinga (SESAB, 2016). Entre os anos de 2007 e 2019,

foram confirmados 78 casos autóctones de LT no município de Itambé, com 21 casos nos três últimos anos, sendo considerado um município endêmico para a doença (SUvisa, 2020). Apesar de apresentar um menor número de casos da enfermidade, o município de Itapetinga também é endêmico, com 24 casos no período 2007 e 2019 e 6 casos nos últimos três anos (SUvisa, 2020).

A transmissão no ambiente domiciliar vem aumentando e isso pode ser demonstrado pela ocorrência de infecção em indivíduos de ambos os sexos, de diferentes faixas etárias, bem como pela infecção de animais domésticos em ambientes peridomésticos, onde são encontrados os flebotômíneos (PITTINER et al., 2009). A presença de pequenos mamíferos silvestres no peridomicílio também tem sido descrita e, uma vez infectados, esses animais são fontes de infecção para os flebotômíneos, que posteriormente transmitem a infecção para os seres humanos e outros animais (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; CARREIRA et al., 2017).

Segundo o Ministério da Saúde (2016), em 2012, a região Nordeste foi responsável por 43,1% dos casos de LV do país e, de acordo com a Sesab (2018b), a doença está em constante expansão no estado da Bahia, estando presente em, aproximadamente, 43% dos municípios. Ressalta-se que o município de Itapetinga e Itambé não são endêmicos para LV, porém, no ano de 2018 foi registrado um caso autóctone de LV no município de Itapetinga (SUvisa, 2020).

Pesquisas demonstram aumento na detecção da infecção por *L. infantum* e *L. braziliensis* em mamíferos silvestres e demonstraram a presença do DNA desses parasitos nos tecidos desses animais (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; QUARESMA et al., 2011; ROQUE; JANSEN, 2014; FERREIRA et al., 2015; ALTEN et al., 2016; CARREIRA et al., 2017). Esses achados reforçam a hipótese de que eles possam estar envolvidos na manutenção dos parasitos no ambiente natural, atuando como fonte de infecção para os vetores (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; QUARESMA et al., 2011; FERREIRA et al., 2015).

Segundo Quinnell e Courtenay (2009), os ciclos de transmissão silvestre e peridomiciliar, bem como seus hospedeiros silvestres e domésticos estão relacionados, atuando de maneira conjunta e intensificando a transmissão do agente para os seres humanos. Adicionalmente, Caldart et al. (2017) destacam que ações humanas relacionadas à produção de grandes quantidades de resíduos, juntamente com a escassez de locais disponíveis para o descarte desses materiais e a intensificação dos processos de urbanização e desmatamento, fornecem ambientes favoráveis à transmissão de *Leishmania* spp. uma vez que aumentam a

densidade de vetores e reservatórios. A tabela 2 destaca a prevalência de *Leishmania* spp. em roedores e marsupiais silvestres no Brasil e no Mundo, diagnosticados a partir da PCR.

Quadro 2. Prevalência de *Leishmania* spp. em roedores e marsupiais silvestres por PCR.

Localidade	Hospedeiros	Positivos/N (%)	Espécie	Referências
Mato Grosso do Sul	<i>Thrichomys fosteri</i>	1/17 (5,8%)	<i>L. (V). naiffi</i>	Cássia-Pires et al., 2014
	<i>Dasyprocta azarae</i>	1/17 (5,8%)	<i>L. (L). infantum</i>	
	<i>Clyomys laticeps</i>	2/17 (11,7%)	<i>L. (L). infantum</i>	
Bahia	<i>T. inermis</i>	1/17 (5,8%)	<i>L. (V). shawi</i>	
Piauí	<i>T. laurentius</i>	1/17 (5,8%)	<i>L. (V). guyanensis</i>	
	<i>T. laurentius</i>	1/17 (5,8%)	<i>L. (L). infantum</i>	
Pernambuco	<i>Nectomys squamipes</i>	28/86 (39,4%)	<i>Leishmania (V.)</i>	Brandão-Filho et al., 2003
	<i>Bolomys lasiurus</i>	6/37 (16%)	<i>Leishmania (V.)</i>	
	<i>Akodon arviculoides</i>	2/38 (17,4%)	<i>Leishmania (V.)</i>	
	<i>D. albiventris</i>	4/29 (13,3)	<i>Leishmania (V.)</i>	
	<i>Holochilus scieurus</i>	2/10 (20%)	<i>Leishmania (V.)</i>	
	<i>Marmosa</i> sp.	1/9 (11,1%)	<i>Leishmania (V.)</i>	
Minas Gerais	<i>T. apereoides</i>	10/64 (15,6%)	<i>L. braziliensis</i>	Quaresma et al., 2011
	<i>T. apereoides</i>	2/64 (3,1%);	<i>L. guyanensis</i>	
	<i>T. apereoides</i>	1/64 (1,5%)	<i>L. infantum</i>	
	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	2/7 (28,5%)	<i>L. infantum</i>	
	<i>Rattus rattus</i>	1/1 (100,0%)	<i>L. infantum</i>	
	<i>D.albiventris</i>	4/19 (21,0%)	<i>L. braziliensis</i>	
	<i>Gracilinanus agilis</i>	3/4 (75,0%)	<i>L. braziliensis</i>	
	<i>Marmosops incanus</i>	1/2 (50,0%)	<i>L. guyanensis</i>	
Distrito Federal	<i>Necromys lasiurus</i>	1/90 (1,1%)	<i>L. braziliensis</i>	Cardoso et al., 2015
	<i>N. lasiurus</i>	1/90 (1,1%)	<i>L. amazonensis</i>	
	<i>N. lasiurus</i>	1/90 (1,1%)	<i>Leishmania spp.</i>	
	<i>Nectomys rattus</i>	1/10 (10%)	<i>Leishmania spp.</i>	
	<i>R. macrurus</i>	1/26 (3,8%)	<i>Leishmania spp.</i>	
	<i>R. macrurus</i>	2/26 (7,6%)	<i>L. braziliensis</i>	
	<i>G. agilis</i>	3/25 (12,0%)	<i>Leishmania spp.</i>	

Localidade	Hospedeiros	Positivos/N (%)	Espécie	Referências
Minas Gerais	<i>T. apereoides</i>	7/18 (38,88%)	<i>Leishmania</i> spp.	Oliveira et al., 2005
	<i>Oryzomys subflavus</i>	1/13 (7,92%)	<i>Leishmania</i> spp.	
Minas Gerais	<i>M. musculus</i>	20/24 (83,3%)	<i>L. braziliensis</i>	Ferreira et al., 2015
	<i>N. lasiurus</i>	3/5 (60,0%)	<i>L. braziliensis</i>	
	<i>Cerradomys subflavus</i>	4/5 (80,0%)	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. donovani</i>	
	<i>D. albiventris</i>	21/34 (61,8%)	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. donovani</i>	
Mato Grosso	<i>N. lasiurus</i>	2/4 (50%)	<i>L. braziliensis</i>	Freitas et al., 2012
São Paulo	<i>D. albiventris</i>	3/191 (1,6%)	<i>Leishmania</i> spp.	Quintal et al., 2011
	<i>Micoureus paraguayanus</i>	11/95 (11,6%)	<i>Leishmania</i> spp.	
Mato Grosso do Sul	<i>D. albiventris</i>	11/43 (25,5%)	<i>L. infantum</i>	Humberg et al., 2012
Pernambuco	<i>Holochilus sciureus</i>	3/19 (15,8%)	<i>Leishmania</i> (V.) spp.	Lima et al., 2013
	<i>H. sciureus</i>	2/19 (10,5 %)	<i>L. (L.) infantum</i>	
	<i>Nectomys squamipes</i>	15/59 (25,4%)	<i>Leishmania</i> . (V.) spp.	
	<i>N. squamipes</i>	4/57 (7,0%)	<i>L. (L.) infantum</i>	
	<i>C. subflavus</i>	1/1 (100%)	<i>Leishmania</i> . (V.) spp.	
	<i>D. albiventris</i>	6/16 (37,5%)	<i>Leishmania</i> . (V.) spp.	
	<i>D. albiventris</i>	1/16 (6,3%)	<i>L. (L.) infantum</i>	
	<i>Marmosa sp.</i>	1/4 (25,0%)	<i>Leishmania</i> . (V.) spp.	
Bahia	<i>Monodelphis domestica</i>	1/4 (25,0%)	<i>Leishmania</i> . (V.) spp.	Trüeb et al., 2018
	<i>Didelphis sp.</i>	10/22 (45,4%)	<i>Leishmania</i> spp.	
	<i>Micoureus sp.</i>	9/16 (56,2%)	<i>Leishmania</i> spp.	
	<i>R. rattus</i>	1/4 (25,5%)	<i>Leishmania</i> spp.	
	<i>Trynomis sp.</i>	1/3 (33,3%)	<i>Leishmania</i> spp.	
Marrocos	<i>M. musculus</i>	1/2 (50%)	<i>Leishmania</i> spp.	Echchakery et al., 2017
	<i>Rattus norvegicus</i>	1/9 (11,1%)	<i>L. infantum</i>	
	<i>M. musculus</i>	9/50 (18%)	<i>L. infantum</i>	

Localidade	Hospedeiros	Positivos/N (%)	Espécie	Referências
	<i>M. musculus</i>	2/50 (4%)	<i>L. tropica</i>	

Legenda: N: Total de indivíduos coletados

3.4.6 Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose deve ser realizado através de dados clínicos e epidemiológicos, juntamente com auxílio de técnicas laboratoriais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Por ser uma doença grave, de evolução rápida e de notificação compulsória, a LV deve ser diagnosticada precocemente e de maneira precisa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

O diagnóstico molecular das infecções por *Leishmania* é realizado através da PCR, que possibilita a detecção do DNA dos parasitos mesmo quando a carga parasitária é baixa, além de permitir a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção em amostras provenientes de seres humanos, animais e até mesmo de flebotomíneos (GONTIJO; CARVALHO, 2003; CÁSSIA-PIRES et al., 2014; GALUZZI et al., 2018).

A técnica de PCR pode ser realizada a partir de *primers* específicos para o DNA genômico ou DNA do cinetoplasto do parasito (kDNA), entretanto, a utilização de *primers* específicos para o kDNA aumenta o limite de detecção devido ao elevado número de cópias de DNA do parasito presente no cinetoplasto (GALUZZI et al., 2018).

As reações de PCR para o diagnóstico das infecções por *Leishmania* spp. apresentam elevada sensibilidade e especificidade, com valores variando entre 70 à 100% e 98 a 100%, respectivamente, a depender do método de extração de DNA utilizado, do acondicionamento das amostras, do tempo da infecção e do quadro clínico (QUINNELL et al., 2001; SHIRIAN et al., 2014; SOLCÀ et al., 2014; CERUTTI et al., 2017). De forma geral, a sensibilidade e a especificidade desse tipo de diagnóstico são maiores em animais polissintomáticos e relativamente menores nos oligossintomáticos e assintomáticos (QUINNELL et al., 2001; SHIRIAN et al., 2014; SOLCÀ et al., 2014; CERUTTI et al., 2017).

Existem diferentes técnicas moleculares que auxiliam na identificação das espécies de *Leishmania* em amostras biológicas, como a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), PCR seguida de sequenciamento de DNA, PCR em tempo real, *nested*-PCR dentre outras (CÁSSIA-PIRES et al., 2014; GALUZZI et al., 2018). A *nested* PCR envolve dois conjuntos de iniciadores, usados em duas reações sucessivas de PCR, onde o objetivo da

segunda corrida é amplificar a sequência alvo secundária dentro do produto da primeira corrida (SAVANI et al., 2009; SILVA et al., 2013). Essa reação aumenta a sensibilidade da técnica por diminuir potenciais inibidores e também aumenta a especificidade, por amplificar regiões de DNA provenientes do produto da primeira reação (SCHÖNIAN et al., 2003; SILVA et al., 2013).

A PCR em tempo real (qPCR) é uma técnica mais rápida, que permite a identificação do parasito e também a sua quantificação, além de apresentar contaminação cruzada mínima, podendo ser realizada utilizando corantes fluorescentes intercalantes (por exemplo, SYBR Green) ou sondas fluorescentes (por exemplo, TaqMan®) (GOTO; LINDOSO, 2010; MOREIRA et al., 2018; GALUZZI et al., 2018). Além das vantagens operacionais, a técnica de qPCR é mais sensível e reprodutível, podendo contribuir com o diagnóstico em áreas endêmicas e, até mesmo, substituir o uso da PCR convencional em rotinas de diagnóstico (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2010). A versatilidade da qPCR permite sua utilização em diferentes ensaios utilizados para a detecção e quantificação de *Leishmania* e também para a genotipagem e identificação de espécies (GALUZZI et al., 2018).

O diagnóstico das infecções por *Leishmania* através da PCR em animais silvestres e sinantrópicos ainda é desafiador, devido à carência de alvos moleculares específicos para as espécies de *Leishmania* e à falta de técnicas padronizadas (ROQUE; JANSEN, 2014). Apesar disso, diferentes estudos utilizaram a técnica de PCR para realização do diagnóstico de *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos silvestres no Brasil (OLIVEIRA et al., 2005; QUARESMA et al., 2011; QUINTAL et al., 2011; FREITAS et al., 2012; HUMBERG et al., 2012; LIMA et al., 2013; CÁSSIA-PIREZ et al., 2014; CARDOSO et al., 2015; TRÜEB et al., 2018). Embora o número de pesquisas com *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos tenha aumentado nas últimas décadas, ainda são escassos os estudos com esses animais na região Nordeste do Brasil, principalmente no estado da Bahia.

4 CAPÍTULO 1

**DETECÇÃO DE *Trypanosoma* spp. EM PEQUENOS MAMÍFEROS NÃO-
VOADORES (RODENTIA E DIDELPHIMORPHIA) CAPTURADOS NO ESTADO
DA BAHIA, NORDESTE DO BRASIL**

4.1 Introdução

O gênero *Trypanosoma* Gruby, 1843 (Kinetoplastea; Trypanosomatida; Trypanosomatidae) é composto por parasitas obrigatórios que infectam invertebrados e todas as classes de vertebrados (anfíbios, aves, répteis, peixes e mamíferos) (VIOLA et al., 2008; LEMOS et al., 2015; COOPER et al., 2017; SPODAREVA et al., 2018). É caracterizado por apresentar ampla distribuição geográfica e mais de 500 espécies descritas parasitando uma gama de hospedeiros (SPODAREVA et al., 2018; JANSEN et al., 2018). Apesar disso, o número de espécies de *Trypanosoma* spp. permanece subestimado, devido aos numerosos táxons não cultiváveis, métodos de diagnóstico parasitológico de baixa sensibilidade e ao alto custo do sequenciamento que, por sua vez, diminui a acessibilidade (RODRIGUES et al., 2019).

Pequenos mamíferos podem se infectar por diversas espécies de *Trypanosoma*, como: *T. lewisi*, *T. rangeli*, *T. lainsoni*, *T. evansi*, *T. cruzi*, dentre outras (HERRERA et al., 2005; MAIA DA SILVA et al., 2004; COURA; DIAS, 2009; NAIFF et al., 2013; CARDOSO et al., 2015; ORTIZ et al., 2018; JANSEN et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019). *Trypanosoma lewisi* é um protozoário que está associado a ambientes antropizados, sendo transmitido por fezes de pulgas de ratos infectados (HOARE, 1972; SALZER et al., 2016; ORTIZ et al., 2018) a diversas espécies de roedores e marsupiais (DOBIGNY et al., 2019). É considerado como potencialmente infeccioso para humanos, sendo considerada como uma zoonose emergente (LUN et al., 2015; ORTIZ et al., 2018).

Trypanosoma rangeli possui como hospedeiros diversos mamíferos domésticos e silvestres e tem como vetor os triatomíneos do gênero *Rhodnius* (MAIA DA SILVA et al., 2007; JANSEN et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019; BAYÃO et al., 2020). É um parasita infectante para humanos, entretanto, não é patogênico (HAMILTON et al., 2010; VALLEJO et al., 2015).

A infecção de animais domésticos e humanos por *T. lainsoni* ainda não foi comprovada (DÍAZ et al., 2020), em contrapartida, há diversos relatos da infecção de mamíferos arbóreos e terrestres por esse protozoário (NAIFF; BARRET, 2013; ORTIZ et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019). Os vetores e o ciclo de transmissão desse parasita ainda são desconhecidos (RODRIGUES et al., 2019), entretanto, a infecção por via oral não deve ser descartada pois é provavelmente o mecanismo de transmissão mais frequente de tripanossomas no ciclo selvagem (COURA, 2015).

Trypanosoma evansi é um protozoário que infecta diversos mamíferos domésticos e silvestres, incluindo aqueles ameaçados de extinção (AREGAWI et al., 2019). Apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrado na América Latina, África e Ásia (HERRERA et al., 2005). Diferente dos outros tripanosomas, *T. evansi* não se desenvolve em seu vetor e sua transmissão é realizada de forma mecânica por moscas hematófagas dos gêneros *Stomoxys* e *Tabanus* (AREGAWI et al., 2019).

Trypanosoma cruzi é uma das espécies mais estudadas, sendo responsável por provocar a doença de Chagas (Chagas, 1909), enfermidade que representa um grave problema de saúde pública e um desafio econômico em diversos países no mundo, principalmente na América do Sul (LOPES et al., 2018). De acordo com o Ministério da Saúde (2019), existem cerca de 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* no Brasil, sendo a doença de Chagas responsável por uma das quatro maiores causas de óbitos por doenças infecciosas e parasitárias no país.

De acordo com Zingales et al. (2009) e Zingales et al. (2012), o *T. cruzi* é um parasita heterogêneo do ponto de vista genético que possui sete genótipos reconhecidos atualmente (TcI a TcVI e Tcbat), também chamados de Unidades Discretas de Tipagem (DTU's). Adicionalmente, é considerado como um parasito flagelado e enzoótico de mamíferos silvestres, tendo como hospedeiros inúmeras espécies de mamíferos, sendo os marsupiais *Didelphis* spp da América do Sul uns de seus hospedeiros mais antigos (JANSEN et al., 2018; LOPES et al., 2018). Diversas espécies de triatomíneos da família Reduviidae atuam como vetores do parasita que, atualmente, encontra-se amplamente distribuído em todos os biomas da América, entre o sul dos Estados Unidos e Sul da Argentina, incluindo a Mata Atlântica (BRENIÈRE et al., 2016; JANSEN et al., 2018).

A Mata Atlântica é uma floresta mundialmente conhecida pela sua biodiversidade, entretanto, devido à intensa atividade antrópica de desmatamento, este bioma encontra-se representado, atualmente, por fragmentos de mata que correspondem a 11,6% de sua extensão original (RIBEIRO et al., 2011; SCARANO; CEOTTO, 2015). Dentre as consequências geradas pela fragmentação da Mata Atlântica, destacam-se as alterações climáticas, expansão e aumento na distribuição de vetores, alterações nas relações parasitos-hospedeiros, surgimento de zoonoses e doenças emergentes e reemergentes (THOMPSON, 2013).

Inúmeras espécies de pequenos roedores e marsupiais são encontradas em abundância na Mata Atlântica (PAGLIA et al., 2012). Esses animais fazem parte de um importante grupo ecológico, sendo considerados bioindicadores ambientais e atuam como hospedeiros e

reservatórios de parasitos zoonóticos, dentre eles o *Trypanosoma cruzi* (JANSEN et al., 2017; COSTA et al., 2018).

O acometimento de pequenos mamíferos silvestres pela infecção por *T. cruzi* tem sido constantemente relatado no Brasil (FERNANDES et al., 1999; HERRERA et al., 2005; ROCHA et al., 2013; THOMPSON et al., 2013; COSTA et al., 2015; BARROS et al., 2017; COSTA et al., 2018; JANSEN et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019) e no mundo (HERRERA et al., 2015; ROJO et al., 2017; HERNANDEZ-CORTAZAR et al., 2018). Porém, estudos envolvendo outras espécies de *Trypanosoma* ainda são escassos no Brasil.

A Bahia é um estado do Brasil endêmico para doença de Chagas com risco potencial de transmissão da enfermidade em todos os municípios (SESAB, 2018a; SESAB, 2019). Apesar disso, com a exceção do estudo de Barret et al. (1980), não foram encontrados estudos relacionados à infecção por *T. cruzi* em pequenos roedores e marsupiais silvestres em tal estado. Da mesma forma, nesse mesmo estado, não foram encontradas pesquisas envolvendo outras espécies de *Trypanosoma* nesses animais. Sendo assim, objetivou-se investigar a infecção por *Trypanosoma* spp. em pequenos roedores e marsupiais capturados em remanescentes de Floresta de Mata Atlântica localizada nos municípios de Itapetinga e Itambé, Bahia.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Área de estudo

Este estudo está inserido em um projeto maior intitulado “Pequenos mamíferos não-voadores do Sul da Bahia: conhecendo a mastofauna baiana” (PROPP 00220.1100.1645, Licença ICMBio 17131-4), cuja escolha da área de estudo, captura de animais e colheita de material biológico já estavam pré-definidos.

As áreas selecionadas para o estudo localizam-se em Itapetinga e Itambé, região Sudoeste do estado da Bahia. A principal atividade econômica desses municípios é a pecuária, baseada no sistema extensivo de criação (OLIVEIRA, 2003). O bioma é representado pela Mata Atlântica e o clima é tropical semi-úmido, com temperatura média anual de 23,6°C, pluviosidade média anual de 857 mm, com inverno seco e verão chuvoso, segundo a classificação de Köppen-Geiger (CLIMATE-DATA.ORG, 2020).

Com o auxílio do Software Google Earth Pro foram previamente selecionados dezesseis fragmentos florestais, de acordo com os seguintes critérios: 1) possuir extensão para comportar

um transecto linear de 500 m para instalação das estações de captura, mantendo uma distância mínima de 200 m das bordas e 2) ser adjacente a uma área de pastagem, também utilizada nas amostragens. A partir desta seleção prévia foram sorteados doze fragmentos para serem visitados, dos quais sete foram disponibilizados pelos proprietários para o desenvolvimento do estudo (Fig. 1). Em seguida, foram sorteados quadrantes dentro de cada fragmento para a instalação das armadilhas, mantendo uma distância mínima de 200 m da borda. Após a definição do local de instalação das armadilhas no interior dos remanescentes florestais, foram instaladas as armadilhas na pastagem adjacente mantendo a distância de 200 m entre a borda e o fragmento.

Os sete remanescentes florestais selecionados nesse estudo possuem fitofisionomias semelhantes entre si, com dossel medindo entre 15 e 25 m e estrato herbáceo-arbustivo entre 2 e 5 m. As áreas dos remanescentes variam de 85 a 992 hectares e a menor distância entre os fragmentos amostrados foi de 3 km. As pastagens adjacentes estudadas apresentam predomínio de gramíneas exóticas, com vegetação arbustiva esparsa, tendo como enfoque a criação bovina extensiva. Todas as áreas foram georreferenciadas com o Sistema de Posicionamento Global (GPS) (Fig. 1) e suas coordenadas geográficas estão listadas na tabela 1.

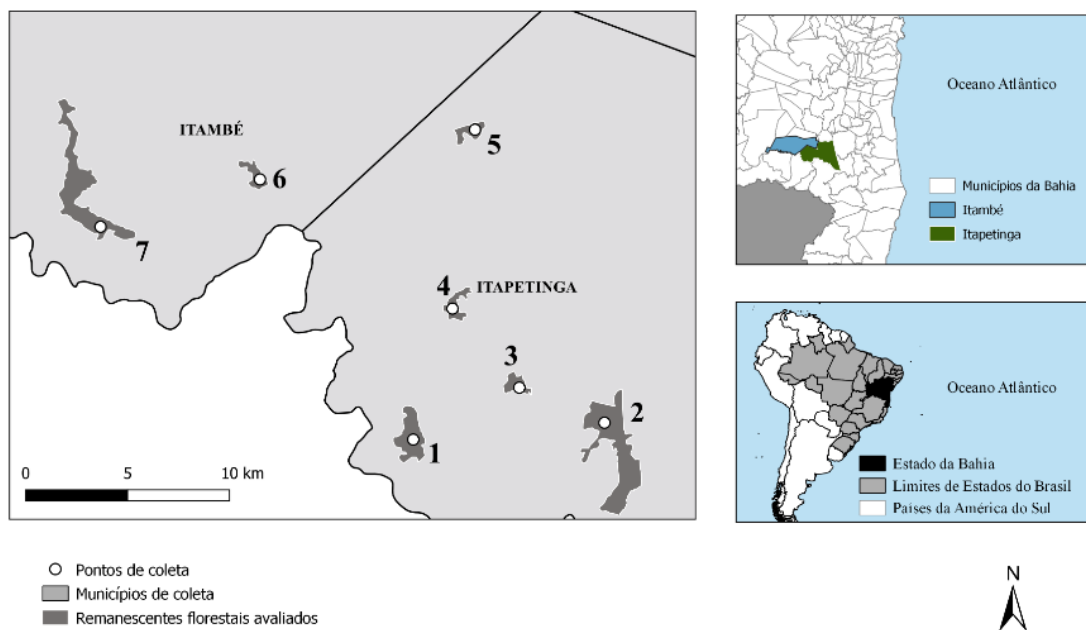


Figura 1. Áreas amostrais dos roedores e marsupiais capturados nos remanescentes florestais do Sudoeste da Bahia, Brasil. Dados gráficos: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). Elaboração: Brito Júnior, P. A. (2020).

Tabela 1. Características das áreas amostrais dos roedores e marsupiais capturados nos remanescentes florestais do Sudoeste da Bahia, Brasil.

Localidades (Áreas)	Coordenadas geográficas (DDD° MM' SS'')	Extensão (ha)	Distância do centro urbano (Km)
1	15°22'5.87''S, 40°19'19.95''W	283	11
2	15°21'39.24''S, 40°14'16.79''W	992	10
3	15°20'43.64''S, 40°16'31.75''W	91	9
4	15°18'38.47''S, 40°18'17.73''W	99	5,5
5	15°13'54.86''S, 40°17'42.02''W	98	2,5
6	15°15'13.71''S, 40°23'22.95''W	85	11
7	15°16'28.70''S, 40°27'35.72''W	542	20

4.2.2 Captura de animais

A captura de animais foi realizada em duas campanhas, com duração de sete dias cada, sendo a primeira em agosto de 2018 (estação seca) e a segunda em fevereiro de 2019 (estação chuvosa). Foram utilizados dois tipos de armadilhas: as de captura viva (75 armadilhas/área) do modelo *Sherman*[®] (31 x 8 x 9 cm) e *Tomahawk*[®] (50 x 21,5 x 20 cm) e as de interceptação-e-queda (AIQs) ou *pitfalls* (4 baldes/área).

Em cada área ou unidade amostral foram abertos dois transectos de 500 metros, sendo um no interior do fragmento de floresta semidecidual e outro na pastagem (com distância máxima de 500m entre eles) (Apêndice A). Os transectos possuem 25 estações/pontos com espaçamento de 20 metros entre si. No interior do fragmento florestal, foram instaladas 50 armadilhas de captura, uma *Sherman* e uma *Tomahawk* (Figura 2A) em cada estação, dispostas alternadamente no solo e a cerca de dois metros de altura (sub-bosque), alternando essa disposição nas estações adjacentes. Nas pastagens foram instaladas 25 armadilhas no solo, uma vez que o mesmo não apresenta estrato arbóreo, sendo uma armadilha por estação/ponto, intercaladas entre *Sherman* e *Tomahawk*, totalizando 75 armadilhas por unidade amostral.

As armadilhas foram vistoriadas todos os dias no período da manhã e iscadas com mistura de banana, aveia, fubá de milho, paçoca de amendoim e sardinha, a qual era renovada sempre que necessário. O esforço amostral total ao final das duas campanhas (seca e chuvosa) foi de 7.350 armadilhas de captura viva-noite.

Adicionalmente, em cada área/unidade amostral, foram instaladas armadilhas do tipo *pitfalls* no interior do fragmento florestal, contendo cada uma quatro baldes de 60 litros dispostos em linha e enterrados no solo, distantes 10 metros entre si e com lonas plásticas interligando-os (Figura 2B). Os fundos dos baldes eram perfurados para evitar o acúmulo de água em dias chuvosos e nenhum balde era iscado. As *pitfalls* ficaram abertas por sete noites consecutivas, sendo vistoriadas todos os dias no período da manhã, totalizando um esforço amostral ao final das duas campanhas (seca e chuvosa) de 392 baldes-noite. Todas as armadilhas foram desinstaladas ao final de cada campanha e devidamente lavadas.



Figura 2. A: Armadilha *Sherman* no solo e *Tomahawk* no sub-bosque. B: Armadilha de queda (*pitfall*). Fonte: arquivo pessoal.

4.2.3 Colheita de material biológico

As armadilhas contendo os animais capturados foram acondicionadas em sacos de tecidos e levadas até a base física das áreas de estudo para posterior manejo e colheita de amostras. Filhotes, fêmeas prenhes e lactantes não foram amostradas e, nesses casos, os animais eram identificados com brincos de alumínio, numerados e liberados no local de origem.

Os procedimentos para coletas dos animais foram realizados de acordo com o Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais, seguindo os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2013). A metodologia dessa pesquisa está de acordo os padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Ética e Bem-Estar Animal e foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) (protocolo 028/18). Os indivíduos coletados foram individualizados com etiquetas com a mesma numeração dos seus esqueletos

e crânio, taxidermizados, tombados e depositados na Coleção de Mamíferos Alexandre Rodrigues Ferreira (CMARF-UDESC).

Os animais amostrados foram eutanasiados utilizando-se cloridrato de cetamina (30 mg/kg para marsupiais e 100 mg/kg para os roedores) em associação ao cloridrato de xilazina (2mg/kg para marsupiais e 5 mg/kg para os roedores), por via intramuscular na região glútea, de acordo com Cubas et al. (2006). Em seguida, foi realizada a colheita de fragmentos de fígado, baço, rim, coração e pulmão, os quais foram armazenados individualmente em tubos criogênicos, identificados e armazenados em freezer a -20°C, para posterior análise molecular.

4.2.4 Extração de DNA

Para cada animal, o DNA foi extraído a partir de um *pool* de amostras (fígado, baço, rim, coração e pulmão), utilizando o kit Easy-DNA (Invitrogen®), conforme orientações do fabricante. Posteriormente, a concentração de DNA de cada amostra foi quantificada através do NanoDrop 2000 (ThermoScientific) e o DNA estocado à temperatura de -20° C. O DNA de *T. cruzi*, utilizado como controle positivo, foi proveniente de cultura de formas epimastigotas da cepa TcII (antiga cepa y) e sua extração e quantificação foram realizadas conforme descrito anteriormente.

4.2.5 Amplificação do DNA de *Trypanosoma* spp. por PCR

Um fragmento de aproximadamente 650 pb do gene 18S (SSU) rRNA foi amplificado utilizando dois pares de *primers*, descritos na tabela 2.

Tabela 2. *Primers* utilizados nas reações de PCR para *Trypanosoma* spp.

Espécie	Pares de bases (pb)	<i>Primers</i>	Sequências (5'-3')	Referência
<i>Trypanosoma</i> spp.		TRY927F	CAGAAACGAAACACGGGAG	Noyes et al., 1999
		TRY927R	CCTACTGGGCAGCTT GGA	
	650	SSU561F	TGGGATAACAAAGGAGCA	
		SSU561R	CTGAGACTG TAACCTCAAAGC	

As ampliações foram realizadas em um termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems by Life Technologies) e o volume final das reações foi padronizado para 25µL. O DNA de *T. cruzi* foi utilizado como controle positivo e o controle negativo foi água ultra-pura. A primeira PCR foi realizada com os *primers* TRY927F e TRY927R (NOYES et al., 1999). As condições de amplificação foram similares às descritas por Rodrigues et al. (2019), contendo 2,5µL de tampão, 3 µM de MgCl₂, 2,5µM de dNTPs, 0,4µM de cada primer à 10µM, 1,25U de PlatinumTM Taq DNA Polymerase e 4µL de DNA. As condições termocíclicas foram: uma desnaturação inicial de 94°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 60 seg. e 72 °C por 90 seg. e uma extensão final em 72 °C por 10 min.

A *nested-PCR* foi realizada utilizando-se os *primers* SSU561F e SSU561R, específicos para o gênero *Trypanosoma*, que amplificam um fragmento de 650 pb (NOYES et al., 1999). As quantidades de reagentes e as condições termocíclicas foram as mesmas descritas anteriormente.

Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0% contendo Sybr Green (Invitrogen®). A presença de bandas foi analisada com o auxílio do transiluminador (Loccus Biotecnologia). Os produtos da amplificação de cada amostra foram purificados com o kit PureLink® Genomic DNA (Invitrogen) e sequenciados através da plataforma ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) em ambas as direções. Os cromatogramas foram analisados através do software FinchTV 1.4.0.

4.2.6 Análise estatística

A comparação das espécies, indivíduos e ordens de animais acometidos pelo *Trypanomoma* sp. foi realizada pelo teste de qui-quadrado, considerando significância $p < 0.05$ e o cálculo do intervalo de confiança (95%) da prevalência foram realizados com o auxílio do programa R Core Team (2014).

4.3 RESULTADOS

Ao todo foram capturados 454 animais, provenientes de onze espécies diferentes, sendo a maioria roedores (76,2%; 346), seguidos dos marsupiais (23,8%; 108), como demonstrado na tabela 3. A maioria dos animais deste estudo foram capturados na estação seca (88,9%;

404/454) e as espécies mais prevalentes nas regiões de Itambé e Itapetinga foram *Cerradomys vivoi*, *Calomys expulsus*, *Necromys lasiurus* e *Marmosops incanus* (Tabela 3).

Tabela 3. Espécies de pequenos mamíferos capturados, de acordo com suas classificações taxonômicas, nas áreas dos remanescentes de Mata Atlântica e pastagens nos municípios de Itapetinga e Itambé, região Centro-Sul da Bahia, Brasil.

Táxon	Área	N
ORDEM DIDELPHIMORPHIA		
Família Didelphidae		
<i>Didelphis albiventris</i> (Lund, 1840)	Todas	25
<i>Gracilinanus microtarsus</i> (Wagner, 1842)	1; 4; 5; 6; 7	24
<i>Monodelphis domestica</i> (Wagner, 1842)	7	1
<i>Marmosops incanus</i> (Lund, 1840)	1; 3; 4; 6; 7	58
ORDEM RODENTIA		
Família Cricetidae		
<i>Calomys expulsus</i> (Lund, 1841)	Todas	87
<i>Calomys cf. tener</i> (Winge, 1887)	2; 4	2
<i>Cerradomys vivoi</i> (Percequillo, Hingst-Zaher & Bonvicino, 2008)	Todas	116
<i>Necromys lasiurus</i> (Lund, 1841)	Todas	74
<i>Oligoryzomys cf. flavescens</i> (Waterhouse, 1837)	3; 4; 6	3
<i>Oligoryzomys nigripes</i> (Olfers, 1818)	1; 3; 4; 5; 6; 7	48
<i>Rhipidomys mastacalis</i> (Lund, 1840)	1; 2; 4; 6	16
TOTAL		454

Legenda: N: Total de indivíduos coletados

A infecção por *Trypanosoma* spp. foi detectada em 4,6% (21/454) das amostras e a taxa de infecção da ordem Didelphimorphia foi significativamente maior (14,5%, $p < 0.05$) em relação à Rodentia (4,3%). Cinco espécies de pequenos mamíferos foram acometidas por três espécies de *Trypanosoma*. *Trypanosoma cruzi* foi a espécie encontrada infectando o maior número de indivíduos (2,6%; 12/454), seguido por *T. lewisi* (1,1%; 5/454) e *T. lainsoni* (0,8%; 4/454). Os animais infectados e suas respectivas espécies encontram-se descritos na tabela 4.

Tabela 4. Resultado da *nested*-PCR para *Trypanosoma* spp. em roedores e marsupiais capturados nas diferentes áreas e números de acesso ao Genbank.

Espécies hospedeiras	Positivos/N (%)	Espécie/Genótipo	Área	Genbank
RODENTIA				
<i>Calomys expulsus</i>	1/87 (1,1%)	<i>T. lainsoni</i>	7	MN196494.1
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	3/48 (6,2%)	<i>T. lainsoni</i>	3	(MN196497.1), (MH411675.1)
<i>Necromys lasiurus</i>	5/74 (6,7%)	<i>T. lewisi</i>	1; 2; 4; 5	(KP098535.1), (MK005286.1)
Total	9/209(4,3%)			
DIDELPHIMORHIA				
<i>Marmosops incanus</i>	5/58 (8,0%)	<i>T. cruzi/ TcI</i>	6; 7	(MH411644.1), (MN721309.1), (AY785574.1)
<i>Didelphis albiventris</i>	7/25 (28,0%)	<i>T. cruzi/ TcI</i>	2; 3; 4; 6	(MH411644.1), (MH411639.1), (AY785574.1), (MH469959.1)
Total	12/83 (14,5%)			

Legenda: N: Total de indivíduos coletados

As áreas de capturas estão situadas longe dos centros urbanos, sendo a área 5 a mais próxima e a área 7 a mais distante, estando localizadas a 2,5 e 20 km de distância, respectivamente. Apesar disso, com exceção da área 2, foi constatado que todas as áreas são antropizadas, sendo constantemente desmatadas para a coleta de madeira, além de serem circundadas por fazendas, com casas e animais domésticos (cachorros, cavalos e gado), muitas vezes criados de forma livre, com acesso a mata.

4.4 DISCUSSÃO

O sucesso de captura observado ao longo da estação seca desse estudo associado à ausência de flores e frutos disponíveis corrobora com Passamani (2000), que descreve que o sucesso de captura aumenta quando a disponibilidade de alimento é menor, sugerindo que há um maior deslocamento desses animais na escassez de alimentos, aumentando as chances de os mesmos caírem nas armadilhas em busca de recursos alimentares.

A prevalência de infecção por *T. cruzi* foi de 2,6% (IC: 95%, 1,5% - 4,6%) (Tabela 4) e assim como encontrado em diversos estudos (ZINGALES et al., 2011; ZINGALES et al., 2012; RODRIGUES et al., 2019), o genótipo TcI de *T. cruzi* foi o mais disseminado em termos de espécies hospedeiras e distribuição geográfica, acometendo os marsupiais das espécies *M. incanus* e *D. albiventris*, sendo os *D. albiventris* significativamente ($p < 0,05$) mais acometidos do que os *M. incanus* (Tabela 4).

A infecção por *T. cruzi* no marsupial *M. incanus* já foi descrita na Mata Atlântica, no Cerrado e na Caatinga (ROCHA et al., 2013a; JANSEN et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019). Descrevemos neste estudo o primeiro registro da infecção por *T. cruzi* (TcI) em *M. incanus* no bioma de Mata Atlântica no estado da Bahia. Apesar desse marsupial possuir hábito arbóreo, e ocupar o sub-bosque como estrato florestal (LORETTO; VIEIRA, 2008; PAGLIA et al., 2012), no presente estudo os *M. incanus* positivos para *T. cruzi* foram capturados tanto no solo (40%; 2/5 espécimes), quanto no estrato arbóreo (60%; 3/5 espécimes). Sendo assim, é possível afirmar que não existem indícios que associem as DTU's de *T. cruzi* aos estratos florestais, às espécies de mamíferos ou ao bioma (RODRIGUES et al., 2019). Adicionalmente, esses resultados evidenciam animais infectados pelo *T. cruzi* no estrato solo e no arbóreo, demonstrando que a transmissão do parasita estava ocorrendo em ambos os estratos.

O genótipo TcI está mais associado ao ciclo silvestre do parasito, sendo frequentemente encontrado em pequenos mamíferos silvestres, especialmente os gambás (MARCILI et al., 2009a; COSTA et al., 2015; NANTES et al., 2019), de forma similar ao que foi encontrado nesse estudo. A prevalência da infecção por *T. cruzi* em *D. albiventris* foi de 28,0% (IC: 95%, 1,4 – 5,2) (Tabela 4), o que corrobora com as altas taxas de infecção descritas nessa espécie de marsupial no Brasil, com 45,2% e 32,5% em Ilha do Arvoredo (SC) e Campo Grande (MS), respectivamente (GRISARD et al., 2000; NANTES et al., 2019) e na Argentina, com 36,4% (ALVARADO-OTEGUI et al., 2012). Esse achado é muito importante haja vista que gambás do gênero *Didelphis* infectados apresentam o parasita circulante, além de armazenarem e eliminarem o mesmo através de suas glândulas de cheiro (DEANE et al., 1984; NANTES et al., 2019). Desta forma, esses animais podem contribuir não só com a manutenção do parasita na região estudada, mas também podem abrigar e eliminar o parasita em todas as suas formas através de suas glândulas de cheiro (DEANE et al., 1984; JANSEN et al., 1999; COURA; BORGES- PEREIRA, 2010), transmitindo o parasita para insetos, outros animais silvestres e para os seres humanos.

Nas áreas 2, 3, 4 e 6 foram encontrados gambás infectados pelo *T. cruzi* (Tabela 4). Com a exceção da área 2, as demais áreas são antropizadas e os seres humanos e animais domésticos possuem estreita relação com as regiões de mata, possibilitando eventual contato com os *Didelphis* infectados e possível transmissão do parasito. Os *Didelphis* são animais que se adaptam facilmente a ambientes antropizados, circulando entre os ambientes silvestres, peridomésticos e domésticos à procura de alimento, favorecendo a exposição à ciclos de transmissão distintos (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; JANSEN et al., 2017; BRANDÃO et al., 2019). Isso ocorre devido à destruição do ecossistema que, por sua vez, provoca restrições alimentares a esses animais, favorecendo o contato entre eles e os seres humanos e a transmissão do parasita (XAVIER et al., 2012).

Apesar de os municípios de Itambé e Itapetinga serem classificados com médio e baixo risco de ocorrência da doença de Chagas, respectivamente (SESAB, 2016a), não foram encontrados estudos com triatomíneos nesses municípios. Entretanto, pesquisas realizadas na região Sudoeste encontraram as espécies *Triatoma infestans*, *Panstrangylus geniculatus*, *Triatoma pseudomaculata* e *T. sordida* infectados por *T. cruzi* (BARRET et al., 1979; SILVEIRA et al., 2016). A maioria dos triatomíneos encontrados são de média a alta importância vetorial (GONÇALVES et al., 2012; SILVEIRA et al., 2016), demonstrando um risco considerável de transmissão vetorial nesses locais.

Os gambás são marsupiais didelfídeos que possuem hábitos onívoros, favorecendo sua infecção por via oral através da ingestão de pequenos mamíferos infectados, insetos infectados, sementes contaminadas com fezes de barbeiro ou pela ingestão do material da glândula anal de outros marsupiais didelfídeos infectados (DEANE et al., 1984; DIAS, 1992; BERN et al., 2011; JANSEN et al., 2017).

Entre os anos de 2007 e 2019 foram confirmados 4 e 2 casos autóctones em humanos da doença de Chagas nos municípios de Itambé e Itapetinga, respectivamente (SUVISA, 2020a). Entretanto, esses municípios não são endêmicos para a doença, tendo em vista que nos últimos 3 anos não houve casos notificados (SUVISA, 2020a). Apesar disso, os achados deste estudo confirmam a presença do parasita e sugerem a ocorrência do vetor nas regiões estudadas, uma vez que se constatou a infecção de alguns animais. Cabe ressaltar que os marsupiais, principalmente *Didelphis* sp., têm sido associados à presença de triatomíneos em remanescentes de Mata Atlântica próximo a residências (BARRET et al., 1979; RIBEIRO JR et al., 2015), facilitando a interação entre os ciclos doméstico e silvestre (JANSEN et al., 2017). É possível que ocorra essa interação na área desse estudo, uma vez que as fazendas possuem casas

adjacentes aos remanescentes de mata e os *D. albiventris* são animais sinantrópicos que percorrem em seu hábitat, em média, 1100 m², podendo chegar a 1600m² (ALMEIDA et al., 2008; JANSEN et al., 2017). Por fim, tanto os *D. albiventris* quanto os *M. incanus* infectados por *T. cruzi* foram capturados em regiões de mata diferentes (Tabela 4), demonstrando que as fontes de infecção também são distintas.

No presente estudo, foi encontrado pela primeira vez o *T. lainsoni* em roedores da Mata Atlântica (Tabela 4). Até o momento, esse parasita havia sido descrito apenas em três estudos no Brasil, dos quais dois foram em roedores da Amazônia (NAIFF; BARRET, 2013; ORTIZ et al., 2018) e um em marsupiais e morcegos da Mata Atlântica e Cerrado (RODRIGUES et al., 2019), não havendo relatos em seres humanos. Este achado contribui com o conhecimento a respeito dos diferentes táxons e ambientes em que o parasita é encontrado. Os roedores infectados por *T. lainsoni* neste estudo pertencem às espécies *C. expulsus* e *O. nigripes* (Tabela 4), que são roedores com hábito de locomoção terrestre (PAGLIA et al., 2012). Entretanto, dois animais da espécie *O. nigripes* infectados por *T. lainsoni* foram capturados no sub-bosque. Este achado corrobora com Rodrigues et al. (2019), que supõem que o *T. lainsoni* ocorra entre mamíferos arbóreos e terrestres apesar de, até o momento, não existirem informações sobre as prováveis espécies de vetores deste parasita.

Nas áreas 1, 2, 4 e 5 foram capturados cinco roedores da espécie *N. lasiurus* infectados por *T. lewisi*, sendo este o primeiro relato da infecção em roedores silvestres do estado da Bahia. *Trypanosoma lewisi* é uma espécie de parasita cujos principais reservatórios são os ratos domésticos (*Rattus* spp.) (ORTIZ et al., 2018). Entretanto, pode acometer pequenos mamíferos silvestres (MARAGUI et al., 1995; LINARDI; BOTELHO, 2002) especialmente, o roedor *N. lasiurus* (CARDOSO et al., 2015; ORTIZ et al., 2018). De maneira oportunista, também pode infectar os seres humanos sendo considerado uma zoonose emergente, cujo principal vetor em áreas tropicais e subtropicais são as pulgas da espécie *Xenopsylla cheops* (LINARDI; BOTELHO, 2002; ORTIZ et al., 2018). Os roedores e, eventualmente, outros animais contraem a infecção ao ingerirem pulgas infectadas ou as fezes de pulgas contendo tripomastigotas metacíclicas (MARAGUI et al., 1995). Desta forma, a provável via de infecção dos *N. lasiurus* deste estudo seja a via oral. Apesar de não terem sido encontrados estudos com pulgas na região estudada, o fato de existirem roedores silvestres infectados, possibilita afirmar que o parasita e o vetor estão presentes nos fragmentos de Mata Atlântica dos municípios de Itambé e Itapetinga.

Há uma variedade de espécies de *Trypanosoma* encontrados no Brasil, entretanto o *T. cruzi* é o mais importante pelo fato de provocar a doença de Chagas, que é uma zoonose

responsável por um grave problema de saúde pública no país (LOPES et al., 2018). A complexidade do ciclo de transmissão do *T. cruzi* na natureza envolve uma série de componentes referentes ao parasita, aos hospedeiros, ao vetor e ao ambiente (BRANDÃO et al., 2019). Este estudo possibilitou a realização de um levantamento desses componentes, contribuindo com informações a respeito da epidemiologia da doença na região estudada.

4.5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a infecção por *T. cruzi*, cujo genótipo encontrado foi o TcI, foi detectada em quase todas as áreas estudadas, sendo este o primeiro registro dessa infecção em *M. icanus* no bioma de Mata Atlântica no estado da Bahia. A infecção dos pequenos mamíferos por *T. lainsoni* e *T. lewisi* também foi constatada, evidenciando a diversidade de espécies de trypanosomatídeos que acometem os animais da região estudada, sendo este o primeiro registro da infecção por *T. lainsoni* em roedores da Mata Atlântica e o primeiro relato de *T. lewisi* em roedores silvestres do estado da Bahia.

5 CAPÍTULO 2

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Leishmania infantum* EM PEQUENOS
MAMÍFEROS NÃO-VOADORES (RODENTIA E DIDELPHIMORPHIA)
CAPTURADOS NO ESTADO DA BAHIA, NORDESTE DO BRASIL**

5.1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses de importância mundial e apresentam um impacto importante na saúde pública. E, além do homem acometem também nos mamíferos domésticos e silvestres. São causadas por mais de 20 espécies de parasitos intracelulares obrigatórios pertencentes ao gênero *Leishmania* (CAMPINO; MAIA, 2013). Mais de 30 espécies de flebotomíneos fêmeas são considerados vetores e transmitem o agente ao realizarem o repasto sanguíneo no hospedeiro (QUINNELL; COURTENAY, 2009; CAMPINO; MAIA, 2013).

A infecção no homem e animais domésticos é consequência de distúrbios ecológicos e alterações no ciclo epidemiológico do parasita (LAINSON; RANGEL, 2005). Um exemplo disso é a alteração do hábitat do vetor que, primordialmente, era encontrado no ambiente silvestre, entretanto, devido a intensa antropização das matas tem sido encontrado no intradomicílio e peridomicílio (LAINSON; RANGEL, 2005; LIMA et al., 2013; CALDART et al., 2017; MOTA et al., 2019).

Atualmente, estima-se que mais de um bilhão de pessoas estão sob o risco de se infectarem por *Leishmania* spp. (DNDI, 2019). A enfermidade se manifesta clinicamente de duas formas, a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT), a depender da espécie do parasita envolvido na infecção e das defesas no hospedeiro. No Brasil, *L. (L.) infantum chagasi* é a espécie responsável por provocar a LV (MILLAN et al., 2016) e as principais espécies causadoras de LT são a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (GONTIJO; CARVALHO, 2003; VALE; FURTADO, 2005).

A diversidade de hospedeiros, vetores e espécies de *Leishmania*, em associação com o intenso desmatamento e fragmentação das matas contribuem para que as leishmanioses se caracterizem por serem de difícil prevenção e controle (ROQUE; JANSEN, 2014). Ainda que o conhecimento a respeito dessa enfermidade tenha melhorado nas últimas décadas, sabe-se muito pouco sobre o espectro de espécies de mamíferos silvestres hospedeiros e vetores deste parasita na natureza (CÁSSIA-PIRES et al., 2014; ROQUE; JANSEN, 2014).

Os pequenos roedores e marsupiais encontram-se distribuídos em diferentes biomas e são animais que apresentam riqueza e abundância de espécies (PAGLIA et al., 2012). Essas características proporcionam uma maior interação desses animais com a *Leishmania* spp. sendo

considerados importantes sinalizadores dos impactos que ocorrem no ambiente silvestre (CARDOSO et al., 2015).

Estudos que avaliam a ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos silvestres são importantes para melhorar a compreensão sobre as interações parasita-hospedeiro bem como para definir o papel desses animais no ciclo de transmissão (CARDOSO et al., 2015). A Bahia é um estado do Brasil considerado endêmico para a LV e LT (SESAB, 2016; SESAB, 2018b), entretanto, ainda são escassos os estudos sobre essas doenças envolvendo os pequenos mamíferos na região. A região Sudoeste da Bahia possui uma área de Mata Atlântica, na qual encontram-se diversas espécies desses indivíduos em abundância. No entanto, não foram encontrados estudos a respeito de roedores e marsupiais silvestres infectados pelos agentes das leishmanioses nessa região. Sendo assim, objetivou-se com este estudo investigar a infecção por *Leishmania* spp., bem como caracterizar estas espécies, em pequenos roedores e marsupiais capturados em remanescentes de Floresta de Mata Atlântica localizadas nos municípios de Itapetinga e Itambé, no Sudoeste da Bahia.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Área de estudo

Este estudo está inserido em um projeto maior intitulado “Pequenos mamíferos não-voadores do Sul da Bahia: conhecendo a mastofauna baiana” (PROPP 00220.1100.1645, Licença ICMBio 17131-4), cuja escolha da área de estudo, captura de animais e colheita de material biológico já estavam pré-definidos.

As áreas selecionadas para o estudo localizam-se em Itapetinga e Itambé, região Sudoeste do estado da Bahia. A principal atividade econômica desses municípios é a pecuária, baseada no sistema extensivo de criação (OLIVEIRA, 2003). O bioma é representado pela Mata Atlântica e o clima é tropical semi-úmido, com temperatura média anual de 23,6°C, pluviosidade média anual de 857 mm, com inverno seco e verão chuvoso, segundo a classificação de Köppen-Geiger (CLIMATE-DATA.ORG, 2020).

Com o auxílio do Software Google Earth Pro foram previamente selecionados dezesseis fragmentos florestais, de acordo com os seguintes critérios: 1) possuir extensão para comportar um transecto linear de 500 m para instalação das estações de captura, mantendo uma distância mínima de 200 m das bordas e 2) ser adjacente a uma área de pastagem, também utilizada nas

amostragens. A partir desta seleção prévia foram sorteados doze fragmentos para serem visitados, dos quais sete foram disponibilizados pelos proprietários para o desenvolvimento do estudo (Fig. 1). Em seguida, foram sorteados quadrantes dentro de cada fragmento para a instalação das armadilhas, mantendo uma distância mínima de 200 m da borda. Após a definição do local de instalação das armadilhas no interior dos remanescentes florestais, foram instaladas as armadilhas na pastagem adjacente mantendo a distância de 200 m entre a borda e o fragmento.

Os sete remanescentes florestais selecionados nesse estudo possuem fitofisionomias semelhantes entre si, com dossel medindo entre 15 e 25 m e estrato herbáceo-arbustivo entre 2 e 5 m. As áreas dos remanescentes variam de 85 a 992 hectares e a menor distância entre os fragmentos amostrados foi de 3 km. As pastagens adjacentes estudadas apresentam predomínio de gramíneas exóticas, com vegetação arbustiva esparsa, tendo como enfoque a criação bovina extensiva. Todas as áreas foram georreferenciadas com o Sistema de Posicionamento Global (GPS) (Fig. 1) e suas coordenadas geográficas estão listadas na tabela 1.

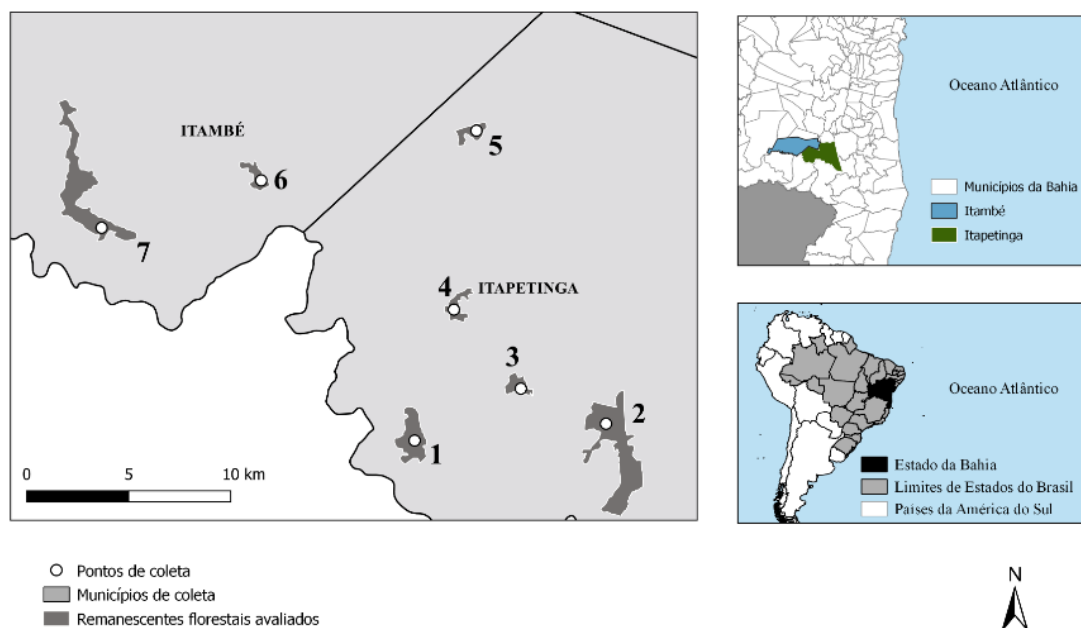


Figura 1. Áreas amostrais dos roedores e marsupiais capturados nos remanescentes florestais do Sudoeste da Bahia, Brasil. Dados gráficos: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). Elaboração: Brito Júnior, P. A. (2020).

Tabela 1. Características das áreas amostrais dos roedores e marsupiais capturados nos remanescentes florestais do Sudoeste da Bahia, Brasil.

Localidades (Áreas)	Coordenadas geográficas (DDD° MM' SS'')	Extensão (ha)	Distância do centro urbano (Km)
1	15°22'5.87''S, 40°19'19.95''W	283	11
2	15°21'39.24''S, 40°14'16.79''W	992	10
3	15°20'43.64''S, 40°16'31.75''W	91	9
4	15°18'38.47''S, 40°18'17.73''W	99	5,5
5	15°13'54.86''S, 40°17'42.02''W	98	2,5
6	15°15'13.71''S, 40°23'22.95''W	85	11
7	15°16'28.70''S, 40°27'35.72''W	542	20

5.2.2 Captura de animais

A captura de animais foi realizada em duas campanhas, com duração de sete dias cada, sendo a primeira em agosto de 2018 (estação seca) e a segunda em fevereiro de 2019 (estação chuvosa). Foram utilizados dois tipos de armadilhas: as de captura viva (75 armadilhas/área) do modelo *Sherman*[®] (31 x 8 x 9 cm) e *Tomahawk*[®] (50 x 21,5 x 20 cm) e as de interceptação-e-queda (AIQs) ou *pitfalls* (4 baldes/área).

Em cada área ou unidade amostral foram abertos dois transectos de 500 metros, sendo um no interior do fragmento de floresta semidecidual e outro na pastagem (com distância máxima de 500m entre eles) (Apêndice A). Os transectos possuem 25 estações/pontos com espaçamento de 20 metros entre si. No interior do fragmento florestal, foram instaladas 50 armadilhas de captura, uma *Sherman* e uma *Tomahawk* (Figura 2A) em cada estação, dispostas alternadamente no solo e a cerca de dois metros de altura (sub-bosque), alternando essa disposição nas estações adjacentes. Nas pastagens foram instaladas 25 armadilhas no solo, uma vez que o mesmo não apresenta estrato arbóreo, sendo uma armadilha por estação/ponto, intercaladas entre *Sherman* e *Tomahawk*, totalizando 75 armadilhas por unidade amostral.

As armadilhas foram vistoriadas todos os dias no período da manhã e iscadas com mistura de banana, aveia, fubá de milho, paçoca de amendoim e sardinha, a qual era renovada sempre que necessário. O esforço amostral total ao final das duas campanhas (seca e chuvosa) foi de 7.350 armadilhas de captura viva-noite.

Adicionalmente, em cada área/unidade amostral, foram instaladas armadilhas do tipo *pitfalls* no interior do fragmento florestal, contendo cada uma quatro baldes de 60 litros dispostos em linha e enterrados no solo, distantes 10 metros entre si e com lonas plásticas interligando-os (Figura 2B). Os fundos dos baldes eram perfurados para evitar o acúmulo de água em dias chuvosos e nenhum balde era iscado. As *pitfalls* ficaram abertas por sete noites consecutivas, sendo vistoriadas todos os dias no período da manhã, totalizando um esforço amostral ao final das duas campanhas (seca e chuvosa) de 392 baldes-noite. Todas as armadilhas foram desinstaladas ao final de cada campanha e devidamente lavadas.



Figura 2. A: Armadilha *Sherman* no solo e *Tomahawk* no sub-bosque. B: Armadilha de queda (*pitfall*). Fonte: arquivo pessoal.

5.2.3 Colheita de material biológico

As armadilhas contendo os animais capturados foram acondicionadas em sacos de tecidos e levadas até a base física das áreas de estudo para posterior manejo e colheita de amostras. Filhotes, fêmeas prenhes e lactantes não foram amostradas e, nesses casos, os animais eram identificados com brincos de alumínio, numerados e liberados no local de origem.

Os procedimentos para coletas dos animais foram realizados de acordo com o Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais, seguindo os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2013). A metodologia dessa pesquisa está de acordo os padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Ética e Bem-Estar Animal e foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso

de Animais da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) (protocolo 028/18). Os indivíduos coletados foram individualizados com etiquetas com a mesma numeração dos seus esqueletos e crânio, taxidermizados, tombados e depositados na Coleção de Mamíferos Alexandre Rodrigues Ferreira (CMARF-UESC).

Os animais amostrados foram eutanasiados utilizando-se cloridrato de cetamina (30 mg/kg para marsupiais e 100 mg/kg para os roedores) em associação ao cloridrato de xilazina (2mg/kg para marsupiais e 5 mg/kg para os roedores), por via intramuscular na região glútea, de acordo com Cubas et al. (2006). Em seguida, foi realizada a colheita de fragmentos de fígado, baço, rim, coração e pulmão, os quais foram armazenados individualmente em tubos criogênicos, identificados e armazenados em freezer a -20°C, para posterior análise molecular.

5.2.4 Extração de DNA

Para cada animal, o DNA foi extraído a partir de um *pool* de amostras (fígado, baço, rim, coração e pulmão), utilizando o kit Easy-DNA (Invitrogen®), conforme orientações do fabricante. Posteriormente, a concentração de DNA de cada amostra foi quantificada através do NanoDrop 2000 (ThermoScientific) e o DNA estocado à temperatura de -20° C.

Extração de DNA de cultura de *L. amazonensis* (cepa IFLA/BR 1967/PH8) também foi realizada. Antes da extração, foi realizada a contagem de células promastigotas presentes em 1 ml de cultura, utilizando Câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio óptico comum, segundo metodologia convencional. Posteriormente, o DNA foi extraído conforme descrito anteriormente.

5.2.5 Amplificação do DNA de *Leishmania* spp. por PCR em tempo real (qPCR)

Para amplificação do DNA de *Leishmania* spp., foram utilizados os primers 13A (5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT-3') e 13B (5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3'), que amplificam um fragmento com 120 pares de bases de uma região do kDNA do gênero *Leishmania* (RODGERSs et al, 1990). A amplificação foi realizada em um termociclador AB 7500 Fast (Applied Biosystems) e os produtos amplificados foram detectados por meio do fluoróforo SYBR® Green (Promega). O DNA extraído da cultura de *L. amazonensis* foi utilizado como controle positivo.

A reação foi padronizada em um volume final de 20 μL , contendo 10 μL de GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega), 1 μL de cada *primer* a 5 μM , 0,1 μL de CXR Reference Dye (Promega) e 4 μL de DNA a 50ng/ μL . As condições de amplificação foram: um ciclo de 50°C por 2 min; um ciclo de 95°C por 10 min; 45 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. A curva de dissociação consistiu-se de um ciclo de 95° por 15 seg (rampa de 1,6°C/seg), 60°C por 1 min (rampa de 1,6°C/seg), 95°C por 15 seg (rampa de 0,15°C/seg).

5.2.6 Quantificação do número de cópias do DNA de *Leishmania* spp. por qPCR

As amostras positivas na etapa anterior foram quantificadas através da técnica de PCR em tempo real quantitativo (qPCR). As promastigotas provenientes de uma alíquota de DNA extraído de cultura de *L. amazonensis* (controle positivo) foram utilizadas nas diluições para confecção da curva padrão. Foram feitas seis diluições seriadas a 10x contendo de 10⁷ a 10² promastigotas/ml. A partir da diluição 10², foram realizadas três diluições a 2x contendo de 50 a 12,5 promastigotas/ml. A reação da curva padrão foi realizada utilizando os mesmos *primers* e ciclos de amplificação descritos anteriormente, com volume final de 20 μL , contendo 10 μL de GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega), 0,5 μL de cada *primer* a 5 μM , 0,1 μL de CXR Reference Dye (Promega), 3 μL de DNA a 50ng/ μL e água ultra-pura estéril até completar o volume final. Os nove pontos da curva padrão obtida continham 1,275 x 10⁷ a 1,60 x 10¹ promastigotas.

5.2.7 Identificação das espécies de *Leishmania* por PCR

As amostras positivas na PCR em tempo real foram submetidas à PCR convencional (*Nested-PCR*) utilizando os *primers* descritos na tabela 2.

Tabela 2. *Primers* utilizados na reação de PCR para *Leishmania* spp.

Espécies	Pares de bases (pb)	Primers	Sequências (5'-3')	Referências
<i>Leishmania</i> spp.	520	S4	GAT CCA GCT GCA GGT TCA CC	Uliana et al., 1994
		S12	GGT TGA TTC CGT CAA CGG AC	
	490	S17	CCAAG CTGCC CAGTA GAAT	Savani et al., 2009
		S18	TCGGG CGGAT AAAAC CC	

As ampliações foram realizadas em um termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems by Life Technologies) e o volume final das reações foi padronizado para 25µL. A primeira PCR foi realizada com os *primers* S4 e S12 (ULIANA et al., 1994). As condições de amplificação foram similares às descritas por Savani et al. (2009), contendo 2,5µl de tampão, 2 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,2µM de cada *primer* à 10µM, 2U de Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen™) e 5µl de DNA genômico. As condições termocíclicas foram: 94°C por 3 min., seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 min., 50°C por 1 min. e 72°C por 1 min. e uma extensão final de 72°C por 7 min.

O fragmento de 520 pb obtido a partir da primeira reação de PCR foi utilizado como DNA na *nested*-PCR, utilizando-se os *primers* S17 e S18, específicos para o gênero *Leishmania*, que amplificam um fragmento de 490 pb (SAVANI et al., 2009). As quantidades de reagentes foram as mesmas descritas anteriormente. As condições termocíclicas foram: 94°C por 4 min., seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 min., 55°C por 1 min. e 72°C por 30 seg. e uma extensão final de 72°C por 7 min (SAVANI et al., 2009).

DNA extraído de cultura de *L. amazonensis* (cepa IFLA/BR 1967/PH8) foi utilizado como controle positivo nas reações. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo. Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0% contendo Sybr Green (Invitrogen®). A presença de bandas foi analisada com o auxílio do transiluminador (Loccus Biotecnologia).

Os produtos da amplificação de cada amostra foram purificados com o kit PureLink® Genomic DNA (Invitrogen) e sequenciados na plataforma ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) em ambas as direções. Os cromatogramas foram analisados através do software FinchTV 1.4.0.

5.2.8 Análise estatística

A comparação das espécies, indivíduos e ordens de animais acometidos pela *Leishmania* spp. foi realizada pelo teste de qui-quadrado, considerando significância de $p < 0.05$, e o cálculo do intervalo de confiança da prevalência foi realizado com o auxílio do programa R Core Team (2014).

5.3 RESULTADOS

Ao todo foram capturados 454 animais, provenientes de onze espécies diferentes, sendo a maioria roedores (76,2%; 346), seguidos dos marsupiais (23,8%; 108), como demonstrado na tabela 2. A maioria dos animais deste estudo foram capturados na estação seca (88,9%; 404/454) e as espécies mais prevalentes nas regiões de Itambé e Itapetinga foram *Cerradomys vivoi*, *Calomys expulsus*, *Necromys lasiurus* e *Marmosops incanus* (Tabela 3). Ao longo da estação seca foi observado uma baixa disponibilidade de flores e frutos, diferentemente do que foi encontrado na segunda campanha, durante a estação chuvosa, na qual a disponibilidade de alimento era maior.

Tabela 3. Espécies de pequenos mamíferos capturados, de acordo com suas classificações taxonômicas, nas áreas dos remanescentes de Mata Atlântica e pastagens nos municípios de Itapetinga e Itambé, região Centro-Sul da Bahia, Brasil.

Táxon	Área	N
ORDEM DIDELPHIMORPHIA		
Família Didelphidae		
<i>Didelphis albiventris</i> (Lund, 1840)	Todas	25
<i>Gracilinanus microtarsus</i> (Wagner, 1842)	1; 4; 5; 6; 7	24
<i>Monodelphis domestica</i> (Wagner, 1842)	7	1
<i>Marmosops incanus</i> (Lund, 1840)	1; 3; 4; 6; 7	58
ORDEM RODENTIA		
Família Cricetidae		
<i>Calomys expulsus</i> (Lund, 1841)	Todas	87
<i>Calomys cf. tener</i> (Winge, 1887)	2; 4	2
<i>Cerradomys vivoi</i> (Percequillo, Hingst-Zaher & Bonvicino, 2008)	Todas	116
<i>Necromys lasiurus</i> (Lund, 1841)	Todas	74
<i>Oligoryzomys cf. flavescens</i> (Waterhouse, 1837)	3; 4; 6	3
<i>Oligoryzomys nigripes</i> (Olfers, 1818)	1; 3; 4; 5; 6; 7	48
<i>Rhipidomys mastacalis</i> (Lund, 1840)	1; 2; 4; 6	16
TOTAL		454

Legenda: N: Total de indivíduos coletados

As áreas de capturas localizam-se afastadas dos centros urbanos, sendo a área 5 a mais próxima e a área 7 a mais distante, estando localizadas a 2,5 e 20 km de distância dos centros urbanos, respectivamente. Apesar disso, com exceção da área 2, foi constatado que todas as áreas são antropizadas, sendo constantemente desmatadas para a coleta de madeira, além de serem circundadas por fazendas, com casas e animais domésticos (cachorros, cavalos e gado), muitas vezes criados de forma livre, com acesso a mata.

Dos 454 animais capturados, 13 foram encontrados naturalmente infectados por *Leishmania* spp. na qPCR, representando uma prevalência de 2,8% (IC: 95%, 1,6% - 4,8%) (Tabela 4). Todos os indivíduos infectados foram capturados na região de mata e durante a estação seca e pertencem às espécies *N. lasiurus* (7,6%; 1/13) e *G. microtarsus* (92,3%; 12/13), sendo a taxa de infecção de *G. microtarsus* significativamente maior ($p < 0,05$) em relação à de *N. lasiurus* (Tabela 4). Após o sequenciamento das 13 amostras, detectou-se que três marsupiais da espécie *G. microtarsus*, estavam infectados por *L. infantum* (Tabela 5), e não foi possível detectar as espécies de *Leishmania* dos demais animais (10).

Tabela 4. Resultado da qPCR para *Leishmania* spp. nos roedores e marsupiais capturados, nas diferentes áreas.

Espécies hospedeiras	Positivos/N (%)	Áreas
Rodentia		
<i>Necromys lasiurus</i>	1/74 (1,3%)	1
Didelphimorphia		
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	12/24 (50,0%)	1; 6; 7

Legenda: N: Total de indivíduos coletados da espécie

Tabela 5. Espécies de hospedeiros positivos para *L. infantum*, suas respectivas áreas e suas identificações no GenBank.

Nº de identificação	Espécies hospedeiras	Áreas	Genbank	Grau de similaridade (%)
27	<i>G. microtarsus</i>	1	XR_001203206	100
42	<i>G. microtarsus</i>	6	KY707970	100
345	<i>G. microtarsus</i>	7	XR_001203206	100

A quantificação média de promastigotas das amostras positivas através da qPCR foi de $1,72 \times 10^6$ promastigotas/ml, variando de $2,30 \times 10^1$ a $1,30 \times 10^7$ promastigotas/mL do macerado de *pool* de órgãos (Tabela 6).

As curvas de dissociação apresentaram um único pico de temperatura de *melting* (T_m), não sendo observados dímeros de *primers*. Em ambas as quantificações (A e B), as curvas de dissociação apresentaram uma T_m de 83°C (Figura 3). A eficiência (Eff) da curva de amplificação de A foi de 92,586% e de B foi 100% (Figura 3). Os coeficientes de correlação linear (R^2) das amplificações foram altos, sendo 0,997 na curva padrão A e 0,981 na curva B, demonstrando uma boa correlação linear em todas as curvas padrão (Figura 3).

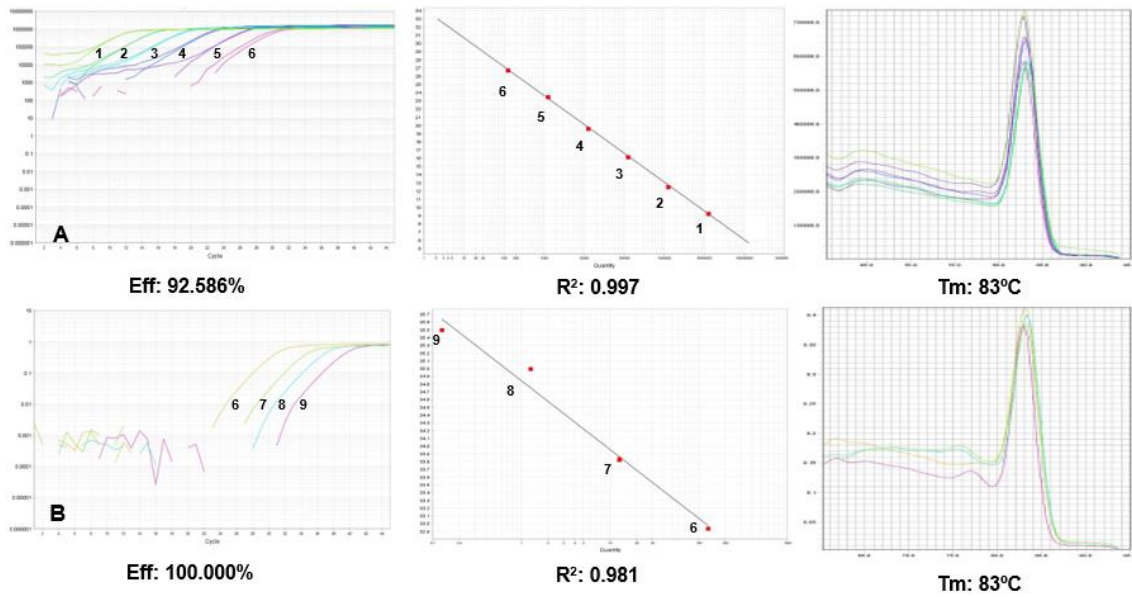


Figura 3. Curvas de amplificação (esquerda), curvas padrão (centro) e curvas de dissociação (direita) pelo sistema Sybr Green da *Leishmania* spp. (A): [1] $1,28 \times 10^7$; [2] $1,28 \times 10^6$; [3] $1,28 \times 10^5$; [4] $1,28 \times 10^4$; [5] $1,28 \times 10^3$; [6] $1,28 \times 10^2$; (B): [6] $1,28 \times 10^2$; [7] 63,65; [8] 31,86; [9] 15,94.

Tabela 6. Quantificação de promastigotas de *Leishmania* spp. através da qPCR.

Amostras	14	19	27	42	57	74	87	102	267	269	344	345	453
	2,82x10 ⁴	4,48x10 ⁴	1,64x10 ⁵	1,50x10 ⁶	1,40x10 ⁶	1,3x10 ⁷	5,8x10 ⁶	4,06x10 ⁵	2,30x10 ¹	6,82x10 ¹	2,36x10 ¹	6,72x10 ⁴	1,04x10 ³

5.4 DISCUSSÃO

O sucesso de captura de roedores durante a estação seca desse estudo corrobora com os achados obtidos num estudo anterior no qual foi detectada elevada densidade de roedores durante a estação seca, porém realizado no bioma Cerrado (MELLO, 1980). Segundo Santos-Filho et al. (2008), algumas espécies de roedores apresentam picos reprodutivos na estação chuvosa e isso provavelmente pode ocasionar o aumento da população durante a estação seca. A escassez de alimento observada na estação seca desse estudo pode ter colaborado para que um maior número de animais fosse capturado. De acordo com Passamani (2000), quando a quantidade de alimento disponível é menor os animais tendem a se deslocar mais em busca desses recursos, aumentando a probabilidade de serem capturados pelas armadilhas, contribuindo assim com o sucesso de captura.

Apesar de terem sido encontrado animais naturalmente infectados por *Leishmania* spp. nesse estudo, não foi possível identificar todas as espécies desse parasita envolvidas na infecção e sugere-se que isso possa estar relacionado com uma baixa carga parasitária de alguns animais, mesmo embora tenha sido feita a *nested* PCR (QUINTAL et al., 2011).

O roedor *N. lasiurus* encontra-se amplamente distribuído no Brasil (OLIVEIRA et al., 2013) e diversos estudos relataram infecção desta espécie por *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *Leishmania* spp. (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; FREITAS et al., 2012; FERREIRA et al., 2015; FREITAS et al., 2012; CARDOSO et al., 2015), entretanto, não foram encontrados estudos que relataram infecção por *Leishmania* spp. nesse roedor no estado da Bahia, sendo esse o primeiro registro nessa região.

Necromys lasiurus é classificado como potencial reservatório de *L. braziliensis*, devido ao seu papel na manutenção da infecção e na transmissão do parasita para os vetores (BRITO et al., 2012; FREITAS et al., 2012; ROQUE; JANSEN, 2014). Nesse estudo, o animal infectado foi capturado no estrato solo da região de mata da área 1, corroborando com estudos que descrevem o seu uso do hábitat como sendo terrestre (OLIVEIRA; BONVICINO, 2006; PÁGLIA et al., 2012). Apesar da área 1 estar localizada longe (11km) do centro urbano (tabela 1), é uma área antropizada, com evidente desmatamento para exploração de madeira e, em suas proximidades, localiza-se uma fazenda cuja sede é habitada por seres humanos que possuem cachorros, cavalo e criação de gado. Desta forma, o ciclo zoonótico da LT pode ser estabelecido devido a alteração desses ambientes florestais, tendo em vista que os flebotomíneos voam em

busca de novos hospedeiros e pequenos mamíferos silvestres e podem adaptar-se aos ambientes domésticos e peridomésticos (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; ROTUREAU, 2006; QUARESMA et al., 2011).

As evidências de alterações ambientais encontradas na área 1 possibilitam o estreito contato dos seres humanos, animais domésticos e animais silvestres com os protozoários do gênero *Leishmania*. Adicionalmente, a área de vida do *N. lasiurus* varia de 200 a 2500m² e, devido a alterações em seu habitat, essa espécie de roedor pode atuar como um elo entre os ciclos doméstico e peridoméstico, uma vez que ele é uma fonte potencial de alimento para flebotomíneos peridomésticos como a *Lutzomyia intermedia* e *Lu. whitmani* (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; OLIVEIRA; BONVICINO, 2006). Apesar de não terem sido encontrados estudos com flebotomíneos transmissores da LT nos municípios estudados, esses dados sugerem a existência de transmissão vetorial na região, uma vez que os municípios de Itambé e Itapetinga são endêmicos para LT, com 21 e 6 casos humanos autóctones, respectivamente, notificados nos três últimos anos (SUVISA, 2020).

Um estudo experimental realizado por Andrade et al. (2015), demonstrou a presença de *L. (V.) braziliensis* em pele, fígado e baço de *N. lasiurus* e comprovou-se através do xenodiagnóstico a infecção de flebotomíneos por este parasita. Corroborando com os achados de Andrade et al. (2015), o presente estudo também evidenciou a presença de *Leishmania* spp. nos órgãos internos de *N. lasiurus*, cuja carga parasitária foi de $2,8 \times 10^4$ cópias de promastigotas/ml de *Leishmania* spp. Tal fato leva a supor uma provável presença de parasitos também na pele do animal, de modo que ele poderia atuar como um possível reservatório de *Leishmania* na região em que foi encontrado.

A detecção de *Leishmania* spp. em marsupiais é descrita em inúmeros estudos (CARDOSO et al., 2015; FERREIRA et al., 2015; QUINTAL et al., 2011; HUMBERG et al., 2012; LIMA et al., 2013; ROQUE; JANSEN, 2014), entretanto, até o momento não há na literatura relatos de infecção natural por *Leishmania* spp. em indivíduos da espécie *G. microtarsus*, sendo essa a primeira descrição no Brasil. Foram encontrados 12 marsupiais infectados, sendo 25% (3/12) deles acometidos pela *L. infantum* (Tabela 5) e os demais 75% (9/12) por *Leishmania* spp. Esses indivíduos foram capturados nos estratos solo e arbóreo da região de mata, corroborando com o estudo que descreve que *G. microtarsus* é um marsupial essencialmente arborícola, cujo deslocamento no habitat é vertical, ocupando principalmente as camadas superiores da floresta, embora possa ocorrer no sub-bosque ou até mesmo no solo (VIEIRA; CAMARGO, 2012). Essas características possibilitam afirmar que o vetor está

circulando em ambos os estratos florestais e que esses animais, necessariamente, foram infectados no interior da mata, uma vez que não se deslocam horizontalmente.

Os marsupiais infectados por *L. infantum* foram capturados nas áreas 1, 6 e 7, que se localizam nos municípios de Itambé e Itapetinga (Figura 1). Apesar desses municípios não serem endêmicos para a LV, no ano de 2018 foi registrado um caso humano autóctone da doença em Itapetinga (SUVISA, 2020). Nesse mesmo ano ocorreu a captura de todos os animais infectados por *Leishmania* spp. desse estudo, inclusive daqueles por *L. infantum*. Esses dados confirmam a presença do vetor e do parasita nos municípios estudados. Adicionalmente, essas evidências sugerem que os ciclos de transmissão são independentes para cada área, uma vez que a distância mínima entre as áreas onde ocorreram as capturas é de 8 km, impossibilitando que o flebotomíneo voe de uma área para outra, tendo em vista que sua extensão de vôo é de, no máximo, um quilômetro (MORRISON et al. 1993).

Lutzomyia longipalpis é o principal vetor da *L. infantum* e encontra-se distribuído em quase todo o estado da Bahia, tendo sido a espécie mais prevalente dos flebotomíneos (42,78%) entre os anos de 2009 a 2012 (RODGERS et al., 2019), com ocorrência registrada no município de Itapetinga (LIMA, 2010). Estudos indicam que a proliferação de flebotomíneos é maior na estação chuvosa (BRANDÃO-FILHO et al., 2003), sendo evidenciado por estudos ecológicos de flebotomíneos na Bahia que indicaram que a densidade populacional desses insetos, principalmente *L. longipalpis*, aumenta após o final dessa estação (SHERLOCK, 1996). Apesar do fato de que todos os animais encontrados infectados deste estudo tenham sido capturados na estação seca, época em que a proliferação de mosquitos é menor, nós identificamos a presença do parasita no hospedeiro, o que não quer dizer que a infecção tenha que ter ocorrido nesta estação, pois seu curso pode ser prolongado.

Embora os cães sejam considerados os principais reservatórios de *L. infantum* no Brasil, o papel do marsupial *Didelphis* spp. como reservatório silvestre é sugerido por diversos autores, ressaltando-se que a sinantropia desses animais auxilia na conexão entre os ambientes silvestres e peridomésticos (QUINTAL et al., 2011; CARREIRA et al., 2012; HUMBERG et al., 2012; ROQUE; JANSEN, 2014; CARREIRA et al., 2017). O fato de ter sido encontrado DNA de *Leishmania* spp. em um número expressivo de indivíduos da espécie *G. microtarsus* é um forte indício de que esses animais possam atuar como fontes de infecção para os vetores, entretanto, são necessários estudos utilizando xenodiagnóstico com indivíduos dessa espécie e com os vetores competentes da região, a fim de comprovar a sua infecciosidade para esses vetores (LIMA et al., 2013).

Por fim, esses resultados sugerem que os seres humanos que habitam em casas situadas próximas aos fragmentos das matas 1, 6 e 7 estão susceptíveis a se infectarem com o agente da LV, uma vez que fêmeas de *L. longipalpis* conseguem se deslocar de 250 metros a 1 quilômetro de distância (MORRISON et al. 1993) e têm sido encontradas no intradomicílio e peridomicílio (MOTA et al., 2019). Essas áreas são antropizadas, com evidências de desmatamento, contendo casas e presença constante de seres humanos, cães e demais animais domésticos em seu interior e também nos arredores. Apesar de a Secretaria da Saúde do Estado da Bahia não ter relatado a infecção por *L. infantum* em cães na região estudada, esses animais também estão susceptíveis à infecção e considerados importantes reservatórios nos ambientes doméstico e silvestre (QUINNELL; COURTENAY, 2009) quando criados de forma livre (como no presente estudo). O mesmo pode estar ocorrendo com os indivíduos da espécie *Didelphis* spp., que embora não tenham sido encontrados infectados nesse estudo, também são susceptíveis à infecção, e além disso foram capturados em todas as áreas (Tabela 3). Uma vez infectados, esses marsupiais podem atuar como reservatórios silvestres e, por serem animais sinantrópicos, auxiliar na transmissão do agente no ambiente silvestre e peridoméstico (CARREIRA et al., 2017). De acordo com Quinnell e Courtenay (2009), os ciclos de transmissão silvestre e peridomicilar, bem como seus hospedeiros silvestres e domésticos estão relacionados, atuando de maneira conjunta e intensificando a transmissão do agente para os seres humanos.

A possibilidade de pelo menos duas espécies de mamíferos silvestres de diferentes gêneros participarem do ciclo de transmissão de *Leishmania* spp. na região estudada demonstra o quanto os ciclos enzóticos desse parasita são complexos, sendo considerado um enigma com diversas peculiaridades ainda não descobertas (ROQUE; JANSEN, 2014). Por fim, a antropização das áreas amostradas neste estudo pode modificar a dinâmica de transmissão de patógenos e proporcionar o aparecimento de zoonoses como a LV e LT (OSTFELD; KEESING, 2012; TRÜEB et al., 2018).

5.5 CONCLUSÃO

Este estudo aborda o primeiro relato da infecção natural de *N. lasiurus* no estado da Bahia. O *G. microtarsus* é um hospedeiro de *Leishmania* spp. e *L. infantum*, sendo esse o primeiro relato do Brasil nessa espécie. Isso evidencia que o parasita está circulando entre os vetores e os reservatórios silvestres nos fragmentos de Mata Atlântica, havendo risco de

transmissão de *Leishmania* spp. para os seres humanos e animais domésticos que possuem um estreito convívio com os fragmentos de mata da região.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, I. C. L.; COSTA, A. P.; GENNARI, S. M.; MARCILI, A. Survey of *Trypanosoma* and *Leishmania* in Wild and Domestic Animals in an Atlantic Rainforest Fragment and Surroundings in the State of Espírito Santo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 3, p. 686–693, 2014.
- ACOSTA, N.; LÓPEZ, E.; LEWIS, M. D.; LLEWELLYN, M. S.; GÓMEZ, A.; ROMÁN, F.; MILES, M. A.; YEO, M.; Hosts and vectors of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in the Chagas disease endemic region of the Paraguayan Chaco. **Parasitology**, v. 144, p. 884–898, 2017.
- AFONSO, M. M. S.; DUARTE, R.; MIRANDA, J. C.; CARANHA, L.; RANGEL, E. F. Studies on the Feeding Habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Populations from Endemic Areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 1-5, 2012.
- AKHOUNDI, M.; DOWNING, T.; VOTÝPKA, J.; KUHL, K.; LUKES, J.; CANNET, A.; RAVEL, C.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; KASBARI, M.; GRANOUILAC, B.; GRADONI, L.; SERENO, D. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 57, p. 1-29, 2017.
- ALMEIDA, A. J.; TORQUETTI, C. G.; TALAMONI, S. A. Use of space by neotropical marsupial *Didelphis albiventris* (Didelphimorphia: Didelphidae) in an urban forest fragment. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 2, p. 214–219, 2008.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, J.; THE WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ALVARADO-OTEGUI, J. A.; CEBALLOS, L. A.; OROZCO, M. M.; ENRIQUEZ, G. F.; CARDINAL, M. V.; CURA, C.; SCHIJMAN, A. G.; KITRON, U.; GÜRTLER, R. E. The sylvatic transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* in a rural area in the humid Chaco of Argentina. **Acta Tropica**, v. 124, p. 79–86, 2012.
- ALVES, C. R.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M.; MELLO, C. B.; GARCIA, E. S.; NOGUEIRA, N. F.; BOURGUINGNON, S. C.; SOUZA, W.; AZAMBUJA, P. GONZALEZ, M. S. *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 44–52, 2007.
- ALTEN, B.; MAIA, C.; AFONSO, M. O.; CAMPINO, L.; JIMÉNEZ, M.; GONZÁLEZ, E.; MOLINA, R.; BAÑULS, A. L.; PRUDHOMME, J.; VERGNES, B.; TOTY, C.; CASSAN, C.; RAHOLA, N.; THIERRY, M.; SERENO, D.; BONGIORNO, G.; BIANCHI, R.; KHOURY, C.; TSIRIGOTAKIS, N.; DOKIANAKIS, E.; ANTONIOU, M.; CHRISTODOULOU, V.; MAZERIS, A.; KARAKUS, M.; OZBEL, Y.; ARSERIM, S. K.; ERISOZ KASAP, O.; GUNAY, F.; OGUZ, G.; KAYNAS, S.; TSERTSVADZE, N.; TSKHVARADZE, L.; GIORGOBIANI, E.; GRAMICCIA, M.; VOLFF, P.; GRADONI, L. Seasonal dynamics of phlebotomine sand fly species proven vectors of Mediterranean

Leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004458, 2016.

ANDRADE, M. S.; COURTENAY, O.; BRITO, M. E. F.; CARVALHO, F. G.; CARVALHO, A. W. S.; SOARES, F.; CARVALHO, S. M.; COSTA, P. L.; ZAMPIERI, R.; FLOETER-WINTER, L. M.; SHAW, J. J.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Infectiousness of Sylvatic and Synanthropic Small Rodents Implicates a Multi-host Reservoir of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004137, 2015.

ARAÚJO, C. A. C.; WANIEK, P. J.; XAVIER, S. C. C.; JANSEN, A. M. Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 308–312, 2011.

ARAÚJO, R. F.; MENDONÇA, V. J.; ROSA, J. A.; MATOS, J. F. M.; LIMA, S. C. R.; FIGUEIREDO, M. A. A. Description of a newly discovered *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Foci in Ibipeba, State of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 4, p. 513-516, 2014.

AREGAWI, W. G.; AGGA, G. E.; ABDI, R. D.; BÜSCHER, P. Systematic review and meta-analysis on the global distribution, host range, and prevalence of *Trypanosoma evansi*. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 67, 2019.

ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doenças de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro: Editora Imperial Novo Milênio, 2008, 65p.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

ASHFORD, R. W. What it takes to be a reservoir host. **The Belgian Journal of Zoology**, v. 127, n. 1, p. 85–90, 1997.

AZEVEDO, A. CR.; VILELA, M. L.; SOUZA, N. A.; ANDRADE-COELHO, C. A.; BARBOSA, A. F.; FIRMO, A. LS.; RANGEL, E. F. The Sand Fly Fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of a Focus of Cutaneous Leishmaniasis in Ilhéus, State of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 75-79, 1996.

BARRETT, T. V.; HOFF, R.; MOTT, K. E.; GUEDES, F.; SHERLOCK, I. A. An outbreak of acute Chagas's disease in the Sao Francisco Valley region of Bahia, Brazil: triatomine vectors and animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 6, p. 703-709, 1979.

BARRETT, T. V.; HOFF, R. H.; MOTT, K. E.; MILES, M. A.; GODFREY, D. G.; TEIXEIRA, R.; ALMEIDA DE SOUZA, J. A. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 1, p. 84-89, 1980.

BARROS, J. H. S.; XAVIER, S. C. C.; BILAC, D.; LIMA, V. S.; DARIO, M. A.; JANSEN, A. M. Identification of novel mammalian hosts and Brazilian biome geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcIII and TcIV. **Acta Tropica**, v. 172, p. 173–179, 2017.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BAUTISTA-LÓPEZ, N. L.; NDAO, M.; CAMARGO, F. V.; NARA, T.; ANNOURA, T.; HARDIE, D. B.; BORCHERS, C. H.; JARDIM, A. Characterization and diagnostic application of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote excreted-secreted antigens shed in extracellular vesicles released from infected mammalian cells. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 744-758, 2017.

BAYÃO, T. S.; CUPERTINO, M. C.; MAYERS, N. A. J.; SIQUEIRA-BATISTA, R. A systematic review of the diagnostic aspects and use of *Trypanosoma rangeli* as an immunogen for *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 53, p. 1-7, 2020.

BENASSI, J. C.; BENVENGA, G. U.; FERREIRA, H. L.; SOARES, R. M.; SILVA, D. T.; PEREIRA, V. F.; RUIZ, V. L. A.; OLIVEIRA, T. M. F. S. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in horses from an endemic area for canine visceral leishmaniasis in southeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 6, p. 1058-1063, 2018.

BERN, C.; KJOS, S.; YABSLEY, M. J.; MONTGOMERY, S. P. *Trypanosoma cruzi* and Chaga's Disease in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, n.4, p.665-681, 2011.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asiangenotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n.9, p. 4172-4177, 2003.

BOGGIATTO, P. M.; GIBSON-CORLEY, K. N.; METZ, K.; GALLUP, J. M.; HOSTETTER, J. M.; MULLIN, K.; PETERSEN, C. A. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, p. e1019, 2011.

BOGGILD, A. K.; RAMOS, A. P.; ESPINOSA, D.; VALENCIA, B. M.; VELAND, N.; MIRANDA-VERASTEGUI, C.; AREVALO, J.; LOW, D. E.; LLANOS-CUENTAS, A. Clinical and demographic stratification of test performance: a pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for American cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 345-350, 2010.

BONVICINO, C. R.; LIMA, J. F. S.; ALMEIDA, F. C. A new species of *Calomys* Waterhouse (Rodentia, Sigmodontinae) from the Cerrado of Central Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 2, p. 301-307, 2003.

BONVICINO, C. R., LINDBERGH, S. M., & L. S. MAROJA. Small non-flying mammals from conserved and altered areas of Atlantic Forest and Cerrado: comments on their potential use for monitoring environment. *Brazilian Journal of Biology*, v. 62, n. 4, p.765-774, 2002.

BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J. A.; D'ANDREA, P. S. **Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos**. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa – OPAS/OMS, 2008. 120 p.

BORDES, F.; BLASDELL, K.; MORAND, S. Transmission ecology of rodent-borne diseases: New frontiers. **Integrative Zoology**, v. 10, p. 424–435, 2015.

BORJA, L. S.; COELHO, L. B.; JESUS, M. S.; QUEIROZ, A. T. L.; CELEDON, P. A. F.; ZACHIN, N. I. T.; SILVA, E. D.; FERREIRA, A. G. P.; KRIEGER, M. A.; VERAS, P. S. T.; FRAGA, D. B. M. High accuracy of an ELISA test based in a agella antigen of *Leishmania* in serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis with potential to improve the control measures in Brazil – A Phase II study. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1-8, 2018.

BRANDÃO, E. M. V.; XAVIER, S. C. C.; CARVALHAES, J. G.; D'ANDREA, P. S.; LEMOS, F. G.; AZEVEDO, F. C.; CÁSSIA-PIRES, R.; JANSEN, A. M.; ROQUE, A. L. R. Trypanosomatids in small mammals of na agroecosystem in Central Brazil: another piece in the puzzle of parasite transmission in an anthropogenic landscape. **Pathogens**, v. 8, n. 4, p. 190, 2019.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; BRITO, M. E.; CARVALHO, F. G.; ISHIKAWA, E. A.; CUPOLILLO, E.; FLOETER-WINTER, L.; SHAW, J. J. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.

BRASIL. **Leishmaniose Tegumentar (LT): o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**, 2019. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar#epidemiologia>>. Acesso em: 14 jul. 2019.

BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: Morfologia e Ciclo Evolutivo. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1997. cap. 2, p.25-30.

BRENIÈRE, S. F.; WALECKX, E.; BARNABÉ, C. Over six thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into discrete typing units (DTUs): attempt at an inventory. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004792, 2016.

BRITO, C.; MOREIRA, O. **Diagnóstico molecular da doença de Chagas**. 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/diagnostico/>>. Acesso em: 1 mar. 2019.

BRITO, M. E. F.; ANDRADE, M. S.; DANTAS-TORRES, F.; RODRIGUES, E. H. G.; CAVALCANTI, M. P. C.; ALMEIDA, A. M. P.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 425-429, 2012.

CABALLERO, Z. C.; SOUSA, O. E.; MARQUES, W. P.; SAEZ-ALQUEZAR, A.; UMEZAWA, E. S. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 8, p. 1045-1049, 2007.

- CABRERA, M. A. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A. B.; MARZOCHI, M. C. A.; XAVIER, S. C.; DA SILVA, A. V. M.; JANSEN, A. M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 2, p. 79–83, 2003.
- CALDART, E. T.; FREIRE, R. L.; FERREIRA, F. P.; RUFFOLO, B. B.; SBEGHEN, M. R.; MAREZE, M.; GARCIA, J. L.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T. *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 1, p. 17-27, 2017.
- CÂMARA, E. M. V. C.; OLIVEIRA, L. C.; MEYER, R. L. Occurrence of the mouse opossum, *Marmosops incanus* in Cerrado "Stricto sensu" area, and new locality records for the Cerrado and Caatinga biomes in Minas Gerais State, Brazil. **Mammalia**, v. 67, n. 4, p. 617-619, 2003.
- CAMPINO L., MAIA C. The Role of Reservoirs: Canine Leishmaniasis. In: PONTE-SUCRE, A.; DÍAZ, E.; PADRÓN-NIEVES, M. **Drug Resistance in Leishmania Parasites**. New York: Springer, 2013. p. 45-64.
- CANALE, G. R.; PERES, C. A.; GUIDORIZZI, C. E.; GATTO, C. A. F.; KIERULFF, M. C. M. pervasive defaunation of forest remnants in a tropical biodiversity hotspot. **Plos One**, v. 7, n. 8, p. e41671, 2012.
- CARDOSO, R. M.; ARAÚJO, N. N. S. L.; ROMERO, G. A. S.; SOUZA, T. T. C. M.; DIETRICH, A. G.; MENDES, J. D.; REIS, M. L.; FERREIRA, J. B. C.; HECHT, M. M.; GONÇALVES, R. G. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. **Parasites e Vectors**, v. 8, n. 171, p. 1-8, 2015.
- CARREIRA, J. C. A.; MAGALHÃES, M. A. F. M.; BRAZIL, R. P.; SILVA, A. V. M. *Leishmania* in Marsupials—An Overview of Infection Records in the Americas and Australia. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 7, p. 315-343, 2017.
- CARREIRA, J. C. A.; SILVA, A. V. M.; PEREIRA, D. D.; BRAZIL, R. P. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 111, p. 1-5, 2012.
- CARVALHO, S. M. S.; SANTOS, P. R. B.; LANZA, H.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Diversidade de flebotomíneos no Município de Ilhéus, Bahia. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 19, n. 3, p. 239-244, 2010.
- CÁSSIA-PIRES, R.; BOITÉ, M. C.; D'ANDREA, P. S.; HERRERA, H. M.; CUPOLILLO, E.; JANSEN, A. M.; ROQUE, A. L. R. Distinct *Leishmania* species infecting wild caviomorph rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. **Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. e3389, 2014.
- CAVAZZANA JR, M.; MARCILI, A.; LIMA, L.; SILVA, F. M.; JUNQUEIRA, A. C. V.; VELUDO, H. H.; VIOLA, L. B.; CAMPANER, M.; NUNES, V. L. B.; PAIVA, F.; COURA, J. R.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of

trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 3, p. 345–355, 2010.

CEOTTO, P.; FINOTTI, R.; SANTORI, R.; CERQUEIRA, R. Diet variation of the marsupials *Didelphis aurita* and *Philander frenatus* (Didelphimorphia, Didelphidae) in a rural area of Rio de Janeiro State, Brazil. **Mastozoologia Neotropical**, v. 16, n. 1, p. 49-58, 2009.

CERUTTI, P. H. P.; LOPES, C. G.; FILHO, F. G. L.; GUEDES, V. R. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana: uma revisão de literatura. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 55-59, 2017.

CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais**. Brasília: Conselho Federal de Medicina Veterinária. 2013. 66p.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHAPPUIS, C. F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

CLIMATE-DATA.ORG. **Clima Itapetinga**. Disponível em: <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/bahia/itapetinga-1071/>. Acesso em: 13 jan. 2020.

CONTRERAS, I. K.; MACHADO, M. A.; ROCHA, C. O. J. M.; OLIVEIRA, G. R.; CARVALHO, F. C. G. Sinais clínicos apresentados por cães positivos para leishmaniose visceral no município de Vassouras, Rio de Janeiro. **PubVet – Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 13, n. 4, p. 1-6, 2019.

COOPER, C.; THOMPSON, R. C. A.; BOTERO, A.; KRISTANCIC, A.; PEACOCK, C.; KIRILAK, Y.; PEACOCK, C.; KIRILAK, Y.; CLODE, P. L. A comparative molecular and 3-dimensional structural investigation into crosscontinental and novel avian *Trypanosoma* spp. in Australia. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 234, p. 1–13, 2017.

COSTA, A. P.; COSTA, F. B.; SOARES, H. S.; RAMIREZ, D. G.; MESQUITA, E. T. K. C.; GENNARI, S. M.; MARCILI, A. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum chagasi* infection in wild mammals from Maranhão State, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 1, p. 656-666, 2015.

COSTA, A. P.; FERREIRA, J. I. G. S.; SILVA, R. E.; TONHOSOLO, R.; ARAÚJO, A. C.; GUIMARÃES, M. F.; HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; MARCILI, A. *Trypanosoma cruzi* in triatomines and wild mammals in the National Park of Serra das Confusões, Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 4, p. 445-451, 2018.

COSTA, L. P.; LEITE, Y. L.; DA FONSECA, G. A.; DA FONSECA, M. T. Biogeography of South American forest mammals: endemism and diversity in the Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 32, n. 4, p. 872-881, 2000.

COSTA, P. C.; COSTA, F. B.; SOARES, H. S.; RAMIREZ, D. G.; MESQUITA, E. T. K. C.; GENNARI, S. M.; MARCILI, A. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum chagasi* infection in wild mammals from Maranhão State, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 11, p. 656-666, 2015.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v.115, p.5-13, 2010.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 104, n. 1, p. 31-40, 2009.

COURA, J. R.; MOREIRA, C. J. C.; JUNQUEIRA, A. C. V. A doença de Chagas na região Amazônica. **Instituto Oswaldo Cruz**, 2012.

COURA, J.R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions—A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature/ Outlooks*, 2010.

COVA, B. O., FONSECA, E. O. L., SANTOS, R. F., SANTOS, P. R. B., NATIVIDADE, M. S., WILL, R. M. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana no município de Ituberá, baixo sul da Bahia. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 39, n. 1, p. 105-124, 2015.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. 1354 p.

CURTIS-ROBLES, R.; LEWIS, B. C.; HAMER, S. A. High *Trypanosoma cruzi* infection prevalence associated with minimal cardiac pathology among wild carnivores in central Texas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.5, n.2, p.117-123, 2016.

DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 4, p. 155-159, 2011.

DAVAL, N.; MARCHAL, C.; GUILLAUMOT, L.; HÜE, T.; RAVEL, C.; KECK, N.; KASBARI, M. First report of autochthonous non-vectorial canine leishmaniasis in New Caledonia, south-western Pacific: implications for new control measures and recommendations on importation of dogs. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 108, p. 1-9, 2016.

DATASUS. **Leishmaniose Tegumentar Americana - casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação - Bahia**, 2019a. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/ItaBA.def>>. Acesso em: 16 ago. 2019.

DATASUS. **Leishmaniose Visceral - casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação – Bahia**, 2019b. Disponível em: <

<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvBA.def>>. Acesso em: 16 ago. 2019.

DEANE, M. P.; JANSEN, A. M.; LENZI, H.L. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host the opossum *Didelphis marsupialis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 513-515, 1984.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239-243, 2001.

DESQUESNES, M.; DARGANTES, A.; LAI, D-H.; LUN, Z-R.; HOLZMULLER, P.; JITTAPLAPONG, S. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. **BioMed Research International**, v. 3, p. 194176, 2013.

DEVILLERS, H.; LOBRY, J. R.; MENU, F. An agent-based model for predicting the prevalence of I and II in their host and vector populations. **Journal of Theoretical Biology**, v. 255, n. 3, p. 307–315, 2008.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Epidemiologia. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. p. 33-65.

DIAS, J. C. P. Epidemiology of Chagas disease. In: WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M. E.; RASSI, A. **Chagas Disease - American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992. 271p.

DIAS, J. C. P.; Jr, A. N. R.; Gontijo, E. D.; Luquetti, A.; Shikanai-Yasuda, M. A.; Coura, J. R.; Torres, R. M.; Melo, J. R. C.; Almeida, E. A.; Jr, W. O.; Silveira, A. C.; Rezende, J. M.; Pinto, F. S.; Ferreira, A. W.; Rassi, A.; Filho, A. A. F.; Sousa, A. S.; Filho, D. C.; Jansen, A. M.; Andrade, G. M. Q.; Britto, C. F. P. C.; Pinto, A. Y. N.; Jr, A. R.; Campos, D. E.; Abad-Franch, F.; Santos, S. E.; Chiari, E.; Hasslocher-Moreno, A. M.; Moreira, E. F.; Marques, D. S. O.; Silva, E. L.; Marin-Neto, J. A.; Galvão, L. M. C.; Xavier, S. S.; Valente, S. A. S.; Carvalho, N. B.; Cardoso, A. V.; Silva, R. A.; Costa, V. M.; Vivaldini, S. M.; Oliveira, S. M.; Valente, V. C.; Lima, M. M.; Alves, R. V. Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 7-86, 2016.

DIAS, J. C. P.; NETO, V. A.; LUNA, E. J. A. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 375-379, 2011.

DIAS-LIMA, A. G.; SHERLOCK, I. A. Sylvatic vectors invading houses and the risk of emergence of cases of Chagas disease in Salvador, State of Bahia, Northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 611-613, 2000.

- DIAS, R. C. F.; THOMAZ-SOCCOL, V.; PASQUALI, A. K. S.; ALBAN, S. M.; FENDRICH, R. C.; POZZOLO, E. M.; CHIYO, L.; JÚNIOR, A. B.; FERREIRA, F. P.; DESTO, S. S.; FREIRE, R. L.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T. Variables associated with the prevalence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in dogs on the tri-border of Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 27, n. 3, p.338-347, 2018.
- DÍAZ, A. G.; RAGONE, P. G.; RUSMAN, F.; FLORIDIA-YAPUR, N.; MARQUEZ, R. M.; DÍAZ, M. M.; TOMASINI, N.; DIOSQUE, P. A novel genotype and first record of *Trypanosoma lainsoni* in Argentina. **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 731, 2020.
- DI NOIA, J. M.; BUSCAGLIA, C. A.; DE MARCHI, C. R.; ALMEIDA, I. C.; FRASCH, A. C. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas disease is due to a single parasite lineage. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, p. 401–413, 2002.
- DNDI (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE). **Doença de Chagas**. 2019. Disponível em: < <https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>>. Acesso em: 14 ago. 2019.
- DOBIGNY, G; GAUTHIER, P.; HOUÉMÉNOU, G.; DOSSOU, H. J.; BADOU, S.; ETOUGBÉTCHÉ, J.; TATARD, C.; TRUC, P. Spatio-temporal survey of small mammal-borne *Trypanosoma lewisi* in Cotonou, Benin, and the potential risk of human infection. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 75, 2019.
- DOURADO, M. I. C.; NORONHA, C. V.; ALCANTARA, N.; ICHIHARA, M. Y. T.; LOUREIRO, S. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana e suas relações com a lavoura e o garimpo, em localidade do estado da Bahia (Brasil). **Revista de Saúde Pública**, v. 23, n. 1, p. 2-8, 1989.
- ECHCHAKERY, M.; CHICHARRO, C.; BOUSSAA, S.; NIETO, J.; CARRILLO, E.; SHEILA, O.; MORENO, J.; BOUMEZZOUGH, A. Molecular detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania tropica* in rodent species from endemic cutaneous leishmaniasis areas in Morocco. **Parasites and Vectors**, v. 10, p. 454, 2017.
- ENRIQUEZ, G. F.; CARDINAL, M. V.; OROZCO, M. M.; SCHIJMAN, A. G.; GÜRTLER, R. E. Detection of *Trypanosoma cruzi* infection in naturally infected dogs and cats using serological, parasitological and molecular methods. **Acta Tropica**, v. 126, n. 3, p. 211-217, 2013.
- EPSTEIN, P. R.; DOBSON, A. P.; VANDERMEER, J. Biodiversity and infectious emerging diseases: Integrating health and ecosystem monitoring. In: GRIFO, F.; ROSENTHAL, J. **Biodiversity and Human Health**. Island Press, 1997. p. 60-86.
- FERNANDES, O.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; PINHO, A. P.; MOREL, C. M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; JANSEN, A. M. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the nontranscribed spacer of the mini-exon gene. **Parasitology**, v. 118, n. 2, p. 161-166, 1999.

- FERREIRA, E. C.; CRUZ, I.; CAÑAVATE, C.; MELO, L. A.; PEREIRA, A. A. S.; MADEIRA, F. A. M.; VALÉRIO, S. A. N.; CUNHA, H. M.; PAGLIA, A. P.; GONTIJO, C. M. F. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 71, p. 1-7, 2015.
- FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 507-509, 2006.
- FERREIRA, M. G. P. A.; FATTORI, K. R.; SOUZA, F.; LIMA, V. M. F. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 150-154, 2009.
- FERREIRA, R. T. B.; CABRAL, M. L.; MARTINS, R. S.; ARAUJO, P. F.; SILVA, S. A.; BRITTO, C.; BRANQUINHO, M. R.; CARDARELLI-LEITE, P.; MOREIRA, O. C. Detection and genotyping of *Trypanosoma cruzi* from açai products commercialized in Rio de Janeiro and Pará, Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2018.
- FIDALGO, A. S. O. B. V.; COSTA, A. C.; FILHO, J. D. S.; CÂNDIDO, D. S.; FREITAS, E. C.; PEREIRA, L. S.; ANDRADE, M. C.; GOMES, K. C. M. S.; BEZERRA, C. M.; OLIVEIRA, M. F. Insect vectors of Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 2, p. 174-182, 2018.
- FRAGA, D. B. M.; PACHECO, L. V.; BORJA, L. S.; TUY, P. G. S. E.; BASTOS, L. A.; SOLCÀ, M. S.; AMORIM, L. D. A. F.; VERAS, P. S. T. The Rapid Test Based on *Leishmania infantum* Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2016.
- FREITAS, T. P. T.; D'ANDREA, P. S.; PAULA, D. A. J.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; BONVICINO, C. R.; ALMEIDA, A. B. P. F.; BOA-SORTE, E. C.; SOUSA, V. R. F. Natural Infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Mus musculus* captured in Mato Grosso, Brazil. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 1, p. 81-83, 2012.
- GALAVIZ-SILVA, G.; MERCADO-HERNÁNDEZ, R.; ZÁRATE-RAMOS, J. J.; MOLINA-GARZA, Z. J. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs and small mammals in Nuevo León, Mexico. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 49, n. 3, p. 216-223, 2017.
- GALLUZZI, L.; CECCARELLI, M.; DIOTALLEVI, A.; MENOTTA, M.; MAGNANI, M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2018.
- GAMA, A.; ELIAS, J.; RIBEIRO, A. J.; ALEGRIA, N.; SCHALLIG, H. D. F. H.; SILVA, F.; SANTARÉM, N.; CARDOSO, L.; COTOVIO, M. Cutaneous leishmaniosis in a horse from northern Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 200, n. 1-2, p. 189-192, 2014.

GARCIA, E. S.; RATCLIFFE, N. A.; WHITTEN, M. M.; GONZALEZ, M. S.; AZAMBUJA, P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*–*Rhodnius prolixus* interactions. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 1, p. 11-21, 2007.

GARDNER, A. L. Genus *Marmosops*. In: GARDNER, A. L.; CREIGHTON, G. K. **Mammals of South America: Marsupials, Xenarthrans, Shrews and Bats**. Chicago: The University of Chicago, 2008. v.1, p.69.

GEISE, L.; ASTÚA, D. Distribution extension and sympatric occurrence of *Gracilinanus agilis* and *G. microtarsus* (Didelphimorphia, Didelphidae), with cytogenetic notes. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 4, p. 269-276, 2009.

GOMES, C. M.; PAULA, N. A.; MORAIS, O. O.; SOARES, K. A.; ROSELINO, A. M.; SAMPAIO, R. N. R. Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 5, p. 701-711, 2014.

GOMES, Y. M.; **Diagnóstico laboratorial – situação atual da doença de Chagas**. 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/diagnostico/>>. Acesso em: 1 mar. 2019.

GÓMEZ-HERNÁNDEZ, C.; BENTO, E. C.; REZENDE-OLIVEIRA, K.; NASCENTES, G. A. N.; BARBOSA, C. G.; BATISTA, L. R.; TIBURCIO, M. G. S.; PEDROSA, A. L.; LAGES-SILVA, E.; RAMÍREZ, J. D.; RAMIREZ, L. E. *Leishmania* infection in bats from a non-endemic region of Leishmaniasis in Brazil. **Parasitology**, v. 144, n. 14, p. 1980-1986, 2017.

GONÇALVES, R. G.; GALVÃO, C.; MENDONÇA, J.; NETO, E. M. C. **Guia de triatomíneos da Bahia**. Feira de Santana: UEFS Editora, 2012a. 112p.

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

GONTIJO, C. M. F., MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GRAÇA, G. C.; VOLPINI, A. C.; ROMERO, G. A. S.; NETO, M. P. O.; HUEB, M.; PORROZZI, R.; BOITÉ, M. C.; CUPOLILLO, E. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 664–674, 2012.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis in the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230–250, 1993.

GRISARD, E. C.; CARVALHO-PINTO, C. J.; SCHOLZ, A. F.; TOMA, H. K.; SCHLEMPER JR, B. R.; STEINDEL, M. *Trypanosoma cruzi* infection in *Didelphis*

marsupialis in Santa Catarina and Arvoredo Islands, Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 6, p. 795-800, 2000.

H Aidamak, J.; Shimada, M. K.; Klisiowicz, D. R.; Reifur, L. *Trypanosoma cruzi* vector infection rate is underestimated in some localities in the State of Bahia. **Revista de Patologia Tropical**, v. 45, n. 1, p. 55-65, 2016.

Hall, C. A.; Pierce, E.M.; Wimsatt, A. N.; Hobby-Dolbeer, T.; Meers, J. B. Virulence and vertical transmission of two genotypically and geographically diverse isolates of *Trypanosoma cruzi* in mice. **The Journal of Parasitology**, v. 96, n. 2, p. 371-376, 2010.

Hamilton, P. B.; Adams, E. R.; Malele, I. I.; Gibson, W. C. A novel, high-throughput technique for species identification reveals a new species of tsetse-transmitted trypanosome related to the *Trypanosoma brucei* subgenus, *Trypanozoon*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 1, p. 26-33, 2008.

Hamilton, P. B.; Lewis, M. D.; Cruickshank, C.; Gaunt, M. W.; Yeo, M.; Llewellyn, M. S.; Valente, S. A.; Silva, F. M.; Stevens, J. R.; Miles, M. A.; Teixeira, M. M. G. Identification and lineage genotyping of South American trypanosomes using fluorescent fragment length barcoding. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 44-51, 2010.

Henriksson, J.; Aslund, L.; Macina, R. A.; Cazzulo, B. M. F.; Cazzulo, J. J.; Frasch, A. C. C.; Pettersson, U. Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 42, n. 2, p. 213-224, 1990.

Hernández-Cortazar, I.; Guardia, K. C. A.; Torres-Castro, M.; Acostaviana, K.; Guzmán-Marín, E.; Chan-Pérez, J. I.; Ortega-Pacheco, A.; Rodríguez-Vivas, R. I.; Medina-Pinto, R.; Jiménez-Coello, M. Frequency of *Trypanosoma cruzi* infection in synanthropic and wild rodents captured in a rural community in Southeast of Mexico. **Veterinary Medicine International**, v. 2018, n. 1, p. 1-7, 2018.

Herrera, C. P.; Licon, M. H.; Nation, C. S.; Jameson, S. B.; Wesson, D. M. Genotype diversity of *Trypanosoma cruzi* in small rodents and *Triatoma sanguisuga* from a rural area in New Orleans, Louisiana. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 123, p. 1-9, 2015.

Herrera, H. M.; Dávila, A. M. R.; Norek, A.; Abreu, U. G.; Souza, S. S.; D'Andrea, P. S.; Jansen, A. M. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 263-275, 2004.

Herrera, L.; D'Andrea, P. S.; Xavier, S. C. C.; Mangiadi, R. H.; Fernandes, F.; Jansen, A. M. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra da Capivara' and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 5, p. 379-388, 2005.

Hoare, C. A. **The trypanosomes of mammals: a zoological monograph**. Blackwell Scientific Publications Oxford: United Kingdom, 1972. 749p.

HODIAMONT, C. J.; KAGER, P. A.; BART, A.; VRIES, H. J.; VAN THIEL, P. P. A. M.; LEENSTRA, T.; VRIES, P. J.; VAN VUGT, M.; GROBUSCH, M. P.; VAN GOOL, T. Species-directed therapy for leishmaniasis in returning travellers: a comprehensive guide. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 8, n. 5, p. e2832, 2014.

HUMBERG, R. M. P.; OSHIRO, E. T.; CRUZ, M. S. P.; RIBOLLA, P. E. M.; ALONSO, P. A.; FERREIRA, A. M. T.; BONAMIGO, R. A.; JR, N. T.; OLIVEIRA, A. G. Short Report: *Leishmania chagasi* in opossums (*Didelphis albiventris*) in an urban area endemic for visceral leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 3, p. 470–472, 2012.

HUTCHINSON, R.; STEVENS, J. R. Barcoding in trypanosomes. **Parasitology**, v. 145, p. 563–573, 2018.

INEMA. **Mapa do relevo da Bahia**, 2014. Disponível em: <http://www.inema.ba.gov.br/wp-content/files/MTematico_relevo.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2019.

INPE. **INPE estima 5.843 km² desmatados na Amazônia em 2013**, 2013. Disponível em: <http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=3443>. Acesso em: 16 ago. 2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORESTAS (IBF). **Bioma Mata Atlântica**, 2019. Disponível: <<https://www.ibflorestas.org.br/bioma-mata-atlantica>>. Acesso em: 17 ago. 2019.

JANSEN, A. M.; PINHO, A. P. S.; LISBOA, C. V.; CUPOLILLO, E.; MANGIA, R. H.; FERNANDES, O. The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still unsolved puzzle. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 203-204, 1999.

JANSEN, A. M.; ROQUE, A. L. R. Domestic and wild mammalian reservoirs. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. **American Trypanosomiasis**. Elsevier, p. 249-276, 2010.

JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. C.; ROQUE, A. L. R. Ecological aspects of *Trypanosoma cruzi*: wild hosts and reservoirs. **American Trypanosomiasis Chagas Disease**, 2^a ed, p. 243-264, 2017.

JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. C.; ROQUE, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-25, 2018.

KAR, K. Serodiagnosis of Leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 123-152, 1995.

LACERDA, L. C; SILVA, A. N.; FREITAS, J. S.; CRUZ, R. D. S.; SAID, R. A.; MUNHOZ, A. D. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus: frequency and associated factors in cats in northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.16, n. 2, 2017.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

- LAINSON, L.; SHAW, J. J.; FRAIHA, H. Chagas's Disease in the Amazon Basin: I. *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Pará north Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 193-204, 1979.
- LEMOS, M.; FERMINO, B. R.; SIMAS-RODRIGUES, C.; HOFFMANN, L.; SILVA, R.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G.; SOUTO-PADRÓN, T. Phylogenetic and morphological characterization of trypanosomes from Brazilian armoured catfishes and leeches reveal high species diversity, mixed infections and a new fish trypanosome species. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 573, p. 1-17, 2015.
- LENT, H.; WYGODZINSKY, P. W. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **American Museum of Natural History**, v. 163, n. 3, 1979.
- LIMA, A. D. Animais vetores. In: BRAZIL, T. K. **Catálogo de fauna silvestre de importância médica na Bahia**. Salvador: EDUFBA, 2010. p. 107.
- LIMA, B. S.; DANTAS-TORRES, F.; CARVALHO, M. R.; MARINHO-JUNIOR, J. F.; ALMEIDA, E. L.; BRITO, M. E. F.; GOMES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in north-eastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 9, p. 592-597, 2013.
- LIMA, V. S.; INIGUEZ, A. M.; OTSUKI, K.; FERREIRA, L. F.; ARAÚJO, A.; VICENTE, A. C. P.; JANSEN, A. M. Chagas disease in ancient hunter-gatherer population, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 1001-1002, 2008.
- LINARDI, P. M.; BOTELHO, J. R. Prevalence of *Trypanosoma lewisi* in *Rattus norvegicus* from Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 3, p. 411-414, 2002.
- LOPES, C. M. T.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; PAVAN, M. G.; PEREIRA, M. C. D. S.; ROQUE, A. L. R. *Trypanosoma janseni* n. sp. (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) isolated from *Didelphis aurita* (Mammalia: Didelphidae) in the Atlantic Rainforest of Rio de Janeiro, Brazil: integrative taxonomy and phylogeography within the *Trypanosoma cruzi* clade. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 1, p. 45-55, 2018.
- LORETTO, D.; VIEIRA, M. V. Use of space by the marsupial *Marmosops incanus* (Didelphimorphia, Didelphidae) in the Atlantic Forest, Brazil. **Mammalian Biology**, v. 73, p. 255-261, 2008.
- LUCIANO, R. M.; LUCHEIS, S. B.; TRONCARELLI, M. Z.; LUCIANO, D. M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.46, n.3, p.181-197, 2009.
- LUN, Z. R.; WEN, Y. Z.; UZUREAU, P.; LECORDIER, L.; LAI, D. H.; LAN, Y. G.; DESQUESNES, M.; GENG, G. Q.; YANG, T. B.; ZHOU, W. L.; JANNIN, J. G.; SIMARRO,

P. P.; TRUC, P.; VINCENDEAU, P.; PAYS, E. Resistance to normal human serum reveals *Trypanosoma lewisi* as an underestimated human pathogen. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 1999, n. 1-2, p. 58–61, 2015.

LUQUETTI, A.O.; RASSI, A. Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi e doença de Chagas***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.344 – 378.

MACEDO, A. M.; MARTINS, M. S.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J. DNA Fingerprints of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 55, n. 1-2 p. 147-154, 1992.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis?. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 8, p. 341-344, 2011.

MAIA DA SILVA, F.M.; JUNQUEIRA, A. C. V.; CAMPANER, M.; RODRIGUES, A. C.; CRISANTE, G.; RAMIREZ, L. E.; CABALLERO, C. E.; MONTEIRO, F. A.; COURA, J. R.; ANEZ, N.; TEIXEIRA, M. M. G. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 3361–3373, 2007.

MAIA DA SILVA, F.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A. C. V.; COURA, J. R.; AÑEZ, N.; SHAW, J. J.; STEVENS, J. R.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 129, n. 5, p. 549 561, 2004.

MAIA DA SILVA, F.; RODRIGUES, A. C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S.; BRIGIDO, M. C.; JUNQUEIRA, A. C.; COURA, J. R.; TAKEDA, G. F.; SHAW, J. J.; TEIXEIRA, M. M. G. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. **Parasitology**, v. 128, n. 3, p. 283-294, 2004a.

MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. The epidemiology, clinical manifestations and management of Chagas heart disease. **Clinical Cardiology**, v. 38, n. 9, p. 565-569, 2015.

MARAGHI, S.; WALLBANKS, K. R.; MOLYNEUX, D. H. Oral transmission of Trypanosomes of the subgenus *Herpetosoma* from small mammals. **Parasitology Research**, v. 81, p. 693-695, 1995.

MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA, M.; JR; JUNQUEIRA, A. C. V.; VELUDO, H. H.; MAIA DA SILVA, F.; CAMPANER, M.; PAIVA, F.; NUNES, V. L. B.; TEIXEIRA, M. M. G. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, n. 6, p. 641–655, 2009.

MARCILI, A.; LIMA, L.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A.; BATISTA, J. S.; JUNQUEIRA, A. C. V.; SOUZA, A. I.; DA ROSA, J. A.; CAMPANER, M.; LEWIS, M. D.; LLEWELLYN, M. S.; MILES, M. A.; TEIXEIRA, M. M. G. Comparative phylogeography of

Trypanosoma cruzi TCIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 1265–1274, 2009a.

MARIALVA, E. F. **Bionomia de *Migonemyia migonei* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) em condições experimentais**. 2019. 73f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, 2019.

MAROLI, M.; FELICIANGLI, M. D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R. N.; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013.

MARTINS, A. L. G. P.; BARRETO, J. A.; LAURIS, J. R. P.; MARTINS, A. C. G. P. American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 1. p. 52-58, 2014.

MARTINS, E. G.; BONATO, V. On the diet of *Gracilinanus microtarsus* (Marsupialia, Didelphidae) in an Atlantic Rainforest fragment in southeastern Brazil. **Mammalian Biology**, v. 69, p. 58-60, 2004.

MARZOCHI, F.; COSTA, S. C. G. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 987–996, 2001.

MEDKOUR, H.; DAVOUST, B.; DULIEU, F.; MAURIZI, L.; LAMOUR, T.; MARIE, J.; MEDIANNIKOVID, O. Potential animal reservoirs (dogs and bats) of human visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in French Guiana. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 6, p. 1-15, 2019.

MELLO, D.A. Estudo populacional de algumas espécies de roedores do Cerrado (Norte do Município de Formosa, Goiás). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 40, p. 843–860, 1980.

MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 264, p. 1-8, 2016.

METZDORF, I. P.; JUNIOR, M. S. C. L.; MATOS, M. F. C.; FILHO, A. F. S.; TSUJISAKI, R. A. S.; FRANCO, K. G.; SHAPIRO, J. T.; BORGES, F. A. Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 166, p. 121-125, 2017.

MILES, M. A.; LLEWELLYN, M. S.; LEWIS, M. D.; YEO, M.; BALEELA, R.; FITZPATRICK, S.; GAUNT, M. W.; MAURICIO, I. L. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. **Parasitology**, v. 136, p. 1509–1528, 2009.

MILES, M. A.; SOUZA, A. A.; POVOA, M. M.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; TOYÉ, P. J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil. **Nature**, v. 272, p. 819-821, 1978.

MILLÁN, J.; TRAVAINI, A.; ZANET, S.; LÓPEZ-BAO, J. V.; TRISCIUOGLIO, A.; FERROGLIO, E.; RODRÍGUEZ, A. Detection of *Leishmania* DNA in wild foxes and associated ticks in Patagonia, Argentina, 2000 km south of its known distribution área. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 241, p. 1-7, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico**, v. 46, n. 21, p. 1-9, 2015. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/03/2014-020.pdf>>. Acesso em: 23 fev. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico**, v. 50, p. 1-10, 2019a. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/23/2018-025.pdf>>. Acesso em: 23 fev. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doença de Chagas: o que é, causas, sintomas, tratamento e prevenção**. 2019. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas>>. Acesso em: 21 ago. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância em Saúde**. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 773p. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_1ed_atual.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Visceral: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. 2019b. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 07 ago. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Tegumentar: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. 2019c. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar#epidemiologia>>. Acesso em: 14 ago. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**, p. 1-190, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Recomendações sobre o diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular para confirmação da doença de Chagas aguda e crônica. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 4, p. 475-478, 2013.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine Leishmaniosis -New Concepts And Insights On An Expanding Zoonosis:Part Two. **Trends Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 371-377, 2008.

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 365-368, 2008.

MONTGOMERY, S. P.; STARR, M. C.; CANTEY, P. T.; EDWARDS, M. S.; MEYMANDI, S. K. Neglected parasitic infections in the United States: Chagas disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.90, n. 5, p. 814-818, 2014.

MORAND, S.; BORDES, F.; CHEN, H-W.; CLAUDE, J.; COSSON, J-F.; GALAN, M.; CZIRJÁK, G. Á.; GREENWOOD, A.; LATINNE, A.; MICHAUX, J.; RIBAS, ALEXIS. Global parasite and *Rattus* rodent invasions: the consequences for rodent borne diseases. **Integrative Zoology**, v. 10, n. 5, p. 409-23, 2015.

MORENO, A. M. H. **Mecanismos de transmissão da doença de Chagas**. 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/transmissao/>>. Acesso em: 31 mai. 2020.

MOREIRA, O. C.; YADON, Z. E.; CUPOLILLO, E. The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: current status and perspectives. **Acta Tropica**, v. 184, p. 29-37, 2018.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. P.; MATTE, D. M.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 11, p. 6810-6814, 1980.

MORRISON, A. C.; FERRO, C.; MORALES, A.; TESH, R. B.; WILSON, M. L. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **Journal of Medicine and Entomology**, v. 30, p. 427-435, 1993.

MOTA, T. F.; SOUSA, O. M. F.; SILVA, Y. J.; BORJA, L. S.; LEITE, B. M. M.; SOLCÀ, M. S.; MELO, D. A.; BRODSKY, C. I.; DIAS, E. S.; VERAS, P. S. T.; FRAGA, D. B. M. Natural infection by *Leishmania infantum* in the *Lutzomyia longipalpis* population of an endemic coastal area to visceral leishmaniasis in Brazil is not associated with bioclimatic factors. **Neglected Tropical Diseases**, p. 1-17, 2019.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 4, p. 1561-1577, 2005.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

MORRISON, A. C.; FERRO, C.; TESH, R. B. Host preference of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American Visceral Leishmaniasis in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 68-75, 1993.

NAIFF, R. D.; BARRETT, T. V. *Trypanosoma (Megatrypanum) lainsoni* n. sp. from *Mesomys hispidus* (Rodentia: echimyidae) in Brazil: trypomastigotes described from experimentally infected laboratory mice. **Parasite**, v. 20, p.51, 2013.

NANTES, W. A. G.; BARRETO, W. T. G.; SANTOS, F. M.; MACEDO, G. C.; RUCCO, A. C.; ASSIS, W. O.; PORFÍRIO, G. E. O.; ANDRADE, G. B.; JANSEN, A. M. HERRERA, H. M. The influence of parasitism by *Trypanosoma cruzi* in the hematological parameters of the white ear opossum (*Didelphis albiventris*) from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 9, n. 24, p. 16-20, 2019.

NOYES, H. A.; STEVENS, J. R.; TEIXEIRA, M.; PHELAN, J.; HOLZ, P. A nested PCR for the ssrRNA gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in

wombats and kangaroos in Australia. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 331–339, 1999.

NUNES, C. M.; LIMA, V. M.; PAULA, H. B.; PERRI, S. H.; ANDRADE, A. M.; DIAS, F. E. F.; BURATTINI, M. N. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 153, n. 1-2, p. 19–23, 2008.

OLIFIERS, N.; GENTILE, R.; FISZON, J. T. Relation between small-mammal species composition and anthropic variables in the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n. 3, p. 495-501, 2005

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**, v. 129, p. 219–227, 2005.

OLIVEIRA, J. A.; BONVICINO, C. R. Rodentia. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Nelio R. dos Reis, 2006. cap 12, p.361.

OLIVEIRA, N. G. De “capital da pecuária” ao “sonho de pólo calçadista”: a constituição da estrutura urbana de Itapetinga, v.2, p. 65, 2003. Disponível em: <<https://portalseer.ufba.br/index.php/ppgau/article/view/1545/971>>. Acesso em: 24 jan. 2020.

OLIVEIRA, V. V. G.; ALVES, L. C.; JUNIOR, V. A. S. Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals. **Ciência Rural**, v. 45, n. 9, p. 1622-1628, 2013.

ORTIZ, P. A.; GARCIA, H. A.; LIMA, L.; DA SILVA, F. M.; CAMPANER, M.; PEREIRA, C. L.; JITTAPALAPONG, S.; NEVES, L.; DESQUESNES, M.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G. Diagnosis and genetic analysis of the worldwide distributed Rattus-borne *Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi* and its allied species in blood and fleas of rodents. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 63, p. 380–390, 2018.

OSTFELD R. S.; KEESING, F. Effects of host diversity on infectious disease. **The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, p. 157-182, 2012.

OTERO, A. C. S.; SILVA, V. O.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; SOUSA, C. B. P. Short report: occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 1, p. 128-131, 2000.

PAGLIA, A. P., FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M. S.; CHIARELLO, A. G.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, M. C. M.; MENDES, S. L.; TAVARES, V. C.; MITTERMEIER, R. A.; PATTON, J. L. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals, 2.ed. **Occasional Papers in Conservation Biology**, n. 6, p. 1-76, 2012.

PAIVA-CAVALCANTI, M.; REGIS-DA-SILVA, C. G.; GOMES, Y. M. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum*

infection: a mini-review. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 4, p. 537-542, 2010.

PAPADOGIANNAKIS, E.; SPANAKOS, G.; KONTOS, V.; MENOUNOS, P. G.; TEGOS, N.; VAKALIS, N. Molecular Detection of *Leishmania infantum* in Wild Rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 7-8, p. e23-e25, 2010.

PARDINI, R.; UMETSU, F. Effects of forest fragmentation on small mammals in an Atlantic Forest landscape. **Biota Neotropica**, v. 6, n. 2, p. 2567-2586, 2006.

PASSAMANI, P. Análise da comunidade de marsupiais em Mata Atlântica de Santa Teresa, Espírito Santo. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, v. 1, n. 12, p. 215-228, 2000.

PEREIRA, A. N. S.; FERREIRA, E. C.; LIMA, A. C. V. M. R.; TONELLI, G. B.; RÊGO, F. D.; PAGLIA, A. P.; ANDRADE-FILHO, J. D.; PAZ, G. F.; GONTIJO, C. M. F. Detection of *Leishmania* spp in silvatic mammals and isolation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from *Rattus rattus* in an endemic area for leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Plos One**, v. 12, n. 11, p. 1-9, 2017.

PETERSEN, C. A.; BARR, S. C. Canine Leishmaniasis in North America: Emerging or Newly Recognized? **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p. 1-11, 2009.

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A. B.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, v. 107, n. 1, p. 66-69, 2008.

PITTNER, E.; VOLTARELLI, E.; PERLES, T. F.; ARRAES, S. M. A. A.; SILVEIRA, T. G. V.; LONARDONI, M. V. C. Ocorrência de leishmaniose tegumentar em cães de área endêmica no Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 561-565, 2009.

QUARESMA, P. F.; RÊGO, F. D.; BOTELHO, H. A.; DA SILVA, S. R.; MOURA JÚNIOR, A. J.; TEIXEIRA NETO, R. G.; MADEIRA, F. M.; CARVALHO, M. B.; PAGLIA, A. P.; MELO, M. N.; GONTIJO, C. M. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 10, p. 579-585, 2011.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J. J.; SHAW, M. A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v. 122, n. 3, p. 253-261, 2001.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1915-1934, 2009.

- QUINTAL, A. P. N.; RIBEIRO, E. S.; RODRIGUES, F. P.; ROCHA, F. S.; FLOETER-WINTERD, L. M.; NUNES, C. M. *Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 176, v. 2-3, p. 112–119, 2011.
- RAMÍREZ, J. D.; HERNÁNDEZ, C.; MONTILLA, M.; ZAMBRANO, P.; FLÓREZ, A. C.; PARRA, E.; CUCUNUBÁ, Z. M. First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. **Zoonoses and Public Health**, v. 61, n.7, p. 477-479, 2014.
- RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 937-954, 2009.
- RASSI JR, A.; RASSI, S. G.; RASSI, A. Sudden death in Chagas' disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.76, n. 1, p. 86-96, 2001.
- READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 147-154, 2014.
- REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of american cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 61, n. 4, p. 530-541, 1999.
- REZENDE, M. B.; HERRERA, H. M.; CARVALHO, C. M. E.; CARVALHO ANJOS, E. A.; RAMOS, C. A. N.; ARAÚJO, F. R.; TORRES, J. M.; OLIVEIRA, C. E. Detection of *Leishmania* spp. in Bats from an Area of Brazil Endemic for Visceral Leishmaniasis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 6, p. 36-42, 2017.
- REY, L. **Parasitologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 856 p.
- RIBEIRO, F. C.; SCHUBACH, A. O.; MOUTA-CONFORT, E.; SCHUBACH, T. M. P.; MADEIRA, M. F.; MARZOCHI, M. C. A. Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. **Veterinary Parasitology**, v.148, n. 3-4, p 200-206, 2007.
- RIBEIRO, I.; SEVCSIK, A. M.; ALVES, F.; DIAP, G.; DON, R.; HARHAY, M. O.; CHANG, S.; PECOUL, B. New, improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.3, n. 7, p. e484, 2009.
- RIBEIRO JR, G.; GURGEL-GONÇALVES, R.; REIS, R. B.; SANTOS, C. G. S.; AMORIM, A.; ANDRADE, S. G.; REIS, M. G. Frequent house invasion of *Trypanosoma cruzi*-infected triatomines in a suburban area of Brazil. **Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, 2015.
- RIBEIRO, M.C.; MARTENSEN, A.C.; METZGER, J.P.; SCARANO, M.T.F.; FORTIN, M.J. The Brazilian Atlantic Forest: A shrinking biodiversity hotspot. In: ZACHOS, F. E.; HABEL, J. C. **Biodiversity Hotspots**. Alemanha: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2011. 500 p.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 292-297, 2000.

ROBERTSON, L. J.; UTAAKER, K. S.; GOYAL, K.; SEHGAL, R. Keeping parasitology under the one health umbrella. **Trends Parasitology**, v. 30, p. 369–372, 2014.

ROCHA, F. L.; ROQUE, A. L. R.; ARRAIS, R. C.; SANTOS, J. P.; LIMA, V. S.; XAVIER, S. C. C.; CORDEIR-ESTRELA, P.; D'ANDREA, P. S.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil. **Parasitology**, v. 140, 160–170, 2013.

ROCHA, F. L.; ROQUE, A. L. R.; LIMA, J. S.; CHEIDA, C. C.; LEMOS, F. G.; AZEVEDO, F. C.; ARRAIS, R. C.; BILAC, D.; HERRERA, H. M.; MOURA, G.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* infection in neotropical wild carnivores (Mammalia: Carnivora): at the top of the *T. cruzi* transmission chain. **Plos One**, v. 8, n. 7, p. 1-12, 2013.

ROCHA, R. G., FERREIRA, E., COSTA, B., MARTINS, I., LEITE, Y. L., COSTA, L. P., & C. FONSECA. Small mammals of the mid-Araguaia River in central Brazil, with the description of a new species of climbing rat. **Zootaxa**, v. 2789, n. 2789, p. 1-34, 2011.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of Kinetoplast DNA as a Tool in the Detection and Diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267-275, 1990.

RODGERS, M. S. M.; BAVIA, M. E.; FONSECA, E. O L.; COVA, B. O.; SILVA, M. M. N.; CARNEIRO, D. D. M. T.; CARDIM, L. L.; MALONE, J. B. Ecological niche models for sand fly species and predicted distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and visceral leishmaniasis in Bahia state, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 191, n. 2, p. 1-12, 2019.

RODRIGUES, M. S.; LIMA, L.; XAVIER, S. C. C.; HERRERA, H. M.; ROCHAD, F. L.; ROQUE, A. L. R.; TEIXEIRA, M. M. G. JANSEN, A. M. Uncovering *Trypanosoma* spp. diversity of wild mammals by the use of DNA from blood clots. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 8, p. 171-181, 2019.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v. 124, n. 5, p. 495-507, 2002.

ROJO, G.; SANDOVAL-RODRÍGUEZ, A.; LÓPEZ, A.; ORTIZ, S.; CORREA, J. P.; SAAVEDRA, M.; BOTTO-MAHAN, C.; CATTAN, P. E.; SOLARI, A. Within-host temporal fluctuations of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units: the case of the wild reservoir rodent *Octodon degus*. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 380, p. 1-10, 2017.

ROQUE, A. L. R.; CUPOLILLO, E.; MARCHEVSKY, R. S.; JANSEN, A. M. *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a Putative Reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: Patterns of Experimental Infection. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 2, p. e589, 2010.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014.

ROSSI, R. V.; BIANCONI, G. V.; PEDRO, W. A. Ordem Didelphimorphia. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Nelio R. dos Reis, 2006. cap 02, p.34.

ROTUREAU, B. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 1, p. 81–96, 2006.

SALOMÓN, O. D.; FELICIANGLI, M. D.; QUINTANA, M. G.; AFONSO, M. M. S.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 7, p. 821-846, 2015.

SALZER, J. S.; PINTO, C. M.; GRIPPI, D. C.; WILLIAMS-NEWKIRK, A. J.; PETERHANS, J. K.; RWEGO, I. B.; CARROLL, D. S.; GILLESPIE, T. R. Impact of anthropogenic disturbance on native and invasive trypanosomes of rodents in forested Uganda. **Ecohealth**, v. 13, n. 4, p. 698-707, 2016.

SANTANA, K. S. O.; BAVIA, M. E.; LIMA, A. D.; GUIMARÃES, I. C. S.; SOARES, E. S.; SILVA, M. M. N.; MENDONÇA, J.; MARTIN, M. S. Spatial distribution of triatomines (Reduviidae: Triatominae) in urban areas of the city of Salvador, Bahia, Brazil. **Geospatial Health**, v. 5, n. 2, p. 199-203, 2011.

SANTOS-FILHO, M.; SILVA, D. J.; SANAIOTTI, T. M. Variação sazonal na riqueza e na abundância de pequenos mamíferos, na estrutura da floresta e na disponibilidade de artrópodes em fragmentos florestais no Mato Grosso, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 8, p. 115–121, 2008.

SARAIVA, I.; CARVALHO, G. M. L.; GONTIJO, C. M. F.; QUARESMA, P. F.; LIMA, A. C. V. M. R.; FALCÃO, A. L.; FILHO, J. D. Natural Infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 5, p.1159-1163, 2009.

SAVANI, E. S. M. M.; NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; CASTILHO, T. M.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 18–24, 2009.

SCARANO, F. R.; CEOTTO, P. Brazilian Atlantic forest: impact, vulnerability, and adaptation to climate change. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 9, p. 2319-2331, 2015.

SCHIJMAN, A. G.; BISIO, M.; ORELLANA, L.; ET AL. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 1, p. e931-e931, 2011.

SCHÖNIAN, G.; KUHLS, K.; MAURICIO, I. L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. **Parasitology**, v. 138, p. 405–425, 2011.

SCHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H. D.; PRESBER, W.; JAFFE, C. L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 47, n. 1, p. 349–58, 2003.

SCHUBACH, A.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A. V.; SARTORI, A.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; MATTOS, M. S.; ARAÚJO, M. L.; SOUZA, W. J. S.; HADDAD, F.; PEREZ, M. A.; PACHECO, R. S.; MOMEN, H.; COUTINHO, S. G.; MARZOCHI, M. C. A.; BELIZIA, K.

SESAB. Situação epidemiológica. **Boletim Epidemiológico da Doença de Chagas**, n. 1, p. 1-4, 2018a.

SESAB. Cenário da Doença de Chagas na Bahia. **Boletim Epidemiológico da Doença de Chagas**, n. 1, p. 1-7, 2019.

SESAB. Fauna de triatomíneos da Bahia: distribuição geográfica e importância vetorial.

Boletim Entomológico, n. 5, p. 1-3, 2016a. Disponível em: <

[http://www.saude.ba.gov.br/wp-](http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/08/Boletim_Entomologico_n05_27setembro2016.pdf)

[content/uploads/2017/08/Boletim_Entomologico_n05_27setembro2016.pdf](http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/08/Boletim_Entomologico_n05_27setembro2016.pdf)>. Acesso em: 23 jan. 2020.

SESAB. Situação Epidemiológica Atual. **Boletim Epidemiológico da Leishmaniose**

Visceral (LV) – Bahia, n. 1, 2018b. Disponível em: <[http://www.saude.ba.gov.br/wp-](http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/2018-Boletim-de-Leishmaniose-Vivsceral-n.-01.pdf)

[content/uploads/2017/11/2018-Boletim-de-Leishmaniose-Vivsceral-n.-01.pdf](http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/2018-Boletim-de-Leishmaniose-Vivsceral-n.-01.pdf)>. Acesso em: 14 jul. 2019.

SESAB. **Situação epidemiológica da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) –**

Bahia, n. 1, 2016. Disponível em: <[http://www.saude.ba.gov.br/wp-](http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/2016-Boletim-de-Leishmaniose-Tegumentar.pdf)

[content/uploads/2017/11/2016-Boletim-de-Leishmaniose-Tegumentar.pdf](http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/2016-Boletim-de-Leishmaniose-Tegumentar.pdf)>. Acesso em: 14 jul. 2019.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 91, p. 671–683, 1996.

SHIRIAN, S.; ORYAN, A.; HATAM, G.; PANAH, S.; DANESHBOD, Y. Comparison of

Conventional, Molecular, and Immunohistochemical Methods in Diagnosis of Typical and

Atypical Cutaneous Leishmaniasis. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.

138, n. 1, p.235-240, 2014.

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; TEIXEIRA, A. C.; SOUZA, C. M.; FIGUEIREDO, F. B.

Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis

control program. **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 1-3, p. 257-261, 2011.

SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n.1-2, p. 55-59, 2009.

SILVA, M. A. L.; SOARES, C. R. P.; MEDEIROS, R. A.; MEDEIROS, Z.; MELO, F. L. Optimization of single-tube *nested* PCR for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 134, p. 206-210, 2013.

SILVA, R. B. S.; MENDES, R. S.; SANTANA, V. L.; SOUZA, H. C.; RAMOS, C. P. S.; SOUZA, A. P.; ANDRADE, P. P.; MELO, M. A. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p.625-629, 2016.

SILVEIRA, E. A.; RIBEIRO, I. S.; AMORIM, M. S.; ROCHA, D. V.; COUTINHO, H. S.; FREITAS, L. M.; TOMAZI, L.; SILVA, R. A. A. Correlation between infection rate of triatomines and Chagas Disease in Southwest of Bahia, Brazil: a warning sign? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 3, p. 1941-1951, 2016.

SILVEIRA, A. C.; DIAS, J. C. P. O controle da transmissão vetorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 52-63, 2011.

SIM. Óbitos por causas evitáveis de 5 a 74 anos no estado da Bahia. 2016. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/evitb10ba.def>>. Acesso em: 25 fev. 2019.

SINAM. Casos confirmados de doença de Chagas aguda no estado da Bahia. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/chagasba.def>>. Acesso em: 25 fev. 2019.

SOARES, I. S.; SILVA, S. O.; MOREIRA, F. M.; PRADO, L. G.; FANTINIA, P.; MARANHÃO, R. P. A.; FILHO, J. M. S.; MELO, M. N.; PALHARESA, M. S. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3-4, p. 1-18, 2013.

SOLCÀ, M. S.; BASTOS, L. A.; GUEDES, C. E.; BORDONI, M.; BORJA, L. S.; LARANGEIRA, D. F.; TUY, P. G. S. E.; AMORIM, L. D. A. F.; NASCIMENTO, E. G.; OLIVEIRA, G. G. S.; SANTOS, W. L. C.; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e103635, 2014.

SOS MATA ATLÂNTICA. **Atlas dos Remanescentes Florestais**, 2016. Disponível em: <<http://mapas.sosma.org.br/>>. Acesso em: 17 ago. 2019.

SOS MATA ATLÂNTICA. **Estudo apresenta contribuição das áreas protegidas brasileiras para a economia nacional**, 2018. Disponível em : <<https://www.sosma.org.br/107381/estudo-apresenta-contribuicao-das-areas-protegidas-brasileiras-para-economia-nacional/>> Acesso em: 15 ago. 2019.

SOUZA, W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 17-36, 1999.

SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, n. 2010, p.1-18, 2010.

SPICKLER, A. R. **American trypanosomiasis (Chagas Disease)**, 2017. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/trypanosomiasis_american.pdf>. Acesso em: 28 fev. 2018.

SPODAREVA, V. V.; GRYBCHUK-IEREMENKO, A.; LOSEV, A.; VOTÝPKA, J.; LUKES, J.; YURCHENKO, V.; KOSTYGOV, A. Y. Diversity and evolution of anuran trypanosomes: insights from the study of European species. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1 p. 447, 2018.

STEINDEL, M.; NETO, E. D.; MENEZES, C. L. P.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, A. J. G. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 60, n. 1, 71-80, 1993.

STURM, N. R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, n. 3, p. 205-214, 1989.

SUVISA. **Agravos - Morbidade e Epidemiologia**, 2020. Disponível em: <<http://www.saude.ba.gov.br/suvisa/vigilancia-epidemiologica/agravos-morbidade-epidemiologia/#>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

SUVISA. **Doença de Chagas**, 2020a. Disponível em: <<http://www.saude.ba.gov.br/suvisa/vigilancia-epidemiologica/doencas-de-transmissao-vetorial/doenca-de-chagas/>>. Acesso em: 25 jan. 2020.

TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 463-491, 2006.

TENÓRIO, M. S.; OLIVEIRA E SOUSA, L.; ALVES-MARTIN, M. F.; PAIXÃO, M. S.; RODRIGUES, M. V.; STARKE-BUZETTI, W. A.; ARAÚJO JUNIOR, J. P.; LUCHEIS, S. B. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1-2, p. 203-206, 2014.

TESTON, A. P. M.; ABREU, A. P.; GRUENDLING, A. P.; BAHIA, M. T.; GOMES, M. L.; ARAÚJO, S. M.; TOLEDO, M. J. O. Differential parasitological, molecular, and serological detection of *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV in blood of experimentally infected mice. **Experimental Parasitology**, v. 166, p. 44-50, 2016.

THOMPSON, R. C. A. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 12-13, p. 1079- 1088, 2013.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 85-104, 1998.

- TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F. J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)**, v. 83, n. 1, p. 115-119, 1986.
- TRÜEB, I.; PORTELA, R. D.; FRANKE, C. R.; CARNEIRO, I. O.; RIBEIRO JR, G. J.; SOARES, R. P.; BARROUIN-MELO, S. M. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp. infection in wildlife from urban rainforest fragments in Northeast Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 54, n. 1, p. 76-84, 2018.
- TRUPPEL, J. H.; OTOMURA, F.; TEODORO, U.; MASSAFERA, R.; COSTA-RIBEIRO, M. C. V.; CATARINO, C. M.; DALAGRANA, L.; FERREIRA, M. E. M. C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Can equids be a reservoir of *Leishmania braziliensis* in endemic areas?. **Plos One**, v. 9, n. 4, p. e93731, 2014.
- ULIANA, S. R. B.; NELSON, K.; BEVERLEY, S. M.; CAMARGO, E. P.; FLOETER-WINTER, L. M. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 324-330, 1994.
- VALE, E. C. S.; FURTADO, T. Tegumentary leishmaniasis in Brazil: a historical review related to the origin, expansion and etiology leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 421-8, 2005.
- VALLEJO, G. A.; SUÁREZ, J.; OLAYA, J. L.; GUTIÉRREZ, S. A.; CARRANZA, J. C. *Trypanosoma rangeli*: un protozoo infectivo y no patógeno para el humano que contribuye al entendimiento de la transmisión vectorial y la infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 39, n. 150, p. 111-122, 2015.
- VASCONCELOS, J. M.; GOMES, C. G.; SOUSA, A.; TEIXEIRA, A. B.; LIMA, J. M. Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, p. 221-227, 2018.
- VEXENAT, J. A.; BARRETTO, A. C.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar Americana em uma região endêmica do estado da Bahia. III. Fauna flebotomínica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 3, p. 293-301, 1986.
- VIEIRA, E. M.; CAMARGO, N. F. Uso do espaço vertical por marsupiais brasileiros. In: CÁCERES, N. C. **Os Marsupiais do Brasil**. Ed. UFMS, 2012. cap. 16, p. 347-364.
- VIETTRIA, M.; HERRERA, L.; AGUILAR, C. M.; MOROCOIMA, A.; REYESA, J.; LARES, M.; LOZANO-ARIAS, D.; GARCÍA-ALZATE, R.; CHACÓN, T.; FELICIANGELI, M. D.; FERRER, E. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi/Leishmania* spp. coinfection in domestic, peridomestic and wild mammals of Venezuelan co-endemic areas. **Veterinary Parasitology**, v. 14, p. 123-130, 2018.

VIOLA, L. B.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. A.; FERREIRA, R. C.; RODRIGUES, A. C.; FREITAS, R. A.; DUARTE, M. R.; GREGO, K. F.; BARRETT, T. V.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogeny of snake trypanosomes inferred by SSU rDNA sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, crossinfection and morphological analysis. **Parasitology**, v. 135, n. 5, p. 595–605, 2008.

VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99-109, 2015.

WHO. **Leishmaniose em países de alta carga: uma atualização epidemiológica baseada em dados reportados em 2014**, v. 91, n. 22, p. 282-296, 2016. Disponível em: <https://translate.googleusercontent.com/translate_c?depth=1&hl=pt-BR&prev=search&rurl=translate.google.com&sl=en&sp=nmt4&u=https://www.who.int/wer/2016/wer9122/en/&xid=17259,15700023,15700186,15700191,15700256,15700259,15700262&usg=ALkJrhgtxpBvRqN_OVKhFmqM5g26auNtaw>. Acesso em: 13 jul. 2019.

WHO. **Doença de Chagas (triplanossomíase americana)**, 2019b. Disponível em: <<https://translate.google.com/translate?hl=pt-BR&sl=en&u=https://www.who.int/chagas/en/&prev=search>>. Acesso em: 17 jul. 2019.

WHO. **Leishmaniose**, 2019a. Disponível em: <https://translate.googleusercontent.com/translate_c?depth=1&hl=pt-BR&prev=search&rurl=translate.google.com&sl=en&sp=nmt4&u=https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/leishmaniasis&xid=17259,15700023,15700186,15700191,15700256,15700259,15700262&usg=ALkJrhg5nt6of6pY500-ID6YT0jp3Dc-JQ>. Acesso em: 13 jul. 2019.

WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2018. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 23 fev. 2019.

WINCKER, P.; BRITTO, C.; BORGES-PEREIRA, J.; CARDOSO, M.; OELEMANN, W.; MOREL, C. Use of simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 6, p. 771–777, 1994.

XAVIER, S. C. C.; ROQUE, A. L. R.; LIMA, V. S.; MONTEIRO, K. J. L.; OTAVIANO, J. C. R.; SILVA, L. F. C. F.; JANSEN, A. M. Lower richness of small wild mammal species and Chagas disease risk. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, p. 1-11, 2012.

YEO, M.; ACOSTA, N.; LLEWELLYN, M.; SÁNCHEZ, H.; ADAMSON, S.; MILES, G. A. J.; LÓPEZ, E.; GONZÁLEZ, N.; PATTERSON, J. S.; GAUNT, M. W.; ARIAS, A. R.; MILES, M. A. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 225–233, 2005.

ZIJLSTRA, E. E.; MUSA, A. M.; KHALIL, E. A.; EL-HASSAN, I. M.; EL-HASSAN, A. M. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **The Lancet Infectious Disease**, v. 3, n. 2, p. 87-98, 2003.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. S.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraespecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p.1051-1054, 2009.

ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, M. M. G.; SCHIJMAN, A. G.; LLEWELLYN, M. S.; LAGESSILVA, E.; MACHADO, C. R.; ANDRADE, S. G.; STURM, N. R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v.12, p.240-253, 2012.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de Chagas? **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 44-48, 2011.

ANEXOS

ANEXO A - Protocolo de Extração de DNA de tecido

Isolamento do DNA

- Pesar e transferir 100 mg de tecido para um tubo de eppendorf de 2,0mL livre de Dnase e Rnase.
- Adicionar Nitrogênio líquido para o eppendorf
- Macerar com o auxílio de um bastão de vidro
- Adicionar 350 μ L da solução A e vortequizar para a solução ficar uniformemente dispersa.
- Incubar no banho maria seco a 65°C por 10 minutos
- Adicionar 150 μ L da solução B e vortequizar vigorosamente ate que o precipitado se mova e a amostra fique uniformemente viscosa.
- Adicionar 500 μ L de clorofórmio e vortequizar ate a viscosidade diminua e a mistura fique homogênea.
- Centrifugar na velocidade máxima por 20 minutos a 4°C para separar as fases.
- Transferir a fase superior para um novo tubo eppendorf livre de dnase e rnase de 1,5mL.

Precipitação do DNA

- Adicione 1 mL de etanol absoluto (-20°C) à solução de DNA e agite rapidamente no vórtice.
- Incube o tubo no gelo por 30 minutos
- Centrifugue a velocidade máxima durante 15 minutos a 4°C.
- Remova o etanol e deixe o pellet com o auxilio de uma pipeta.
- Adicione 500 μ L de etanol (80%) e mistura invertendo o tubo 5 vezes
- Centrifugue a velocidade máxima durante 5 minutos a 4°C. Remova o etanol com o auxilio de uma pipeta.
- Centrifugue a velocidade máxima durante 3 minutos a 4°C. Remova o etanol com o auxilio de uma pipeta.
- Ressuspender o sedimento em 100mL TE buffer. Adicione 2 μ L de Rnase.
- Incube a 37°C por 30 minutos.
- DNA está pronto para a realização da PCR.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Esquema representativo evidenciando a linha de *pitfall* (azul) e os transectos de 500 metros contendo 25 estações (laranja) localizados no interior da floresta e na pastagem. Fonte: Google Maps (2018).

