

**DETECÇÃO DE *Borrelia* sp. EM GAMBÁS (*Didelphis aurita*)
IMUNOSSUPRIMIDOS COM CICLOFOSFAMIDA**

WALTEREZ GERALDA DE ARAUJO BARBOZA

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

DETECÇÃO DE *Borrelia* sp EM GAMBÁS (*Didelphis aurita*)
IMUNOSSUPRIMIDOS COM CICLOFOSFAMIDA

WALTEREZ GERALDA DE ARAUJO BARBOZA

Sob a orientação do Professor

ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA

**Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de *Magister
Scientiae* em Medicina Veterinária, Área
de concentração em Medicina Veterinária
Preventiva.**

RIO DE JANEIRO

1997

TÍTULO DA TESE

DETECÇÃO DE *Borrelia* sp. EM GAMBÁS (*Didelphis aurita*)

IMUNOSSUPRIMIDOS COM CICLOFOSFAMIDA

AUTORA:

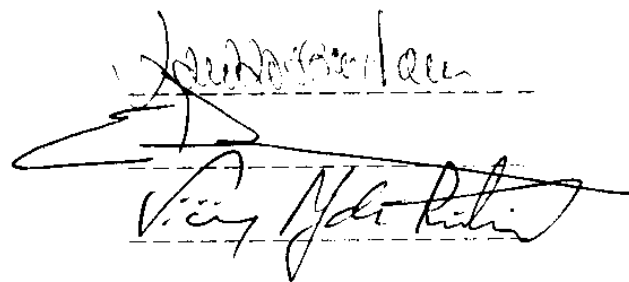
WALTEREZ GERALDA DE ARAUJO BARBOZA

Aprovada em 18 / 12 / 97

ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA

ERIK DAEMON DE SOUZA PINTO

VINICIUS REZENDE RIBEIRO



Two handwritten signatures are present, each written over a horizontal dashed line. The top signature is written in cursive and appears to read 'Adivaldo Henrique da Fonseca'. The bottom signature is also in cursive and appears to read 'Vincius Rezende Ribeiro'.

Aos meus pais Walter e Therezinha, ao irmão
Walter, à cunhada Denise, à sobrinha Karina e
ao meu marido Vinicius, que sempre me
incentivaram em cada conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador prof. Adivaldo Henrique da Fonseca, por acreditar com tanta certeza desde o início que conseguiríamos atingir os nossos objetivos. Aos professores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela ajuda na orientação. Aos Professores co-orientadores Carlos Wilson Gomes Lopes e Carlos Luiz Massard. Ao professor Paulo Fernando Vargas Peixoto e Renato Grechi Pacheco pela realização dos exames laboratoriais. Aos amigos da FIOCRUZ Wilson Jacinto da Silva e Ana Maria Jansen, pelo apoio e atenção dispensados. Ao Ilm^o Sr. GEN BDA Dino Garcia Abreu, Cel Edino Camoleze, Izidro Bendet, Alex da Costa Azevedo e Alexandre Guerreiro pelo incentivo na utilização do espaço físico do Instituto de Biologia do Exército.

Agradeço à minha grande amiga Andrea Moreira Paulino, pela amizade e positivismo tão importantes no dia a dia. Aos amigos Marcia Mayumi Yshikawa, Denclair Escobar de Almeida Júnior, Lilia Aparecida Marques da Silva, Jaime da Silva Pena e a todos os componentes do Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro que de alguma forma participaram deste trabalho.

Agradeço à CARGIL pelo fornecimento de ração durante todo o trabalho e à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa de estudos durante o curso.

BIOGRAFIA

Walterez Geralda de Araujo Barboza, filha de Walter Martins Barboza e Therezinha de Araújo Barboza, nascida em 30 de Março de 1971 na cidade do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro, ingressou na Universidade Federal Fluminense (UFF) em 1989, terminando o curso de Medicina Veterinária em Fevereiro de 1994. Neste período foi monitora de Imunologia por dois anos e bolsista de iniciação científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no Laboratório de Imunologia da UFF.

Foi bolsista do Programa de Aperfeiçoamento Profissional (PAP) no Laboratório de Protozoologia da Fiocruz durante um ano e professora substituta de Imunologia Veterinária no Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) durante dez meses.

Ingressou em Março de 1996 no Curso de Pós- Graduação em Patologia Veterinária com área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da UFRRJ, do qual foi bolsista da CAPES a nível de Mestrado.

Foi convocada para Estágio de Adaptação em Serviço pelo Exército Brasileiro para servir no Laboratório de Imunobiológicos do Instituto de Biologia do Exército, em 1996 e selecionada para lecionar na Universidade Estácio de Sá (UNESA), como professor responsável pela disciplina de Imunologia do Curso de Medicina Veterinária, em 1997.

ÍNDICE

1 - Introdução.....	1
2 - Revisão de Literatura.....	3
3 - Materiais e Métodos.....	8
3. 1 - Captura dos gambás.....	8
3. 2 - Imunossupressão dos gambás.....	9
3. 3 - Testes de diagnóstico da borreliose.....	9
3. 4 - Acompanhamento da Infecção.....	10
4 - Resultados e Discussão.....	17
4. 1 - Imunossupressão dos gambás.....	17
4. 2 -Inoculação em camundongos.....	19
4. 3 - Cultivo em meio BSK.....	20
4. 4 – Hemograma.....	21
4. 5 – Urinálise.....	21
5 - Conclusões.....	24
6 - Referências Bibliográficas.....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	1 a e 1 b -Manilha de barro utilizada para captura dos gambás.....	12
FIGURA	2 -Pesagem dos gambás.....	13
FIGURA	3a - Obtenção de sangue periférico da ponta da cauda para confecção dos esfregaços	14
FIGURA	3b - Obtenção de sangue periférico da veia coccígea para confecção de hemograma.....	14
FIGURA	4 - Gambá solto no mesmo local de captura.....	15
FIGURA	5 - Infectório do IBEx mostrando o aparelho de UV	16

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – Valores médios do hemograma de oito gambás capturados no município de Seropédica, RJ.....	22
TABELA 2 - Valores médios encontrados na Urinálise de dez marsupiais capturados no município de Seropédica, RJ.....	23

RESUMO

O interesse no estudo de patologias associadas aos Marsupiais deve-se à diversidade de nicho ecológico peridomiciliar, facilidade de manuseio e adaptação às condições de cativeiro. O trabalho teve como objetivo detectar infecção natural por *Borrelia* sp e outros patógenos através de exame direto do sangue periférico, urina e macerado de rim de gambás (*Didelphis aurita*) imunossuprimidos com a droga ciclofosfamida. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Doenças Parasitárias do Convênio Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), bem como no Instituto de Biologia do Exército (IBEx), entre fevereiro a setembro de 1997. Foi possível identificar *Borrelia* sp na urina de cinco gambás naturalmente infectados, após imunossupressão com ciclofosfamida. Os animais capturados não apresentaram infestação por carrapatos ou outro ectoparasito e não foi detectado sinal ou sintoma de doença. Os resultados dos exames de hemograma e urinálise estavam dentro dos valores de normalidade para a espécie. Através da histopatologia foi verificado infiltrado linfocitário nos rins dos camundongos inoculados com macerado de rim de gambá positivo. A presença de *Borrelia* sp no sangue periférico de camundongos sugere que estes animais podem servir como modelo experimental.

ABSTRACT

The interest in the study of pathologies associated to marsupials is due to the variety of peridomestic ecological niches, easy handling, and adaptation to the captivity conditions. The goal of this work was to detect natural infection by *Borrelia* sp and other pathogens by means of direct examination of peripheral blood, urine, and macerated kidney from opossums (*Didelphis aurita*) immunosuppressed by the drug cyclophosphamide. The experiments were conducted in the Laboratório de Doenças Parasitárias do convênio Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), and in the Instituto de Biologia do Exército (IBEx), from February to September, 1997. It was possible to identify *Borrelia* sp in the urine of five natural infected opossums, after immunosuppression by cyclophosphamide. The captured animals have not presented infestation by ticks or any other ectoparasite and no sign or symptom of the disease was detected. The results of blood were within the normal values for the species. Lymphocytic infiltrates in the kidneys of mice inoculated with macerated kidney from positive opossums were detected through histopathological analysis. The presence of *Borrelia* sp in the peripheral blood of mice suggest that these animals may be employed as experimental models.

1. - INTRODUÇÃO

A espécie *Didelphis aurita* (WIED, 1826) é o gambá da orelha preta que vive em baixas altitudes na região Neotropical. A diversidade de nicho ecológico peridomiciliar e fertilidade com gestação de cerca de doze dias tornam estes mamíferos potenciais e eficientes reservatórios de patógenos. Eles possuem hábitos noturnos e atingem a idade adulta entre 6 e 12 meses. O interesse no estudo de patologias associadas aos gambás vem crescendo nos últimos anos devido ao fácil manuseio e pelo tamanho do corpo de cerca 40 cm no adulto. As facilidades de contenção, adaptação as condições de cativeiro e aceitação da alimentação em forma de ração, também têm aumentado o interesse das pesquisas laboratoriais pela espécie (PAIVA *et al.*, 1996).

O gênero *Didelphis* tem sido reconhecido como hospedeiro definitivo e reservatório de protozoários, vírus, *Rickettsia*, helmintos e bactérias (SCORZA, 1992). GODSEY *et al.*, 1987 detectaram anticorpos anti-*B. burgdorferi* em animais silvestres, inclusive em *Didelphis virginianus*, nos Estados Unidos. No Brasil, foi detectada *Borrelia* sp no sangue periférico de *Didelphis aurita* em Seropédica (FONSECA *et al.*, 1995) e em São Paulo (YOSHINARI *et al.* 1997).

Os carrapatos e o piolho humano são considerados hospedeiros naturais de *Borrelia* spp. Considerou-se por muitos anos que a transmissão de patógenos aos artrópodes hematófagos durante o repasto sobre hospedeiros vertebrados dependia exclusivamente de infecção sistêmica do hospedeiro, com exceção das viroses. Hoje, sabe-se que existe uma outra via não sistêmica de transmissão de bactérias e protozoários a partir de hospedeiro

vertebrado infectado durante o repasto. Para melhor compreender os mecanismos de transmissão das espiroquetas é necessário um estudo do ciclo enzoótico dessas bactérias. A procura de *Borrelias* na urina de gambás mesmo na ausência de infecção sistêmica pode ser um bom indicador de prevalência de espiroquetas nos *Didelphis* de Seropédica.

Esta pesquisa teve como objetivo detectar infecção natural por *Borrelia* sp. e outros patógenos através de exame direto do sangue periférico, urina e macerado de rim de gambás imunossuprimidos pela ação da droga ciclofosfamida.

2. - REVISÃO DE LITERATURA

O estudo das borrelioses *latu sensu*, vem ganhando importância nas duas últimas décadas, em decorrência da descrição da Borreliose de Lyme, que se constitui em uma das zoonoses mais estudadas da atualidade (FISHBEIN e DENNIS, 1996). Várias pesquisas foram conduzidas na América do Norte, Europa, Ásia, Austrália, África e América do Sul. A febre recorrente nas Américas é causada por borrelias denominadas de acordo com o nome dos carrapatos que as transmitem: *B. turicata*, *B. purkei* e *B. hermsi*, transmitidas respectivamente pelos carrapatos *Ornithodoros turicata*, *O. parkei* e *O. hermsi*. No Brasil, é conhecida a espécie, *B. brasiliensis*, detectada em *O. brasilienses* coletados de roedores.

ARAGÃO (1911a) identificou infecção em galinhas no Brasil causada por espiroquetas não cultiváveis. FLECHTMANN (1992) fez referência ao fato de que o líquido coxal de *Argas (Persicargas) miniatus* Koch, 1844 tem grande importância na transmissão dessas espiroquetas em galinhas.

Borrelia burgdorferi (JOHNSON, SCHIMID, HIDE, STREIGERWALT & BRENER, 1984), é uma das espiroquetas responsáveis pela Doença de Lyme. Ela é transmitida no Leste e região central dos Estados Unidos da América (EUA) pelo *Ixodes scapularis* e na região oeste pelo *Ixodes pacificus* (SPACH *et al.*, 1993). Existem também relatos de transmissão transovariana de *B. burgdorferi* em larvas de *I. dammini* (PIESMAN *et al.*,

1986). Atualmente são reconhecidas quatro genomoespécies dentro do grupo *B. burgdorferi sensu lato*, causadoras da Borreliose de Lyme: as cepas *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelli*, *B. garinii*, genomoespécies VS 116, DN 127, Poti 127, *B. andersoni* e *B. japonica*.

O agente etiológico da Borreliose de Lyme na América do Sul, Austrália e África ainda não foi isolado (YOSHINARI *et al.*, 1997). A *B. burgdorferi lato sensu* está adaptada a roedores, cervídeos, aves migratórias, ursídeos, canídeos, lagomorfos e marsupiais em um ciclo silvestre tendo, geralmente, um carrapato ixodídeo como vetor. Este e outros artrópodes hematófagos veiculam os agentes ao domicílio, quando parasitam animais domésticos e o homem (YOSHINARI *et al.*, 1997). A prevalência de espiroquetas na população de carrapatos coletados sobre animais foi de 81%, enquanto que nos coletados sobre a vegetação foi apenas de 16% (RANDOLPH *et al.*, 1996). Segundo ANDERSON *et al.* (1986), aves migratórias, além de contaminar-se com as borrelias, são capazes de disseminar larvas e ninfas contaminadas a longas distâncias. BISHOP *et al.* (1994), detectou a *B. burgdorferi* no sangue de pássaros silvestres (*Colinus virginianus*) durante três semanas de infecção experimental, mas não detectou as espiroquetas no rim. A prevalência de *B. burgdorferi* encontrada nas larvas de *I. scapularis*, retiradas de pássaros com altos níveis de co-infestação por larvas e ninfas, sugere que os carrapatos podem adquirir a *Borrelia* simplesmente por estarem alimentando-se em local próximo a outro carrapato infectado na ausência de infecção sistêmica das aves. Segundo RANDOLPH *et al.* (1996), esta transmissão ocorre a menos de um centímetro de distância entre os carrapatos. Se no momento de inoculação no hospedeiro houver um seqüestro da *Borrelia*, ela não será detectada no sangue, mas poderá ser transmitida de forma eficaz a um carrapato que vá fazer repasto sobre este sítio. Parece não haver desenvolvimento de infecção sistêmica em roedores e cervídeos capaz de infectar as larvas de carrapato com a

B. burgdorferi por via sistêmica durante o repasto (RANDOLPH *et al.*, 1996). Os animais silvestres, em especial pequenos roedores, são considerados os reservatórios, sendo o *Peromyscus leucopus*, o principal reservatório vertebrado (BOSLER *et al.*, 1984; LEVINE *et al.*, 1985). SMITH *et al.* (1993) afirmaram que na ausência de roedores, pequenos mamíferos podem vir a ser reservatório da *B. burgdorferi* GORELOVA *et al.* (1997) detectaram infecção simultânea por *B. garinni* e *B. afzelii* em roedores na Rússia através de cultura de urina. Animais domésticos como cães, gatos, cavalos e bovinos, além de contraírem a infecção, são potenciais agentes transportadores de carrapatos para o ambiente peridomiciliar, e o teste sorológico contribui no mapeamento das áreas de risco para a borreliose de Lyme (YOSHINARI *et al.*, 1997).

Segundo MAGNARELLI *et al.* (1990), o quadro clínico da doença, sendo que nos animais não é totalmente conhecido, podendo não ocorrer manifestações da doença e nos mamíferos silvestres a infecção é, na maioria dos casos, assintomática. SINSKY & PIESMAN (1989) isolaram *B. burgdorferi* de biópsia da orelha de roedores. A histopatologia revelou infiltrado linfocitário. DAMBACH *et al.* (1997) afirmam que a nefrite é a única manifestação clínica e histopatológica fatal em cães.

SCHULZE *et al.* (1986) encontraram infecção em larvas, ninfas e adultos de *Ixodes scapularis* (=dammini), adultos de *Amblyomma americanum* e em adultos de *Dermacentor variabilis*, coletados sobre *D. virginiana* e outros mamíferos silvestres de um foco endêmico da Doença de Lyme em New Jersey, EUA. Segundo BAKKEN *et al.* (1996), o gênero *Amblyomma* está envolvido na transmissão de *Ehrlichia*, o que torna as regiões endêmicas para a ehrlichiose potencialmente endêmicas para a Borreliose de Lyme. ANDERSON & MAGNARELLI (1987) identificaram *B. burgdorferi* por anticorpos monoclonais em ixodídeos coletados de roedores e gambás. *Ixodes loricatus* foi encontrado

sobre *D. aurita* no Rio de Janeiro por ARAGÃO (1911b) e por BARROS & BAGGIO (1992). Outras quatro espécies do gênero *Ixodes* foram descritas por ARAGÃO (1936).

GODSEY *et al.* (1987) examinaram culturas de sangue obtido por punção cardíaca de vários mamíferos silvestres, na região de Wiscosin, EUA, por exame direto em microscopia de campo escuro, identificando espiroquetas como sendo *B. burgdorferi*. O diagnóstico foi confirmado por fluorescência direta usando soro policlonal de coelho anti-*B. burgdorferi*. BURGUESS & WINDERG (1989) cultivaram feto e rins de coioote através da técnica de imunofluorescência com anticorpos monoclonais, chegando a conclusão de que ocorre infecção por *B. burgdorferi* nestes animais e que a transmissão transplacentária ocorre entre eles, uma vez que a mãe era soronegativa para esta espiroqueta.

BONOLDI *et al.* (1996) investigaram *D. marsupialis* provenientes da região de Itapevi, SP. Estes animais devem participar do ciclo epidemiológico da Borreliose de Lyme no Brasil, já que apresentaram elevada soropositividade contra *B. burgdorferi*, com presença de antígenos circulantes e de microrganismos no sangue periférico. Animais silvestres e domésticos, coletados em áreas endêmicas para Doença de Lyme, foram examinados por MAGNARELLI *et al.* (1984), para se determinar a prevalência de *I. scapularis* e foram testados para anticorpos contra diferentes cepas de espiroquetas. À imunofluorescência indireta (IFA) os autores detectaram anticorpos contra espiroquetas em 20,5% dos 961 soros de *D. virginiana* e outros mamíferos selvagens analisados. SCHMID (1985) detectou anticorpos anti-*B. burgdorferi* em *Oidolecus virginianus*, nos Estados Unidos da América, relacionando a possibilidade de pássaros e mamíferos silvestres serem reservatório. FONSECA *et al.* (1995), detectaram *Borrelia* sp. no sangue periférico de *D. aurita*, infectados naturalmente no município de Seropédica, no estado do Rio de Janeiro. Os autores discutem a importância destes marsupiais em ambiente peridomiciliar, como

potenciais reservatórios da *B. burgdorferi*. O sangue dos gambás foi cultivado em meio BSK e, após crescimento da bactéria, procedeu-se exames diretos de microscopia de campo escuro e contraste de fase. Filhotes de marsupiais capturados apresentaram maior bacteremia do que os adultos (ISHIKAWA *et al.*, 1995).

GORDUS & THEIS (1993) afirmam que as espiroquetemias de *B. burgdorferi* são muito baixas em animais silvestres porque elas possuem tropismo pelas áreas intersticiais dos tecidos. Para a *B. burgdorferi* é mais fácil ocorrer a localização no sítio de inoculação do que haver disseminação pelo sangue, a menos que a *Borrelia* seja carregada por macrófagos através do sistema linfático (RANDOLPH *et al.*, 1996). Segundo GORELOVA *et al.* (1997), é provável que a transmissão da *Borrelia* sp possa ocorrer através da urina dos hospedeiros.

3. - MATERIAIS E MÉTODOS

Local dos Experimentos: Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Doenças Parasitárias do Convênio existente entre a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), bem como no Instituto de Biologia do Exército (IBEx), no período de fevereiro a setembro de 1997.

3.1 - Captura dos gambás: Os gambás (*Didelphis aurita*) foram capturados utilizando armadilhas constituídas de manilhas de barro (Figs. 1a e 1b), que foram distribuídas pelo *Campus* da UFRRJ, próximo a árvores. Utilizou-se frutas (banana madura e mamão) como isca e os gambas capturados foram retirados no início da manhã seguinte.

Os gambás foram contidos quimicamente com éter etílico, examinados minuciosamente com auxílio de pente fino para coleta de ectoparasitos, pesados (Fig. 2), mensurados, identificados com coleiras numeradas. Foi coletado sangue por punção da veia coccígea para a confecção dos esfregaços e do exame direto (Figs 3a e 3b).

Foram examinados 20 animais, dos quais nove foram mantidos no laboratório para imunossupressão, os outros foram soltos no mesmo local de captura, após a coleta de material para a confecção dos exames laboratoriais (Fig. 4).

3.2 - Imunossupressão dos gambás: Foram administrados, via intramuscular, 200 mg/kg de ciclofosfamida (quimioterápico de nome comercial GENUXAL, comercializado pelo Laboratório ASTA Médica), em dose única, em seis animais jovens pesando 500 gr cada e tres adultos de 1 kg cada. Os animais foram mantidos no infectório de segurança biológica equipado com ultravioleta e filtros de carvão que purificam o ar que sai da sala na qual ficaram isolados os animais de experimento no IBEx. Os animais foram mantidos em caixas de PVC com cama de maravalha trocada duas vezes por semana (Figs. 5a e 5b). A alimentação básica foi fornecida sob a forma de ração peletizada para gatos fornecida pela CARGIL, suplementada com bananas e ovos, seguindo recomendação pessoal de pesquisadores do Biotério de Marsupiais da FIOCRUZ. A água foi oferecida sob a forma de “mamadeiras” para camundongos.

3.3 - Testes de diagnóstico de *Borrelia* sp:

- a) Foram feitos esfregaços sangüíneos finos com sangue periférico dos gambás recém-capturados, por punção da veia coccígea. Para fixação e coloração, utilizou-se o método de GIEMSA, com pH 6.8 e 7.2, segundo metodologia descrita por PESSOA (1963). As lâminas foram observadas em microscopia óptica de imersão no aumento de 1500X.
- b) Foram preparadas lâminas com uma gota de sangue e duas de PBS pH 7.2 para exame direto a fresco, no aumento de 400X, em contraste de fase, campo escuro e campo claro. Foi procedido, ainda, exame direto da urina de micção espontânea.
- c) *Borrelia* sp. obtida de macerado dos rins e urina de gambá, foi inoculada em meio BSK (BARBOUR *et al.*, 1983) que foi mantido em estufa a 33° C. As culturas foram observadas após 7, 14, 21 e 28 dias.

d) Macerado de rim de gambá foi inoculado em cinco camundongos “Swiss” de 20 g cada via intraperitoneal, diluído em PBS pH 7.2, na proporção de 8: 10.

3.4 - Acompanhamento da Infecção:

a) Acompanhamento da infecção dos gambás: Realizou-se exame clínico dos gambás com tomada de temperatura retal e observação de qualquer alteração nas articulações, locomoção, pele e mucosas durante dois meses. O sangue periférico foi observado antes da imunossupressão aos 2, 10, 15, 20 e 30 dias após a imunossupressão. A urina foi coletada durante micção espontânea, quando do manuseio dos animais e observada a fresco, no exame direto em microscopia de contraste de fase e em campo claro e campo escuro antes e 48 h, 10 e 15 dias após a imunossupressão. Fragmentos de bexiga, rins, baço e fígado de cinco animais necropsiados, foram fixados em formol a 10% para histopatologia no Laboratório de Anatomia Patológica da UFRRJ.

b) Acompanhamento da infecção dos camundongos: Realizou-se exame clínico dos camundongos inoculados, a fim de observar qualquer alteração nas articulações, locomoção, pele e mucosas. O sangue periférico foi observado em esfregaços sanguíneos corados por Fontana e GIEMSA pH 6.8 e 7.2 e a fresco no exame direto, antes e 20, 30 dias após a imunoculação.

No dia 30, os camundongos foram imunossuprimidos com uma dose de 200 mg/Kg de ciclofosfamida IM. Foram também observados o sangue periférico em esfregaços sanguíneos corados por Fontana e GIEMSA pH 6.8 e 7.2 e a fresco no exame direto aos 10 e 20 e 30 dias após imunossupressão dos camundongos.

Sangue periférico e fragmentos de bexiga, rim, baço, fígado, coração e pulmão foram inoculados em meio BSK (ANDERSON & MAGNARELLI, 1987) e fixados em formol a 10% para histopatologia.



Figs. 1a e 1b – Manilha de barro utilizada para captura dos gambás.



Fig. 2 – Pesagem dos gambás.



Fig. 3a - Obtenção de sangue periférico da ponta da cauda para confecção dos esfregaços.

Fig. 3b - Obtenção de sangue periférico da veia coccígea para confecção de hemograma.



Fig. 4 – Gambá solto no mesmo local de captura.



Fig. 5a – Infectório do IBEx mostrando o aparelho de UV.
Fig. 5b – Caixa de PVC com maravalha.

4. - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi analisado o sangue periférico e urina dos 20 animais recém capturados e todos estavam negativos para *Borrelia* sp. na microscopia óptica. Este fenômeno está de acordo com a observação de GORDUS & THEIS (1993), que afirmam que as espiroquetemias são muito baixas em animais silvestres porque essas possuem tropismo por áreas intersticiais dos órgãos, raramente migrando pelo sangue nestes animais. Porém, não foi detectada alteração histopatológica nos gambás infectados naturalmente e imunossuprimidos com ciclofosfamida.

4.1 -Imunossupressão dos gambás: Dos nove gambás imunossuprimidos, cinco apresentaram a *Borrelia* sp. na urina. Um dos animais veio a óbito sem alteração clínica, 36 horas após a imunossupressão, tendo sido necropsiado. A única alteração macroscópica encontrada na necrópsia foi inflamação com fibrose hepática. Detectou-se *Borrelia* sp. no

exame direto da urina de um dos gambás, obtida de micção espontânea 48 horas após a imunossupressão. Aos 10 dias da imunossupressão foi constatada a presença da *Borrelia* sp. na urina de mais dois animais, aos 15 dias outros dois gambás jovens também apresentaram *Borrelia* sp. apenas na urina. Este resultado positivo após a imunossupressão de gambás foi compatível com o obtido por SERRA-FREIE (1979), que observou parasitemia por *Babesia brasiliensis* após esplenectomia e imunossupressão induzida por corticosteróides, após o sexto dia do início do tratamento.

O encontro de *Borrelia* sp. na urina dos gambás confirma o trabalho de GORELOVA *et al.* (1997), relatam a possibilidade da transmissão da *Borrelia* sp. pela urina. Segundo BONOLDI *et al.* (1996) em estudo realizado no estado de São Paulo, *Didelphis aurita* participa do ciclo epidemiológico de Borreliose e o achado do presente trabalho confirma esta hipótese. SMITH *et al.* (1993), relataram que os animais silvestres podem funcionar como reservatório.

Os gambás infectados naturalmente pela *Borrelia* sp. não apresentaram sinal ou sintoma de doença. Essa ausência de sintomatologia está de acordo com MAGNARELLI *et al.* (1990), que afirmam que nos mamíferos silvestres a infecção é, na maioria dos casos, assintomática. Os resultados da histopatologia dos rins, coração, pulmão e bexiga não revelaram alterações, tendo sido detectado apenas infiltrado inflamatório com fibrose no fígado de um gambá.

A ausência de ectoparasitos sobre os gambás, apesar de BARROS & BAGGIO (1992) no estado do Paraná terem detectado animais parasitados por *I. loricatus* e ninfas de carrapatos ixodídeos da espécie *A. cajennense* e ABEL (1996) no município de Seropédica, RJ, ter detectado animais parasitados por pulgas do gênero *Ctenocephalides* e ninfas de carrapatos ixodídeos da espécie *A. cajennense* entre julho e dezembro de 1996,

sugere que a infecção pela *Borrelia* sp. possa estar sendo transmitida no município de Seropédica, por uma outra via alternativa, além da via comumente relatada, por carrapatos. FONSECA *et al.*, 1994 detectaram grande borreliemia em gambás (*Didelphis aurita*) capturados no município de Seropédica e que estavam isentos de carrapatos. ISHIKAWA *et al.* (1995) também detectaram estas espiroquetas no sangue periférico de vários gambás (*Didelphis aurita*) em Seropédica não parasitados por carrapatos. Mesmo que a transmissão possa também ocorrer por outra via, caso não ocorra reinfestação dos marsupiais por ectoparasitos, é possível que a longo prazo ocorra a cura da infecção por *Borrelia* sp., pois não existem evidências de que o carrapato ixodídeo seja substituível no ciclo das borrelioses com eficiência.

4.2 - Inoculação em camundongos: Um dos camundongos faleceu após 20 dias sem lesões. Dois dos quatro camundongos sobreviventes apresentaram *Borrelia* sp. no sangue periférico aos 20 dias. Um deles desenvolveu lesões eritematosas e ulcerativas nas orelhas após 30 dias. Aos 40 dias eles receberam ciclofosfamida, via intramuscular, na dosagem de 200 mg/ Kg em dose única. Aos 50 dias o camundongo com as lesões na orelha não conseguiu caminhar, nem se alimentava mais, quando foi sacrificado. Após 60 dias os três camundongos restantes foram sacrificados. Dois deles apresentavam as mesmas lesões em uma das orelhas. ANDERSON *et al.* (1985) detectaram *B. burgdorferi* nos rins de 15 roedores selvagens. BURGUESS & WINDERG (1989) cultivaram feto e rins de coiotes, detectando *B. burgdorferi* nos filhotes de coiote, não sendo detectada na mãe. Isto sugere infecção transplacentária por *B. burgdorferi*. Outra evidência desta forma de transmissão foi obtida por YSHIKAWA *et al.* (1995) ao descrever em filhote de gambá, níveis de infecção por *B. sp.* superiores aos maternos. Os animais silvestres, em especial pequenos

roedores são considerados reservatórios naturais de borrelias (YOSHINARI *et al.*, 1997), porém, segundo RANDOLPH *et al.* (1996), parece não haver infecção sistêmica considerável em roedores e marsupiais. MASUZAWA *et al.* (1992) detectaram a presença de *B. burgdorferi* no rim, coração, sangue e baço de camundongos, 14 dias após infecção experimental. O coração destes animais apresentava infiltrado linfocitário. No presente trabalho, após a inoculação de macerado de rim de gambá, o surgimento da *Borrelia* sp. no sangue dos camundongos, sugere que a transmissão da *Borrelia* sp., provavelmente não está relacionada com a bacteremia dos marsupiais ou dos roedores, conforme as observações de RANDOLPH *et al.* (1996). Estas observações apenas complementam o trabalho de LORD *et al.* (1992), que afirmam que cada foco de borreliose possui algum animal silvestre mais bem adaptado para manter a *Borrelia* sp na natureza, podendo o hospedeiro não desenvolver infecção sistêmica, mas segundo LEVINE *et al.* (1985) só há importância epidemiológica na transmissão de patógenos, quando o animal desenvolve infecção sistêmica capaz de infectar vetores.

Nossa tentativa de isolamento da *Borrelia* sp. de biopsia de orelha de roedores, conforme fizeram SINSKY & PIESMAN (1989) para a *B. burgdorferi*, revelou apenas infiltrado polimorfonuclear. Por outro lado, a presença de diversos focos de infiltrados inflamatórios mononucleares no parênquima renal no presente trabalho, pode estar relacionado com a infecção pela *Borrelia* sp. nos animais que foram inoculados com macerado de rim de gambá.

4.3 - Culturas em meio BSK: Tanto as culturas de urina e macerado dos rins de gambá quanto as de sangue periférico, macerado de rim e raspado de orelha dos camundongos foram negativas para *Borrelia* sp. apesar de GODSEY *et al.* (1987). identificarem *B.*

burgdorferi em culturas de sangue obtido por punção cardíaca de vários mamíferos silvestres e de ANDERSON & MAGNARELLI (1987) detectarem *B. burgdorferi* a partir de cultura de macerado de rim de *P. leucopus*, inoculados com macerado de *I. dammini* infectados por esta espiroqueta.

FISHBEIN & DENNIS (1995) e BARBOUR *et al.* (1996) identificaram espiroquetas não cultiváveis no intestino médio de carrapatos da espécie *A. americanum* nos Estados Unidos da América. ARAGÃO (1911a) identificou espiroquetas não cultiváveis infectando galinhas, no Brasil. A *Borrelia* sp. encontrada em nosso meio é de difícil cultivo, podendo haver, no Brasil espécies não cultiváveis infectando roedores e marsupiais.

4.4 - Hemograma: As alterações encontradas de oito gambás examinados foram: linfocitose e eosinofilia (Tabela 1), que não são incomuns em gambás provenientes de captura, já que ocorrem muitas infestações por diversos endoparasitos (JANSEN, 1997).

4.5 - Urinálise: Elementos anormais de sedimentação da urina de 10 gambás, revelaram aspecto límpido, reação ácida, cor amarela, odor muito forte “suis generis”, densidade 1020 a 1030 e presença de algumas células e cristais de oxalato de cálcio (Tabela 2). Um dos animais, apesar de possuir urina ácida, teve como resultado a presença de vários cristais de fosfato triplo. Esse último achado ocorreu em apenas uma coleta, provavelmente devido a alimentação.

Tabela 1. - Valores médios do hemograma de 8 gambás capturados no município de Seropédica, RJ.

	RESULTADO	VALORES NORMAIS *
Eritrócitos	5,35 a 5,56 x 10 ⁶ m l	4,56 X 10 ⁶ m l
Leucócitos totais	8,7 a 10,04 x 10 ³ m l	Nenhum padrão
Hematócrito	45,04 a 46,02 %	44,07 %
Hemoglobina	15,06 a 16,08 g /dl	15,06 g / dl
Linfócitos	60 a 71 %	42,99 %
Neutrófilos	8 a 19 %	46,02 %
Eosinófilos	18 %	8,68 %
Basófilos	1 %	0,31 %
Monócitos	2 %	2,03 %

*Dados obtidos de NAVARRO et al. (1994).

Tabela 2 – Valores médios encontrados na Urinálise de 10 Marsupiais capturados no município de Seropédica, RJ.

Aspecto	Límpido
Cor	Amarelo
Odor	<i>Suis generis</i>
Densidade	1020 a 1030
Reação	Ácida
Hemácias	De ausentes a 1 a 2
Cilindros	Ausentes
Cristais	Vários de oxalato de cálcio
Células epiteliais	Algumas
Muco	Ausente a raros
Flora bacteriana	Discreta a moderada
Urobilinogênio	Normal
Hemoglobina	Presente em 3 animais

5. - CONCLUSÕES

- Foi possível identificar *Borrelia* sp na urina de cinco gambás clinicamente sadios e naturalmente infectados, isentos de ectoparasitos, após imunossupressão com ciclofosfamida.
- A presença de *Borrelia* sp no sangue periférico de camundongos inoculados com macerado dos rins de gambá positivo para este agente, sugere que os primeiros podem servir como modelo experimental.
- A ciclofosfamida mostrou-se eficiente na imunossupressão dos gambás estudados.

4. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, I. S. 1996. Estudo de Borreliose em Marsupiais. Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Zootecnia da UFRRJ como requisito para a obtenção do título de Zootecnista. 30 p.
- ANDERSON, J. F.; JOHNSON, R. C.; MAGNARELLI, L. A. & HYDE, F. W. 1985. Identification of endemic foci of lyme disease: isolation of *Borrelia burgdorferi* from feral rodents and ticks (*D. variabilis*). Journal of Clinical Microbiology, 22 (1): 36 – 38.
- ANDERSON, J. F.; JOHNSON, R. C.; MAGNARELLI, L. A. & HYDE, F. W. 1986. Involvement of birds in the epidemiology of Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* Infect. Immun., 51: 394-396.
- ANDERSON, J. F. & MAGNARELLI, L. A. 1987. *Ixodes dammini* and *Borrelia burgdoeferi* in Northern New England and Upstate New York. Journal of Parasitology, 73 (2): 419 – 421.

- ARAGÃO, H. B. 1911a. Soroterapia e vacinação na espiroquetose das aves. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol 3. 39 p.
- ARAGÃO, H. B. 1911b. Notas sobre Ixódidas brasileiros. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol 3. 169 p.
- ARAGÃO, H. B. 1936. Ixodidas brasileiros de alguns países limítrofes. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 31 (4): 759 – 843.
- BAKKEN, J. S.; KRUETH, J.; WILSON – NORDSKOG & TILDEN, R. L. 1996. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. JAMA 275 (3): 199 - 205.
- BARBOUR, A. G.; BURGDORFER, W.; HAYES, S. E.; PETER, O. & AESCHLIMANN, A. 1983. Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. Curr. Microbiol., 8: 123 – 126.
- BARBOUR, A.G.; MAUPIN ,G. O.; TELTOW, G. I.; CARTER, C. J. & PIESMAN, J. 1996. Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*. Possible agent of Lyme disease like illness. The Journal of Infectious Diseases. 173: 403 – 409.
- BARROS, D. M. & BAGGIO, D. 1992. Ectoparasites Ixodida Leach, 1817 on wild mammals in the State of Paraná, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 87(2): 291-296.

- BISHOP, K. L.; KHAN, M. I. & NIELSEN, S. W. 1994. Experimental infection of northern bobwhite quail with *Borrelia burgdoeferi*. J. of Wildlife Diseases, 30 (4): 506 – 513.
- BONOLDI, V.L.N.; BARROS-BATTESTI, D. M.; FONSECA, A. H.; SOARES, C. O.; S. VASCONCELOS, A.; JOPPERT, A. M.; SCHUMAKER, T. T. S. & YOSHINARI, N. H. 1996. Estudo dos gambás (*Didelphis marsupialis*) na Epidemiologia da Borreliose de Lyme na Região de Itapevi. Anais. XI Reunião Anual da federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu - MG. 214p.
- BOSLER, E. M. B.; ORMISTON, B. G.; COLEMAN, J. L.; HANRAHAN, J. P. & BENACH, J. L. 1984. Prevalence of the lyme disease spirochete populations of white-tailed deer and white-footed mice. Yale Journal of Biology and Medicine, 57: 651 – 659.
- BURGESS, E. C. & L. A. WINDERG. 1989. *Borrelia* sp infection in coyotes, black-tailed jack rabbits and desert cottontails in southern Texas. J. Wildlife Dis., 25(1): 47-51.
- DAMBACH, B. M.; SMITH, C. A. LEWIS, R. M. & VAN-WINKLE, T. J. 1997. Morphologic immunohistochemical, and ultrastructural lesion in dogs putatively associated with *Borrelia burgdorferi*. Vet. Pathology. Mar, 34 (2): 85 – 96.
- FISHBEIN, D. B.; DENNIS, D. T. 1995. Tick - borne diseases- a growing risk. The New England Journal of Medicine .17: 452 - 453.

- FLECHTMANN, C. H. W. 1992. Ácaros de importância médico veterinária. Biblioteca Rural. Livraria Nobel S/A. 50 pág.
- FONSECA, A. H.; SOARES, C. O.; ISHIKAWA, M. M.; MASSARD, C. L. & YOSHINARI, N. H. 1995. Detection of *Borrelia sp* in opossum (Marsupialia: *Didelphidae*) In Brasil. XXV. Congress Of The Wourld Small Animal Veterinary Association. Pacific Yokohama, Japan.
- GODSEY, M. S. JR.; AMUNDSON, T. E.; BURGUESS, E. C. SCHELL, W.; DAVIS, J. P.; KASLOW, R. & EDELMAN, R. 1987. Lyme disease in Wisconsin: distribution and host preferences of *Ixodes dammini* and prevalence of antibody to *Borrelia burgdorferi* in small mamals. Am. J. Trop. Med.Hig., 37 (1): 180 – 187.
- GORDUS, A. G. & THEIS, J. H. 1993. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from the blood of a bushy-tailed wood rat in California. J. Wildlife. Dis., 29 (3): 478-480.
- GORELOVA, N. B.; BELLENGER, E.; POSTIC, D. & KOVALEVSKII, IuV. 1997. Spontaneous mixed infection in rodents with *Borrelia* and *Leptospira*. Med. Parasitol. Mosk. Oct-Dec (4): 53.
- ISHIKAWA, M. M.; SOARES, C. O.; CASTRO, A. L.; ABEL, I. S.; OLIVEIRA, A.; MASSARD, C. L. & FONSECA, A. H. – Estudo da *Borrelia sp* em marsupiais capturados em ambiente peridomiciliar no Estado do Rio de Janeiro. XIV Congresso

Brasileiro de Parasitologia – Suplemento Da Revista De Patologia Tropical 23 (2):
291, 1995.

JANSEN, A. M. 1997. Comunicação Pessoal. Pavilhão Carlos Chagas. Laboratório de
Imunologia. FIOCRUZ. R. J. Brasil.

JOHNSON, R. C.; SCHMID, G. P.; HYDE, F. W.; STEIGERWALT, A. G. & BRENNER,
D. J. 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. International
Journal of Sistematic Bacteriology, 34 (4): 496-497.

LEVINE, J. F.; WILSON, M. L. and SPIELMAN, A. 1985. Mice as reservoir of the Lyme
disease spirochete. Am. Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 34: 355 – 360.

LORD, R. D.; HUMPHEREYS, J. G.; LORD, V. R.; MCLEAN, R. G. & GARLAND, C.
L. 1992. *Borrelia burgdorferi* Infection in White-footed Mice (*Peromyscus leucopus*)
in Hemlock (*Tsuga canadensis*) Habitat in Western Pennsylvania. Journal of Wildlife
Diseases, 28 (3): 364 - 368.

MAGNARELLI, L. A.; MEEGAN, J. M.; ANDERSON, J. F. & CHAPPELL, W. A.
1984. Parasitism by *Ixodes damni* (ACARI: IXODIDAE) and antibodies to spirochetes
in mammals at Lyme disease foci in Connecticut, USA. J. Med. Entomol. 21 (1):52-57.

- MAGNARELLI, L. A. MILLER, J. N. ANDERSON, J. F. AND RIVIERE, G. R. 1990. Cross-reactivity of non-specific treponeman antibody in serological tests for Lyme disease. J. Clin Microbiolol. 28: 1276 – 1279.
- MAZUZAWA, T.; BEPPU, Y.; KAWABATA, H.; YANAGIHARA, Y.; IWAMOTO, Y.; SHIMIZU, T. & JOHNSON, R. C. 1992. Journal of Clinical Microbiology 30 (11): 3016-3018.
- NAVARRO, C. E. K. G. & PACHALY, J. R. 1994. Manual de Hematologia Veterinária. 1ª Edição. Livraria Varela. 169 p.
- PAIVA, M. G. S.; CHAPLIN, E. L.; FORTES, E.; STOBBE, N. S.; ARAUJO, F. A.P. & SILVA, N. R. S. 1996. Metodologia de esplenectomia em *Didelphis marsupialis*. Ver. Bras. Med. Vet., 18 (04): 149 – 150.
- PESSOA, S. B. 1963. Parasitologia Médica. Livraria Ed. Guanabara. 2ª edição. 849 p.
- PIESMAN, J.; DONAHUE, J. G.; MATHER, T. N. & SPIELMAN, A. 1986. Transovarially acquired Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) in field - collected larval *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol., 23: 219.
- RANDOLPH, S. E. ; GERN, L. and NUTTAL, P. A 1996. Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. Parasitology Today 12 (12): 455 - 496.

- SCHMID, G. P. 1985. The global distribution of Lyme disease. Ver. Infectious Diseases, 7: 41 – 50.
- SCHULZE, T. L.; BOWEN, G. S.; LAKAT, M.; PARKIN, W. E. & SHISLER, J. K. 1986. Seasonal abundance hosts of *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) and other ixodid ticks from na endemic Lyme disease focus in New Jersey, USA. J. Med. Entomol. 23 (1): 105 – 109.
- SCORZA, J. V. 1992. Importancia del *Didelphis marsupialis* en Salud Publica. Consejo de Publicaciones de Universidad de los Andes .Mérida - Venezuela. 62 p.
- SERRA-FREIRE, N. M. 1979. *Babesia ernestoi* n. sp., in *Didelphis marsupialis* L., 1758 and *D. albiventris* Lund, 1841 in Brazil. Zbl. Vet. Med. B. 26: 614-629.
- SMITH, R. P.; RAND, P. W.; LACOMBE, E. H.; TELFORD III, S. R.; RICH, S. M.; PIESMAN, J. & SPILMAN, A. 1993. Norway rats as reservoir hosts for Lyme disease spirochetes on Monhegan Island, Maine. The Journal of Infectious Diseases, 168: 687 - 691.
- SINSKY, R. J. & PIESMAN, J. 1989. Ear punch biopsy method for detection of *Borrelia burgdorferi* from rodents. Journal of Clinical Microbiology, 27: 1723 – 1727.

SPACH, D.; LILES W. C.; CAMPBELL, G. L.; QUICK, R. E.; ANDERSON, D. E. & FRITSCHÉ, T. R. 1993. Tick – borne diseases in the United States. The New Journal of Medicine, 23 (23): 936 – 947.

YOSHINARI, N. R.; BARROS, P. J. L.; BONOLDI, V. L. N.; ISHIKAWA, M.; BATTESI, D. M. B.; PIRANA, S.; FONSECA, A.H. & SCHUMAKER, T. T. 1997. Perfil da Boreliose de Lyme no Brasil. Ver. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo, 52 (2): 111 – 117.