

Andreza Pain Marcelino

DETECÇÃO DE *Leishmania* (Ross, 1903) EM *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) EM BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS, 2007 E 2008.

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de doutora em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Co-orientadores: Élvio Carlos Moreira
Célia Maria Ferreira Gontijo

**Belo Horizonte
UFMG-Escola de Veterinária
2011**

M314d Marcelino, Andreza Pain, 1980-
Detecção de Leishmania (Ross, 1903) em *Rattus norvegicus*
(Berkenhout, 1769) em Belo Horizonte, Minas Gerais, 2007 e 2008 /
Andreza Pain Marcelino. – 2011.
42 p. : il.

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Co-orientadores: Élvio Carlos Moreira, Célia Maria Ferreira Gontijo
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de
de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Leishmaniose tegumentar – Diagnóstico – Teses. 2. Leishmania-
Teses. 3. Reação em cadeia de polimerase – Teses. 4. Rato como
transmissor de doenças – Teses. I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos.
II. Moreira, Élvio Carlos. III. Gontijo, Célia Maria Ferreira. IV. Universidade
Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 616.936 4

AGRADECIMENTOS

À Escola de Veterinária da UFMG por proporcionar aos profissionais da saúde um ensino de qualidade.

Ao meu orientador e co-orientadores Jenner K. Pimenta dos Reis, Élvio Carlos Moreira e Célia Maria Ferreira Gontijo, pelo direcionamento da pesquisa e apoio técnico-científico.

À equipe do Laboratório LALEI do centro de Pesquisas René Rachou, em especial ao Eduardo de Castro Ferreira, pelo auxílio indispensável em todas as fases da pesquisa.

À equipe da Prefeitura de Belo Horizonte/ Secretaria Municipal de Saúde/Gerência de Controle de Zoonoses da Pampulha pelo apoio incomensurável na captura dos roedores, em especial Cristiano, Jerônimo, Bruno e Marcos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPEMIG), órgão financiador do nosso trabalho.

Aos meus amigos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pelo apoio e carinho oferecidos.

Ao meu namorado Reinaldo Araújo pela companhia, amor e compreensão, principalmente nos momentos mais difíceis do trabalho.

A todos meus companheiros de trabalho do Setor de Doença Parasitárias da Fundação Ezequiel Dias pelo auxílio, companheirismo e amizade.

Aos meus pais pela confiança, amor e dedicação a mim confiados.

À Deus por essa grande oportunidade.

SUMÁRIO

	RESUMO	9
	ABSTRACT	10
1.	INTRODUÇÃO	11
2.	LITERATURA CONSULTADA	12
2.1	O gênero <i>Leishmania</i>	12
2.1.2	Leishmaniose tegumentar.....	12
2.2	Reservatórios	14
2.2.1	Infecção em <i>Rattus norvegicus</i>	15
2.3	Diagnóstico da leishmaniose	16
		17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1	Área de estudo	17
3.2	Delineamento do Estudo	19
3.3	Procedimentos éticos	19
3.4	Coleta de amostras biológicas	19
3.5	Coleta de sangue para diagnóstico sorológico	20
3.6	Coleta de amostra biológica para diagnóstico parasitológico	20
3.7	Coleta de material para isolamento em meio de cultura	20
3.8	Coleta de amostra para pesquisa molecular	20
3.9	Métodos de diagnóstico	20
3.9.1	Sorológico	20
3.9.1.1	Imunofluorescência Indireta (IFI).....	20
3.9.1.2	Teste Imunoenzimático (ELISA).....	21
3.9.2	Parasitológico	21
3.9.2.1	Exame direto.....	21
3.9.2.2	Isolamento em meio de cultura.....	21
3.9.3	Molecular	21
3.9.3.1	Extração do DNA genômico em amostras de sangue e medula óssea.....	21
3.9.3.2	Extração do DNA genômico em amostras de tecido.....	22
3.9.3.3	Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	22
3.9.3.4	Controle endógeno da PCR.....	22
3.9.3.5	Seqüenciamento.....	23
3.9.3.6	Estatística.....	25
4	RESULTADOS	25
4.1	Captura dos roedores	25
4.2	Técnicas sorológicas (ELISA e IFI)	27
4.3	Parasitológico	27
4.3.1	Exame direto.....	27
4.3.2	Isolamento em meio de cultura.....	28
4.4	Molecular	28
4.4.1	Extração do DNA.....	28
4.4.2	Reação em cadeia de Polimerase e seqüenciamento.....	28
5.	DISCUSSÃO	30
6.	CONCLUSÕES	35
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE TABELAS

Tabela1.	Resultados dos testes sorológicos para diagnóstico das leishmanioses em <i>Rattus norvegicus</i> capturados por Regional/Bairro em Belo Horizonte no período de 2007/2008.....	27
Tabela2.	Resultados da LnPCR para diagnóstico das leishmanioses em <i>Rattus norvegicus</i> capturados por Regional/Bairro em Belo Horizonte no período de 2007/2008	30

LISTA DE FIGURAS

Figura1.	Casos de leishmaniose tegumentar notificados em Belo Horizonte, Minas Gerais no período de 2001 a 2010	13
Figura2.	Casos de leishmaniose tegumentar notificados nas Regionais de estudo, Belo Horizonte, Minas Gerais no período de 2007 a 2010.....	14
Figura 3.	Regionais de Belo Horizonte e áreas de captura de <i>Rattus norvegicus</i> , Belo Horizonte, Minas Gerais, 2007/2008	18
Figura 4.	Área de captura dos <i>Rattus norvegicus</i> , peridomicílio de Belo Horizonte, Minas Gerais. A) Bairro Suzana (regional Pampulha), B) Lagoa da Pampulha (regional Pampulha), C) Bairro Dona Clara (regional Pampulha), D) Bairro Leblon (regional Venda Nova)	19
Figura 5.	Alinhamento das seqüências do fragmento do gene SSUrRNA de espécies de <i>Leishmania</i> , depositadas no GenBank.....	24
Figura 6.	A, B e D: exemplares de <i>Rattus norvegicus</i> capturados nas regionais Pampulha e Venda Nova no município de Belo Horizonte, Minas Gerais. C: lesão na base da cauda de um exemplar de <i>R. norvegicus</i> capturado na regional Norte.....	26
Figura 7.	Número de <i>Rattus norvegicus</i> capturados no período de 2007 e 2008 no município de Belo Horizonte, Minas Gerais.....	26
Figura 8.	Gel de agarose 1% mostrando os produtos da LnPCR utilizando os iniciadores R221/R332 (603pb na 1° reação) e R223/R333 (353pb na 2° reação)	28
Figura 9.	Número de tecidos positivos na LnPCR por animal infectado em <i>Rattus norvegicus</i> , Belo Horizonte, 2007/2008.....	29

RESUMO

A leishmaniose tegumentar (LT) é amplamente distribuída e envolve muitas espécies de *Leishmania* e uma variedade de vetores e hospedeiros em uma epidemiologia complexa. O objetivo da pesquisa foi o rastreamento por isolamento e cultura em meio bifásico, aposição de tecidos em lâminas, ensaio imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência indireta (IFI) e LnPcr seguida de seqüenciamento de *Leishmania* sp. em *Rattus norvegicus* capturados em área de transmissão de leishmaniose em Belo Horizonte, Minas Gerais. As técnicas de diagnóstico direto (isolamento e cultura) e lâminas não revelaram formas promastigotas e amastigotas visíveis. Os testes sorológicos identificaram 43,75% (35/80) animais positivos no ELISA. Na IFI cada amostra foi pesquisada nas diluições 1:40, 1:80 e 1:160, onde 70% (56/80) dos animais foram positivos (10% a 1:160; 33,75% a 1:80 e 26,25% a 1:40) e 30% (24/80) negativos. Um total de 21,25% (17/80) dos animais foi negativo em ambos os testes. A nested PCR (LnPCR) dirigida ao gene SSUrRNA para *Leishmania* associada ao sequenciamento foi utilizada para analisar 315 amostras clínicas de 80 *Rattus norvegicus*. Amostras de 80 fragmentos de pele de cauda, 78 fragmentos de medula óssea, 78 amostras de sangue e 79 fragmentos de baço foram submetidos ao diagnóstico e revelaram 17,46% (55/315) tecidos positivos onde 10% (8/80) pele de cauda, 26,92% (21/78) sangue, 30,76% (24/78) medula óssea e 2,53% (2/79) baço. A taxa de infecção dos roedores foi 36,25% (29/80) e em 65,51% (19/29) destes os parasitos foram caracterizados como pertencentes ao complexo *Leishmania braziliensis*. Os resultados demonstram a urbanização do ciclo da leishmaniose tegumentar, tipicamente rural e adaptabilidade do vetor a ambientes antropizados. A identificação de infecção natural de *R.norvegicus* por *L. braziliensis* é importante indicador do potencial zoonótico desta espécie e a manutenção dos programas de controle populacional de roedores e de educação em saúde são medidas importantes no controle das leishmanioses no meio urbano, onde o contexto ambiental é constantemente modificado.

Palavras chave: *R. norvegicus*; PCR; sequenciamento; roedores; *L.braziliensis*

ABSTRACT

The cutaneous leishmaniasis (CL) is widespread and involves many species of *Leishmania* and a variety of vectors and hosts in a complex epidemiology. The aim of the study was the screening for isolation and culture in biphasic medium, imprints of tissues in slides, Immunoenzimatic Assay (ELISA), Indirect Immunofluorescence (IFI) and LnPCR followed by sequencing of *Leishmania* sp. in *Rattus norvegicus* captured in the area of transmission of leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais. Diagnostic techniques (direct isolation and culture) revealed no visible amastigotes and promastigotes in samples analysed. Serological tests identified 43.75% (35/80) positive animals by ELISA. In the IFI was assessed in each sample dilutions 1:40, 1:80 and 1:160, where 70% (56/80) of animals were positive (10% 1:160; 33.75% and 26 to 1:80 25% at 1:40) and 30% (24/80) were negative. A total of 21.25% (17/80) was negative in both tests. The nested PCR (LnPCR) targeted to the gene associated with *Leishmania* SSUrRNA for sequencing were used to analyze 315 clinical samples from 80 *Rattus norvegicus*. Samples of 80 pieces of tail skin, 78 fragments of bone marrow, 78 blood samples and 79 fragments of spleen were subjected to the diagnosis and showed 17.46% (55/315) positive tissues where 10% (8 / 80) skin tail, 26.92% (21/78) blood, 30.76% (24/78) bone marrow and 2.53% (2 / 79) spleen. The infection rate of rodents was 36.25% (29/80) and 65.51% (19/29) of them had the parasite characterized as belonging to the *Leishmania braziliensis*. The results demonstrate the urbanization of the cycle of cutaneous leishmaniasis, typically rural and adaptability of the vector to the anthropogenic environments. The identification of natural infection by *L. braziliensis* in *R. norvegicus* is a significant indicator for zoonotic potential of this species and the maintenance of programs for its population control and health education are important measures in the control of leishmaniasis in the urban context where the environment is constantly modified.

Keywords: *R. norvegicus*; PCR, sequencing; rodents, *L. braziliensis*

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* pertencente à ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*, e compostas por dois grandes grupos clínicos: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV). A LT geralmente caracteriza-se por um espectro de manifestações clínicas como lesão ulcerativa na porta de entrada da inoculação do parasito (leishmaniose cutânea) que podem regredir espontaneamente ou evoluir para nódulos não ulcerados disseminados (leishmaniose cutânea difusa) e por lesões inflamatórias nas mucosas com caráter destrutivo (leishmaniose mucosa). Já a leishmaniose visceral pode causar comprometimento de diferentes órgãos como rins, baço e fígado dentre outras lesões e se destaca por sua alta taxa de mortalidade, principalmente em imunocomprometidos.

Apesar de a LT ser uma doença tratável, este tratamento é agressivo por ser de longa duração e apresentar efeitos colaterais com diferentes níveis de toxicidade. Sua alta morbidade e capacidade desfigurante podem acarretar grandes transtornos psicológicos nos pacientes acometidos constituindo grave problema de saúde pública. Sendo assim, a leishmaniose tegumentar está na lista de doenças de notificação compulsória desde 2001 pelo Ministério da Saúde.

Os estudos epidemiológicos sobre a ocorrência das leishmanioses visceral e cutânea apontavam entre as décadas de 40 a 60 para uma endemia tipicamente rural e que quando raramente urbanizada poderia ocorrer em áreas suburbanas com baixas condições de moradia e saneamento ambiental. Os dados de casos humanos de LT e LV publicados atualmente pelo Serviço de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde para todo o território nacional apontam para uma mudança no perfil epidemiológico da doença, hoje intensamente urbanizada, com a emergência de focos isolados.

Belo Horizonte tem hoje uma situação que pode ser considerada grave em relação à leishmaniose, pois é nítida a presença da LT e LV de forma totalmente adaptada. Em relação ao ciclo de transmissão da LV, apesar de existir diferentes indagações principalmente a respeito dos reservatórios, define-se o cão como sendo o principal hospedeiro vertebrado envolvido no ciclo de transmissão dentro de um ambiente urbanizado. Já a transmissão da LT apresenta características complexas vinculadas a situações ecológicas distintas e diretamente ligadas a alguns fatores determinantes. Como exemplo pode-se citar a variedade de espécies de vetores identificados, a adaptação destes em características climáticas distintas além da presença do parasita a uma ampla variedade de hospedeiros tanto no meio silvestre quanto no meio urbano, sinalizando a grande atratividade do flebótomo por muitas espécies animais criando inúmeras perspectivas de transmissão. Muitos animais silvestres já foram incriminados como reservatórios para a LT como roedores e marsupiais. A presença destas espécies animais no meio urbano albergando o parasita pode indicar a participação dos mesmos como reservatórios, influenciando de forma direta no ciclo urbano da LT. Todavia, mais estudos são necessários para elucidar estas questões. Além de roedores e marsupiais, o cão também é motivo de investigação quanto ao seu potencial de infecção ao inseto vetor. O papel destas espécies na cadeia de transmissão ainda é incerto. A persistência da LT em área urbanizada sugere, de qualquer forma, a ocorrência de uma transmissão secundária, peridoméstica destes parasitos.

O controle da leishmaniose visceral segundo ministério da saúde é baseado no diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos, controle do vetor através de manejo ambiental e controle químico em casos específicos, de eliminação dos reservatórios e educação em saúde. O controle da LT em medidas gerais concentra-se no tratamento dos casos humanos, educação em saúde, proteção

individual e controle químico em casos específicos. O controle de reservatórios no meio urbano não está estabelecido principalmente pelo fato de ainda existir dúvidas em relação às espécies de animais envolvidos na transmissão. Portanto, estudos voltados para vetores, reservatórios e as modificações no meio ambiente podem elucidar alguns fatores determinantes para a expansão da doença.

Dentro desta proposta eco-epidemiológica, o objetivo do presente trabalho foi investigar a infecção de roedores sinantrópicos, *Rattus norvegicus* por *Leishmania* sp. e sua relação com os locais investigados no período de 2007 e 2008. Entre outros aspectos, a seleção da área a ser estudada levou em consideração os achados de Neiva (2005), onde se observou alto índice de sorologia positiva em *Rattus norvegicus* nas regionais Pampulha e Venda Nova do município de Belo Horizonte, Minas Gerais.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1 O gênero *Leishmania*

Os parasitas do gênero *Leishmania* são organismos unicelulares, de ciclo digenético, constituindo um grupo de espécies muito similares morfológicamente, no entanto biologicamente distintas (características genéticas, bioquímicas e imunológicas) (Shlomai, 1994).

Em seu ciclo biológico apresentam basicamente duas formas, desenvolvidas em hospedeiros vertebrados e invertebrados. A forma amastigota apresenta-se arredondada ou oval, não são móveis devido à presença de um flagelo rudimentar, estando dentro de células do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF) de hospedeiros vertebrados. A outra forma, promastigota, possui flagelo livre, são móveis e extracelulares, presentes no trato alimentar de vetores flebotomíneos (Grimaldi e Tesh, 1993).

São transmitidas pela picada de fêmeas do díptero hematófago do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo

Mundo. Os vetores são infectados quando se alimentam de hospedeiros reservatórios, os quais se podem destacar roedores, edentados (tatu, tamanduá e preguiça), marsupiais (gambá), canídeos, primatas (Lainson e Shaw, 1987). Neste contexto, o homem se destaca como um hospedeiro acidental nas Américas.

São classificadas taxonomicamente de acordo com a localização do parasito no aparelho digestório do flebotomíneo tomando como referência seu piloro. No subgênero *Leishmania* o parasita se adere na região suprapilária (porção média e anterior do intestino) e no subgênero *Viannia* na porção peripilária (anterior, média e também posterior do intestino) (Lainson e Shaw, 1979; Lainson e Shaw, 1987). As *Leishmanias* do subgênero *Viannia* ocorrem apenas no continente americano.

As três principais espécies de *Leishmania* envolvidas na leishmaniose tegumentar americana (LTA) no país são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*, mais recentemente, *L. (Viannia) lisoni*, *L. (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Viannia) shawi* foram reportadas. Para leishmaniose visceral a espécie envolvida nas Américas é a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (Lainson, 2010).

2.1.2 Leishmaniose tegumentar

Entende-se por leishmaniose tegumentar um conjunto de manifestações clínicas na pele e/ou mucosas do homem e diferentes espécies animais silvestres e domésticos das regiões tropicais e subtropicais do Velho e Novo Mundo. Nas Américas lesões semelhantes às causadas pela leishmaniose tegumentar americana (LTA) são descritas desde a antiguidade em esculturas de cerâmica construídas pelos povos do Peru e do Equador. No Brasil, Moreira (1895) relatou pela primeira vez na Bahia a observação de lesão cutânea, denominando de “botão da Bahia” e a descrição de formas amastigotas em lesões de pacientes foi dada em epidemia ocorrida em Bauru (São Paulo) como “úlceras de

Bauru” em 1909 por Adolpho Lindenberg, Carini e Paranhos (Lainson, 2010).

A LT não representa causa primária de morte. Mas a freqüência com que acomete os membros, a existência de casos de evolução crônica, com difícil resposta terapêutica, aliadas a lesões destrutivas das mucosas e ao aspecto lepromatóide, observado na leishmaniose difusa, fazem com que essa endemia seja reconhecida como de grande importância socioeconômica, traduzindo-se em importante problema de Saúde Pública, mesmo em países desenvolvidos (Dujardin et al., 2008). Nos dias atuais, a LT no Brasil é diagnosticada em todos os estados, sendo

que nos últimos vinte anos o número de casos de LT cresceu progressivamente, com média de 26.402 casos (Sinan, 2010). Minas Gerais (MG) notificou entre os anos de 2006-2009, 5.338 casos de LT, sendo que a espécie *Leishmania* (Na região metropolitana de Belo Horizonte os casos de LT são relatados desde 1987 (Passos et al., 1990), sendo que nos últimos dez anos 491 casos humanos foram notificados (Sinan, 2010) (Figura 1 e Figura 2). A principal característica da leishmaniose em Belo Horizonte é a transmissão urbana e periurbana. Esse fato se explica pela presença de vetores totalmente adaptados ao meio urbano como *Lutzomyia intermedia* e *L. whitmani* (Passos et al., 1993).

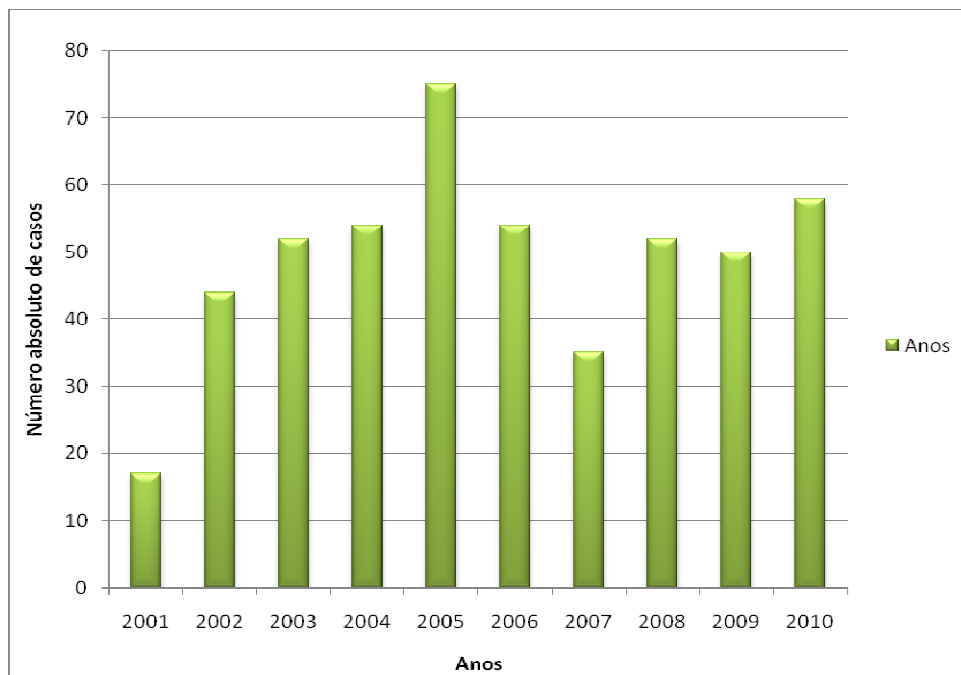


Figura 1. Casos humanos de leishmaniose tegumentar notificados em Belo Horizonte, Minas Gerais no período de 2001 a 2010.

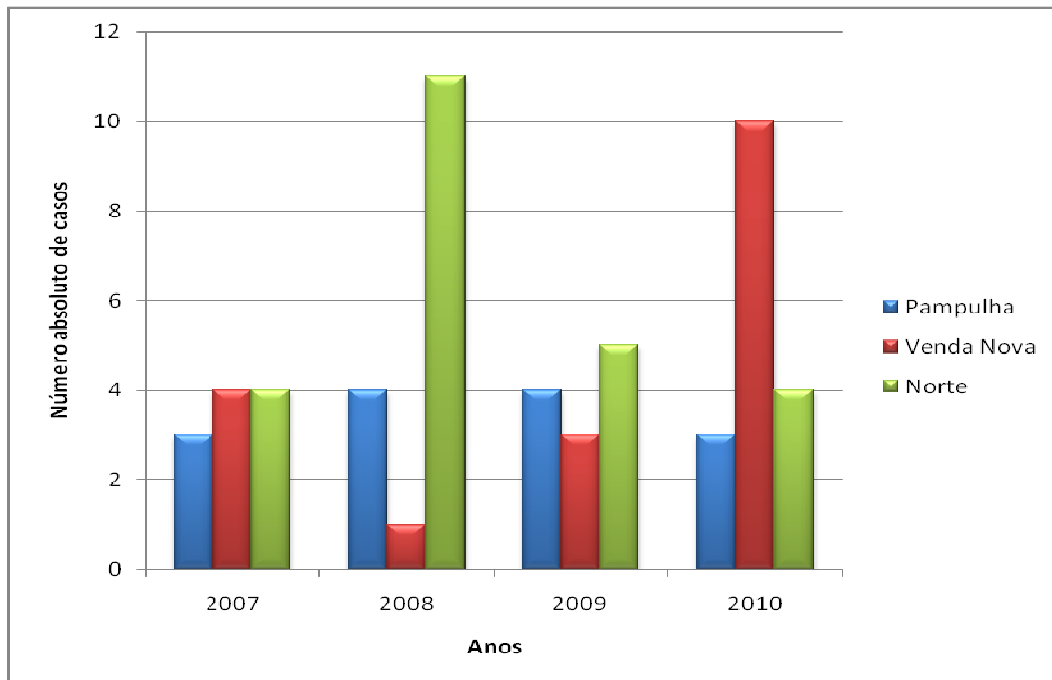


Figura 2. Casos humanos de leishmaniose tegumentar notificados nas Regionais de estudo, Belo Horizonte, Minas Gerais no período de 2007 a 2010.

2.2 Reservatórios

Diferentes estudos taxonômicos têm sido realizados de isolados de *Leishmania*, principalmente no Novo Mundo, revelando uma grande diversidade de espécies de parasitos infectando uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, sendo que algumas estão associadas à doença humana e outras aparentemente restritas a ordens inferiores de mamíferos, tais como roedores (Oliveira et al., 2005).

Segundo Ashford (1996), reservatório é um hospedeiro responsável pela manutenção por longos períodos de um agente infeccioso no ambiente. Além disso, para agir como um bom reservatório, o organismo necessita ser abundante (biomassa) e constituir espécies freqüentemente agregadas e vida longa o suficiente para manter o agente infeccioso em estações de não transmissão. Além dos reservatórios principais, são observados reservatórios secundários, que são

hospedeiros acidentais que por algum motivo se tornam responsáveis por algumas transmissões.

Um conjunto de fatores de natureza física, química e biológica é observado para cada ambiente ecológico, fatores abióticos ou bióticos que condicionam a dinâmica das comunidades (Ávila-Pires, 1989). Logo, elas não são estáticas ou estáveis, podendo alterar-se e mudar de condição por influência de mudanças ocorridas no meio ambiente exterior ou desenvolvimento ontogenético dos organismos envolvidos (Whitfield, 1979 citado por Ávila Pires, 1989). Para cada área endêmica são observados os micro focos, onde suas próprias características vão repercutir no tipo de reservatório para *Leishmania* observado (Van Wynsberghe et al., 2009).

Segundo concepção de Quinnell e Courtenay (2009) muitos animais podem se infectar, se tornando reservatórios primários, secundários ou acidentais. Os hospedeiros

secundários podem transmitir a infecção, mas não podem mantê-la na ausência do reservatório primário. Reservatórios acidentais podem se infectar, mas normalmente não transmitem a infecção. A diferenciação entre reservatório primário e secundário é bem difícil. Uma forma de identificar um reservatório primário é observar a persistência da infecção em áreas onde apenas é observado aquele animal ou que métodos de controle prevenindo as transmissões provenientes desta espécie sejam eficazes no controle da doença. Como pré-requisitos para ser um reservatório observam-se: prevalência da infecção, transmissão sazonal, infecção crônica em períodos de não transmissão e infecção do vetor.

Um dos primeiros trabalhos realizados com roedores foi realizado na China, onde os autores verificaram a susceptibilidade de hamster (*Cricetulus griseus* e *Cricetulus triton*), e ratos (*Mus wagneri*, *Mus rattus* e *Mus rattus albinus*) à *L. donovani*, observando que todos foram sensíveis à infecção (Young et al., 1929).

Desde então a investigação de reservatórios silvestres e sinantrópicos para as leishmanioses vêm sendo o objetivo de muitas pesquisas, principalmente no papel dos roedores no processo de transmissão.

2.2.1 Infecção em *Rattus norvegicus*

Araújo Filho (1978), no Rio de Janeiro, demonstrou a presença de amastigotas em lesões dérmicas de dois exemplares de *Proechimys dimidiatus* e em um *Rattus norvegicus norvegicus*.

Azab et al. (1984) identificaram no Egito, *Leishmania* de um *Rattus norvegicus* através de fator de excreção (EF) e perfil eletroforético de proteínas, não afirmaram, no entanto, qual a espécie em questão, apenas concluíram não se tratar de *L. donovani*, *L. tropica* ou *L. major*.

Giannini (1985) nos Estados Unidos, infectou experimentalmente nove *Rattus norvegicus* com *L. donovani* e seis *Rattus*

norvegicus com *L. major* e observou a capacidade destes roedores em albergar *L. major* por um longo período, por isolamento (ou crescimento) em cultura e também na sorologia (dot ELISA) com manutenção de altos títulos de anticorpos específicos. Já em relação à *L. donovani* apenas na primeira semana pós-infecção o isolamento das promastigotas foi possível.

Em 1994 no Egito, Morsy et al. detectaram seis *Rattus norvegicus* com sorologia reativa para leishmaniose (hemaglutinação indireta > 1/256), um *C. cahirinus* (> 1/128) e quatro *Gerbillus pyramidum* (>1/1024). Isolaram parasitologicamente em cultura e histologia em apenas dois *G. pyramidum*. A área investigada havia notificado no momento da pesquisa, dois casos de LV e um de LT em nativos da região. Amastigotas foram identificadas histologicamente também em dois cães.

Di Bella et al. (2003) na Itália encontraram uma soroprevalência de 33,3% de *Leishmania* em *R. norvegicus*.

Neiva (2005) realizou estudo sorológico em amostra de roedores, *Rattus norvegicus*, capturados no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, utilizando as técnicas de IFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) e ELISA (Ensaio Imunoenzomático), onde obteve resultados positivos para *Leishmania*. De 98 animais testados 27,6% foram positivos na IFI e no ELISA, 10,2% reativos na IFI, 26,5% reativos ao ELISA somente e 35,7% não foram reativos em nenhum dos dois testes. Posteriormente utilizou-se PCR em amostras de medula e fígado de um exemplar que se mostrou positivo. No entanto, quando as amostras que demonstraram amplificação da região conservada do kDNA de *Leishmania* foram submetidas à amplificação específica para os complexos *L. braziliensis*, *L. mexicana* e *L. infantum/L. chagasi* não houve resultado positivo. Como apenas uma amostra foi testada, uma investigação mais minuciosa sobre a existência e a tipificação de *Leishmania* em *R. norvegicus* em Belo Horizonte foi sugerida.

Papadogiannakis et al. (2009), investigaram a presença de *Leishmania* em *Rattus norvegicus* na Grécia, pela técnica de PCR, encontrando de 16 animais avaliados, um infectado com *Leishmania infantum*.

Motazedian et al. (2010), coletaram no Iran 57 *Rattus norvegicus* e por cultura e histologia encontraram uma fêmea positiva. Quando realizada técnica molecular em amostras de orelha, fígado e baço outros 29 animais foram positivos na nested PCR. A caracterização foi realizada através de seqüenciamento, revelando *L. major*. Nenhum dos animais apresentou sinais clínicos característicos.

Psaroulaki et al. (2010), coletaram 622 ratos (402 *Rattus norvegicus* e 220 *Rattus rattus*) em 51 cidades na ilha de Chipre durante três anos e investigaram a presença de IgG contra seis parasitos: *Rickettsia typhi*, *R. conorii*, *Bartonella henselae*, *Coxiella burnetti*, *Toxoplasma gondi* e *Leishmania infantum*. Dentre os *Rattus norvegicus* capturados, 344 foram submetidos à sorologia para leishmaniose e 19 animais (5,6%) foram reativos na Imunofluorescência Indireta. Na região duas espécies de *Leishmania* acontecem em paralelo, *L. infantum* em cães e *L. donovani* em humanos.

Ferreira (2010), pesquisou a presença de *Leishmania* em cães e pequenos mamíferos na regional Nordeste de Belo Horizonte, área endêmica para LV e LTA e detectou pela PCR com diferentes alvos, caracterização por RFLP e sequenciamento infecção de cães, marsupiais e roedores por *Leishmania* do complexo *Leishmania braziliensis* e complexo *Leishmania donovani* em ambiente peridomiciliar e área verde. Dentre os *Rattus norvegicus* coletados 100% (9/9) apresentaram infecção por *Leishmania*.

2.3 Diagnóstico da leishmaniose

Para complementar a investigação clínica e epidemiológica, o diagnóstico laboratorial pode ser dividido em exames parasitológicos ou imunológicos.

O diagnóstico direto pode ser realizado através da demonstração e isolamento do parasita, geralmente em biópsias de lesão ou aspirados de baço, fígado ou medula óssea, aposição de tecidos e lesões em lâminas de microscopia, em meios de cultura bifásicos ou inoculação em animais de aspirados ou fragmentos de biópsia (Sundar e Rai, 2002; Alves e Bevilacqua, 2004).

Os testes diretos histopatológicos e isolamento em meios de cultura possuem baixa sensibilidade, execução demorada e especialmente no caso de meios de cultura principalmente para *L. braziliensis*, difícil isolamento além de fácil contaminação, fatores limitantes na rotina diagnóstica (Noyes et al., 1998; Evans et al., 1990; Akhavan et al., 2010). Para alguns autores (Dias et al., 1977; Falqueto et al., 1986) o esfregaço por aposição não é um processo indicado para diagnóstico da leishmaniose tegumentar em cães devido ao baixo número de parasitas nas lesões.

Dentre os testes sorodiagnósticos para a leishmaniose tegumentar o primeiro a ser utilizado ainda na década de 30 foi a Intradermorreação de Montenegro (IRM) que mede a hipersensibilidade celular tardia e é extensivamente empregado em pesquisas epidemiológicas por sua praticidade, podendo ser aplicado nas condições de trabalho nas zonas rurais onde se localizam os principais focos endêmicos. Podem apresentar mais de 95% de positividade para a forma mucosa (reação hiperérgica), moderada na forma cutânea e negativa na forma cutâneo-mucosa (reação anérgica). O teste serve como indicador de exposição e para monitorar a imunidade após vacinação tendo demonstrado 100% de especificidade e de 86-100% de sensibilidade (Guedes et al., 1990). Devido a sua grande utilidade, o antígeno empregado no teste foi padronizado por Melo et al. em 1977.

Posteriormente, já na década de 60 a reação de imunofluorescência indireta (IFI) foi desenvolvida e implantada na rotina diagnóstica, e na década de 70, o ensaio imunoenzimático (ELISA) foi colocado em

prática, mas não disponível comercialmente (Alves e Bevilacqua, 2004). A variação de sensibilidade das técnicas diagnósticas é muito discutida. A qualidade da IFI no diagnóstico, por exemplo, depende muito da cepa (homólogas ou heterólogas) e estágio de vida das leishmanias (amastigotas ou promastigotas). Fernández-Pérez et al. (1999) destacam que a IFI elaborada com amastigotas possui mesma especificidade e maior sensibilidade que a IFI com formas promastigotas de *L.infantum* no diagnóstico da LV. De uma forma geral, são utilizados antígenos brutos totais ou lisados, com especificidade alcançando de 70 a 90%. As reações cruzadas com outros agentes infecciosos (outros tripanossomatídeos, malária, micobactérias) é outro limitante da sorologia e devido a doença de Chagas e leishmaniose visceral produzirem altos níveis de anticorpos circulantes, estes testes sorológicos são mais indicados para estas patologias (Mohammed et al., 1986; Reed et al., 1987; Yamamoto et al., 1988).

Atualmente, métodos moleculares como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) são muito utilizados como ferramenta para detecção de *Leishmania* em amostras clínicas tanto de humanos e de cães como também em animais silvestres e sinantrópicos. (Omran et al., 1997; Oliveira et al., 2005; Silva et al., 2005; Brandão-Filho et al. 2003; Van Wysesberghe et al., 2009). Com objetivo de aumentar a sensibilidade da técnica, sem perder a especificidade, muitos autores destacam a aplicabilidade da Nested PCR em diferentes alvos (regiões dirigidas aos minicírculos de kDNA, ao ribossomo SSUrRNA ou internal transcribed space ITS1 e ITS2) como alternativa de alta resolução na identificação nas leishmanioses (Noyes et al., 1998; Van Eys et al., 1992; Cruz et al., 2002; Cruz et al., 2006; Akhavan et al., 2010).

A identificação da espécie de *Leishmania* envolvida é necessária ao entendimento da epidemiologia, na utilização de tratamentos adequados e na formação de prognósticos, podendo assim contribuir para o conhecimento do papel destes animais na manutenção das espécies causadoras das leishmanioses tegumentar e visceral no

ambiente. No entanto a diferenciação em nível de espécie é difícil devida à grande similaridade morfológica entre as espécies (Sundar et al., 2002).

Para a identificação e caracterização das *Leishmanias* em nível específico ou subespecífico pode-se destacar como as mais amplamente difundidas as eletroforeses de enzimas e anticorpos monoclonais, PCR-RFLPs (Restriction fragment length polymorfism) e seqüenciamento de fragmentos de DNA obtidos da amplificação de diferentes órgãos que após alinhamento com as seqüências depositadas no Genbank é possível identificar a espécie envolvida. (Lopes et al., 1984; Schönian et al., 2003; Volpini et al., 2004; Medeiros et al., 2008).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

O estudo foi realizado na cidade de Belo Horizonte, capital de Minas Gerais, localizado na zona metalúrgica do Estado. Está delimitado pelas latitudes 19° 46' 35"e 20° 03' 34" sul e pelas longitudes 43° 51' 27"e 44° 03' 47" oeste de Greenwich e possui população humana de 2.375.444 habitantes (IBGE, 2010). Ocupa uma área de 330,9 Km², a uma altitude média de 858 m e apresenta clima predominantemente tropical com temperatura média anual de 20,5°C e precipitação pluvial média de 1.200mm anuais com a concentração de chuvas no período de novembro a março (INMET, 2006).

Para fins administrativos e de planejamento das ações de governo a cidade é dividida em nove Administrações Regionais com autonomia financeira e gerencial segundo a Prefeitura Municipal. De acordo com esta divisão, este estudo engloba as regionais Pampulha, Venda Nova e Norte (Figura 3). Baseado na mesma divisão das Administrações Regionais formou-se nove Distritos Sanitários encarregados das políticas de saúde humana e animal. O Serviço de Controle de Zoonoses foi incorporado a este sistema em 1993, e,

entre os anos de 1995 e 1996, parte de suas ações foram descentralizadas para os Centros de Saúde. Atualmente as Gerências de Controle de Zoonoses do nível central e dos Distritos Sanitários são responsáveis pela execução do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral em cães, mostrando

a descentralização das ações de controle das zoonoses. Para efetivar a pesquisa, contou-se com o apoio e colaboração da Gerência de Controle de Zoonoses do Distrito Pampulha por disponibilizar as coletas dos roedores em seus ambientes fossoriais destas regionais.

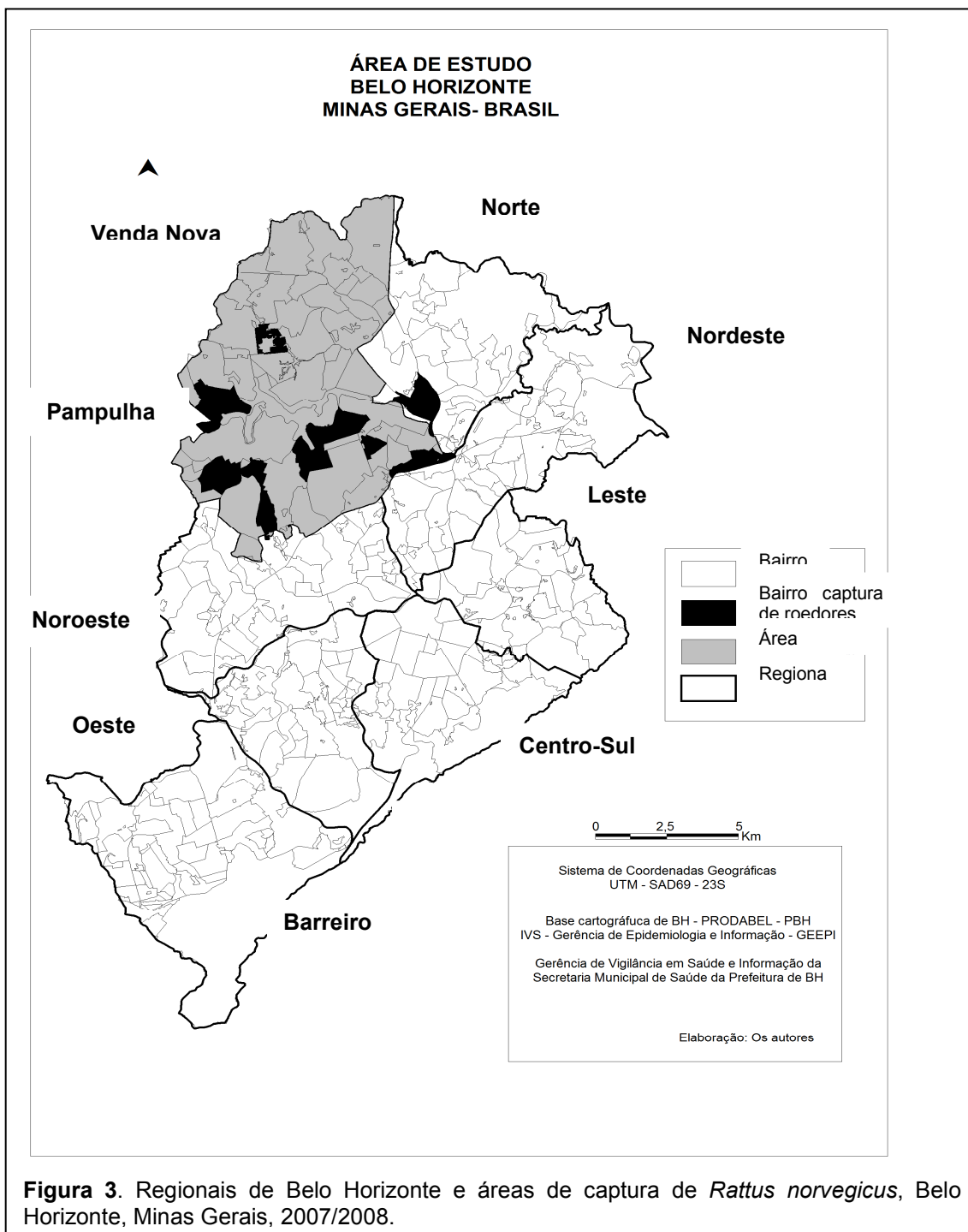


Figura 3. Regionais de Belo Horizonte e áreas de captura de *Rattus norvegicus*, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2007/2008.



Figura 4. Área de captura dos *Rattus norvegicus*, peridomicílio de Belo Horizonte, Minas Gerais. A) Bairro Suzana (regional Pampulha), B) Lagoa da Pampulha (regional Pampulha), C) Bairro Dona Clara (regional Pampulha), D) Bairro Leblon (regional Venda Nova).

3.2 Delineamento do Estudo

O trabalho desenvolveu-se em 5 fases: captura dos roedores, coletas de amostras para exame parasitológico, cultura e isolamento, realização da Reação de Imunofluorescência Indireta e Ensaio Imunoenzimático, técnica de Reação em Cadeia de Polimerase e seqüenciamento para detecção de *Leishmania* e identificação da espécie.

3.3 Procedimentos éticos

O projeto obteve a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, número 054/08. Todos os procedimentos de coleta de amostras dos animais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os animais foram capturados com armadilhas de arame

galvanizado tipo gaiola, modelo Tomahawk (35x12x12cm) utilizando como isca suspensa ração para cães. As armadilhas foram distribuídas em 10 pontos com distância mínima entre eles de 200 metros em cada estação de captura sendo colocadas à noite e recolhidas ao amanhecer. As capturas foram realizadas duas vezes por semana, repetidas mensalmente de julho a novembro de 2007 e abril a novembro de 2008. Com a finalidade de registro e classificação dos animais uma ficha com dados sobre peso, medidas (cauda e corpo) e presença ou não de lesões de pele foi preenchida. A identificação da espécie estabeleceu-se de acordo com literatura específica (Bonvicino e Oliveira, 2008) observando-se as características morfológicas dos animais.

3.4 Coleta de amostras biológicas

Os animais foram sedados com 1-5 mg/kg de Xilazina e lavados em solução de etanol

70° GL para eliminar o máximo de contaminantes. Após coleta de 5 ml de sangue através de punção cardíaca procedeu-se ao sacrifício do animal através da aplicação de 50 mg/ Kg de Tiopental, via intraperitoneal e foram coletadas as amostras do baço, pele e medula óssea.

3.5 Coleta de sangue para diagnóstico sorológico

O sangue foi coletado através de punção cardíaca e uma fração deste foi centrifugado a 2000 x g, separados os soros e armazenados a -20°C.

3.6 Coleta de amostra biológica para diagnóstico parasitológico

Fragmentos de fígado, baço, pele de orelha e de cauda foram coletados, cautelosamente enxutos em papel de filtro para eliminação do excesso de sangue e levemente friccionados em lâminas de microscopia, previamente desengorduradas em solução de álcool-éter. Uma alíquota da medula óssea foi utilizada para a realização de esfregaço em lâmina de microscopia.

3.7 Coleta de material para isolamento em meio de cultura

Fragmentos de baço, medula óssea e pele contendo em média 1 cm³, foram coletados de maneira anti-séptica e colocados em solução salina contendo estreptomicina (200µg/mL), penicilina (500 UI/mL) e flucitosina (500µg/mL) e encaminhados para o laboratório de leishmanioses da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para inoculação em meio de cultura para a tentativa de isolamento de amostras de *Leishmania* sp.

3.8 Coleta de amostra para pesquisa molecular

Parte do sangue coletado a priori em tubos contendo EDTA foi transferido para tubos estéreis e conservados a -20°C até o momento de utilização. Pequenos fragmentos da ponta da cauda, baço e medula óssea coletados com auxílio de

pinça, tesoura e lâmina de bisturi de uso único para cada amostra, foram estocados em tubos estéreis contendo etanol a 100% e conservados a -20°C até a realização das técnicas moleculares.

3.9 Métodos de diagnóstico

3.9.1 Sorológico

3.9.1.1 Imunofluorescência Indireta (IFI)

Utilizou-se para tal técnica Kit comercial Biomanguinhos e conjugado anti-imunoglobulina de rato, fração IgG, marcado com Isotiacianato de Fluoresceína obtida de soro imune de cabra (Sigma-USA) na diluição de 1:128. Os soros foram diluídos na concentração de 1/40, 1/80, 1/160 em "Phosphate buffer saline" (PBS).

Conforme protocolo do fabricante (Biomanguinhos) as lâminas então fixadas com 10µl de antígeno receberam 10µl das referidas diluições dos soros e controles (soros controles negativos e positivos selecionados de amostras caracterizadas anteriormente por Neiva 2005, com resultados de ELISA, IFI e PCR) em cada círculo da lâmina e incubados por 30 minutos em estufa a 37°C. Após incubação, lavadas com PBS, permanecendo cobertas por 5 minutos com a solução e novamente lavadas com água destilada. Após secagem das mesmas em temperatura ambiente, adicionou-se em cada círculo 15µl de uma solução de conjugado anti-IgG de rato diluído 1:150 (após diluições seriadas de soros controle positivo e negativo para se chegar a diluição de conjugado ideal) em PBS e azul de Evans na concentração 1/50. Foram incubadas por 30 minutos a 37°C e lavadas com PBS cobrindo a mesma com essa solução, deixando em repouso por 5 minutos. Posteriormente lavadas com água destilada e secas em temperatura ambiente. Sobre as lâminas colocou-se glicerina tamponada e lamínula. Fez-se leitura em microscópio de imunofluorescência (Marca Zeiss) com aumento de 40X onde títulos iguais ou superiores a 1/40 foram considerados positivos.

3.9.1.2 Teste Imunoenzimático (ELISA)

Placas de 96 cavidades de poliestireno de fundo chato foram sensibilizadas com peptídeo recombinante S7 (Biogene) “overnight” à 4°C. Seguindo o protocolo do fabricante, após período de sensibilização das placas, a solução S7 foi desprezada e a placa lavada três vezes com tampão de lavagem PBST (Phosphate Buffer Saline + Tween a 20%). Nas placas foram distribuídos 100µl de uma solução composta por PBST + 2% de leite em pó desnatado, incubando-se por 30 minutos em temperatura ambiente. Após incubação a solução foi desprezada e a placa lavada duas vezes com PBST. A cada orifício da placa colocou-se 100µl do soro a ser analisado e controles diluídos a 1/80, incubando-se novamente a 37°C por 30 minutos. Os soros controles (mesmos utilizados na IFI) foram aplicados em triplicata. As placas foram lavadas com solução PBST, retirando-se o excesso de anticorpos não reagentes e incubando-se novamente a 37°C por 30 minutos com 100µl/orifício de conjugado diluído em PBST a 1/5000 (após padronização em diluições seriadas do conjugado com os soros controles positivo e negativo). O conjugado imunoenzimático foi a antiimunoglobulina de rato, fração IgG, marcado com peroxidase, obtida através de soro imune de cabra (Sigma –USA) na diluição de 1:17000. Novamente as placas foram lavadas por quatro vezes e acrescentou-se 100µl de substrato (5 mg de O-fenilenodiamino-OPD + 4 µl de água oxigenada a 30% + 10 ml de tampão citrato-fosfato), mantendo-se as placas ao abrigo da luz por 20 minutos. Após incubação 30µl de ácido sulfúrico a 2N foram acrescentados em cada orifício da placa para interromper a reação. A leitura da reação foi feita em leitor de ELISA (marca labsystems MULTiskan MS. Modelo Versão 4.4, ano 1994) com comprimento de onda de 492nm. Todas as amostras não reativas na IFI e também negativas na PCR foram selecionadas para estabelecer-se o ponto de corte. A média dos valores de absorbância destas amostras além dos valores dos controles negativos foi calculada e o ponto de corte final foi dois desvios padrões acima desta média.

3.9.2 Parasitológico

3.9.2.1 Exame direto

As lâminas confeccionadas por aposição dos fragmentos de pele, baço, fígado e medula óssea foram fixadas com May Grunwald e coradas com “Giemsa”. Para a pesquisa das formas amastigotas de *Leishmania* sp foi realizada leitura em microscópio óptico com aumento de 100 vezes.

3.9.2.2 Isolamento em meio de cultura

No laboratório os fragmentos de pele de cauda, baço e medula óssea foram transferidos em capela de fluxo laminar para novo tubo contendo solução salina idêntica em concentração àquela supracitada e guardados a 4°C. Transcorridas 24 horas o fragmento foi triturado e inoculado em tubos com meio de cultura bifásico composto de ágar-sangue NNN (Novy Mc Noel e Nicolle) e uma fase líquida contendo 0,5 mL de meio Schneider’s enriquecido com 20% de soro fetal bovino e contendo antibióticos associados (Penicilina 100 U/ml e Estreptomicina 100 µg/ml) e anti-fúngico (flucitosina (500µg/mL) mantidos à 26° C ± 1°C. A cada sete dias, uma alíquota foi observada ao microscópio óptico em aumento de 10 e 40 vezes, sendo a amostra considerada positiva quando observada a presença de formas promastigotas de *Leishmania* sp. Ao mesmo tempo, foi realizado o repique da cultura para um novo tubo. Este processo foi repetido quatro vezes e após a quinta semana as culturas negativas foram descartadas.

3.9.3 Molecular

3.9.3.1 Extração do DNA genômico em amostras de sangue e medula óssea

Para isolamento de DNA do sangue e medula óssea utilizou-se kit comercial Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Adicionou-se 20µl de proteinase K (20mg/ml) com 300µl de tampão de lise em 200µl de amostra. Após

incubação de 10 minutos e centrifugação (11.000 x g) por um minuto, o material foi colocado em uma coluna contendo sílica e novamente lavado com o tampão de lise (400µl). Nova centrifugação foi realizada a 11.000 x g e 500µl de tampão de lavagem adicionados. Após centrifugação as amostras foram eluídas em 200 µl de tampão de eluição a temperatura de 70°C e estocadas a -20°C até o uso.

3.9.3.2 Extração do DNA genômico em amostras de tecido

O DNA de tecido foi extraído através de kit comercial Illustra Cells and Tissue GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) conforme especificações do fabricante. Aproximadamente 50 mg de tecido de pele e baço foram aliqüotados para extração. Após homogeneização dos fragmentos, adicionou-se 1ml de PBS e posterior centrifugação rápida. Descartou-se o sobrenadante e foram adicionados mais 50µl de PBS, seguidos de homogeneização e centrifugação por 10 segundos a 2.000 x g. Cinquenta microlitros de solução de lise e 20µl de proteinase K (20mg/ml) foram adicionados e a solução foi homogeneizada em agitador de tubos por 15 segundos e incubada por 1 hora a 56°C. Após a incubação foi centrifugada por 10 segundos a 2.000 x g e adição de 500µl de tampão de lise seguida de incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram colocadas em colunas de sílica e centrifugadas por 1 minuto a 11.000 x g e o sobrenadante descartado. Novamente 500µl de tampão de lise foram acrescentados e centrifugação por 1 minuto (11.000 x g), tubo coletor descartado. Para eluição 200µl de solução de eluição pré aquecida a 70°C foi adicionada. As amostras de DNA genômico foram estocadas a 20°C até seu uso.

3.9.3.3 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para a detecção da infecção foi utilizada a nested PCR (LnPCR) dirigida a um fragmento do gene SSUrRNA, região altamente conservada entre as espécies do gênero *Leishmania*. Os iniciadores utilizados

foram: (R221): 5' GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG-3', (R332): 5' GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG-3', (R223): 5' TCC CAT CGC AAC CTC GGTT-3' e (R333): 5' AAA GCG GGC GCG GTC CTG-3', utilizando protocolo adaptado e modificado de Cruz et al., 2002. A primeira reação foi realizada em um volume final de 50µl contendo 10µl de DNA "template" e 40µl do mix composto por tampão 10X com 2 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 15 pmol de cada iniciador R221 and R332 com 1,4 unidades de Taq DNA polimerase (BioTools, Espanha). A cada conjunto de reações foram incluídos três controles negativos (contendo todos os componentes exceto DNA) e positivos (DNA purificados das cepas de referência de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/74/pp75) e *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/LTB16). As seguintes condições para o ciclo foram respeitadas: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C, 60°C e 72°C respectivamente e etapa final de extensão 72°C por 5 minutos. A primeira reação produz banda de 353 pb. O produto amplificado foi diluído quatro vezes em água deionizada e usado como "template" para a próxima reação. O volume final da segunda reação foi 25µl contendo tampão 10X com 2 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 15pmol de cada iniciador R223 e R333, 0.7 unidades de Taq DNA polimerase (BioTools, Espanha) e 10 µl do "template". As condições de amplificação foram: um ciclo de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 30 segundos para as seguintes temperaturas respectivamente, 94°C, 65°C e 72°C e extensão final de 72°C por 5 minutos. O produto final da segunda reação possui 603 pb. Os resultados das PCRs foram observadas através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% a 100V em 5x TBE (0,045 M Tris-borato, 1 mM EDTA) corados com brometo de etídeo (0,5 µg/ml).

3.9.3.4 Controle endógeno da PCR

Para testar a integridade do DNA extraído das amostras com resultados negativos na LnPCR foi utilizado um protocolo padronizado por Ferreira et al. (2010) para amplificação de um gene endógeno

conservado entre os pequenos mamíferos. Para a análise 10% das amostras não reagentes de cada tecido foram submetidas à PCR. Os iniciadores para IRBP foram: fwd 5' TCC AAC ACC ACC ACT GAG ATC TGC CC 3' e IRBP rev. 5' GTG AGG AAG AAA TCG GAC TGG CC 3' com produto final de 227 pares de base. Para amplificação utilizou-se das condições abaixo: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de desnaturação 94°C por 30 segundos, anelamento 57°C por 30 segundos e extensão final 72°C por 5 minutos.

3.9.3.5 Seqüenciamento

A fim de caracterizar as amostras positivas na PCR genérica o seqüenciamento foi realizado. As amostras positivas da segunda reação da LnPCR com bandas nítidas (de

353 pb) foram selecionadas, extraídas do gel de agarose e purificadas pelo kit QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN). Após purificação, 5µl da amostra foi utilizada como template, 1µl de BIG DYE, 1µl de um dos iniciadores (3.2 pmol) e 3µl de H₂O compuseram o mix. A condição aplicada à PCR foi 96°C por 1 minuto, 30 ciclos de 96°C por 15 segundos e 57°C por 15 segundos (dependente da temperatura de anelamento do iniciador utilizado) e 60°C por 4 minutos. O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador ABI 310 (Life Technologies). A edição, alinhamento e busca de sites de restrição das seqüências foi através do programa Bioedit. O alinhamento das seqüências com aquelas depositadas no GenBank permitem a identificação de três complexos importantes na área de estudo, sendo eles *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum chagasi* e *Leishmania amazonensis* (Figura 5).

```

                    10         20         30         40
50
L_braziliensis (M80292) R3R4.seq  TCCCATCGCAACTTCGGTTCGGTGTGTGGCGCCTTTGGAGGGGTTTAGTG
L_amazonensis (M80293) R3R4.seq  .....
L_infantum (M81430) R3R4.seq     .....C.....-.....

                    60         70         80         90
100
L_braziliensis (M80292) R3R4.seq  CGTCCGGTGC GGCTCCGGTTCGTCCGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCAC
L_amazonensis (M80293) R3R4.seq  .....A.....
L_infantum (M81430) R3R4.seq     .....A..A.....

                    110        120        130        140
150
L_braziliensis (M80292) R3R4.seq  GGCCTCTAGGAATGAAGGAGGTTAGTTCGGGGGAGAACGTACTGGGGCGT
L_amazonensis (M80293) R3R4.seq  .....
L_infantum (M81430) R3R4.seq     .....

                    160        170        180        190
200
L_braziliensis (M80292) R3R4.seq  CAGAGGTGAAATTCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATT
L_amazonensis (M80293) R3R4.seq  .....
L_infantum (M81430) R3R4.seq     .....

                    210        220        230        240
250
L_braziliensis (M80292) R3R4.seq  CTTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAGTGTGGAGATCGAAGAT
L_amazonensis (M80293) R3R4.seq  .....
L_infantum (M81430) R3R4.seq     .....

                    260        270        280        290
300
L_braziliensis (M80292) R3R4.seq  GATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTG
L_amazonensis (M80293) R3R4.seq  .....
L_infantum (M81430) R3R4.seq     .....

                    310        320        330        340
350
L_braziliensis (M80292) R3R4.seq  GGGATCTTATGGGCCGGCTGCGGCAGGGTTTACCCTGTGTCCAGCACCG
L_amazonensis (M80293) R3R4.seq  .....
L_infantum (M81430) R3R4.seq     .....

                    360
L_braziliensis (M80292) R3R4.seq  CGCCCCTTT
L_amazonensis (M80293) R3R4.seq  .....
L_infantum (M81430) R3R4.seq     .....

```

Figura 5. Alinhamento das seqüências do fragmento do gene SSUrRNA de espécies de *Leishmania*, depositadas no GenBank.

3.9.3.6 Estatística

Para analisar a eficiência dos resultados sorológicos e moleculares utilizou-se o teste Kappa calculado pelo software Stata 10. Este teste foi utilizado para descrevermos a concordância entre dois testes diagnósticos, baseando-se no número de respostas concordantes além do que seria esperado tão somente pelo acaso. A diferença das frequências de positivos na sorologia, na PCR, ambientes de coleta e as relações com gênero e idade foram analisadas pelo teste Qui-quadrado com nível de significância 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Captura dos roedores

As capturas foram realizadas duas vezes por semana, repetidas mensalmente de

julho a novembro de 2007 e abril a novembro de 2008 totalizando 80 *Rattus norvegicus* coletados (figura 6). Em 2007 foram coletados 50 animais, sendo que 64% (32/50) provenientes da margem da Lagoa da Pampulha, Venda Nova e Norte e 36% (18/50) de bairros da regional Pampulha. Em 2008, 30 animais foram coletados e 100% deles oriundos de bairros da regional Pampulha (figura 7). Dentre estes, 36,25% foram fêmeas adultas, 10% fêmeas jovens, 40% machos adultos e 13,75% machos jovens segundo classificação de WHO (1987). Os ratos capturados depois de identificados foram levados ao laboratório para coleta das amostras clínicas.

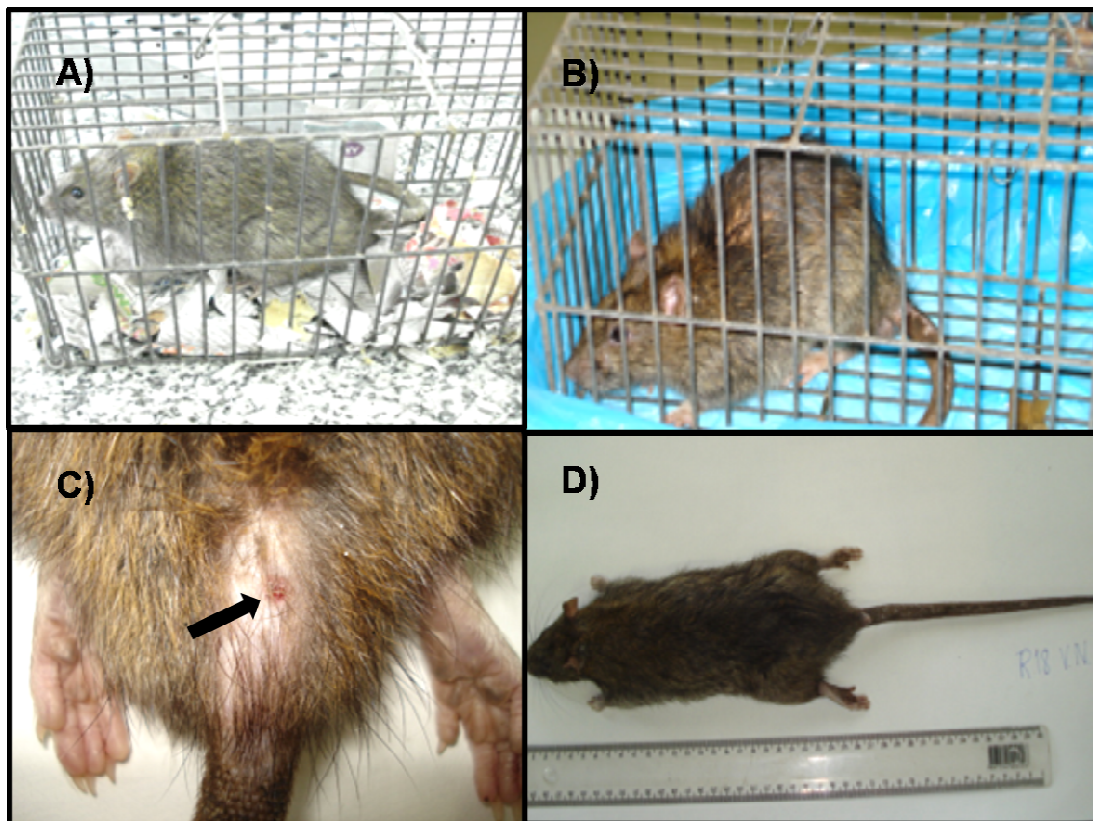


Figura 6. A, B e D: exemplares de *Rattus norvegicus* capturados nas regionais Pampulha e Venda Nova no município de Belo Horizonte, Minas Gerais. C: lesão na base da cauda de um exemplar de *R. norvegicus* capturado na regional Norte.

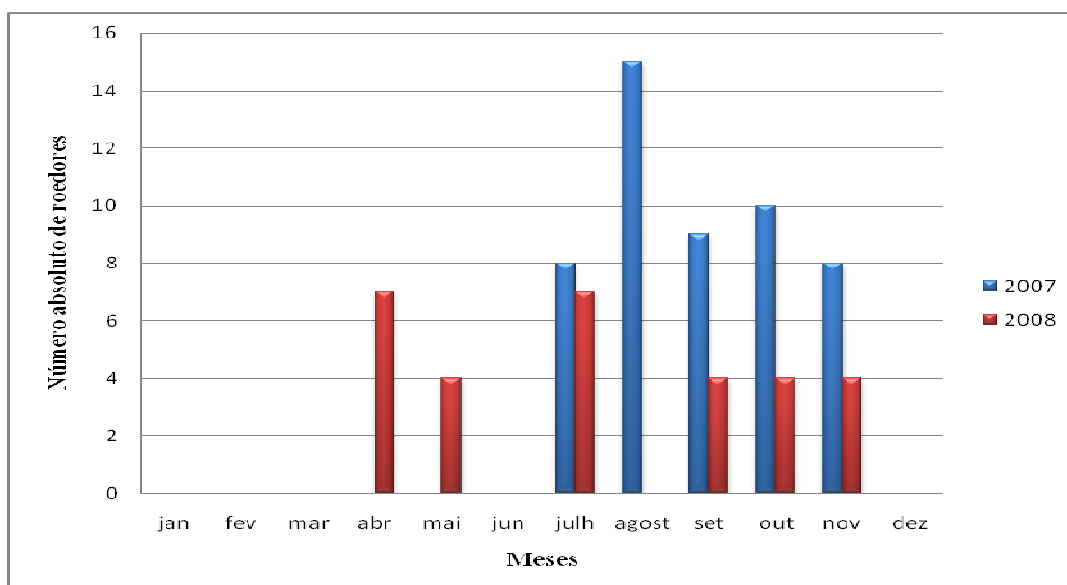


Figura 7. Número de *Rattus norvegicus* capturados no período de 2007 e 2008 em Belo Horizonte, Minas Gerais.

4.2 Técnicas sorológicas (ELISA e IFI)

As amostras que apresentaram leitura de absorbância no ELISA superior a 0,233 foram consideradas reativas. A técnica apresentou 43,75% (35/80) animais reativos e 56,25% (45/80) não reativos. Na IFI cada amostra foi pesquisada nas diluições 1:40, 1:80 e 1:160, onde 70% (56/80) dos animais foram reativos apresentando as seguintes diluições: 10% (8/80) 1:160;

33,75% (27/80) 1:80; 26,25% (21/80) 1:40 e 30% (24/80) não reativos.

Quando examinados os resultados das duas sorologias, observou-se que 35% (28/80) das amostras foram reativas nas duas técnicas, 35% (28/80) das amostras reativas apenas na IFI, 8,75% (7/80) reativas somente no ELISA e 21,25% (17/80) não reativas nos dois testes (Tabela1).

Tabela1. Resultados dos testes sorológicos para diagnóstico das leishmanioses em *Rattus norvegicus* capturados por Regional/Bairro em Belo Horizonte no período de 2007/2008.

REGIONAL/BAIRROS	ANIMAIS CAPTURADOS	AMOSTRAS REATIVAS		FREQUÊNCIA POSITIVOS	
		RIFI	ELISA	RIFI	ELISA
PAMPULHA					
LAGOA DA PAMPULHA	19	12	8	63,15%	42,10%
DONA CLARA	1	1	1	100%	100%
SUZANA	9	5	3	55,55%	33,33%
ST TEREZINHA	12	8	4	66,66%	41,66%
BRAÚNAS	7	5	3	71,42%	42,85%
CECILIA	7	1	4	14,28%	57,14%
HELIOPOLIS	6	6	5	100%	83%
LIBERDADE	1	1	-	100%	0%
UNIVERSITARIO	5	5	-	100%	0%
NORTE SÃO BERNARDO	3	3	3	100%	100%
VENDA NOVA LEBLON	10	9	4	90%	40%
TOTAL	80	56	35	70%	43,75%

O teste Kappa apresentou uma ligeira concordância entre as duas técnicas sorológicas ($K=0,166$). Quando analisados os resultados de EIE e IFI título 1:40 observou-se $K=0,04$; EIE e IFI título 1:80, $K=0,25$ e EIE e IFI título 1:160, $K=0,36$, indicativo de concordância considerável (concordância bruta de 71%).

O teste qui-quadrado apresentou diferença significativa entre os resultados de IFI e ELISA ($p<0,001$). Não foi identificada

diferença significativa entre os resultados sorológicos reativos e variáveis como local de coleta e gênero. A técnica de IFI apresentou incidência superior e significativa entre os animais adultos (teste de Fisher; $p=0,007$).

4.3 Parasitológico

4.3.1 Exame direto

Dos 80 animais avaliados, apenas um animal apresentou lesão na cauda, no entanto pouco sugestiva de leishmaniose tegumentar. O exame parasitológico da mesma não indicou a presença de formas amastigotas. As lâminas correspondentes aos fragmentos de medula, cauda e baço também não apresentaram formas amastigotas visíveis.

4.3.2 Isolamento em meio de cultura

De um total de 240 amostras de tecidos inoculadas em meio de cultura 80 (100%) relativas aos fragmentos de pele contaminaram-se com fungos. Em relação aos outros tecidos (80 de baço e 80 de medula), nenhuma forma promastigota de *Leishmania sp* foi observada.

4.4 Molecular

4.4.1 Extração do DNA

O produto das extrações foi mensurado em aparelho nanodrop revelando uma diferença quantitativa entre os órgãos. Pele de cauda apresentou níveis que variaram de 400 a 2000 ng/μl de DNA genômico, medula 50 a 350 ng/μl e sangue 10 a 150 ng/μl. As amostras negativas na LnPCR testadas com o gene endógeno IRBP mostraram-se positivas.

4.4.2 Reação em Cadeia de Polimerase e seqüenciamento.

Um total de 315 amostras provenientes de 80 animais foi analisado, sendo 80 fragmentos de pele, 78 fragmentos de medula, 78 amostras de sangue e 79 fragmentos de baço. A LnPCR identificou 17,46% (55/315) tecidos positivos com a seguinte distribuição: 2,53% (2/79) baço, 10% (8/80) pele de cauda, 26,92% (21/78) sangue e 30,76% (24/78) medula óssea (Figura 8). A taxa de animais com a presença de DNA de *Leishmania* foi de 36.25% (29/80).

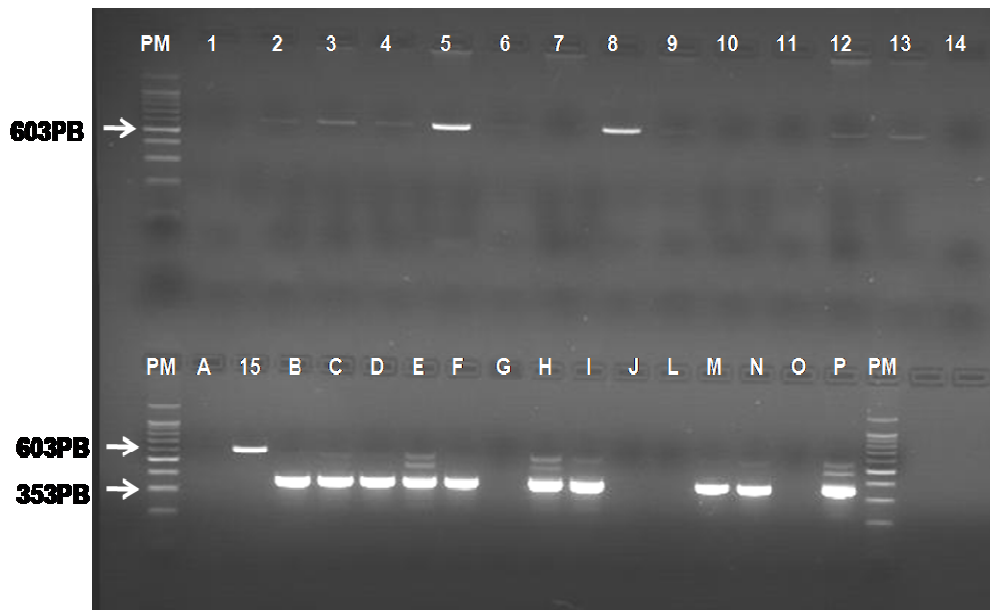


Figura 8. Gel de agarose 1% mostrando os produtos da LnPCR utilizando os iniciadores R221/R332 (603pb na 1° reação) e R223/R333 (353pb na 2° reação). PM: peso molecular de 100pb; de 1 a 15 primeira reação: 1, 10 e 14 controles negativos (sem DNA); 2 a 9 e 11: amostras de diferentes tecidos de *R. norvegicus*; 15 controle positivo (*L.chagasi*, 10ng/μl); de A até P, segunda reação, J e O controles negativos (sem DNA); B a I e L,M,N: amostras de diferentes tecidos de *R. Norvegicus*; P controle positivo (*L.chagasi*, 10ng/μl).

Dos 29 animais infectados a proporção de tecidos positivos por animal pode ser observada na figura 9.

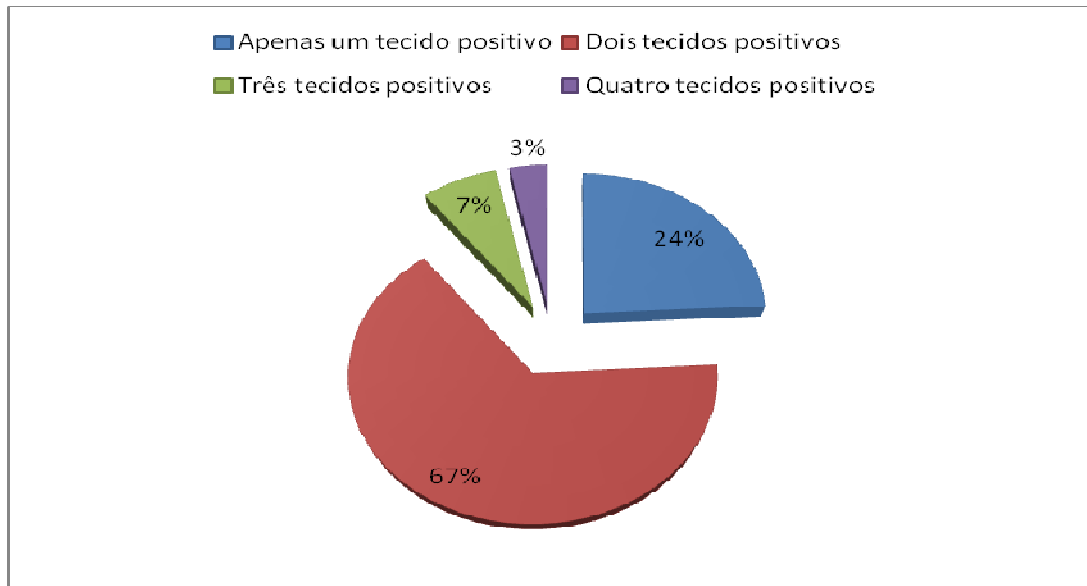


Figura 9. Número de tecidos positivos na LnPCR por animal infectado em *Rattus norvegicus*, Belo Horizonte, 2007/2008.

O teste Kappa apresentou uma concordância substancial (concordância bruta 90%; $K=0,74$) entre os resultados de sangue e medula. Comparando-se os outros tecidos, apenas uma ligeira concordância foi observada ($K=0$ a $0,09$). Características como gênero e faixa etária não influenciaram na taxa de positivos na LnPCR. A proporção entre PCR, EIE e IFI positivos foi significativamente diferente ($p<0,001$) e a diferença ocorreu

principalmente entre os valores de PCR e IFI.

A proporção de animais positivos na LnPCR foi significativamente superior ($p<0,001$) nas regiões da Lagoa da Pampulha, Venda Nova e Norte (tabela2). Conseqüentemente, o número de animais infectados em 2007 foi 46% (23/50) e em 2008, 6,66% (2/30). A diferença entre os animais positivos nos dois anos analisados foi significativa com valor de $X^2=17,95$ e $p<0,001$.

Tabela 2. Resultados da LnPCR para diagnóstico das leishmanioses em *Rattus norvegicus* capturados por Regional/Bairro em Belo Horizonte no período de 2007/2008.

REGIONAIS/BAIRRO	ANIMAIS CAPTURADOS	ANIMAIS POSITIVOS	FREQUÊNCIA POSITIVOS
PAMPULHA			
LAGOA DA PAMPULHA	19	15	78,94%
DONA CLARA	1	-	-
SUZANA	9	-	-
ST TEREZINHA	12	-	-
BRAÚNAS	7	-	-
CECÍLIA	7	-	-
HELIÓPOLIS	6	-	-
LIBERDADE	1	-	-
UNIVERSITÁRIO	5	2	40%
NORTE			
SÃO BERNARDO	3	3	100%
VENDA NOVA			
LEBLON	10	9	90%
TOTAL	80	29	36,25%

As amostras com bandas nítidas na segunda reação da LnPCR foram selecionadas, purificadas e submetidas ao seqüenciamento. A identificação foi realizada em 65,51% (19/29) dos animais positivos na LnPCR e todas identificadas como pertencentes ao complexo *Leishmania braziliensis*.

5 DISCUSSÃO

Os ciclos de transmissão das espécies de *Leishmania* podem envolver um grande número de espécies de mamíferos como reservatórios sendo que mais de 60 espécies parecem estar implicadas. Devido a esta complexidade pode ser difícil identificar todos os reservatórios envolvidos bem como identificar o papel de cada um deles no ciclo zoonótico das leishmanioses em uma área de transmissão. É sabido também que uma determinada espécie de mamífero pode se comportar como reservatório ou não dependendo das condições eco epidemiológicas da região. Com o processo de urbanização das leishmanioses este cenário se tornou ainda

mais complexo, pois os animais domésticos e sinantrópicos podem ser incorporados aos ciclos de transmissão.

O município de Belo Horizonte foi escolhido para a investigação devido às altas taxas de positividade humana e canina para LV e LT. Nos últimos anos o número de casos de LT vem apresentando picos importantes e este aumento pode ser devido à melhoria das técnicas diagnósticas (principalmente com uso da biologia molecular para caracterização), controle inadequado de reservatórios e associação da leishmaniose com doenças oportunistas (HIV/AIDS) (Molina et al., 2003). Em contraposição, Luz et al. (2001) analisando dentre outros pontos, a estrutura dos municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte em realizar o diagnóstico da LT, afirmam que o aumento do número de casos deve-se mais ao real aumento da doença do que melhoria no diagnóstico considerando ainda a precariedade do mesmo.

Apesar deste quadro preocupante da situação das leishmanioses em Belo

Horizonte existem poucos estudos acerca da investigação de possíveis reservatórios de *Leishmania*, principalmente de *Leishmania braziliensis*, principal agente etiológico da LT.

É sabido que as espécies de *Leishmania* que causam as diferentes formas da doença humana podem ser encontradas infectando várias espécies de mamíferos dentre eles roedores, canídeos e marsupiais.

A investigação sobre a infecção por *Leishmania* de roedores que circulam nas proximidades das residências humanas é uma questão importante, podendo contribuir para a compreensão da dinâmica de transmissão nos centros urbanos.

Durante os dois anos do estudo os *Rattus norvegicus* foram abundantes no peridomicílio apresentando, no entanto, uma discreta neofobia, dificultando em parte, a coleta dos mesmos. Em relação à isca oferecida nas armadilhas, ração destinada à alimentação de cães, foi eficiente em atrair os animais, o que pode sugerir a existência de compartilhamento de alimentos entre estes roedores e animais domésticos em ambiente peridomiciliar, estreitando assim o contato entre as espécies.

A ausência de culturas positivas pode ser explicada pela baixa sensibilidade da técnica e alto risco de contaminação, fatores já observados por outros autores. A espécie de *Leishmania* identificada nas técnicas moleculares também influencia no crescimento em meio de cultura onde a espécie *L. braziliensis* possui baixo crescimento (Noyes et al., 1998; Medeiros et al., 2002). A sensibilidade das técnicas de observação direta como histopatologia e cultura são diretamente proporcionais à carga parasitária presente nas estruturas, apontando a necessidade de técnicas mais sensíveis como a PCR para a detecção de infecção (Dias et al., 1977; Falqueto et al., 1986; Oliveira et al.; 2005; Fagundes et al., 2010).

Brandão-Filho et al.(2003) constataram a baixa sensibilidade das técnicas parasitológicas. De 81 pequenos mamíferos

naturalmente infectados, identificados no município de Amaraji (Pernambuco) por *Leishmania braziliensis*, apenas seis foi possível o isolamento e em 26 destes, visualização do parasito em lâmina.

Ferreira (2010) investigou a infecção de pequenos mamíferos por *Leishmania* na região Nordeste de Belo Horizonte e não observou formas amastigotas por aposição de tecidos em lâminas coradas com Giemsa dos animais infectados. O autor atribui os resultados negativos ao fato de ter sido detectado nesses roedores, pela técnica de RTQ-PCR, baixa carga parasitária, equivalente a menos de 10 parasitos por miligrama de tecido. Outro fato destacado pelo autor é o encontro de nove *R. norvegicus* infectados por *L.braziliensis*, dois apresentando lesão, embora ambos com exames parasitológicos negativos, corroborando com os resultados do presente estudo.

A maior parte dos animais coletados em 2007 é proveniente da Lagoa da Pampulha, Venda Nova e Norte, e em 2008 as coletas foram focadas em alguns bairros da Pampulha. A diferença nos locais de coleta não influenciou, no entanto, nas taxas de animais reativos sorologicamente, demonstrando a provável circulação do parasito nestes roedores em todas as regionais pesquisadas. Neiva, (2005) estudou a mesmas áreas de coleta e também encontrou *Rattus norvegicus* reativos na IFI e ELISA, com maior frequência em animais oriundos da Pampulha (29,3%).

Em relação à concordância entre as duas técnicas sorológicas, os valores encontrados foram extremamente baixos quando analisados títulos de IFI reativa 1:40. Com IFI reativa 1:160, a concordância com ELISA é superior, sugerindo que para este animal, o ponto de corte para a IFI possa não se equiparar ao estabelecido para cães. Por outro lado, a utilização de antígeno bruto (*L.major*) na IFI e antígeno recombinante (S7) no ELISA podem interferir no resultado das técnicas acarretando maior sensibilidade para a IFI e maior especificidade ao ELISA. Segundo

Costa et al. (2003), o uso de antígeno bruto para IFI e ELISA são altamente sensíveis, mas apresentam baixa especificidade.

Um fato observado entre as duas técnicas sorológicas é em relação ao número de reativos e faixa etária dos animais. A IFI apresentou um índice de animais reativos significativamente superior em adultos do que em jovens. Ao contrário, o ELISA não mostrou diferença de reatividade entre as faixas etárias. Portanto, para diagnóstico da infecção em animais jovens em *Rattus norvegicus*, o ELISA provavelmente é o método mais indicado.

Em outras regiões onde a leishmaniose é endêmica como continente africano, americano e europeu levantamentos sorológicos foram realizados para averiguar a participação de *R. norvegicus* na epidemiologia da doença, obtendo resultados positivos para *Leishmania* em muitos deles como nos Estados Unidos (seis animais reativos), no Egito (seis animais reativos), na Itália em 2003 (33% de reativos) e em 2010 na ilha de Chipre (5,6% reativos) (Gianini et al., 1985; Morsy et al., 1994; Psaroulaki et al., 2010). A característica comum observada nestes roedores é a ausência de lesões. Diferenças no ambiente, na espécie de *Leishmania* envolvida, no vetor e características intrínsecas do roedor além dos meios diagnósticos utilizados podem refletir nas diferenças de prevalência encontradas.

Corroborando com os achados de Ferreira et al. (2010), a aplicação da PCR com gene endógeno IRBP exclusivo de vertebrados foi ferramenta muito útil para testar a integridade do DNA utilizado nas reações de PCR. Cerca de 10% de cada tecido com resultado negativo na PCR foi aleatoriamente escolhido e submetido à IRBP e todos demonstraram a presença de banda específica, respaldando-se de reações não reativas devidas à degradação do DNA por extração ou armazenamento incorreto ou mesmo a presença de inibidores presentes nos extratos e tecidos.

Nos últimos 10 anos a técnica de PCR evoluiu muito e seu uso no diagnóstico

isolado ou em investigações epidemiológicas vem ganhando cada vez mais espaço no meio. Por se tratar de técnica altamente sensível e específica muito tem auxiliado na pesquisa de possíveis reservatórios não canídeos para as leishmanioses contribuindo assim para melhor entendimento do ciclo da doença (Brandão-filho et al., 2003; Oliveira et al., 2005; Papadogiannakis et al., 2009; Freitas, 2010; Ferreira, 2010; Roque et al., 2010; Motazedian et al., 2010).

A ausência de um padrão ouro com alta sensibilidade para o diagnóstico da leishmaniose pode interferir nas avaliações de sensibilidade e especificidade de uma técnica, no entanto a PCR é considerada por muitos autores como método de alta especificidade e sensibilidade podendo substituir com êxito metodologias de isolamento e cultura, e imunológicas como o teste de Montenegro aplicado na rotina diagnóstica de LT (Pirmez et al., 1999; Medeiros et al., 2002; Oliveira et al., 2003; Fagundes et al., 2010).

O grau de parasitismo durante uma infecção por *Leishmania* pode diferir entre os órgãos, portanto a identificação dos tecidos com maior número de parasitos é importante para melhorar a sensibilidade do diagnóstico. A concordância mais significativa observada entre os tecidos foi entre sangue e medula, tecidos que apresentaram maior taxa de infecção em comparação com fragmentos de pele (10%) e baço (2,53%). Corroborando com os resultados da presente pesquisa, Oliveira et al. (2005) observaram maior sensibilidade de amostras de sangue coletadas em eluato de papel filtro do que em fragmentos de pele para diagnosticar *Leishmania* sp. em roedores. A carga parasitária encontrada no sangue de roedores mostrou-se suficiente para detecção do parasito por meio da PCR, propiciando diagnóstico simples através de técnica pouco invasiva.

A detecção de fragmentos de medula óssea e baço positivos na PCR reafirma a capacidade de visceralização da *L. braziliensis*, fato este já reportado por outros autores (Nery-Guimarães et al., 1968;

Laison et al., 1981; Roque et al., 2010) enquanto que a observação de parasitismo na pele e sangue é fundamental para inferir uma possível infecção do vetor.

Dos animais positivos pela LnPCR, 93% (27/29) concentraram-se nas áreas da Lagoa da Pampulha, Venda Nova e Norte. No entanto, a sorologia detectou animais reativos em todos os bairros estudados da regional Pampulha. É importante destacar que a detecção do DNA de *Leishmania* é indicativa da presença da infecção, visto que a degradação do DNA e cinetoplasto ocorrem logo após a morte do parasito (Prina et al., 2007) e que a sorologia apenas aponta a indução de proteção pelo organismo após contato com o agente infeccioso mas não necessariamente infecção ativa. Portanto, pode-se inferir que nas áreas com PCR positiva além de sorologia reativa, provavelmente o ciclo de transmissão na *L. braziliensis* está bem consolidado, com a presença de animais mais propensos à instalação da infecção ao contrário das áreas com sorologia reativa somente.

Segundo Evans et al. (1990) os anticorpos anti *Leishmania* podem persistir de meses a anos, sendo observado em humanos sem sintomatologia ou em animais positivos e negativos na necropsia. Roque et al. (2010) observaram em *Thrichomys laurentius* infectados experimentalmente com *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi* que ambas infecções produzem resposta humoral com altos títulos na IFI e no ELISA detectável após três semanas e que mantiveram-se altos até o final da pesquisa, ao longo de doze meses pós-infecção.

Os testes sorológicos são preferencialmente aplicados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina e humana porque nestas patologias a produção de anticorpos é mais elevada. Contudo, diversos autores reportam a ocorrência de reações cruzadas entre as leishmanioses, outros tripanossomatídeos e micoplasmas, reações estas com títulos relativamente baixos, até 1:80 na IFI (Badaró et al., 1983; Mohammed et al., 1986; Reed et al., 1987; Yamamoto et al., 1988). Na presente pesquisa

observamos 14,28% das amostras com títulos iguais ou superiores à 1:160, indicando a possibilidade de produção de altos níveis de imunoglobulinas IgG por essa espécie de roedor, ao contrário do observado normalmente em cães e humanos infectados com *L. braziliensis*. Nos animais que foi possível a caracterização da infecção pela LnPCR além de sorologia reativa, é pouco provável que o diagnóstico sorológico esteja ligado à reação cruzada com outros patógenos.

A leishmaniose tegumentar é amplamente distribuída e envolve muitas espécies de *Leishmania* e uma variedade de vetores em uma epidemiologia complexa. No Brasil, os reservatórios para as leishmanioses têm sido estudados intensamente desde a década de 60 por vários pesquisadores, principalmente na região amazônica e estado do Ceará (Deane e Deane, 1956; Nery-Guimarães et al., 1968; Laison et al., 1981; Mello e Teixeira, 1984). Para *L. braziliensis* o reservatório primário ainda não é bem definido como para outras leishmanioses do subgênero *Viannia* (Shaw et al., 1988). Muitos trabalhos reforçam a hipótese de que o principal reservatório para *L. braziliensis* nas Américas são os roedores e gambás, tanto no meio silvestre quanto no meio urbano (Magalhães-Rocha et al., 1987; Rocha et al., 1988; Genaro et al., 1993; Vasconcelos et al., 1994; De-Lima et al., 2002; Brandão-Filho et al., 2003; Oliveira et al., 2005; Roque et al., 2010).

Com o intenso desmatamento, os vetores se adaptaram em áreas degradadas, urbanizadas e estão presentes no intra e peridomicílio. Segundo Bongiorno et al. (2003) as características de atratividade do flebótomo pelo reservatório é diretamente dependente do habitat de alimentação. Além disso, a urbanização da doença tem causado grandes mudanças na sua epidemiologia com alterações no perfil clássico de transmissão principalmente pela adaptação do parasito a novos vetores e hospedeiros (Dantas-torres et al., 2007). A presença de espécies vetorais para leishmaniose tegumentar como *Lu. whitmani* e *Lu. intermedia* tem sido reportada por alguns autores, no município de Belo

Horizonte (Sousa et al., 2004; Saraiva et al., 2010).

Muitos animais podem se infectar, se tornando reservatórios primários, secundários ou acidentais. A ocorrência de parasitas em cavalos e mulas, gatos, morcegos (Lampo et al., 2000; Souza, 2005; De Lima et al., 2008) é um indício da intensa adaptação do parasita no novo cenário desta zoonose. Grande parte destes animais apresenta lesões, característica que os define como hospedeiros acidentais dessa endemia.

Alguns autores assumem o cão bem como o homem, hospedeiros acidentais da leishmaniose tegumentar, em contrapartida, outros assinalam que o cão tem papel na transmissão, principalmente pelo seu íntimo contato com o homem e a relação de sua presença em áreas com casos humanos (Falqueto et al., 1986; Marzochi e Marzochi, 1994). O cão é susceptível à infecção por LT, desenvolvendo lesões características (Genaro et al., 1990), mas pode servir de atrativo juntamente com outros animais para o vetor. A capacidade do cão em infectar o flebótomo é outro objeto de pesquisa (Travi et al., 2006, Castro et al., 2007). O último estudo conduzido em área endêmica para leishmaniose tegumentar em Belo Horizonte por Ferreira (2010) detectou infecção de cães e pequenos mamíferos por *L.braziliensis* de forma significativa na regional Nordeste de Belo Horizonte em área urbana e sugeriu a participação destes no ciclo da LT e atentou para a presença comprovada do vetor *L.whitmani* na região estudada (Saraiva et al., 2010).

A capacidade dos *Rattus norvegicus* se infectarem com espécies de leishmanias dermatóricas foi relatada por Giannini (1985) por meio de infecção experimental de seis roedores com *L.major* e nove com *L.donovani*, onde apenas os infectados com *L.major* mostraram capacidade de manter a infecção por longos períodos. Motazedian et al. (2010) no Iran detectaram através de PCR taxa de infecção de 52% (30/57) em *R. norvegicus* por *L.major* com a presença do parasito em diferentes tecidos como pele de orelha, fígado e baço. Em 2009 na Grécia

Papadogiannakis et al. identificaram *Leishmania infantum* em 3,3% (1/16) de *Rattus norvegicus* através de PCR seguida de seqüenciamento e verificaram que a PCR convencional não foi capaz de revelar a infecção, somente detectada quando empregada a Nested PCR. Estes resultados levaram os autores a inferir que o animal apresentava baixa carga parasitária e uma possível resistência a espécies viscerotrópicas. No presente estudo foi identificada apenas a infecção de *R. norvegicus* por *L.braziliensis* em área onde ocorrem simultaneamente a leishmaniose tegumentar e a visceral, sugerindo que *Rattus norvegicus* como outras espécies de roedores estão mais relacionadas ao ciclo das espécies dermatóricas.

Segundo Wollinska e King (2009), a partir de uma abordagem genética sobre resistência e susceptibilidade, acreditam que o ambiente pode alterar a força de seleção. Por conseguinte, uma espécie pode exercer em um determinado momento um papel importante dependendo da pressão exercida pelo meio, não existindo espécies reservatórios e sim espécies que mantêm um ciclo de transmissão em determinadas situações.

As regiões com roedores positivos na LnPCR apresentam ecótopo favorável ao ciclo das leishmanioses. Em Venda Nova (bairro Leblon) e na região Norte (bairro São Bernardo), a principal característica observável é o intenso acúmulo de lixo, nas margens de um esgoto a céu aberto nas proximidades das casas, com fluxo constante da população local além da presença de cães. A regional Pampulha é considerada uma área nobre do município, com uma população menos vulnerável às leishmanioses, no entanto, com notificação de casos humanos ao longo dos últimos anos. A Lagoa da Pampulha possui um ambiente diversificado com intenso fluxo de pessoas e de cães que normalmente acompanham seus donos nas caminhadas pela manhã e final da tarde, promiscuidade entre diferentes espécies animais como aves e capivaras e intensa matéria orgânica. O roedor *Rattus norvegicus* é de fácil observação nas margens da lagoa,

principalmente ao entardecer, horário também de maior densidade vetorial (Alexander et al., 1998; Peterson e Shaw, 2003).

Os resultados alcançados na pesquisa aliados aos dados epidemiológicos sobre casos humanos de leishmaniose tegumentar em Belo Horizonte suportam a hipótese de que existe um ciclo ativo de transmissão da LT no meio urbano, sendo que é de absoluta relevância destacar a possibilidade de estes roedores estarem atuando como reservatórios circunstanciais para a *Leishmania braziliensis* em determinadas áreas da cidade.

Algumas características necessárias para incriminar um animal como reservatório segundo Ashford (1996) podem ser destacadas em *Rattus norvegicus* como: são espécies agregadas, abundantes e possuem

vida longa suficiente para manter o agente infeccioso (média vida de 24 meses). Além disso, não apresentaram sintomas característicos para leishmaniose tegumentar e observou-se alta taxa de exemplares infectados albergando a mesma espécie de *Leishmania* presente na área endêmica estudada (*L. braziliensis*). A observação de parasitismo no sangue e pele dos animais, tecidos vias de infecção do vetor, também são resultados relevantes da pesquisa. Outros fatores importantes neste contexto e que precisam ser investigados são a capacidade destes animais infectados de servirem como fontes de infecção para o vetor e o estudo da variabilidade genética do parasito envolvido na infecção dos vetores, do homem e dos roedores.

Considerando os resultados obtidos neste estudo e face ao comportamento da doença no meio urbano, onde o contexto ambiental é constantemente modificado, a continuidade de pesquisas voltadas ao conhecimento da participação de *R. norvegicus* no ciclo de transmissão das leishmanioses se fazem necessárias.

A manutenção de programas de controle populacional de roedores e a educação em saúde são medidas importantes visto o potencial zoonótico destes animais para as leishmanioses como também para outras enfermidades como as leptospiroses, sabidamente ligadas à epidemias em ambiente urbanizado.

6. CONCLUSÕES

1. Os resultados obtidos na pesquisa demonstram que a espécie de roedor *Rattus norvegicus* é hospedeira de *Leishmania braziliensis* em algumas áreas de Belo Horizonte.

2. O encontro de *Leishmania braziliensis* em *Rattus norvegicus* em áreas com casos humanos de leishmaniose tegumentar sugere a participação destes roedores no ciclo, seja na infecção direta do vetor, como atrativo alimentar do flebótomo para áreas vulneráveis ou mantendo o parasita no ambiente, fatores estes que necessitam de maiores investigações para serem determinados.

3. Muitos animais infectados com *Leishmania* sp. apresentaram altos títulos sorológicos demonstrados pelas técnicas sorológicas IFI e ELISA.

4. Os métodos parasitológicos de isolamento em meio de cultura e exame de lâminas com aposição de tecidos não se revelaram sensíveis para diagnosticar a infecção por *Leishmania* em *R. norvegicus* no estudo.

5. Provavelmente no *R. norvegicus*, sangue e medula óssea são os órgãos com maior carga parasitária para *L. braziliensis*.

6. Como um reservatório primário ou mesmo secundário para *L. braziliensis* no meio urbano ainda não foi incriminado e casos humanos são notificados periodicamente, é necessário determinar os fatores epidemiológicos relevantes para a ocorrência da doença.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, B.; LOZANO, C.; BARKER, D.C.; McCANN; ADLER, G.H. Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. *Acta Trop.*, v.69, n.1, p.41-50, 1998.
- ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemiologia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad. Saúde Pública*, v.20, n.1, p.259-265, 2004.
- AKHAVAN, A.A.; MIRHENDI, H.; KHAMESIPOUR, A. et al. Leishmania species: Detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. *Exp. Parasitol.*, v. 126, n.4, p.552-556, 2010.
- ARAÚJO FILHO, N.A. *Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana na Ilha Grande, Rio de Janeiro: estudos sobre a infecção humana, reservatórios e transmissores*. 1978. 148f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Rio de Janeiro.
- ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.*, v.14, n.5, p.523-532, 1996.
- ÁVILA-PIRES, F.D. Zoonoses: hospedeiros e reservatórios. *Cad. Saúde Pública*, v.5, n.1, p. 82 -97, 1989.
- AZAB, M.E.; RIFAAT, M.A.; SCHNUR, L.F. et al. Canine and rodent leishmanial isolates from Egypt. *Trans. Roy. Soc. Hyg.*, v.78, n.2, p.263-264, 1984.
- BADARÓ, R.; REED, S.G.; CARVALHO, E.M. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.32, n.3, p.480-484, 1983.
- BEVILACQUA, P. D.; PAIXÃO, H. H.; MODENA, C. M.; CASTRO, M. C. P. S. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte, *Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.* v. 53, n.1, p.1-8, 2001.
- BONGIORNO, G.; HABLUTZEL, A.; KHOURY, C.; MAROLI, M. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Act. Trop.*, v.88, n. 2, p.109-116, 2003.
- BRANDÃO-FILHO, S.P.; BRITO, M.E.; CARVALHO, F.G. et al. Wild and synanthropic host of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.97, n.3, p.291-296, 2003.
- BONVICINO, C.R.; OLIVEIRA, J.A. *Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos*. Mendeley, Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008. 120p.
- CASTRO, E.A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; AUGUR, C.; LUZ, E. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the state of Paraná (Brazil). *Exp. Parasitol.*, v.117, n.1, p.13-21, 2007.
- CRUZ, L.; CAÑAVATE, C.; RUBIO, J.M. et al. A nested polymerase chain reaction (L-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.96, n.1, p.185-189, 2002.
- CRUZ, L.; CHICHARRO, C.; NIETO, J. et al. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric mediterranean visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, v.44, n.7, p.2343-2347, 2006.
- DANTAS TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet. Parasitol.*, v.149, n.3-4, p. 139-146, 2007.

- DEANE, L.M. *Leishmaniose visceral no Brasil*. Estudos sobre reservatórios e transmissores no Estado do Ceará. 1956. 161f. Tese (Doutorado)- Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro.
- DE-LIMA H.; GUGLIELMO, Z.; RODRÍGUEZ, A. et al. Cotton Rats (*Sigmodon hispidus*) and Black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania spp.* In Lara state, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.97, n.2, p.169-174, 2002.
- DE-LIMA, H.; RODRÍGUEZ, N.; BARRIOS, M.A. et al. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.103, n.4, p.412-414, 2008.
- DIAS, M.; MAYRINK, W.; DEANE, L.M. et al. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana. I-Estudo de reservatórios em área endêmica no Estado de Minas Gerais. *Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo*, v.19, n.6, p.403-410, 1977.
- DIAS, F.O.P.; LOROSA, E.S.; REBÊLO, J.M.M. Fonte alimentar sangüinea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad. Saúde Pública*, v.19, n.5, p.1373-1380, 2003.
- DI BELLA, C.; VITALE, F.; RUSSO, G. et al. Are rodents a potencial reservoir for *Leishmania infantum* in Italy? *J. Mt. Ecol.*, v.7, suppl., p.125-129, 2003.
- DUJARDIN, J.C.; CAMPINO, L.; CAÑAVATE, C. et al. Spread of vector-borne diseases and neglected leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis.*, v.14, n.7, p. 1013-1018, 2008.
- EVANS, T.G.; VASCONCELOS, I.A.B.; LIMA, J.W. et al. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assement of serodiagnostic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.42, n.2, p.118-123, 1990.
- FAGUNDES, A.; SCHBACH, A.; DE PAULA, C.C. et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.105, n.1, p.109-112, 2010.
- FALQUETO, A.; COURA, J.R.; BARROS, G.C. et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.81, n.2, p.155-163, 1986.
- FERNÁNDEZ-PÉREZ, F.J.; MÉNDEZ, S.; FUENTE, C de LA et al. Short report: improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.61, n.4, p.652-653, 1999.
- FERREIRA, E.C. *Estudo dos hospedeiros de Leishmania em área de ocorrência das leishmanioses no município de Belo Horizonte, MG, Brasil*. 2010. 131f. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Centro de pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FERREIRA, E.C.; GONTIJO, C.M.; CRUZ, I. et al. Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in areas endemic for leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 105, n.7, p. 895-898, 2010.
- FREITAS, T.P.T. *A ecoepidemiologia das leishmanioses: levantamento de flebotomíneos em Cuiabá e investigação quanto a participação de roedores e marsupiais em Rondonópolis, Mato Grosso*. 2010. 104f. Dissertação (mestrado em Ciências veterinárias)- Faculdade de agronomia e medicina veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá.
- GENARO, O.; COSTA, C. A.; WILLIAMS, P. et al. Ocorrência de calazar em área urbana da grande Belo Horizonte, MG. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.23, n.2, p.121, 1990.

- GENARO, O.; HERMETO, M.V.; CHAVES, K. M. et al. Eco-epidemiological aspects of the leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Brasil. Research and Control of Leishmaniasis in Brazil, Recife. *Proceedings of a National Workshop*. FIO CRUZ/CpqAM, p.67-81, 1993.
- GIANNINI, S. H. Induction and detection of leishmanial infections in *Rattus norvegicus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.79, n.4, p.458-461, 1985.
- GRIMALDI, G. JR; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol.*, v.6, n.3, p.230-250, 1993.
- GUEDES, ACM; CUCÉ, L.C.; FURTADO, T. Avaliação imunológica e histopatológica da Reação de Montenegro. *An. Bras. Dermatol.*, v.65, n. 5a (supl), p. 34S-40S, 1990.
- CENSO demográfico, 2000. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/seculoxxestatisticaspopulacionais.shtm>. Acesso em: 23 agost. 2010.
- CLIMATOLOGIA. Instituto Nacional de Meteorologia- INMET, 2006. Disponível em: < www.inmet.gov.br >. Acesso em: 01 set. 2006.
- LAINSON, R., SHAW, J.J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: LUMSDEN, WHR, Evans DA. ed.-*Biology of the Kinetoplastida*. London: Academic Press, 1979, v.2, p.1-116.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J.; READY, P.D. et al. Leishmaniasis in Brazil: XVI Isolation and identification of leishmania species from sand flies, wild mammals and man in north Pará State with particular reference to *L.braziliensis guyanensis* causative agent of "pian bois". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.75, n.4, p.530-536, 1981.
- LAINSON, R.; SHAW, J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W.; Killick Kendrick R. (eds). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press, 1987, p.1-120.
- LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amaz Saude* , v.1, n.2, p. 13-32, 2010.
- LAMPO, M.; FELICIANGELI, M.D.; MÁRQUEZ, L.M. et al. A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.62, n.6, p.718-719, 2000.
- LOPES, U.G.; MOMEM, H.; GRIMALDI, Jr.G. et al. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J.Parasitol*, v.70, n.1, p.89-98, 1984.
- LUZ, Z. M.P.; PIMENTA, D.N.; CABRAL, A.L.L.V. et al. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.34, n.3, p.249-254, 2001.
- MAGALHÃES-ROCHA, N. M.; MELO, M.N.; BABÁ, E. H. et al. Isoenzymatic characterization of *Leishmania* isolated from six rodents captured in the Rio Doce Valley, M.G. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.82 p.95, 1987.
- MARZOCHI, M.C.A. e MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil-Emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. *Cad. Saúde Pública*, v.10, p.359-375, 1994.
- MEDEIROS, A.C.R.; RODRIGUES, S.S.; ROSELINO, A.M.F. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of leishmania for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. M. Biol. Res.*, v.35, n.4, p.421-424, 2002.

- MEDEIROS, A.R.; SILVA, Jr. W.A.; ROSELINO, A.M. DNA sequencing confirms the involvement of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in American tegumentary leishmaniasis in the state of São Paulo, *Braz. Clin.*, v.63, n.4, p.451-456, 2008.
- MELLO, D. A.; TEIXEIRA, M. L. Infecção experimental de *Calomys callosus* (rodentia- cricetidae) com *Leishmania donovani chagasi* (Laison, 1982). *Rev. Saúde Pública*, v.18, n.4, p.337-341, 1984.
- ATLAS de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnósticos clínico e diferencial, Brasília: Ministério da Saúde, 2006, 136p.
- MOLINA, R.; GRADONI, L.; ALVAR, J. HIV and the transmission of *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitol*, v.97, n.1, p.29-45, 2003.
- MOHAMMED, E.A.E.R.; WRIGHT, E.P.; ABDEL RAHMAN, A.M. et al. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect haemagglutination. *Tran. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.80, n.2, p.271-274, 1986.
- MOREIRA, J. Existe na Bahia o botão de Biskra?: estudo clínico. *Gazeta Médica da Bahia*, v.26, p. 254-258, 1895.
- MORSY, T.A.; SHAZLY, A.M.; KADY, G.A. et al. Natural *Leishmania* infections in two stray dogs and two *Gerbillus pyramidum* in Dakahlia Governorate, *Egypt. Journ. Egypt Soc. Parasitol*, v.24, n.2, p.383-394, 1994.
- MOTAZEDIAN, M.H.; PARHIZKARI, M.; MEHRABANI, D. et al. First detection of *Leishmania major* in *Rattus norvegicus* from Fars Province, Southern Iran. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, v.10, n.10, p.969-975, 2010.
- NEIVA, H. M. *Frequência de Anticorpos de Leishmania sp em Rattus norvegicus no município de Belo Horizonte, Minas Gerais*. 2005. 45f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- NERY-GUIMARÃES, F.; AZEVEDO, M.; DAMASCENO, R. Leishmaniose tegumentar- zoonose de roedores silvestres na Amazônia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.66, n.2, p.151-168, 1968.
- NOYES, H.A.; REYBURN, H.; WENDY BAILEY, J.; SMITH, D. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J. Clin. Microbiol.*, v.36, n.10, p.2877-2881, 1998.
- OLIVEIRA, C.I.; BÁFICA, A.; OLIVEIRA, F.; FAVALI, C.B.F. et al. Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of american cutaneous leishmaniasis. *Clin. Inf. Diseases*, v.37, n.11, p.149-153, 2003.
- OLIVEIRA, F. S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M. Q. et al. PCR- based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic área of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 129, n.3-4, p.219-227, 2005.
- OMRAN, F.O.; OSKAM, L.; ZIJLSTRA, E.E. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiology*, v.35, n.10, p.2454-2457, 1997.
- PAPADOGIANNAKIS, E.; SPANAKOS, G.; KONTOS, V. et al. Molecular Detection of *Leishmania infantum* in wild rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. *Zoonosis and Public Health*, v57, n.7-8, p.23-25, 2009.
- PASSOS, V.M.A.; FALCÃO, A.L.; KATZ, N. Urban American Cutaneous Leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.85, n.2, p.243-244, 1990.
- PASSOS, V. M. A.; FALCÃO A. L.; MARZOCHI, M. C. A. et al. Epidemiological aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.88, n.1, p. 103-110, 1993.

- PASSOS, V.M.A.; FERNANDES, O.; LACERDA, P.A.F. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the state of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Trop.*, v.72, n.3, p.251-258, 1999.
- PETERSON, A.T.; SHAW, J. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate effects. *Int. J. Parasitol.*, v.33, n.9, p.919-931, 2003.
- PIRMEZ, C.; DA SILVA TRAJANO, V.; OLIVEIRA NETO, M.P. et al. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J.Clin. Microbiol.*, v.37, n.6, p.1819-1823, 1999.
- PRINA, E.; ROUX, E.; MATTEI, D.; MILON, G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death; an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes. Infect.*, v.9, n.11, p.1307-1315, 2007.
- PSAROULAKI, A.; ANTONIOU, M.; TOUMAZOS, P. et al. Rats as indicators of presence and dispersal of six zoonotic microbial agents in Cyprus, an island ecosystem: a seroepidemiological study. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.104, n.11, p.733-739, 2010.
- QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir host and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitol.*, v.136, n.14, p.1915-1934, 2009.
- REBÊLO, J. M. M.; ARAÚJO, J. C.; CARVALHO, M. L. Flebotomos (*Lutzomyia*, *Phlebotominae*) da Ilha de São Luís, zona do Golfão Maranhense, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.32, n.3, p.247-253, 1999.
- REED, S.G.; BADARÓ, R.; LOYD, R.M.C. Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani chagasi* by human infection sera. *J. Immunol.*, v.138, n.5, p.1596-1601, 1987.
- ROCHA, N.M.; MELO, M.N.; BABÁ, E.H.; DIAS, M.; MICHALICK, M.S.; DA COSTA, C.A.; WILLIAMS, P.; MAYRINK, W. *Leishmania braziliensis braziliensis* isolated from *Akodon arviculoides* captured in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.82, n.1, p.68, 1988.
- ROQUE, A.L.R.; CUPOLILO, E.; MARCHEVSKY, R.S.; JANSEN, A.M. *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: patterns of experimental infection. *Negl. Trop. Dis.*, v.4, n.2, p.589, 2010.
- SARAIVA, L.; ANDRADE FILHO, J.D.; SILVA, S.O. et al. Molecular detection of *Leishmania* sp. In sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from an endemic area of leishmaniasis in Belo Horizonte city, Minas Gerais State- Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.105, n.8, 2010.
- SCHÖONIAN, G.; NASCREDDIN, A.; DINSE, N. et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v.47, n.1, p.349-358, 2003.
- SHAW, J.J. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.83, n.1, p.486-490, 1988.
- SHLOMAI J. The assembly of kinetoplast DNA. *Parasitol Today*, v.10, n.9, p.341-346, 1994.
- SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends in Parasitol.*, v.21, n.12, p.550, 2005.
- GRANDES Regiões Federadas, 2001 a 2010. Sistema de informação de agravos de notificações, SINAN/SVS/MG. Disponível em <<http://portal2.saude.gov.br>> Acesso em: 10 dez. 2010.

- 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. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.99, n.8, p.795-803, 2004.
- SOUZA, A.L. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.128,n.1, p.41-45, 2005.
- SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, v.9, n.5, p.951-958, 2002.
- TRAVI, B.L.; TABARES, C.J.; CADENA, H. *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in two Colombian dogs: a note on infectivity for sand flies and response to treatment. *Biomedica*, v.26, n.1, p.249-253, 2006.
- VAN EYS, G.J.; SCHOONE, G.J.; KROON, N.C.; EBELING, S.B. Sequences analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.51, n.1, p.133-142, 1992.
- VAN WYNSBERGHE, N.R.; CANTO-LARA, S.B.; SOSA-BIBIANO, E.I. et al. Comparison of small mammal prevalence of *Leishmania (Leishmania) Mexicana* in five foci of cutaneous leishmaniasis in the state of Campeche, Mexico. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.51, n.2, p.87-94, 2009.
- VASCONCELOS, I.A.B.; VASCONCELOS, A.W.; FE FILHO, N.M et al. The identify of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturite, northeastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.50, n.2, p.158-164, 1994.
- VOLPINI, A. C.; PASSOS, V. M.; OLIVEIRA, G. C.; ROMANHA, A. J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (leish) amazonensis* causing American Cutaneous Leishmaniasis. *Acta Trop.* v.90, n.1, p.31-37,2004.
- YAMAMOTO, Y.I.; NUNES, V.L.B.; JUNIOR, F.A.R. et al. Estudo da eficiência das reações de imunofluorescência e de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, v.25, n.1, p.143-152, 1988.
- YOUNG, C. W.; HERTIG, M.; PAO YUNG, L. The Kala-azar transmission problem: field and laboratory studies in China. II. Susceptibility of various rodents to infects with *Leishmania donovani*. *Am. J. Hyg.*, v.10, n.1, p.183-200, 1929.
- WHITFIELD, P. J. *The biology of parasitism: an introduction to the study of associating organism*. London, Edward Arnold, 1979, 277p.
- WOLINSKA, J.; KING, K.C. Environment can alter selection in host-parasite interactions. *Trends. Parasitol.*, v.25,n.5,p.236-244, 2009.
- VECTOR control series: rodents. Training and information guide. Geneva: WHO, 1987. 107p.
- CONTROL of the *Leishmaniasis*. Geneva: WHO, 1990, 158p.