

Hessem Miranda Neiva

**FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS DE *Leishmania* sp EM *Rattus norvegicus*
NO MUNICÍPIO DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2005

N417f Neiva, Hessem Miranda, 1968-

Freqüência de anticorpos de *Leishmania* sp em *Rattus norvegicus* no município de Belo Horizonte, Minas Gerais / Hessem Miranda Neiva. – 2005. 45 p. : il.

Orientador: Jenner karlisson Pimenta dos Reis
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Leishmaniose visceral americana – Teses. 2. Leishmania – Teses.
3. Epidemiologia - Teses. I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 616.936 4

Dissertação defendida e aprovada em 31 de maio de 2005 pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Orientador




Prof. Romário Cerqueira Leite



Prof. José Oswaldo Costa



Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho



Dra. Cristina Marques Lisboa Lopes

AGRADECIMENTOS

À Escola de Veterinária da UFMG por acreditar e apoiar os profissionais das demais áreas de saúde.

À Prefeitura Municipal de Belo Horizonte/ Secretaria Municipal de Saúde/Gerência de Controle de Zoonoses da Pampulha, na pessoa de Jerônimo Avendanha, pelo apoio fundamental na captura dos roedores.

Aos funcionários e estagiários da Gerência de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, Cristiano, Joseph, Gabriela e Lígia pela persistência e dedicação na captura dos roedores.

À equipe do Laboratório de Parasitologia do ICB da UFMG, em especial a Roberto Teodoro da Costa, pelo apoio e ensinamentos.

À equipe do Laboratório de Leishmaniose Canina da Escola de Veterinária da UFMG, em especial à Juliana e Jader pela paciência e auxílio nas análises.

À equipe do Laboratório de pesquisas de Endo- Ectoparasitose da Escola de Veterinária da UFMG, na pessoa do Prof. José Oswaldo Costa que me acolheu pacientemente no seu laboratório.

Ao Prof. Elvivo Carlos Moreira pelos ensinamentos e apoio.

Ao Prof. Jenner K. Pimenta dos Reis pela orientação e disponibilidade.

Aos pesquisadores do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz, Edelberto Santos dias, Célia Maria Ferreira Gontijo e Ricardo Barata pelo apoio nas análises das amostras.

Ao prof. João Paulo Haddad pela colaboração nas análises estatísticas.

Aos Funcionários da Escola de Veterinária da UFMG, Toninho, Eduardo e D. Sônia pela dedicação e apoio.

Aos colegas Bruna e Leandro pela ajuda fundamental na realização do trabalho.

Ao farmacêutico e amigo Mário Borges Rosa pela amizade e apoio incondicional.

Às farmacêuticas e amigas Tânia e Valdirene pela disponibilidade sempre.

Ao meu sobrinho e afilhado Olavo pelo convívio, paciência, disponibilidade e auxílio nos momentos de stress com o computador.

A toda a equipe do Laboratório de Retrovíruses da Escola de Veterinária da UFMG pelo apoio e amizade.

SUMÁRIO

	RESUMO	9
	ABSTRACT	9
1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	12
2.2	RESERVATÓRIOS DO PARASITA.....	16
2.3	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	ÁREA DE ESTUDO.....	18
3.2	CAPTURA DOS ANIMAIS E COLETA DE AMOSTRAS.....	19
3.3	TÉCNICAS DE ANÁLISE.....	19
3.3.1	Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	19
3.3.2	Teste Imunoenzimático (ELISA).....	20
3.3.3	Exame parasitológico.....	20
3.3.4	Reação de Hemaglutinação Indireta (RHI).....	21
3.3.5	Reação Cadeia Polimerase (PCR).....	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5	CONCLUSÃO	34
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
8	ANEXOS	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Casos humanos e óbitos de Leishmaniose visceral (LV) em Belo Horizonte, 1993 a 2004	15
Tabela 2-	Casos humanos de Leishmaniose visceral ocorridos no Município de Belo Horizonte, por distrito Sanitário entre 1994 e 2004	15
Tabela 3-	Resultado das análises sorológicas (ELISA e RIFI) nas 29 amostras coletadas em papel de filtro e soro	31
Tabela 4-	Resultado dos testes sorológicos por Distrito Sanitário	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Leishmaniose visceral- Série histórica de casos e óbitos, Brasil, 1980-2003 ...	13
Gráfico 2 -	Sensibilidade do teste ELISA em amostras de soro.....	25
Gráfico 3 -	Sensibilidade e especificidade do teste Elisa em amostras de soro... ..	25
Gráfico 4 -	Sensibilidade do teste de ELISA em amostras coletadas em papel de filtro.....	27
Gráfico 5-	Sensibilidade e especificidade do teste ELISA em amostras coletadas em papel de filtro	29
Gráfico 6-	Comparação de resultados sorológicos das 98 amostras analisadas	31

ANEXOS

Anexo 1 -	Mapa da Região Metropolitana de Belo Horizonte.....	41
Anexo 2 -	Mapa dos Distritos Sanitários da Cidade de Belo Horizonte	43
Anexo 3-	Resultado do Teste PCR.....	45

RESUMO

A leishmaniose visceral americana (LVA) é uma doença parasitária transmitida por um protozoário denominado *Leishmania chagasi* através da picada da fêmea do mosquito hematófago dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, tendo como principais reservatórios o cão e a raposa. Com objetivo de verificar a frequência de anticorpos de *Leishmania* sp em *Rattus norvegicus*, nos Distritos Sanitários (DS) da Pampulha, Venda Nova e Norte no Município de Belo Horizonte, Minas Gerais, utilizando técnicas sorológicas; foram coletadas amostras de sangue de 98 animais. Verificou-se uma reatividade de 27,6 % naquelas analisadas nos testes ELISA e RIFI e identificou-se o protozoário *Leishmania* em uma amostra analisada pela técnica Reação Cadeia de Polimerase (PCR). Os resultados obtidos, considerando os Distritos Sanitários, separadamente, foram de 29,3% para amostras referentes ao Distrito Sanitário Pampulha nos testes ELISA e RIFI, 21,0% no DS Venda Nova e 25,0 % na regional Norte.

PALAVRAS-CHAVE: *Rattus norvegicus*, leishmaniose visceral, anticorpos, *Leishmania*.

ABSTRACT

American Visceral Leishmaniasis (AVL) is a parasitic disease caused by a protozoan named *Leishmania chagasi* and transmitted by the bite of female hematophagous mosquitoes of the genus *Phlebotomus* and *Lutzomyia*. The main reservoirs of the parasite are the dog and the fox. With the objective of determining the frequency of antibodies against *Leishmania* sp in *Rattus norvegicus* in the Sanitary Districts (SD) of Pampulha, Venda Nova and North of Belo Horizonte, Minas Gerais, blood samples were collected from 98 animals. A positivity rate of 27.6% was observed in samples analyzed by ELISA and the presence of the *Leishmania* protozoan was identified by the Polymerase Chain Reaction (PCR). Considering the Sanitary Districts individually, the positivity rates in ELISA and IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test) were 29.3% for samples from the Pampulha District, 21.0% for samples from the Venda Nova District and 25.0% for samples from the North region of Belo Horizonte.

KEYWORDS: *Rattus norvegicus*, visceral leishmaniasis, antibodies, *Leishmania*.

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros casos de leishmaniose visceral (LV) foram observados, na Índia, por Cunningham em 1885 e o agente etiológico descrito em 1903, quase simultaneamente, por William Leishman e Charles Donovan. Laveran e Mesnil, em 1903, nomearam o parasito, associando-o ao calazar indiano, de *Piroplasma donovani*, sendo corrigido naquele mesmo ano por Ross, que criou o gênero *Leishmania*, denominando assim o agente etiológico do calazar de *Leishmania donovani* (Genaro, 2000).

Desde a descrição do parasita, várias classificações foram propostas. Inicialmente, a classificação do protozoário foi baseada nos aspectos clínicos da doença, admitindo-se três espécies do gênero *Leishmania*, a saber, a *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica* e a *Leishmania braziliensis* responsáveis pela leishmaniose visceral, cutânea e cutâneomucosa, respectivamente. A leishmaniose visceral, na Índia e no Sudão, que ocorria principalmente, em adultos, foi reconhecida como *L. donovani* e os casos em crianças, no Mediterrâneo, foram reconhecidos como *L. infantum*, admitindo-se portanto, duas variedades de *Leishmania* causadoras da leishmaniose visceral. Nas Américas, por muitos anos, o parasita causador da leishmaniose visceral foi simplesmente chamado de *L. donovani*, mas em 1937, Cunha e Chagas o identificaram como *L. chagasi*, tendo notado diferenças bioquímicas no parasito que se comportava diferentemente de outras espécies de *Leishmania* ante reação soro aglutinantes (Lainson, 1983; Maciel et al., 1947).

Pessoa (1961), citado por Michalick (2000), propôs uma classificação baseada, principalmente, em aspectos epidemiológicos, considerando que as formas de leishmaniose visceral, no mundo, eram causadas por uma única espécie do

parasita, a *Leishmania donovani* e a *Leishmania tropica tropica*, responsáveis pelas formas de leishmaniose cutânea urbana do Velho Mundo e a *Leishmania tropica major* pelas formas cutâneas de ocorrência rural.

Atualmente, o sistema de classificação tem sido complementado por uma variedade de métodos bioquímicos e imunológicos, dentre estes, o critério molecular que define características intrínsecas do parasita. Comparações de fragmentos de DNA indicam que a *L. chagasi* e *L. infantum* representam uma única espécie, no Novo Mundo. Há evidências de que a *L. chagasi* foi introduzida ali, por migrantes humanos e seus cães oriundos de regiões do mediterrâneo, correspondendo, portanto, à *L. infantum* (Grimaldi Jr. et al., 1989).

Ainda existem controvérsias quanto ao uso do nome específico *chagasi* para o agente etiológico da LV, uma vez que alguns autores consideram a *Leishmania chagasi* igual à *Leishmania infantum* (Manual, 2004). Neste trabalho, considerou-se o nome *chagasi* para denominação do agente etiológico.

Trata-se de uma doença sistêmica denominada leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar transmitida através da picada de fêmeas do mosquito hematófago do gênero *Phlebotomus* conhecidos como flebotomíneos (Insecta: Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo, tendo como principal reservatório o cão e a raposa (Pessoa e Martins, 1982). É causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que agrupa organismos unicelulares, heteroxenos, pertencentes à ordem *Kinetoplastida* e à família *Trypanosomatidae*. Os vetores são infectados quando se alimentam de sangue de um hospedeiro reservatório, nos quais se

incluem o homem ou animais domésticos e selvagens (Desjeux, 1992; Michalick, 2000).

Todas as espécies de *Leishmania* são morfológicamente semelhantes e apresentam, basicamente, três formas em seu ciclo de vida: paramastigota e promastigota no mosquito e amastigota, encontrada nos macrófagos dos hospedeiros vertebrados. A forma amastigota é intracelular, arredondada ou fusiforme, medindo entre 2 e 5 μm de diâmetro, contendo núcleo simples, cinetoplasto e flagelo rudimentar, e se divide, repetidamente, por fissão binária longitudinal. No trato digestivo do hospedeiro invertebrado, sofre várias transformações evolutivas e atinge a forma promastigota metacíclica infectante, que possui núcleo central, cinetoplasto terminal e flagelo bem desenvolvido.

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo da fêmea do vetor, quando as formas promastigotas infectantes são inoculadas e então fagocitadas pelas células do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF), especificamente, pelos macrófagos, principalmente, daquelas localizadas no fígado, baço e medula óssea. Após a interiorização no macrófago, as formas promastigotas sofrem transformação para amastigota, que é uma forma intracelular obrigatória. Após sucessivas multiplicações, as células se rompem liberando as formas amastigotas que podem ser fagocitadas por outros macrófagos. No vetor, após ingestão da forma amastigota proveniente do sangue do hospedeiro vertebrado, sofrem transformações evolutivas no seu trato digestivo, no qual é descrita uma variedade morfológica do parasito nos estágios promastigota e paramastigota. Essas formas promastigotas infectantes migram para a porção anterior do tubo digestivo do inseto (proboscida) e são inoculadas juntamente com a saliva no hospedeiro vertebrado, no próximo repasto sanguíneo, completando assim o ciclo evolutivo (Genaro, 2000).

A manutenção dos protozoários *Leishmania*, nos hospedeiros, depende de vários fatores, sendo os mais importantes: a densidade populacional do hospedeiro, a duração da infecção, a localização dos parasitas e a resposta imune no hospedeiro. A distribuição de cada espécie de *Leishmania* é determinada pela presença do vetor, do hospedeiro ou de ambos (Ashford, 2000).

A epidemiologia da leishmaniose é extremamente diversa, sendo, aproximadamente, 20 espécies de *Leishmania* patogênicas para o homem e 30 espécies de mosquito são, comprovadamente, vetores, podendo apresentar-se de duas formas distintas: a zoonótica, que ocorre na América Latina, Mediterrâneo e Ásia, e a antroponótica, restrita ao leste da África e sub continente indiano (Bangladesh, Índia e Nepal) (Ashford, 2000; Desjeux, 2001; Leishmaniasis, 2005).

Considerando as diferenças no perfil epidemiológico e mudanças no comportamento da doença, vários fatores relacionados ao ambiente urbano devem ser revistos, tais como estudos sistematizados com ênfase nos vetores, reservatórios e modificações do ambiente que irão favorecer a expansão da doença. A proximidade dos roedores *R. norvegicus* ao ambiente domiciliar e sua participação em várias doenças transmitidas ao homem, como a Hantavirose e leptospirose, sugerem também sua participação no ciclo zoonótico da LVA. Esses roedores formam um importante grupo que pode estar servindo como reservatório para o protozoário.

Com objetivo de verificar a frequência sorológica de *Rattus norvegicus* reativos nos testes ELISA e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), foram coletadas amostras de sangue destes animais em três áreas de transmissão da leishmaniose visceral, em Belo Horizonte, Minas Gerais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A leishmaniose é prevalente em quatro continentes, considerada endêmica em 88 países, dentre os quais 72 em desenvolvimento, atingindo 12 milhões de pessoas em todo o mundo, com ocorrência de dois milhões de casos novos anualmente (500.000 de LV).

Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral no mundo foram relatados em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão e mais de 80% de leishmaniose cutânea (LC) ocorreu no Afeganistão, Brasil, Irã, Arábia Saudita e Síria (Leishmaniasis, 2005).

Nas Américas, a *Leishmania chagasi* é encontrada dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O primeiro diagnóstico clínico da leishmaniose visceral humana, autóctone, nas Américas, foi em 1913, no Paraguai. Desde então, a doença tem sido registrada na Argentina, Brasil, Venezuela, Guatemala, El Salvador, México, Suriname, Equador e Honduras (Alencar, 1958; Lainson, 1983).

No Brasil, é uma doença endêmica com registro de surtos frequentes, encontrada em 19 Estados da federação, atingindo quatro das cinco regiões brasileiras. Sua maior incidência é no Nordeste com 90% do total de casos, seguido pela região Sudeste, Norte e, finalmente, a Centro-Sul. À medida que a

doença se expande para outras regiões e atinge áreas urbanas e periurbanas, essa situação se modifica, e no período de 2000 a 2002, a região Nordeste já representava uma redução de 77% dos casos do país (Guia..., 2002a; Manual..., 2004).

Segundo dados do Ministério da Saúde houve, na década de 80, no Brasil, um aumento significativo nos casos humanos de LVA e leishmaniose tegumentar americana (LTA); progressão essa que continuou na década de 90 e vem aumentando nos últimos anos. Entre 1984 e 2002, os casos de LVA somaram 48.455 casos, sendo, aproximadamente, 66% deles nos Estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. A média anual, notificada nos últimos 10 anos foi de 3.156 casos, e a incidência de 2 casos/100.000 hab. Também nesses últimos 10 anos, os dados epidemiológicos revelaram a periurbanização e urbanização da LVA, destacando-se surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luis (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e, mais recentemente, em Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO). Houve um incremento do número de casos em 2000 com 4.858 notificados, e um maior número de óbitos, 226, ocorridos no ano de 2002. Entretanto, no ano de 2003, houve uma redução do número de casos e de óbitos notificados no Brasil. (Graf. 1) (Manual..., 2004; Leishmaniose, 2005).

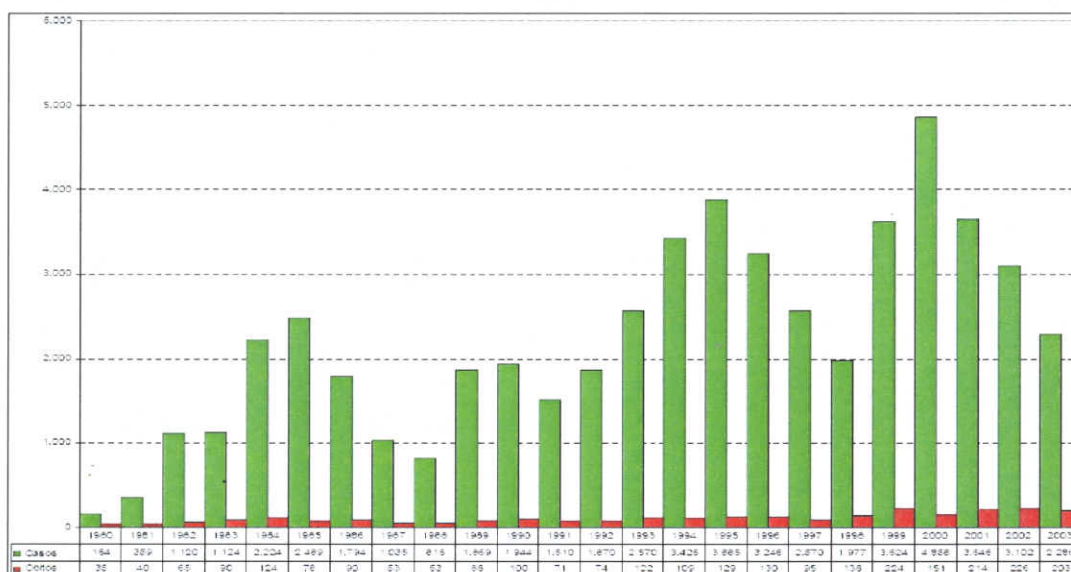


Gráfico 1 - Leishmaniose Visceral – Série histórica de casos e óbitos, Brasil, 1980-2003

Fonte - Brasil (2005)

O primeiro caso de LVA do Estado de Minas Gerais, foi diagnosticado por Maciel e Rosenfeld (1947), em São Paulo, em um paciente natural de Serranópolis, norte do Estado de Minas Gerais. Mas, o primeiro caso, comprovadamente autóctone de Minas Gerais, foi diagnosticado em 1953, em Belo Horizonte, em paciente proveniente do Vale do Rio Doce (Cançado et al., 1956; Oliveira et al., 1959).

Em Belo Horizonte, capital de Minas Gerais, a entrada da doença deu-se a partir dos Distritos Sanitários Nordeste e Leste, regiões que fazem limite, geograficamente, com o Município de Sabará, onde, em 1989, foi notificado o óbito de uma criança acometida pela LVA, e em inquérito epidemiológico foram encontrados cães positivos para *L. chagasi* e *L. longipalpis* nas residências da região. Desde então, a doença tem-se expandido, rapidamente, para as demais regiões do Município, presente, atualmente, em todos os distritos sanitários e demais Municípios da Região metropolitana, independente das condições sócio-econômicas da população. Acomete pessoas saudáveis e moradores de áreas nobres da

capital, o que pode ser explicado pela existência de susceptibilidade da população à doença (Bevilacqua, 1999; Bevilacqua et al., 2001; Genaro et al., 1990; Luz et al., 2001).

Belo Horizonte sofre uma epidemia humana e canina da doença desde 1993 (345 casos de 1994 até 1999). Tal situação demonstra o processo de urbanização das leishmanioses que ocorrem em algumas cidades brasileiras. Desde a década de 70, a região metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) apresenta-se em expansão geográfica, o que favoreceu a ocupação periférica, de maneira desordenada, com verticalização do centro da cidade e redução de áreas verdes, disponíveis no ambiente urbano, conseqüentemente, com surgimento de favelas e expansão de loteamentos. Associados a esses fatores, soma-se a dificuldade de controle da doença nos centros urbanos, devido à aglomeração humana, desnutrição, más condições de moradia e dificuldade de eliminação dos reservatórios (Oliveira, 1999).

Silva et al. (2001) observaram que a transmissão da LVA, na região metropolitana de Belo Horizonte (RMBH), ocorre em um número maior em crianças menores de um ano, no peri e intradomicílio e a prevalência da infecção em cães é mais alta que no homem com 68% de animais com infecção inaparente. Souza et al. (2004) identificaram no Município de Belo Horizonte, uma densidade alta de vetores nas áreas intra e peri domiciliares.

No período de 1994 a 2004, o número de casos de leishmaniose visceral humana aumentou, significativamente, em Belo Horizonte, com a maior taxa de letalidade

registrada nos anos de 1994, 2000 e 2004, sendo a média de 13% nos últimos 11 anos (Tabela 1).

Em relação à ocorrência de leishmaniose visceral humana por Distrito Sanitário, em Belo Horizonte, verifica-se que, no período de 1994 a 2004, praticamente em todas as regiões do Município houve aumento do número de casos da doença, apesar das medidas de controle adotadas, com um maior número de casos nas regiões Norte, Leste e Nordeste (Tabela 2).

Tabela 1. Casos humanos e óbitos de leishmaniose visceral em Belo Horizonte, 1994 a 2004.

	Ano											Total
	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	
Casos	29	46	48	47	25	33	44	57	77	103	128	637
Óbitos	6	4	3	4	4	3	8	9	9	10	23	83
Letalidade (%)	20,7	8,7	6,2	8,5	16	9,1	18,2	15,7	11,7	9,7	18,1	

Fonte - Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte, SMSA/PBH; Gerência de Controle de Zoonoses, SMSA/PBH; Gerência de Epidemiologia e Informações, SMSA/PBH.

Tabela 2. Casos humanos de leishmaniose visceral ocorridos em Belo Horizonte, por Distrito Sanitário, de 1994 a 2004.

Distrito	Ano											Total
	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	
Barreiro	0	0	1	1	1	1	3	1	3	2	6	19
Centro sul	0	3	4	1	3	5	3	1	2	7	5	34
Leste	17	15	18	17	7	3	1	3	8	10	14	114
Nordeste	12	24	12	11	4	7	16	15	17	12	22	152
Noroeste	0	0	5	6	4	2	4	6	9	17	24	77
Norte	0	2	3	7	1	11	9	11	12	25	22	103
Oeste	0	1	1	1	2	0	4	3	3	3	10	28
Pampulha	0	0	1	1	0	0	3	8	5	11	5	34
Venda Nova	0	0	2	0	3	4	1	9	17	16	20	72
Indeterminado	0	1	1	2	0	0	0	0	0	1	0	6
Total	29	46	48	47	25	33	44	57	77	103	128	637

Fonte - Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte, SMSA/PBH; Gerência de Controle de Zoonoses, SMSA/PBH; Gerência de Epidemiologia e Informações, SMSA/PBH.

2.2 RESERVATÓRIOS DO PARASITA

Vários trabalhos vêm sendo realizados, ao longo dos anos, com a finalidade de identificar os reservatórios do parasita *Leishmania*.

Segundo Nery et al. (1968) desde as primeiras décadas do século XX, a busca pelos reservatórios silvestres das leishmanioses tem sido o objetivo de pesquisadores, no Velho e Novo Mundo, dando-se ênfase aos roedores desde o momento em que foram descobertos como reservatório de *Leishmania* spp. Young et al. (1929) realizaram trabalho na China, com objetivo de verificar a susceptibilidade de vários roedores como hamster (*Cricetulus griseus* e *Cricetulus triton*), "vole" (*Microtus* sp.) e ratos das espécies *Mus wagneri*, *Mus rattus* e *Mus rattus albinus* à infecção por *L. donovani*, concluindo que todos os animais foram susceptíveis à infecção pelo protozoário.

Em 1954, Deane e Deane constataram, pela primeira vez, a infecção natural de uma raposa por *Leishmania donovani*, em Sobral, no Ceará. Nos anos seguintes, vários estudos foram realizados no sentido de determinar, nos animais silvestres, a infecção por *Leishmania* spp. Forratini, em 1960, citado por Lainson e Shaw (1968), examinou 928 animais existentes em florestas brasileiras, encontrando a *Leishmania* sp em apenas uma paca (*Cuniculus paca*), e observou lesões na pele de um rato (*Kannabateomys amblyonyx*) e em cotia da espécie *Dasyprocta azarae*. Em 1968, nos arredores de Bagdá, no Iraque, Bray e Dabbagh examinaram 132 cachorros selvagens e 52 roedores para constatar possível infecção com *Leishmania*, entretanto, obtiveram resultado negativo em todas as culturas de tecido. No Estado do Piauí, Deane et al. (1974) encontraram um exemplar de porco-espinho, naturalmente infectado por *Leishmania*, nas vísceras, sendo,

posteriormente, descrita como *Leishmania hertigi* por Herrer (1971).

Hoogstraal et al. (1963), em trabalho realizado na cidade de Malakal, no Sudão, com inoculação, em hamsters, de culturas obtidas do baço de animais das espécies *R. rattus* e *Acomys* spp., demonstraram a infecção desses animais por *L. donovani*. E, em 1968 indicaram os roedores *Arvicanthis niloticus*, *Acomys albigens* e *Rattus rattus*, e os carnívoros *Genetta genetta* e *Felis serval* como hospedeiros do parasita causador da LV, no Sudão, a *L. donovani* (Hoogstraal et al., 1968).

Lainson (1983) demonstrou a importância de vários animais silvestres na transmissão da LVA, na região amazônica, funcionando como reservatório da doença no ambiente peridomiciliar. Nesse trabalho, a *L. chagasi* foi isolada na pele e vísceras de uma raposa (*Cerdocyon thous*) e consideráveis números de flebotomíneos *L. longipalpis* foram encontrados em casas e galinheiros das vilas onde ocorria a LVA.

Em trabalho experimental com inoculação de *L. chagasi* em *Calomys callosus*, Mello e Teixeira (1984) verificaram a presença de numerosas formas amastigotas intra e extracelular em todos os esfregaços de medula óssea, fígado e baço desses animais.

Em 1984, Sherlock et al. identificaram o primeiro mamífero não canídeo silvestre, *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae), proveniente da cidade de Jacobina, Estado da Bahia, naturalmente infectado com o agente causador da LVA, no Novo Mundo. Em 1988, esses pesquisadores realizaram infecção experimental em *Didelphis albiventris* com *L. donovani*, que, em análise pós-mortem, mostrou esplenomegalia, presença de quantidades abundantes de formas amastigotas e lesões características no baço e fígado. O fato foi confirmado, na

Colômbia, por Corredor et al. (1989), com o isolamento de *L. chagasi* nesses animais. Em 1994, Travi et al. registraram o isolamento de *L. chagasi* em gambás (*D. marsupialis*) capturados nas imediações de residências, na Colômbia, mediante cultivo *in vitro* de baço, fígado e pele dos animais em vários meios de cultura e da inoculação intraperitoneal em hamsters, encontrando a *L. chagasi* em cinco (22,7%) dos 22 gambás estudados, sendo esses considerados reservatórios importantes do parasita. Em 1998, esses pesquisadores estudaram mamíferos provenientes de florestas intactas e degradadas do norte da Colômbia, encontrando, em ambas, *D. marsupialis* e *Proechimys canicollis* infectados com *L. chagasi*.

Ratos pretos foram capturados, nos arredores de Bagdá, no Iraque, e culturas vivas foram obtidas do sangue e baço desses animais, sendo, posteriormente, inoculadas em camundongos. Após 120 dias foi constatada a leishmaniose visceral típica nesses animais (El-Adhami, 1976).

Pozio et al. (1981) capturaram 94 *Rattus rattus* e 38 *Rattus norvegicus*, na região de Monte Argentário, Itália, com posterior inoculação de homogeneizados esplênicos desses animais em hamsters, sendo encontrado em 30 deles, a *L. donovani*, agente etiológico da leishmaniose visceral na Bacia do Mediterrâneo. Em 1983, Gradoni et al. verificaram o papel do *Rattus rattus* na epidemiologia da leishmaniose visceral na região da Toscana, Itália, através de infecção experimental desses animais, sugerindo serem esses, reservatórios da doença na Bacia do Mediterrâneo.

R. norvegicus inoculados em laboratório, com cepas de *L. donovani* 1S isolada, no Sudão, em condições similares as que ocorrem na natureza, demonstraram a incapacidade desses se infectarem com *L. donovani*. Assim como, a inoculação de ratos de espinho (*Proechimys semispinosus*),

em laboratório, com *L. chagasi*, indicou que esses animais não são susceptíveis à infecção por *Leishmania* (Giannini, 1985; Travi et al., 2002).

No Distrito de Meshkin-Shahr, na República do Iran, em área endêmica de leishmaniose visceral, encontrou-se roedores (*Mer. Persicus*, *Mes. Auratus*) naturalmente infectados com *L. infantum* (Mohebbali et al., 1998).

Costa (2002), em trabalho realizado no Município de Araçuaí, Minas Gerais, detectou em roedores silvestres e sinantrópicos, através da Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) associada à hibridização molecular, a presença de DNA de parasitas dos três complexos de *Leishmania* em *R. rattus*, indicando que essa espécie de roedor pode estar participando do ciclo zoonótico doméstico da leishmaniose tegumentar e visceral na região.

Esses resultados sugerem a necessidade de um estudo aprofundado nesses animais como possíveis hospedeiros da *L. chagasi* no peridomicílio.

A identificação dos reservatórios da leishmaniose é o pré-requisito para a seleção e aplicação de métodos seletivos de controle (Desjeux, 1992).

2.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico da leishmaniose visceral pode ser realizado através de testes parasitológicos, sorológicos e moleculares, que possuem sensibilidade e especificidade distintas. Pode-se realizar o teste parasitológico em material obtido de punção de medula óssea, fígado, baço ou linfonodo, que são utilizados na confecção de esfregaço ou impressão em lâminas, histologia, isolamento em meios de cultura ou inoculação em animais de laboratório. Segundo Sundar e Rai (2002), a especificidade do método é de 100%, porém

a sensibilidade é variável devido a distribuição pouco homogênea dos parasitas no mesmo tecido. A pesquisa do parasita requer atuação de profissionais especializados, pelo fato de o reconhecimento desse estar condicionado à experiência do profissional (Genaro, 2000).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) passou a ser utilizada a partir da década de 60 com finalidade de detectar anticorpos no soro. Demonstra uma sensibilidade que varia de 90 a 100% e especificidade aproximada de 80% para amostras de soro e, atualmente, tornou-se técnica recomendada pelo Ministério da Saúde no diagnóstico da leishmaniose visceral. Essa especificidade é prejudicada no diagnóstico da leishmaniose visceral, por reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanosomatídeos, como o da Doença de Chagas e os da leishmaniose tegumentar americana.

Mayrink et al. (1967) demonstraram a melhor sensibilidade da RIFI em comparação à técnica de Reação de Fixação do Complemento, que era utilizada no diagnóstico.

A técnica do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) consiste na detecção de anticorpos no soro. É um teste sensível, que permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, sendo mais sensível e menos específico que a RIFI. Os antígenos utilizados são quase sempre derivados de Cultura de promastigota, parasitas intactos ou moléculas solúveis (Sundar et al., 2002).

O mecanismo de reação de teste é semelhante à RIFI, porém o conjugado é marcado com uma enzima, que interage com um substrato adequado dando cor à reação, permitindo, assim, a leitura em espectrofotômetro (Genaro, 2000).

El-Amin et al. (1986) compararam a técnica ELISA e hemaglutinação indireta no

sorodiagnóstico de leishmaniose visceral e mucosa, concluindo que a técnica ELISA era mais sensível.

Essa técnica foi recomendada no Manual de controle de doenças do Ministério da Saúde como triagem e o RIFI como confirmação de casos positivos no diagnóstico sorológico de cães (Guia..., 2002a).

Segundo Gontijo e Melo (2004), as técnicas de biologia molecular para detecção e identificação precisa dos parasitas do gênero *Leishmania*, sem a necessidade de isolamento do parasita em cultura, começaram a ser desenvolvidas na década de 80. Atualmente, métodos de hibridização com sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, incluindo a PCR, estão disponíveis para identificação do parasita, podendo utilizar diferentes tipos de amostras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado na cidade de Belo Horizonte, capital do Estado de Minas Gerais, zona metalúrgica e ocupa uma área de 6.000 km², considerando-se também a região metropolitana, composta de 24 cidades (ANEXO 1). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE 2000, a população estimada da cidade é de 2.238.526 milhões de habitantes e na região metropolitana 4.357.942. Localiza-se entre montanhas na latitude 18-20° S e longitude 43-45° W, tem clima tropical, chuvas no verão e inverno seco. A economia da região é baseada em indústria, agricultura e extração mineral e 30% da população do Estado vive nessa área (Censo..., 2000; Oliveira, 1999; Silva et al., 2001).

Está dividida em nove Distritos Sanitários (ANEXO 2), que possuem no seu organograma, representação técnica dos

serviços da Secretaria Municipal de Saúde, com certo espaço geográfico, populacional e administrativo definido. O Serviço de Controle de Zoonoses foi incorporado ao sistema em 1993, e, entre os anos de 1995 e 1996, parte de suas ações foi descentralizada para os Centros de Saúde. Atualmente, a Gerência de Controle de Zoonoses é responsável pelo controle dos reservatórios, sacrifício de cães positivos e combate ao vetor. O atendimento e treinamento dos profissionais-médicos e auxiliares das Unidades Básicas de Saúde são responsabilidades do setor de Assistência a Saúde, e o Núcleo de Vigilância Epidemiológica pela investigação e notificação de casos humanos, mostrando desse modo a descentralização das ações de controle das zoonoses (Oliveira, 1999).

A captura dos animais para estudo ocorreu nas Regionais Pampulha, Norte e Venda Nova regiões que apresentam características distintas. O Distrito Sanitário da Pampulha é o segundo maior Distrito Sanitário de Belo Horizonte em extensão com uma área de 46,03 Km² com 142.602 habitantes, numa região que agrega grande parte das atrações turísticas e de lazer de Belo Horizonte. Em contraste às residências luxuosas existentes, também apresenta grande número de áreas de risco.

A Regional Norte ocupa uma área de 34,32 Km², limitando-se com os distritos Sanitários de Venda Nova, Pampulha e Nordeste e uma População de 193.764 habitantes. Há bairros com razoável infraestrutura e outros em condições inadequadas de habitabilidade. Na Regional Venda Nova, vivem atualmente 244.566 habitantes, segundo dados do Censo IBGE (2000), com predominância da população jovem, residindo em áreas com significativa precariedade de infra-estrutura urbana (Distrito..., 2005).

3.2 CAPTURA DOS ANIMAIS E COLETA DE AMOSTRAS

Os animais foram capturados nas regiões da Pampulha, Venda Nova e Norte, no período de abril de 2003 a dezembro de 2004, utilizando-se sem sucesso de diferentes tipos de iscas como amendoim torrado com aveia e óleo de fígado de bacalhau, milho verde, bacon e frutas. Posteriormente, utilizou-se ração para cães, que foi distribuída aleatoriamente, nas proximidades das ninheiras, bem como dentro das armadilhas por períodos prolongados. Eram vistórias, diariamente, pela manhã, sendo essa a única isca utilizada com a qual se obteve êxito na captura. As armadilhas eram de arame galvanizado, tipo gaiolas medindo 35x12x12 cm e distribuídas aleatoriamente em pontos de cada Distrito Sanitário onde se constata alta incidência de leishmaniose visceral.

Os animais capturados foram levados para o laboratório, sendo, efetivamente, coletadas amostras de sangue, por punção cardíaca, de 98 animais, que foram centrifugadas por três minutos a 2.000 rpm e o soro armazenado a -20°C. Na impossibilidade de fazer a punção cardíaca, as amostras foram coletadas em papel de filtro e feitas impressões em lâminas do fígado e baço, que foram corados com Panótico rápido.

3.3 TÉCNICAS DE ANALISE

3.3.1 Imunofluorescência Indireta (RIFI)

O desenvolvimento da técnica RIFI foi realizado no intuito de detectar anticorpos imunoglobulina G (IgG) nos soros dos *R.norvegicus*. Utilizou-se de lâminas fixadas com antígenos (*Leishmania amazonensis*), cedidos pelo Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), comumente utilizados no diagnóstico da LVA, e conjugado anti-imunoglobulina de rato, fração IgG, marcado com Isotiocianato de Fluoresceína

obtida de soro imune de cabra (Sigma-USA) na diluição de 1:128.

Após padronização da técnica, o soro foi diluído a 1/40 em "Phosphate buffer saline" (PBS).

As lâminas para RIFI com antígeno fixado foram descongeladas a temperatura ambiente. Colocaram-se as amostras em cada círculo da lâmina e incubaram-se em câmara úmida, na estufa a 37°C por 30 minutos. Em seguida foram lavadas com PBS e cobertas com a mesma solução, permanecendo, assim, por cinco minutos. Novamente lavadas com água destilada e secas com auxílio de circulador de ar.

Adicionou-se, em cada círculo, a solução do conjugado anti-IgG de rato na diluição 1:128, o Azul de Evans na concentração 1/50 e solução 2% Tween 80 em PBS. Foram incubadas, por 30 minutos, na estufa a 37°C e lavadas com PBS e água destilada. Finalmente, foram colocadas sobre essas, glicerina tamponada e as lâminas. Fez-se a leitura das lâminas no microscópio de imunofluorescência (Marca Olympus, modelo BH2-RFCA) com aumento ocular de 20 e 40 X. Animais com títulos de soro iguais ou superiores a 1:40 foram considerados reativos.

3.3.2 Teste Imunoenzimático (ELISA)

Utilizou-se, para execução da técnica, de placas de poliestireno de fundo chato sensibilizadas com antígeno (*Leishmania amazonensis*) cedidas pelo Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

O conjugado imunoenzimático utilizado foi uma antiimunoglobulina de rato, fração IgG, marcado com peroxidase, obtida de soro imune de cabra (Sigma - USA) na diluição de 1:17000.

Após padronização da técnica foi escolhida a diluição do soro de 1/20 e a do conjugado de 1/2.500, nas quais obtiveram-se melhores resultados.

As placas, sensibilizadas com antígeno, receberam 150 µl de tampão de bloqueio "Phosphate buffer saline caseine tween" (PBSCT) e incubaram-nas por uma hora a 37°C, lavando-as, posteriormente, quatro vezes com água destilada. Acrescentaram-se, em cada orifício da placa 100 µl do soro diluído a 1/20, incubando-as, novamente, por 40 minutos a 37°C. Lavaram-se as placas, manualmente, com solução de lavagem para retirar o excesso de anticorpos não reagentes e, novamente incubadas por 40 minutos a 37°C com 100 µl do conjugado diluído em PBSCT a 1/2500. Foram, de novo, lavadas quatro vezes com solução de lavagem. Adicionaram-se às placas 100 µl/orifício da solução de substrato (5 mg de O-fenilenodiamino - OPD + 4 µl de água oxigenada a 30% + 10 mL de tampão citrato-fosfato) mantendo-as ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por 10 minutos. A reação foi interrompida, posteriormente, adicionando em cada orifício 30 µl de ácido sulfúrico 2N.

A leitura da reação foi feita em leitor de ELISA (marca Labsystems Multiskan MS. Modelo Versão 4.4, ano 1994) a um comprimento de onda de 492 nm. Valores positivos foram definidos: aqueles cujas leituras foram superiores a 0,140 para as amostras de soro e 0,180 para as amostras coletadas em papel de filtro, após determinação da sensibilidade e especificidade através do programa Stata versão 8.0.

3.3.3 Exame Parasitológico

Realizaram-se impressões, em lâminas, das bordas do fígado e baço dos animais capturados. Os fragmentos dos órgãos foram, cuidadosamente, enxutos em papel de filtro para retirar o excesso de sangue e,

então, levemente friccionados em lâminas de microscopia previamente desengorduradas em uma solução álcool-éter (V/V). Foram, então, coradas com “Panótico rápido”. Depois de confeccionadas, fez-se a leitura, em Microscópio óptico com lentes de aumento 1000 vezes.

3.3.4 Reação de Hemaglutinação Indireta (RHI)

A Reação de Hemaglutinação Indireta (RHI) é uma técnica sorológica usada no diagnóstico da Doença de Chagas e foi utilizada, neste trabalho com a finalidade de eliminar uma possível reação cruzada com esses tripanosomatídeos. O antígeno é obtido de formas de cultura do parasita de modo a fazer atuar, sobre hemácias sensibilizadas com antígenos de *Trypanosoma cruzi*, o soro a ser testado. Na presença de anticorpos específicos, ocorre aglutinação das hemácias (Guia..., 2002a; Lana et al., 2000).

Utilizou-se o Kit Hemacruzi da Biomérieux Brasil Ltda. As amostras e os soros controle foram diluídos a 1/20, conforme recomendação do fabricante. Foram transferidos 50 µl de cada amostra e dos soros controle (positivo e negativo) para as cavidades da microplaca e, posteriormente, 25 µl da suspensão de hemáceas sensibilizadas com antígenos totais de *T. cruzi* homogeneizadas. A placa foi mantida sob agitação mecânica por três minutos e, em seguida, em repouso por uma hora à temperatura ambiente. Realizou-se, então, a leitura. Verificou-se reação positiva quando se formou um véu uniforme de hemácias recobrimo toda a cavidade. Negativo quando se formou um botão compacto de hemácias no fundo da cavidade e, parcialmente positivo, quando se formou um véu pouco nítido além de pequeno depósito de hemácias no fundo da cavidade.

3.3.5 Reação da Cadeia de Polimerase (PCR)

Com a finalidade de demonstrar a presença do protozoário *Leishmania*, extraiu-se o DNA das amostras de medula óssea, baço e fígado de um animal que apresentou reatividade nos testes sorológicos em todas as diluições testadas.

Para a extração do DNA da amostra de medula óssea, foi utilizado o Kit de Cromatografia em Coluna - GFX™ Genomic Blood DNA Purification (Amersham Pharmacia Biotech) e, para as amostras de baço e fígado, a extração foi realizada através do Kit Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Biosciences), ambas seguindo o protocolo descrito pelos fabricantes.

A detecção do DNA de *Leishmania* foi realizada, através da PCR, utilizando-se um par de iniciadores que flanqueiam a região conservada dos minicírculos de kDNA de todas as espécies de *Leishmania* e correspondem à origem de replicação de ambas fitas de DNA:

Primer A:

5' (G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)
CTAT(A/T)TTACAC AACCCC 3'

e Primer B:

5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3'
(Degrave et al., 1994).

O método utilizado na ampliação e visualização dos produtos amplificados foi o descrito por Michalsky et al. (2002).

Para reação de amplificação foram preparadas duas misturas em duas etapas. À primeira foram adicionados 5µl solução de tampão (MgCl₂ 1,5mM; KCl 50mM; Tris-HCl pH 8,3 10mM) 2,5µl dNTPs (200µM), 2µl de iniciadores, na concentração de 100ng cada e 11,5µl de água MilliQ autoclavada. Foram distribuídos 25µl da

solução em tubos próprios para PCR, aos quais foi adicionada uma pérola de cera, e em seguida, colocados na máquina de PCR à temperatura de 94°C por quatro minutos para que a cera se dissolvesse e, depois mantidos a -20°C por alguns minutos para que se formasse uma barreira. Foram adicionados, à parte superior do tubo 23µl da segunda mistura, contendo 5,0µl da solução de tampão (MgCl₂ 15,0mM; KCl 500mM; Tris-HCl pH 9,0 100mM) 2,5µl dNTPs (200µM) e 0,5µl de Taq DNA polimerase (2,5 U/µl) e 15µl de água MilliQ autoclavada. Após o preparo dos tubos, adicionaram-se 2µl de DNA para cada amostra a ser testada.

A amplificação foi realizada em equipamento termociclador automático (Perkin-Elmer-GeneAmpPCRSistem 2400) em procedimento "Hot-Start". O programa utilizado foi: 94°C por quatro minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 60°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 30 segundos para extensão. Segue a 72°C por 10 min que será a temperatura de extensão final.

A cada conjunto de reações, foi incluído um controle negativo, que continha todos os componentes da reação exceto o DNA. Para controle positivo foi utilizado o DNA de *L. braziliensis*.

Para diagnóstico específico das amostras foram utilizados os iniciadores:

MC1: 5' GTT AGC CGA TGG TGG TCT TG 3'
e
MC2: 5' CAC CCA TTT TTC CGA TTT TG 3'

desenhados a partir do minicírculo da molécula de DNA do cinetoplasto de *L. infantum*.

Para a reação utilizou-se o Kit puRE Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences). Na reconstituição dos reagentes em um volume final de 25µl, a

concentração de cada dNTP é de 200µM em 10µM de Tris-HCl (pH 9.0), 50mM de KCl e 1.5mM de MgCl₂. A concentração da puReTaqDNA polimerase é de 2,5U e de 5pmoles para cada iniciador. Após o preparo da solução, foram adicionados 2,0µl de DNA para cada amostra a ser testada.

Realizou-se a amplificação em equipamento termociclador automático (Perkin-Elmer-GeneAmpPCRSistem 2400). O programa utilizado foi: 94°C por dois minutos, seguido de 25 ciclos de 94°C por 20 segundos para desnaturação, 60°C por 20 segundos para anelamento e 72°C por 30 segundos para extensão. Segue a 72°C por cinco minutos que será a temperatura de extensão final.

A amplificação do kDNA específica para os complexos *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana* foi realizada em termociclador automático (PerkinElmer - Gene Amp PCR System 2400) utilizando-se dois pares de iniciadores B1/B2 específicos para espécies do complexo *L. braziliensis* (De Bruijn et al., 1992) e M1/M2 específicos para espécies do complexo *L. mexicana* (Eresh et al., 1994). Os iniciadores foram sintetizados pela Operon Technologies, Inc - USA.

Os pares de iniciadores B1/B2 e M1/M2 foram desenhados a partir do seqüenciamento das regiões conservadas dos minicírculos de kDNA de várias espécies de *Leishmania*. Foi feita uma comparação entre as seqüências e as regiões que diferenciam as espécies do complexo *L. braziliensis* das espécies do complexo *L. mexicana* que são, justamente, as que flaqueiam a Seqüência Universal (GGGGTTGGTGTA):

L. braziliensis

5' B1 3'
TGGCCTCCCGTGCACAATTAGGGGTGGTGTAATATAG
3' B2 5'

L. amazonensis

5' M2 3'
CTCCGGGCTCGAAACTGGGGTGGTGTAATAATAGGGGCGG
3' M1 5'

Na amplificação utilizando-se de 2µl do DNA de cada amostra. Como controles de PCR positiva e negativa foram utilizadas cepas de referência M2903 de *L. braziliensis* e PH8 de *L. amazonensis* e um controle negativo da reação sem DNA. O kDNA foi amplificado, segundo De Bruijn e Barker (1992), com modificações que consistiram na mudança do número de ciclos de 35 para 25. As reações foram realizadas em um volume final de 10µl, na ausência de gelatina e apenas 10pmol de cada iniciador. Cada tubo de reação continha um volume final de 15µl, sendo 2µl do DNA, 50mM KCl, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs), 1,5mM de MgCl₂, 10mM de Tris-HCl pH 8,3, 10 pmol de cada iniciador e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Amersham Biosciences)

Os ciclos de amplificação consistiram em um passo inicial de 96°C por seis minutos, um ciclo de anelamento (ligação dos iniciadores) a 67,5°C por um minuto, extensão a 72°C por um minuto e desnaturação a 93°C por 30 segundos, seguida de 25 ciclos em termociclador.

Os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídeo (0,5µg/ml). O marcador de tamanho molecular usado foi o φx174, digerido por Hae III, com 11 fragmentos variando de 72 a 1357bp. Foram aplicados no gel 15µl de cada amostra. A corrida foi realizada durante 30 minutos a 100volts.

Os produtos amplificados foram visualizados através de luz ultravioleta e fotografados utilizando-se o "Eagle Eye System" (Stratagene, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Rattus norvegicus são neófbos, e possuem aversão inicial a iscas e armadilhas colocadas no seu ambiente, o que, segundo o "Manual de controle de roedores" do

Ministério da Saúde, ocorre nos locais onde há pouco movimento de pessoas e objetos (Manual..., 2002b). A captura desses animais, nas regiões da Pampulha, Venda Nova e Norte ocorreu em locais de intensa movimentação de pessoas, esgotos com depósitos de lixo diário o que não alterou a neofobia desses roedores, dificultando, assim, a sua captura.

Foram capturados 114 animais no período de 20 meses, entretanto houve êxito na coleta de 98 amostras. Dentre essas, em 63 foi separado o soro e 64 foi coletado em papel de filtro, sendo que em 29 dessas, também foi coletado o sangue por punção cardíaca.

As amostras de soro e aquelas coletadas em papel de filtro foram analisadas, separadamente, plotando-se em gráfico os dados de absorbância obtidos no teste de ELISA para determinação do ponto de corte, considerando-se os valores da sensibilidade e especificidade do método. O gráfico 2 mostra o resultado obtido nas amostras de soro, verificando-se a sensibilidade e especificidade do método. No gráfico 3 verificam-se os resultados obtidos para determinação do ponto de corte, que foi definido onde a sensibilidade do método era de 92% e especificidade 61% correspondendo a valores de absorbância 0,140. Amostras, cujas leituras iguais ou superiores a 0,140, foram consideradas reativas.

Os gráficos 4 e 5 ilustram as curvas obtidas com os valores da absorbância do teste de ELISA realizado nas amostras coletadas em papel de filtro. O ponto de corte foi determinado onde a sensibilidade correspondeu a 50% e a especificidade de 78%, onde a leitura do teste em absorbância correspondeu a 0,180. A leitura de absorbância com valores iguais ou superiores a esses foram consideradas reativa no teste.

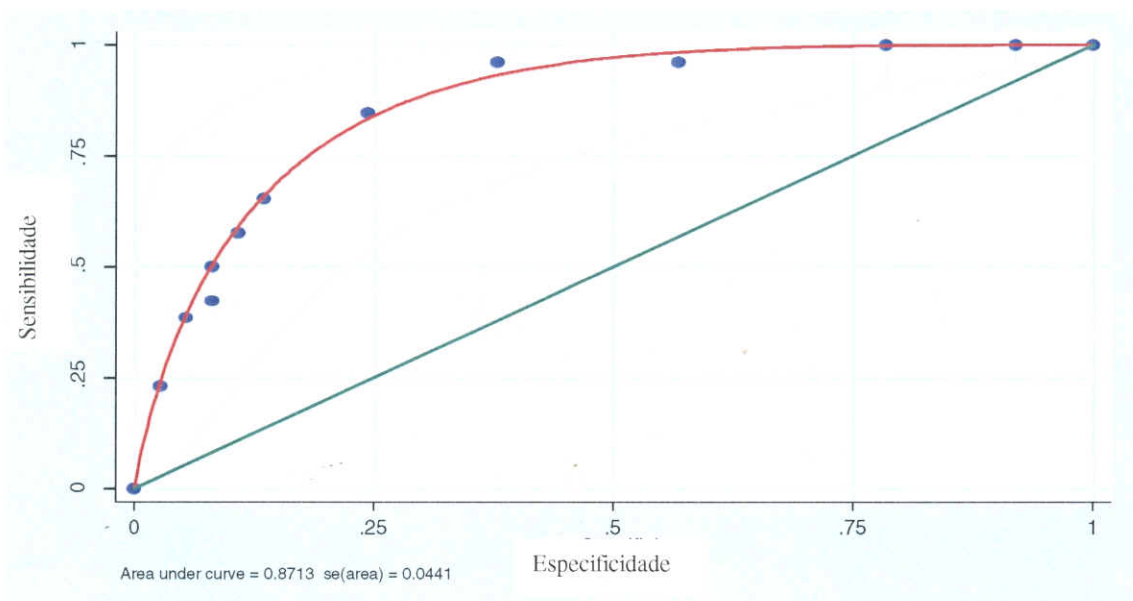


Gráfico 2 - Sensibilidade do teste ELISA em amostras de soro

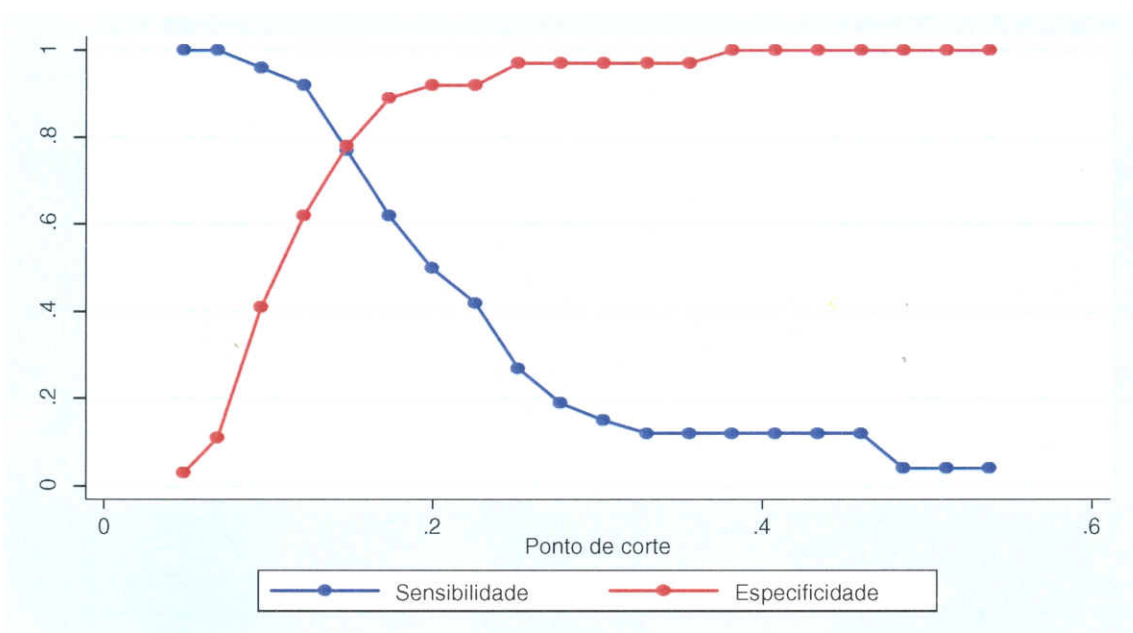


Gráfico 3 - Sensibilidade e especificidade do teste ELISA em amostras de soro

Comparando-se as curvas obtidas com valores de absorbância do ELISA no papel de filtro e soro, verifica-se que, nas amostras de soro, a sensibilidade do teste apresentou valores superiores a 90% enquanto, nas amostras coletadas em papel de filtro, o valor médio da sensibilidade foi 75%. O mesmo pode ser observado em relação à

especificidade do método. Machado (2004), ao comparar os resultados de ELISA em amostras de soros de cães analisados em diversos laboratórios de Belo Horizonte, identificou uma sensibilidade que variou de 98,8 a 100% e a especificidade entre 96,5 e 100%, em acordo com resultados de vários autores.

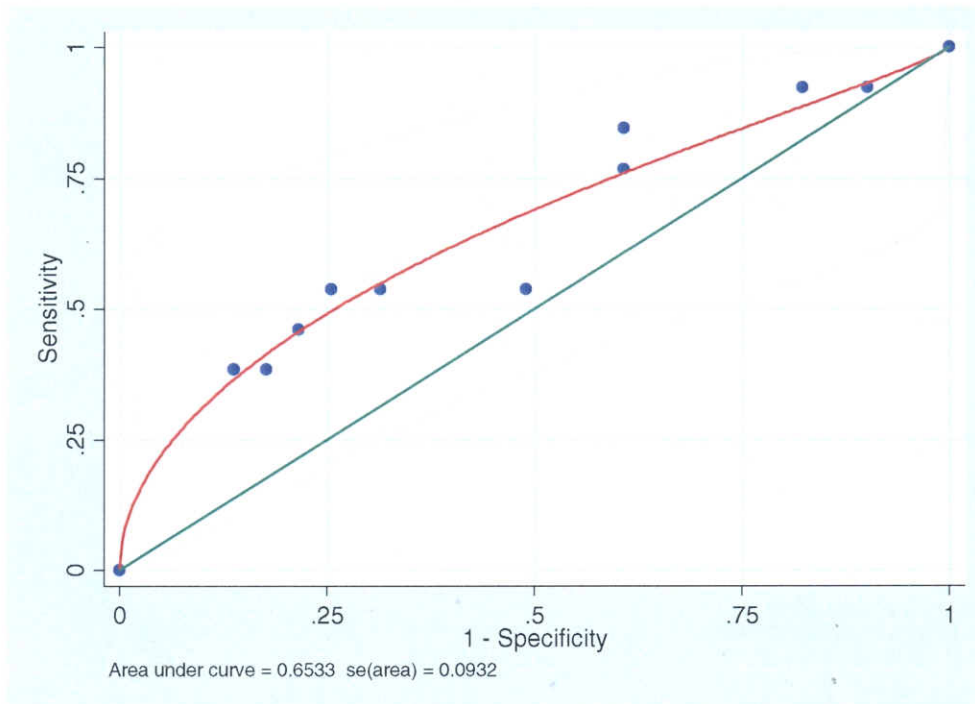


Gráfico 4 - Sensibilidade do teste de ELISA em amostras coletadas em papel de filtro

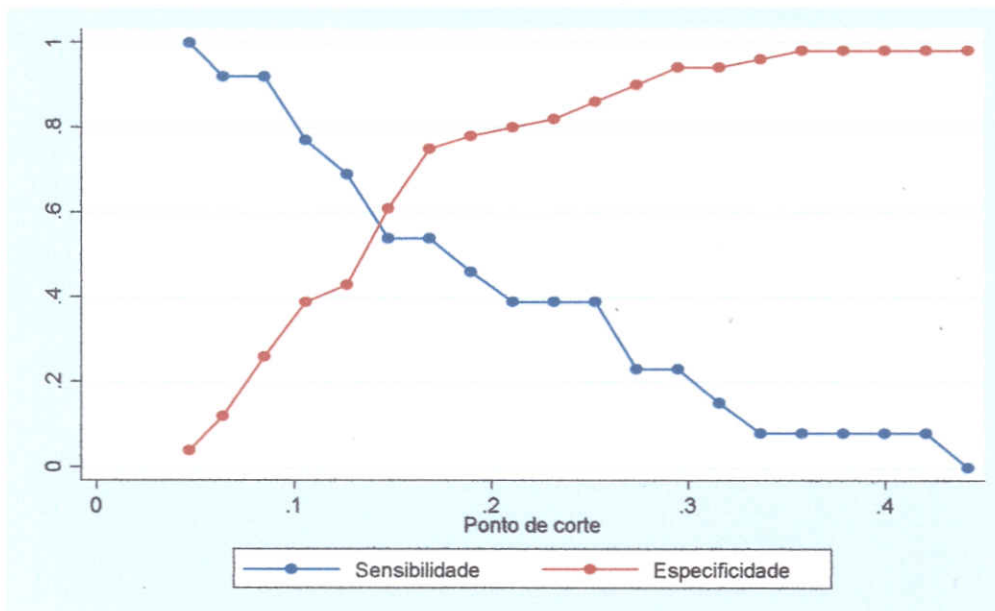


Gráfico 5 -Sensibilidade e especificidade do teste ELISA em amostras coletadas em papel de filtro

Considerando-se os resultados obtidos, nos testes de ELISA e RIFI, nas 29 amostras coletadas tanto em papel de filtro quanto por punção cardíaca (soros), verificou-se um total de 13 amostras reativas (44,8%), sendo o maior número observado nas amostras de soro (TABELA 3), o que pode ser explicado pela menor sensibilidade e especificidade do ELISA, quando se utiliza do papel de filtro para coleta da amostra.

Quando se examina o resultado da análise sorológica dos 98 animais, observa-se que 27 amostras (27,6%) foram reativas nos teste de ELISA e RIFI para antígenos da *Leishmania*, 10 amostras (10,2%) reativas

apenas no RIFI, 26 (26,5%) reativas apenas no ELISA e 35 (35,7%) não foram reativas em nenhum dos testes (Graf. 6).

Evans et al. (1990) compararam os resultados de análises realizadas em cães com LVA e identificaram que, para amostras coletadas em papel de filtro, os resultados positivos encontrados foram inferiores àqueles obtidos quando se analisou o soro dos animais no RIFI. E, o método ELISA identificou mais animais positivos que o RIFI.

Tabela 3. Resultado das análises sorológicas (ELISA e RIFI) nas 29 amostras coletadas em papel de filtro e soro.

Amostras	Reativos ELISA e RIFI	Frequência
Soros	08	61,5 %
Papel de filtro	01	7,6 %
Soro e papel de filtro	04	30,8 %

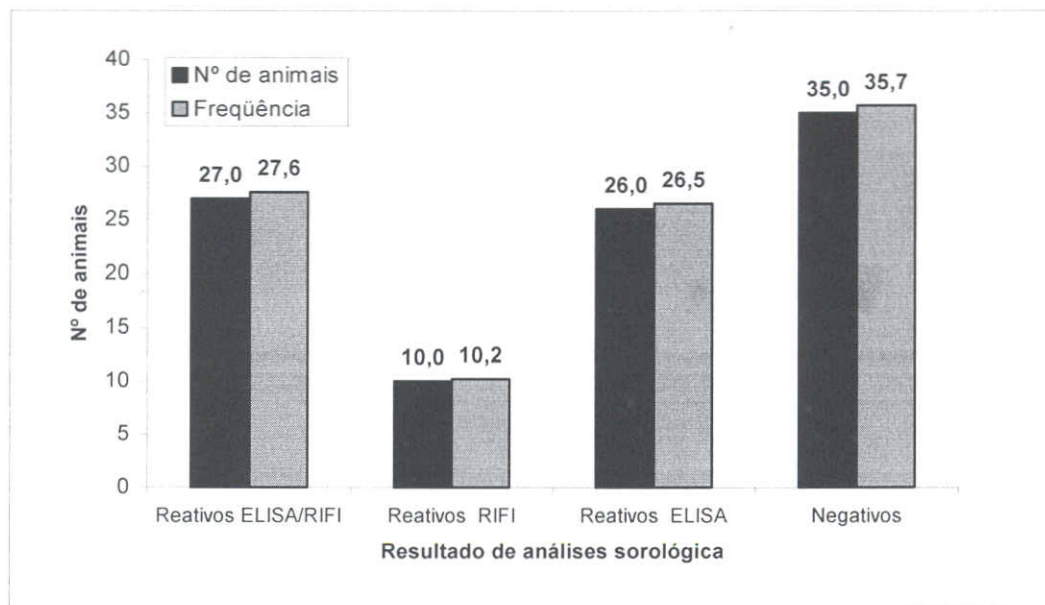


Gráfico 6 - Comparação dos resultados sorológicos das 98 amostras analisadas

Analisando-se os resultados obtidos por Distrito Sanitário estudado, verificou-se que no Distrito Sanitário Pampulha foi capturado o maior número de *Rattus norvegicus* e

também constatou-se uma maior frequência de animais reativos nos testes sorológicos, seguido dos Distritos Sanitários Venda Nova e Norte (Tabela 4).

Tabela 4. Resultado dos testes sorológicos por Distrito Sanitário

Distrito sanitário	Animais capturados	Amostras reativas	Frequência animais reativos (%)
Pampulha	75	22	29,3
Venda Nova	19	04	21,0
Norte	04	01	25,0
Total	98	27	27,6

De acordo com dados da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte verificou-se, entre os anos de 2003 e 2004, um aumento do número de casos humanos notificados de LVA nos Distritos Sanitários do Município. O mesmo acontecendo com os casos caninos, que também aumentaram nesse período.

As amostras reativas no ELISA e RIFI, examinadas por Reação de Hemaglutinação Indireta (RHI), com a finalidade de identificar reações cruzadas com *T. cruzi*, foram negativas.

No exame microscópico das lâminas, com impressão dos órgãos e corados pelo método panótico rápido, não foi observado a presença de formas amastigotas. Segundo Ferrer (1992), citado por Machado (2004), em alguns casos é impossível a detecção do parasito mesmo em animais infectados. Esse método diagnóstico está condicionado ao encontro do parasita e é influenciado pela experiência de quem confecciona e faz a leitura das lâminas, embora seja um método com menor possibilidade de falso-positivo.

Entretanto, o teste PCR (ANEXO 3) demonstrou a presença do protozoário *Leishmania* nas amostras de medula e fígado de um animal examinado, o que pode ser observado na banda diagnóstica de 120 pb, presente em todas as espécies de *Leishmania*, correspondendo, assim, à amplificação da região conservada dos minicírculos do kDNA. Porém, quando as amostras, que demonstraram amplificação da região conservada, foram submetidas à amplificação específica para os complexos *L. brasiliensis*, *L. mexicana*, *L. infantum*/ *L. chagasi*, não houve amplificação com os pares de iniciadores específicos, que amplificam a região variável do kDNA, na faixa de 750pb, 730pb e 447pb respectivamente.

Para a confirmação dos produtos amplificados, torna-se importante a

realização de hibridização para aumentar a sensibilidade da reação e tipar, ao nível dos complexos, as espécies de *Leishmania*. O tipo de amostra analisada, pelo método PCR, também influencia na detecção da espécie, uma vez que vários estudos demonstraram em amostras de sangue, um percentual significativamente maior de positividade em relação a outras amostras (Costa, 2002).

Uma investigação aprofundada da participação do *R. norvegicus* no ciclo zoonótico da LVA, no Município de Belo Horizonte, faz-se necessário devido à frequência elevada desses roedores que apresentaram reatividade nos testes de ELISA e RIFI, bem como pela presença do protozoário *Leishmania* em uma amostra analisada, podendo os mesmos estar envolvidos no ciclo de transmissão roedor-vetor-cão e/ou roedor-vetor-homem.

Segundo Costa (2002) a investigação da participação de roedores sinantrópicos, no Brasil, como reservatório da *Leishmania* não são comuns.

Em países onde a leishmaniose visceral é endêmica, vários estudos foram realizados no intuito de averiguar a participação dos roedores no ciclo de transmissão da doença. Na Itália, Arábia Saudita, Iraque e China, algumas espécies de roedores foram identificadas como susceptíveis à infecção pelo protozoário *Leishmania*, bem como sua importância na epidemiologia da doença (Bray et al., 1968; Gradoni et al., 1983; Pozio et al., 1981; Young et al., 1929).

Este é o primeiro trabalho realizado, no Município de Belo Horizonte, para investigação da participação do *R. norvegicus*, no ciclo de transmissão da LVA. Entretanto, há necessidade de muitos outros estudos para confirmar a sua importância na transmissão da doença como a identificação da espécie de *Leishmania* circulante nesta população por meio de técnicas moleculares

e a capacidade do vetor de se alimentar do sangue desses animais, dentre outros.

Em estudo realizado na cidade de Raposa no Maranhão, verificou-se o sangue de diversos animais no trato digestivo de espécimes de *L. longipalpis*, encontrando-se sangue de cão, homem e roedor, bem como de outros animais. Foram capturadas 2.240 fêmeas de *L. longipalpis*, no ambiente peri e intradomicílio, encontrando-se em 10% desses insetos, sangue de cão e roedor, em 5% de ave, cão, roedor e humano. E, determinou-se, também, a frequência de flebotomíneos que sugaram o sangue de outros vertebrados, encontrando-se 47,2% em roedores, 42,4% em humano, 27,6% no cão, 26,3% em Mucura e 22,5% em equinos (Dias et al., 2003).

Souza et al. (2004) estudaram a fauna de flebotomíneos em Belo Horizonte e identificaram que *L. longipalpis* é a espécie predominante nas regiões Leste, Nordeste, Noroeste, Oeste, Pampulha e Venda Nova. Sendo essa, a espécie mais encontrada (68,23%) no Município tanto no peri como intradomicílio. Resultado semelhante foi obtido por Monteiro et al. (2005) no Município de Montes Claros no norte do Estado de Minas Gerais, que identificaram entre os espécimes capturadas 74,1% de *L. longipalpis*.

5 CONCLUSÕES

O estudo da frequência de anticorpos de *Leishmania* sp em *Rattus norvegicus*, no Município de Belo Horizonte, Minas Gerais, demonstrou a existência de animais reativos nas áreas estudadas e as amostras de soro apresentaram maior sensibilidade e especificidade nos testes sorológicos em comparação às amostras coletadas em papel de filtro.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As mudanças, no perfil epidemiológico da LVA no Brasil, que ocorreram com a urbanização da doença, demonstram a necessidade de estudos sistematizados com a finalidade de elucidar outros vetores e reservatórios da doença no ambiente urbano, além do mosquito do gênero *Lutzomyia* e do cão, respectivamente.

No Município de Belo Horizonte, alguns trabalhos, como a determinação da fauna de flebotomíneos nas diversas regiões da capital, já foram realizados no intuito de elucidar o ciclo de transmissão da doença. Souza et al. (2004) verificaram a presença de *L. longipalpis* no peri e intradomicílio, e Eduardo S. Silva e outros, do Centro de Pesquisas René Rachou da FIOCRUZ (2003), verificaram infecção natural de *D. albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) como hospedeiro de *Leishmania*, no Município de Belo Horizonte, Minas Gerais. A pesquisa de outros possíveis vetores, como as pulgas (Siphonaptera), no ciclo de transmissão da doença, pesquisa realizada na cidade de Jacobina, Bahia e também a capacidade vetorial dos sifonápteros e ixodídeos na leishmaniose visceral canina (Cerqueira et al, 2000; Coutinho, 2003), vem sendo investigada, em áreas endêmicas de LVA, no Brasil.

É importante ressaltar que todas as possibilidades de transmissão da doença devem ser pesquisadas, uma vez que pouco se conhece sobre o seu ciclo no contexto urbano.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, J. E. Leishmaniose visceral no Brasil. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.4, n.3, p.222-236, 1958.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, v.30, n.12/13, p.1269-1281, 2000.
- BEVILACQUA, P. D. *Leishmaniose visceral: interesses públicos e interesses privados na construção social de uma epidemia em Belo Horizonte*. 1999. 343f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BEVILACQUA, P. D.; PAIXÃO, H. H.; MODENA, C. M. et al. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n.1, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.com.br>>. Acesso em: 15 mar. 2003.
- BRAY, R. S.; DABBAGH, M. A. Investigations into the epidemiology of leishmaniasis: unsuccessful search for the reservoir host of kala-azar in Baghdad. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.71, n.2, p.46-47, 1968.
- CANÇADO, J. R.; GAMA, G.; MOURÃO, O. G. et al. Calazar autóctone de Minas Gerais. *O Hospital*, v.50, n.3, p.75-98, set. 1956.
- CENSO demográfico 2000. IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 26 mar. 2005.
- CERQUEIRA, E. J. L.; SILVA, E. M.; MONTE-ALEGRE, A. F. et al. Considerações sobre pulgas (Siphonaptera) da raposa *Cerdocyon thous* (Canidae) da área endêmica de leishmaniose visceral de Jacobina, Bahia, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.33, n.1, jan./fev. 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 1 jun. 2005.
- CORREDOR, A.; GALLEGOS, J. F.; TESH, R. B. et al. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.83, n.2, p.195, Mar./Apr. 1989.
- COSTA, F. S. O. *Deteção de DNA de Leishmania spp em roedores silvestres e sinantrópicos em área de transmissão das leishmanioses no Município de Araçuaí, Minas Gerais, Brasil: o uso da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas implicações epidemiológicas*. 2002. 98f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- COUTINHO, M. T. Z. *Investigação da capacidade vetorial de sifonapteros e ixodídeos na leishmaniose visceral canina*. 2003. 115f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem, *Leishmania chagasi* n. sp. *O Hospital*, v.11, n.1, p.3-9, 1937.
- DE BRUIJN, M. H. L.; BARKER, D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica*, v.52, n.1, p.45-58, Sept. 1992.

- DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. *O Hospital*, v.45, n.4, p.419-421, abr. 1954.
- DEANE, L. M.; SILVA, L. E.; FIGUEIREDO, P. Z. Leishmanias in the viscera of porcupines from the state of Piauí, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.16, n.2, p.68-69, mar./abr. 1974.
- DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D. et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of Leishmania: a mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.89, n.3, p.463-469, jul./set. 1994.
- DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Statistics Quarterly*, v.45, n.2/3, p.267-275, 1992.
- 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, May/June 2001.
- DIAS, F. O. P.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomya longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cadernos de Saúde Pública*, v.19, n.5, set./out. 2003. Disponível em: <<http://www.scielosp.org>>. Acesso em: 15 ago. 2004.
- EL-ADHAMI, B. Isolation of *Leishmania* from a black rat in the Baghdad area, Iraq. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.25, n.5, p.759-761, Sept. 1976.
- EL-AMIN, E. R.; WRIGHT, E. P.; ABDELRAHMAN, A. M. et al. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA – immunofluorescence and indirect haemagglutination. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.80, n.2, p.271-274, 1986.
- ERESH, S.; McCALLUM, S. M.; BARKER, D. C. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology*, v.109, pt.4, p.423-433, Nov. 1994.
- EVANS, T. G.; VASCONCELOS, A. W.; LIMA, J. et al. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.42, n.2, p.118-123, Feb. 1990.
- FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R. W.; BONAGURA, J. D. (Ed.). *Current veterinary therapy XI*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992. p.266-269.
- FORRATINI, O. P. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.2, p.195-203, 1960.
- GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O. et al. *Parasitologia humana*. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. cap.10, p.56-72.
- GENARO, O.; COSTA, C. A.; WILLIMS, P. et al. Ocorrência de calazar em área urbana da grande Belo Horizonte, MG. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.23, n.2, p.121, abr./jun. 1990.

- GIANNINI, S. H. Induction and detection of leishmanial infections in *Rattus norvegicus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.79, n.4, p.458-461, 1985.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v.7, n.3, Set. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 15 abr. 2005.
- GUIA de vigilância epidemiológica: influenza/varíola. Brasília: FUNASA, 2002a. v.2.
- GRADONI, L.; POZIO, E.; GRAMICCIA, M. et al. Leishmaniasis in Tuscany (Italy). VII. Studies on the role of the black rat, *Rattus rattus*, in the epidemiology of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.77, p.427-431, 1983.
- GRIMALDI Jr., G.; TESH, R. B.; McMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.41, n.6, p.687-725, Dec. 1989.
- HERRER, A. *Leishmania hertigi* sp. n. from the tropical porcupine, *Coendou rothschildi* Thomas. *Journal of Parasitology*, v.57, n.3, p.626-629, June 1971.
- HOOGSTRAAL, H.; HEYNEMAN, D. Leishmaniasis in the Sudan Republic. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.18, p.1091-1210, 1968.
- HOOGSTRAAL, H.; Van PEENEN, P. F.; REID, T. P. et al. Leishmaniasis in the Sudan Republic. 10. Natural infections in rodents. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.12, p.175-178, Mar. 1963.
- LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.77, n.5, p.569-596, Oct. 1983.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in Brazil. I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis: incrimination of *Lutzomya flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.62, n.3, p.385-395, 1968.
- LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O. et al. *Parasitologia Humana*. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2000. cap.11. p.73-96.
- LEISHMANIASIS. World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases>>. Acesso em: 05 fev. 2005.
- LEISHMANIOSE visceral. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em: 12 abr. 2005.
- LEISHMANIOSE visceral. Prefeitura Municipal. Belo Horizonte. Disponível em: <http://www.pbh.gov.br>. Acesso em: 14 abr. 2005.
- LUZ, Z. M. P.; PIMENTA, D. N.; LOBO, A. L. et al. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.34, n.3, Maio/jun. 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 18 abr. 2005.

- MACHADO, G. J. *Comparação do diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina entre laboratórios de Belo Horizonte, 2003-2004*. 2004. 47f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MACIEL, P.; ROSENFELD, G. Leishmaniose visceral americana: um caso de um novo foco. *Revista Clínica de São Paulo*, v.21, n.5/6, p.51-61, maio/jun. 1947.
- MANUAL de controle de roedores. Brasília: FUNASA, p.129, 2002b.
- MANUAL de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, p. 920, 2004. (Serie A - Normas e Manuais Técnicos).
- MAYRINK, W.; ARAUJO, F. G.; MAGALHÃES, P. A. Florescent antibody test in visceral leishmaniasis. I. Sensitivity of the test. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.9, n.3, p.172-174, maio/jun. 1967.
- MELLO, D. A.; TEIXEIRA, M. L. Infecção experimental de *Calomys callosus* (rodentia-cricetidae) com *Leishmania donovani chagasi* (Laison, 1982). *Revista de Saúde Pública*, v.18, n.4, p.337-341, ago. 1984.
- MICHALICK, M. S. M. Gênero leishmania. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O. et al. *Parasitologia humana*. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. cap.7, p.31-35.
- MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. P. et al. Assesment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae:Phebotominae). *Revista do instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.44, n.5, out. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br>. Acesso em: 22 abr. 2005.
- MOHEBALI, M.; POORMOHAMMADI, B.; KANANI, A. et al. Rodents: another group of animal hosts of visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, Islamic Republic of Iran. *La Revue de Santé de la Méditerranée orientale*, v.4, n.2, p.376-378, 1998.
- MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.38, n.2, mar./abr. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br>. Acesso em: 22 abr. 2005.
- NERY, F. G.; AZEVEDO, M.; DAMASCENO, R. Leishmaniose tegumentar: zoonose de roedores silvestres na Amazônia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.66, p.151-168, 1968.
- OLIVEIRA, C. A.; BATISTA, S. M.; FALCÃO, A. R. Calazar em Minas Gerais: revisão de dados epidemiológicos. *O Hospital*, v.56, n.4, p.625-643, out. 1959.
- OLIVEIRA, C. L. *Epidemiologia da leishmaniose visceral em Belo Horizonte, 1994 a 1997*. 1999. 118f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. *Leishmania donovani*. In: _____. *Parasitologia médica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. cap.11, p.104-124.
- POZIO, E.; GRADONI, L.; BETTINI, S. et al. Leishmaniasis in Tuscany (Italy). V. Further isolation of *Leishmania* from *Rattus rattus* in the Province of Grosseto. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.75, n.4, p.393-395, Aug. 1981.
- REGIONAIS. Prefeitura Municipal. Belo Horizonte. Disponível em: <http://www.pbh.gov.br>. Acesso em: 14 abr. 2005.

- REUNIÃO anual de pesquisa aplicada em leishmaniose. 7., 2003, Uberaba. *Resumos...* Uberaba: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2003.
- SHERLOCK, I. A.; MIRANDA, J. C.; SADIGURSKY, M. et al. Experimental infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.83, n.1, p.141, jan./mar. 1988.
- SHERLOCK, I. A.; MIRANDA, J. C.; SADIGURSKY, M. et al. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.79, n.4, p.511, out./dez. 1984.
- SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R. S. et al. Visceral leishmaniasis in Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.96, n.3, p.285-291, abr. 2001.
- SOUZA, C. M.; PESSANHA, J. E.; BARATA, R. A. et al. Study on phlebotomine sand fly (*Diptera: Psychodidae*) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.99, n.8, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 31 mar. 2005.
- SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical Diagnosis Laboratory Immunology*, v.9, n.5, p.951-958, Sept. 2002.
- TRAVI, B. L.; ARTEAGA, L. T.; LEON, A. P. et al. Susceptibility of spiny rats (*Proechimys semispinosus*) to *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, n.6, p.887-892, set. 2002.
- TRAVI, B. L.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J. Y. et al. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Tripanosoma cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.50, n.5, p.557-565, May 1994.
- TRAVI, B. L.; OSORIO, Y.; BECERRA, M.T. et al. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.92, n.3, p.275-278, May/June 1998.
- YOUNG, C. W.; HERTIG, M.; PAO YUNG, L. The Kała-azar transmission problem: field and laboratory studies in China. II. Susceptibility of various rodents to infects with *Leishmania donovani*. *American Journal of Hygiene*, v.10, p.183-200, mar. 1929.

ANEXOS

ANEXO 1 - Mapa da Região Metropolitana de Belo Horizonte



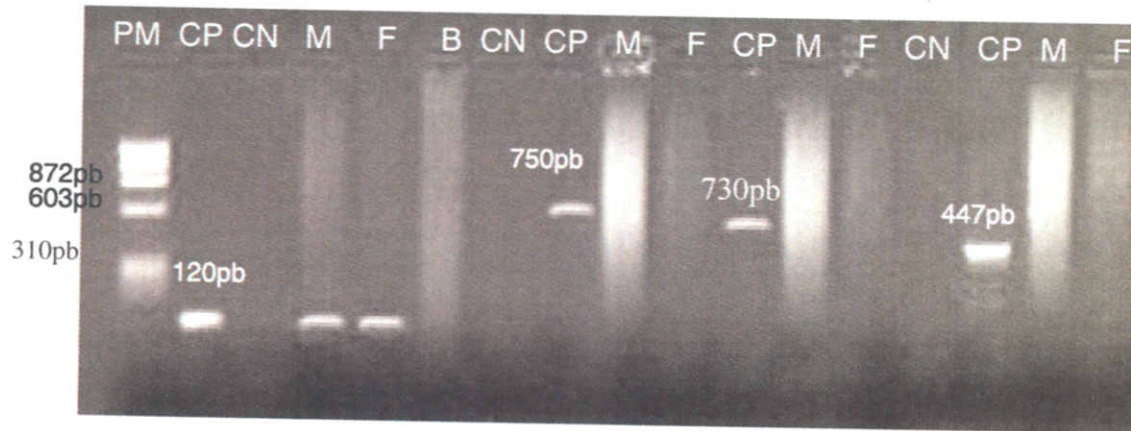
Fonte - Belo Horizonte, 2005

ANEXO 2 – Mapa dos Distritos Sanitários da cidade de Belo Horizonte



Fonte - Belo Horizonte, 2005

ANEXO 3 – Resultado do teste PCR



Gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídio, mostrando os produtos amplificados das amostras de Medula (M), Fígado (F) e Baço (B) de *Rattus norvegicus* com par de iniciadores para o gênero *Leishmania* (120pb), complexo *L. braziliensis* (750pb), complexo *L. mexicana* (730pb) e *L. infantum/L. chagasi* (447pb).

PM: Marcador de tamanho molecular ØX174;

CN: Controle negativo sem DNA;

CP: Controle positivo com DNA de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi*