

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Saúde Pública

Maria Sandra Andrade

**CARACTERIZAÇÃO DA INFECCIOSIDADE
DE PEQUENOS ROEDORES SILVESTRES
E SINANTRÓPICOS PARA INCRIMINAÇÃO
DE HOSPEDEIROS RESERVATÓRIOS DE
*Leishmania (Viannia) braziliensis***

RECIFE
2010

MARIA SANDRA ANDRADE

Caracterização da infecciosidade de pequenos roedores silvestres e sinantrópicos para incriminação de hospedeiros reservatórios de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de doutora em Ciências.

Orientador: Dr. Sinval Pinto Brandão Filho, PhD

RECIFE
2010

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

A553c Andrade, Maria Sandra.
Caracterização da infecciosidade de pequenos roedores silvestres e sinantrópicos para incriminação de hospedeiros reservatórios de *Leishmania (Viannia) braziliensis* / Maria Sandra Andrade. — Recife: M. S. Andrade, 2010.
117 f. : il., tab., mapas.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) — Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

Orientador: Sinval Pinto Brandão Filho.

1. Leishmaniose cutânea - epidemiologia. 2. *Leishmania braziliensis* – parasitologia 3. Reservatórios de doenças 4. Ecoepidemiologia. I. Brandão Filho, Sinval Pinto. II. Título.

CDU 616.993.161

MARIA SANDRA ANDRADE

CARACTERIZAÇÃO DA INFECCIOSIDADE DE PEQUENOS ROEDORES SILVESTRES E SINANTRÓPICOS PARA INCRIMINAÇÃO DE HOSPEDEIROS RESERVATÓRIOS DE *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de doutora em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sinval Pinto Brandão Filho
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dra. Milena Paiva Cavalcanti
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Jeffrey Jon Shaw
Universidade de São Paulo

*Dedico este trabalho a minha Família,
em especial a Josivaldo, Matheus, Arthur.*

*Aos meus pais, Clímério e Terezinha, que
apesar das dificuldades sempre priorizaram
para seus filhos o acesso a uma educação de qualidade.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho inicia-se em 2002 com a proposta de desenvolver um projeto em epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti com o objetivo de concorrer a uma vaga no programa de Mestrado em Saúde Pública no CPqAM/FIOCRUZ. Durante esse período, várias pessoas contribuíram de forma decisiva nesta jornada que teve como resultados a dissertação de Mestrado, cinco artigos publicados e esta tese de doutorado. Registro o meu agradecimento a todos os que tornaram estes oito anos de convivência inesquecíveis e em especial:

Dr. Sinval Pinto Brandão Filho, pela amizade, disponibilidade, competência e o compromisso com o projeto desde o início.

Maria Edileuza Felinto de Brito, que contribuiu de forma decisiva na minha formação, pela disponibilidade, competência, generosidade e amizade.

Francisco Gomes, pela imensa e dedicada contribuição no trabalho com os animais silvestres.

Silvia Carvalho, pela amizade e valiosa contribuição na otimização da PCR.

Fábia Soares, pelo carinho e auxílio indispensável na realização das PCR.

Pietra Lemos, pela amizade e valorosa contribuição no estabelecimento da colônia de flebotomíneos.

Aos colegas, Hélio, Assis, Hamilton e Fernando, pelo apoio indispensável no trabalho de campo.

Aos colegas do laboratório: Éricka, Hélio, Ana Waléria, Inês, Bruna, Júnior e Isabella pela colaboração prestada em diferentes e importantes momentos.

Ao Gen Lucena, pelo apoio na realização deste projeto acadêmico.

As colegas da UPE, Beatriz e Miriam, pelo apoio, ajuda e incentivo.

Aos Amigos do HMAR, Ana Garcia, Lúcia e Rostache, pela ajuda nos “momentos de dificuldades” são nestas horas que reconhecemos os verdadeiros amigos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	<i>Rattus rattus</i> , roedor sinantrópico utilizado como animal experimental.	39
Figura 2 -	<i>Necromys lasiurus</i> , roedor silvestre utilizado como animal experimental.	40
Figura 3 -	<i>Nectomys squamipe</i> , roedor silvestre utilizado como animal experimental.	40
Figura 4 -	Mapa geográfico com a localização dos Municípios de Paudalho e Amaraji na Zona da Mata de Pernambuco.	42
Figura 5 –	Vista panorâmica do Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti, Paudalho, Recife, Pernambuco.	43
Figura 6 –	Sede do Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti.	43
Figura 7 –	Habitações típicas da localidade de Refrigério, Amaraji, Pernambuco.	44
Figura 8 –	Vista panorâmica da localidade de Refrigério, Amaraji, Pernambuco.	44
Figura 9 –	Modelo de armadilha tipo Tomahawk utilizada para capturas de pequenos roedores silvestres e sinantrópicos.	46
Figura 10 –	Modelo de pote plástico utilizado para manter os flebotomíneos após a realização do repasto sanguíneo.	49
Figura 11 –	Técnica de inoculação da cultura de <i>L. (V.) braziliensis</i> nos animais experimentais.	51
Figura 12 –	Técnica de anestesia dos animais experimentais.	52
Figura 13 –	Animal anestesiado em gaiola para realização do xenodiagnóstico.	53

- Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose corado pelo brometo de etídio, mostrando produtos amplificados a partir de primers específicos para o subgênero *Viannia*. Produtos de amplificação da PCR com os iniciadores B1/B2: 1 – Marcador de peso molecular 2 – Controle negativo, 3 – Controle positivo, 4 e 6 – amostra positiva de *Necromys lasiurus*, 7- amostra positiva de *Nectomys squamipes*, animais do primeiro experimento. 60
- Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose corado pelo brometo de etídio, mostrando produtos amplificados a partir de primers específicos para o subgênero *Viannia*. Produtos de amplificação da PCR com os iniciadores B1/B2: 1 – Marcador de peso molecular, 2 – Controle negativo, 3 – Controle positivo, 7 – amostra positiva de *L. longipalpis* após xenodiagnóstico, em *Necromys lasiurus*, animal do primeiro experimento. 64
- Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose corado pelo brometo de etídio, mostrando produtos amplificados a partir de primers específicos para o subgênero *Viannia*. Produtos de amplificação da PCR com os iniciadores B1/B2: 1 – Marcador de peso molecular, 2 – Controle negativo, 3 – Controle positivo, 4 – amostra positiva de *Nectomys squamipes*, 7- amostra positiva de *Necromys lasiurus*, 9 – Amostra positiva de *Rattus rattus*, animais do segundo experimento. 66
- Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose corado pelo brometo de etídio, mostrando produtos amplificados a partir de primers específicos para o subgênero *Viannia*. Produtos de amplificação da PCR com os iniciadores B1/B2: 1 – Marcador de peso molecular, 2 – Controle negativo, 3 – Controle positivo, 4 e 8 – amostras positivas de *L. longipalpis* após xenodiagnóstico em *Necromys lasiurus* e *Rattus rattus*, animais do segundo experimento. 68
- Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose corado pelo brometo de etídio, mostrando produtos amplificados a partir de primers específicos para o subgênero *Viannia*. Produtos de amplificação da PCR com os iniciadores B1/B2: 1 – Marcador de peso molecular, 2 – Controle negativo, 3 – Controle positivo, 6 – amostra positiva de *L. longipalpis* após xenodiagnóstico em *Nectomys squamipes*, animal do primeiro experimento. 69

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Distribuição dos animais silvestres e sinantrópicos, segundo espécie e sexo, capturados no Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti, Paudalho, Recife, Pernambuco, 2007 – 2009. 58
- Tabela 2 – Distribuição das espécies de roedores silvestres e sinantrópicos coletados no Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti, Paudalho, Recife, Pernambuco, segundo a positividade de amostras de baço, fígado e pele no teste de PCR e microscopia óptica, 2007 – 2009. 59
- Tabela 3 – Distribuição dos animais submetidos ao primeiro ensaio de infecciosidade segundo a positividade da pesquisa de formas promastigotas analisados em microscopia óptica dos flebotomíneos dissecados. 62
- Tabela 4 - Resultados do xenodiagnóstico, do primeiro experimento, utilizando *L. longipalpis* realizado em *Necromys lasiurus*, *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus* colonizados em laboratório e infectados com *L. (V.) braziliensis* na concentração de $5,5 \times 10^6$ /ml 63
- Tabela 5 – Distribuição dos animais submetidos ao segundo ensaio de infecciosidade segundo a positividade da pesquisa de formas promastigotas analisados em microscopia óptica após a dissecação dos flebotomíneos. 65
- Tabela 6 - Resultados do xenodiagnóstico, do segundo experimento, utilizando *L. longipalpis* realizado em *Necromys lasiurus*, *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus* colonizados em laboratório e infectados com *L. (V.) braziliensis* na concentração de $2,8 \times 10^5$ /ml. 67
- Tabela 7 - Caracterização de *Leishmania* spp. através de isoenzimas e anticorpos monoclonais das amostras isoladas de pacientes com LTA que realizaram treinamento no CIMNC, Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. 70

LISTA DE ABREVIATURAS

CIMNC –	Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti
CEUA –	Comissão de Ética para o Uso de Animais
DNA –	Ácido desoxirribonucléico
ELISA –	Enzyme linked immunosorbent assay
IDRM –	Intradermoreação de Montenegro
LT -	Leishmaniose Tegumentar
LTA –	Leishmaniose Tegumentar Americana
LACENs –	Laboratório Centrais de Endemias
NA 3 –	Nível de Biossegurança Animal 3
PCR –	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
RIFI –	Reação de Imunofluorescência Indireta
SSSR –	Seção de Serviço de Saúde Regional

ANDRADE, Maria Sandra. **Caracterização da infecciosidade de pequenos roedores silvestres e sinantrópicos para incriminação de hospedeiros reservatórios de *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2010. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

RESUMO

A história natural da leishmaniose tegumentar americana apresenta poucos estudos relacionados ao conhecimento dos reservatórios associados à *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Com o objetivo de caracterizar a infecciosidade experimental de *Necromys lasiurus*, *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus*, para incriminação de hospedeiros reservatórios de *L. (V.) braziliensis*, foram realizados dois experimentos, utilizando *Lutzomyia longipalpis* e dez animais de cada espécie, ambos colonizados em laboratório. Como grupo controle foi utilizado dois hamsters (*Mesocricetus auratus*) para cada grupo de dez animais. No primeiro experimento, os animais foram inoculados com $5,5 \times 10^6$ /ml de promastigotas de fase log de *L. (V.) braziliensis* e o segundo com um inóculo de $2,8 \times 10^5$ /ml, para posterior realização de xenodiagnóstico. Amostras obtidas de sangue, pele, fígado e baço dos animais e exemplares de flebotomíneos foram processadas para a visualização do parasito, através do exame direto e detecção de DNA por meio de PCR específica para o subgênero *Viannia*. No primeiro experimento, 570 exemplares de fêmeas foram submetidos ao xenodiagnóstico e dentre estes, 338 foram dissecados e observados formas compatíveis com promastigotas em 7,7%. Dos 26 animais, 06 apresentaram resultados positivos de infectividade no teste de PCR e 08 exemplares de flebotomíneos foram positivos. No segundo experimento, 678 fêmeas foram submetidas ao xenodiagnóstico e 467 dissecadas. No exame direto, 37,3% foram positivas. Foi verificada a positividade no teste de PCR em 15, dos 29 animais submetidos ao xenodiagnóstico. 27 exemplares de flebotomíneos foram positivos na PCR específica. Estes resultados sugerem que os roedores silvestre *N. lasiurus*, *N. squamipes* e o sinantrópico *R. rattus* são infectivos e prováveis hospedeiros reservatórios de *L. (V.) braziliensis*.

Palavras chaves: Leishmaniose Cutânea. *Leishmania braziliensis*. Reservatórios de doenças. Ecoepidemiologia.

ANDRADE, Maria Sandra. **Characterization of infectivity of wild rodents and synanthropic for prosecution of reservoir hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2010. Thesis (Doctorate in Public Health) - Research Center Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

ABSTRACT

The natural history of American tegumentary leishmaniasis has few studies related to the knowledge of reservoirs associated to *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Aiming to characterize the experimental infectivity of *Necromys lasiurus*, *Nectomys squamipes* and *Rattus rattus*, for prosecution of reservoir hosts of *L. (V.) braziliensis*, two experiments were conducted, using *Lutzomyia longipalpis* and ten animals of each species, both colonized in laboratory. Two hamsters were used as control group (*Mesocricetus auratus*) for each group of ten animals. In the first experiment, the animals were inoculated with 5.5×10^6 /ml promastigotes of log phase of *L. (V.) braziliensis* and the second with an inoculum of 2.8×10^5 /ml for subsequent execution of xenodiagnosis. Samples of blood, skin, liver and spleen of animals and specimens of sandflies were processed for the visualization of the parasite by direct examination and detection of DNA by PCR specific for the subgenus *Viannia*. In the first experiment, 570 female specimens were submitted to xenodiagnosis and among these, 338 were dissected and observed compatible forms with promastigotes in 7.7%. Of the 26 animals, 06 showed positive results of infectivity in the PCR test and 08 specimens of sandflies were positive. In the second experiment, 678 females were subjected to xenodiagnosis and 467 were dissected. On direct examination, 37.3% were positive. Positivity was detected in the PCR test in 15 of the 29 animals submitted to xenodiagnosis. 27 specimens of sandflies were positive in PCR specific. These results suggest that wild rodents *N. lasiurus*, *N. squamipes* and the synanthropic *R. rattus* are infective and probable reservoir host of *L. (V.) braziliensis*.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis. *Leishmania braziliensis*. Disease reservoirs. Ecoepidemiology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Taxonomia da <i>Leishmania</i>.....	15
1.2 Agente etiológico.....	16
1.3 Apresentação clínica das leishmanioses: tegumentar e visceral....	17
1.4 Leishmaniose tegumentar americana: aspectos gerais.....	18
1.5 Agentes etiológicos da LTA.....	20
1.6 Vetores.....	21
1.7 Reservatórios.....	22
1.8 Padrões epidemiológicos da LTA.....	23
1.9 Ciclos de transmissão da LTA.....	25
1.10 Diagnóstico.....	27
1.11 Tratamento.....	30
1.12 Medidas de controle.....	31
2 JUSTIFICATIVA.....	33
3 HIPÓTESE.....	37
4 OBJETIVOS	38
4.1 Geral	38
4.2 Específicos	38
5 MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1 Desenho do estudo.....	39
5.2 Áreas de capturas dos animais.....	40
5.2.1 Capturas dos animais.....	45
5.2.2 Eutanásia e pesquisa de infecção natural.....	46
5.3 Estabelecimento da colônia de animais.....	47
5.4 Estabelecimento da colônia de <i>Lutzomyia longipalpis</i>.....	47
5.5 Ensaios de infecciosidade experimental com <i>Necromys lasiurus</i> <i>Nectomys squamipe</i> e <i>Rattus rattus</i>.....	49
5.5.1 Parasitos.....	49
5.5.2 Infecção experimental.....	50
5.6 Infecciosidade experimental para os flebotomíneos (xenodiagnóstico).....	51

5.6.1 Dissecção dos flebotomíneos.....	53
5.7 Extração do DNA dos exemplares de flebotomíneos.....	54
5.7.1 Amplificação do DNA do cinetoplasto de <i>Leishmania</i> por PCR.....	54
5.8 Extração do DNA dos animais experimentais.....	55
5.8.1 Amplificação do DNA do cinetoplasto de <i>Leishmania</i> por PCR.....	55
5.9 População humana.....	55
5.10 Análise dos dados	56
5.11 Aspectos éticos.....	56
6 RESULTADOS	57
6.1 Animais silvestres e sinantrópicos.....	57
6.2 Ensaio de infecciosidade experimental do primeiro experimento..	60
6.2.1 Xenodiagnóstico.....	61
6.3 Ensaio de infecciosidade experimental do segundo experimento.	64
6.3.1 Xenodiagnóstico.....	65
6.4 População humana.....	69
7 DISCUSSÃO.....	71
8 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS.....	86
APÊNDICES.....	102
Apêndice A – Artigo publicado.....	103
Apêndice B – Artigo publicado.....	112
ANEXOS.....	115
Anexo A – Certificado de licença CEUA-FIOCRUZ.....	116
Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	117

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que se multiplicam em certos vertebrados considerados reservatórios da doença. O parasito é transmitido ao homem pela picada de insetos hematófagos da subfamília *Phlebotominae*, que se alimentaram previamente em um reservatório infectado. Estão entre as doenças infecciosas e parasitárias de maior incidência no mundo, com registro anual de dois milhões de casos. A doença ocorre em aproximadamente 88 países nas Américas, África, Índia, Ásia e Mediterrâneo; nestas regiões, atingem mais de 14 milhões de pessoas, com estimativa de que existam cerca de 350 milhões de indivíduos vivendo em área de risco (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006).

1.1 Taxonomia da *Leishmania*

A taxonomia da *Leishmania* tem passado por várias modificações, sendo consideradas associações de diversos caracteres, critérios clínicos e biológicos, e posteriormente, a utilização de métodos bioquímicos e moleculares (CUPOLILLO et al., 2000; CUPOLILLO; GRIMALDI; MOMEN, 1994; LAINSON; SHAW, 1987; LAINSON; SHAW, 1979; RIOUX et al., 1990). Entre os métodos mais utilizados, cita-se a análise do zimodema por meio da eletroforese de isoenzimas, que revela o perfil enzimático de cada espécie, permitindo compreender a evolução dos parasitos do gênero *Leishmania*. A análise do serodema, ou perfil sorológico, é realizada através de anticorpos monoclonais, na qual cada anticorpo monoclonal reconhece um antígeno específico, que identifica a espécie de *Leishmania* (GRIMALDI; TESH, 1993). O método do kDNA que promove a clivagem de ácidos nucléicos do cinetoplasto por meio de enzimas de restrição. Essas enzimas seccionam a cadeia do ácido desoxirribonucléico (DNA), produzindo fragmentos com diferentes pesos moleculares, importantes na identificação das espécies de protozoários (LAINSON; SHAW, 1987).

O modelo taxonômico mais abrangente e aceito atualmente foi proposto por Ross (1903), que propôs a criação do subgênero *Viannia* e a divisão do gênero em dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*, utilizando como parâmetro o desenvolvimento do parasito no inseto vetor e por Lainson e Shaw (1987) no gênero *Leishmania*.

De acordo com essa classificação, as espécies de *Leishmania* atualmente conhecidas como capazes de infectarem mamíferos (CUPOLILLO et al., 2000; SHAW, 1994) são agrupadas e classificadas em dois subgêneros: o subgênero *Leishmania* (ROSS, 1903) e o subgênero *Viannia* (LAINSON; SHAW, 1987). As espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* desenvolvem-se na porção média e anterior do intestino (seção *Supr pylaria*), já as espécies do subgênero *Viannia*, desenvolvem-se tanto nas partes anterior e média, como também no intestino posterior, na região do piloro (seção *Peri pylaria*) (LAINSON; SHAW, 1979).

1.2 Agente etiológico

Atualmente, são descritas trinta espécies de *Leishmania*. No Velho Mundo, são registradas dez espécies, todas pertencem ao subgênero *Leishmania* - sete são conhecidas como capazes de infectar o homem. No Novo Mundo, são registradas vinte espécies - onze destas pertencem ao subgênero *Leishmania*, das quais seis infectam o homem e nove espécies pertencem ao subgênero *Viannia*, das quais oito infectam o homem (CUPOLILLO et al., 2000; LAINSON; SHAW, 1998; SHAW, 1994).

As *Leishmania* são consideradas parasitos heteroxênicos, isto é, necessitam de um hospedeiro invertebrado e de um vertebrado para completar o ciclo de vida. Os hospedeiros invertebrados são dípteros pertencentes à família *Psychodidae*, sendo que somente dois gêneros são realmente importantes para a epidemiologia das leishmanioses no mundo: *Lutzomyia*, que são os vetores das Américas e *Phlebotomus*, que são os transmissores de leishmaniose na África, na Europa e na Ásia. Na região Neotropical existem cerca de quatrocentas espécies de flebotomíneos, a maioria destas sem importância comprovada na transmissão de leishmanioses (YOUNG; DUNCAN, 1994). Essa variedade reflete-se também nos

reservatórios vertebrados, sendo conhecidas, até o momento, mais de quarenta espécies de mamíferos albergando *Leishmania* spp. (GRIMALDI; TESH, 1993; SHAW; LAINSON, 1987).

1.3 Apresentação clínica das leishmanioses: tegumentar e visceral

A apresentação clínica da doença, de modo geral, divide-se em leishmaniose tegumentar, que acomete pele e mucosas, e visceral causando comprometimento de órgãos internos, especialmente o fígado e o baço, o que traduz uma importante diversidade clínica da doença, que, dependendo da espécie de *Leishmania* e da resposta imune do indivíduo infectado, pode causar desde infecções inaparentes, oligossitomáticas até casos graves e fatais (BADARÓ; DUARTE, 2005; MARZOCHI, 1992).

A leishmaniose visceral é uma síndrome clínica, caracterizada por febre irregular de longa duração, desnutrição, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e trombocitopenia. A definição da leishmaniose visceral pode ser fundamentada nas manifestações clássicas que produzem o agente etiológico no sistema reticuloendotelial do homem, o que acarreta um espectro amplo de manifestações clínicas e imunológicas (BADARÓ; DUARTE, 2005). Atualmente, encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006).

No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da leishmaniose visceral - a *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. (BRASIL, 2006; SANTOS et al., 1998). A distribuição geográfica de *L. longipalpis* é ampla e encontra-se em expansão. Esta espécie é verificada em todas as regiões brasileiras, exceto na região Sul. Encontrada originalmente nas matas, participando do ciclo primário de transmissão da doença, progressivamente, foi adaptando-se para o ambiente rural e essa adaptação foi somada à presença de animais silvestres e sinantrópicos. Recentemente, no final da década de 80, verificou-se a adaptação deste vetor aos ambientes urbanos, principalmente em periferias dos grandes centros urbanos (DANTAS-TORRES; BRANDÃO FILHO, 2006; MARZOCHI; MARZOCHI, 1997).

O principal reservatório da *L. (L.) chagasi* na área urbana são os cães (*Canis familiaris*). No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). O cão é considerado a principal fonte de infecção. Tem sido verificado que a enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e que a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem (BRASIL, 2006).

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença de evolução crônica que se manifesta por lesões cutâneas e mucosas, especialmente as do trato respiratório superior. A principal manifestação clínica consiste na presença de lesão única, ulcerada no local da picada do inseto vetor. Pode apresentar-se como uma infecção assintomática, evoluir para cura espontânea, ou, dependendo da espécie de *Leishmania* e da capacidade imunológica do indivíduo infectado, para diversas formas da doença classificadas como difusa, recidivante, disseminada, a forma mucosa ou mucocutâneo, esta última com consequências estéticas graves para o paciente (FALQUETO; SESSA, 2005; BRASIL, 2007).

A LT tem ampla distribuição mundial, ocorrendo na África, Ásia, Europa mediterrânea, sul da Rússia e nas Américas. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das seis mais importantes doenças infecciosas devido a seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006). Nas Américas, são reconhecidas, atualmente, 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras da doença humana; há registro de casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (BRASIL, 2007).

1.4 Leishmaniose tegumentar americana: aspectos gerais

A natureza leishmaniótica de lesões cutâneas e nasofaríngeas, no Brasil, foram identificadas em 1895 (MOREIRA, 1895). A confirmação de formas de leishmânias ocorreu no ano de 1909, quando Lindenberg encontrou o parasito em indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamentos na construção de rodovias no interior de São Paulo. Gaspar Vianna (1911) deu o nome de *Leishmania*

brazilienses para o parasito, depois corrigido para *Leishmania braziliensis* por Matta em 1916. Brumpt e Pedroso (1913) relataram as primeiras observações sobre a doença, denominando-a leishmaniose americana das florestas, devido ao fato de que sua transmissão se relacionava com o ambiente silvestre.

No ano de 1922, Aragão reproduziu experimentalmente a doença, através da inoculação no focinho de um cão, de macerado de fêmeas de flebotômíneos da espécie *Lutzomyia intermedia*, infectadas após sugarem lesões cutâneas de pacientes. Em 1940, em estudo no estado de São Paulo, foi realizado o exame de um grande número de flebotomos, sendo encontradas infecções naturais de “leptomonas” (promastigotas) em *Lutzomyia migonei*, *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia pessoai* (PESSOA; PESTANA, 1940). Em 1958 Forattini encontrou roedores silvestres parasitados em áreas florestais do estado de São Paulo (FORATTINI, 1960).

A LTA apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil com registro de casos em todas as regiões do País. A partir da década de 80, consolida-se a expansão geográfica da doença no País e, em 2003, é confirmada a autoctonia em todos os estados federados. Apesar da conhecida subnotificação de casos, decorrente das deficiências no sistema de notificação compulsória e dos casos de LTA ocorrerem predominantemente em áreas rurais, onde as condições de assistência à saúde são precárias. Aliado aos casos de cura espontânea não documentados, as estatísticas oficiais têm registrado anualmente cerca de 35 mil casos novos e um coeficiente de detecção médio de 18,5 casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2007).

A doença humana é caracterizada por úlcera única ou múltipla, cuja principal complicação é a metástase por via hematogênica para as mucosas da nasofaringe, com destruição desses tecidos. A evolução da doença nas mucosas assume características variadas, com apresentação clínicas de lesões caracterizadas pelo aumento de volume das partes moles, hiperemia e ulcerações superficiais, mas sem destruição importante ou com o predomínio de lesões ulcerativas e mutilantes (MARZOCHI, 1992).

A lesão de mucosa surge, geralmente, no decorrer dos cinco primeiros anos após o aparecimento da lesão na pele. Em algumas pessoas, a doença aparece primariamente nas mucosas. A ocorrência desta complicação vem sendo reduzida, não excedendo 3% a 5% dos casos em áreas endêmicas conhecidas. Esta redução

estaria associada provavelmente ao diagnóstico e tratamento precoces (BRASIL, 2007; MARZOCHI, 1989).

A LTA ocorre em ambos os sexos e em todas as faixas etárias, entretanto, considerando a média do País, predominam os maiores de 10 anos, representando 90% dos casos e o sexo masculino com prevalência em torno de 74%. Nas últimas décadas, tem havido um aumento no número de casos de todas as formas da doença associado à expansão geográfica dos mesmos. A doença pode ainda ser considerada como uma doença emergente devido à associação com o vírus da imunodeficiência adquirida (ASHFORD, 2000) e a ocorrência de casos em pacientes transplantados (ANTINORI et al., 2008).

Os fatores que possivelmente podem explicar essa expansão estariam relacionados a questões ambientais e sociais. Deve-se considerar que o estado de imunidade dos suscetíveis, desnutrição e falhas terapêuticas são fatores de risco importantes para a ocorrência e gravidade da doença. A multicausalidade dos fatores de risco podem ainda variar de região para região devido às particularidades do ciclo de transmissão local (SHAW, 2007), relacionados aos vetores envolvidos, possíveis reservatórios e perfil ecoepidemiológico (BRANDÃO FILHO, 2001; MARZOCHI, 1992; SHAW; LAINSON, 1987).

1.5 Agentes etiológicos da LTA

Os agentes etiológicos da LTA são parasitos metaxênicos, pertencentes à família Trypanosomatidae, parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema retículo endotelial, com uma forma flagelada ou promastigota e outra aflagelada ou amastigota. Nos vertebrados, apresentam-se sob a forma amastigota, que se multiplica por divisão binária no interior de macrófagos, não só na pele, mas também nas vísceras de alguns animais. No tubo digestivo do flebotomíneo, transformam-se em promastigotas, que também proliferam por divisão binária. Os promastigotas inoculados na pele dos vertebrados envolvem para a forma amastigota, completando-se seu ciclo biológico (MARZOCHI, 1992).

No Brasil, já foram identificadas sete espécies de *Leishmania*, sendo seis do subgênero *Viannia*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.)*

naiffi, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* e uma do subgênero *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis*. As principais espécies responsáveis pela ocorrência de casos humanos são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. De ocorrência mais recente e de menor prevalência as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (MARZOCHI, 1992; SHAW; LAINSON, 1987; YOUNG; DUNCAN, 1994). Na região Nordeste, assim como na maior parte do País, a espécie responsável pela transmissão da LTA é a *L. (V.) braziliensis*. Em Pernambuco, a LTA tem sido, até o momento, associada à *L. (V.) braziliensis* (ANDRADE et al., 2005a; BRANDÃO FILHO, 2001; BRITO et al., 1993).

1.6 Vetores

Os vetores de LTA são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem Diptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*. Nas Américas, existem aproximadamente 30 espécies de *Lutzomyia* com comprovada capacidade de transmitir *Leishmania* spp. podendo existir mais espécies de vetores ainda não identificadas (LAINSON; SHAW, 1998).

As principais espécies envolvidas na transmissão da LTA, no Brasil, são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomi* e *L. migonei*. Estas espécies de flebotomíneos foram definidas como vetoras por atenderem aos critérios que atribuem a uma espécie a competência vetorial. Cabe ressaltar que o papel vetorial de cada uma dessas espécies dependerá da espécie de *Leishmania* presente no intestino do inseto. Embora ainda não tenha sido comprovada a importância epidemiológica de *L. neivai* (PITA-PEREIRA et al., 2009) e *L. fisheri* (MARCONDES et al., 2005) como vetores da LTA, estas espécies de flebotomíneos têm sido encontradas naturalmente infectadas por *Leishmania* (RANGEL; LAINSON, 2009).

1.7 Reservatórios

Os reservatórios da LTA variam de acordo com a espécie de *Leishmania*. A participação de animais silvestres no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar nas Américas só foi comprovada em 1957, quando se demonstrou pela primeira vez a infecção em roedores silvestres, no Panamá (HERTIG; FAIRCHILD; JOHNSON, 1957). Três anos depois, animais silvestres foram novamente encontrados parasitados no estado de São Paulo (FORATTINI, 1960). Surgiram, então, várias descobertas que contribuíram para a definição do quadro epidemiológico da LTA, hoje representado por um complexo de espécies de *Leishmania*, animais reservatórios, manifestações clínicas e insetos transmissores, compondo diferentes ciclos de transmissão.

Foram registrados como hospedeiros diferentes espécies de animais, como *Akodon* (FORATTINI et al., 1972), *Proechimys* (LAINSON; SHAW, 1973), *Rattus* (BRANDÃO FILHO et al., 1994; VASCONCELLOS et al., 1994), *Oryzomys* (FORATTINI et al., 1972, 1973; LAINSON; SHAW, 1969), *Rhipidomys* (LAINSON et al., 1981), *Nectomys* e *Necromys* (BRANDÃO FILHO et al., 1994) e em marsupial *Didelphis* (BRANDÃO FILHO et al., 1994; LAINSON; SHAW, 1973).

Além dos relatos do parasito em animais silvestres e sinantrópicos, devem-se considerar os registros de infecção por *Leishmania* em animais domésticos como cães (*canis familiaris*), equinos (*Equus caballus*) e, mais raramente, em gatos (FALQUETO et al., 1986, 1991; REITHINGER; ESPINOZA; DAVIES, 2003).

As amostras encontradas nestes animais, contudo, não foram identificadas e caracterizadas categoricamente como *Leishmania*, tendo sido relatadas apenas como base nas características morfológicas e no comportamento do parasito em meio de cultivo *in vitro* ou *in vivo*. Neste sentido, o isolamento e identificação de amostras de *L. (V.) braziliensis* em roedor silvestre (*Bolomys lasiurus* = *Necromys lasiurus*) e sinantrópico (*Rattus rattus*) constituem a primeira incriminação clássica de um reservatório primário desta espécie de *Leishmania*.

1.8 Padrões epidemiológicos da LTA

Os padrões epidemiológicos de transmissão da LTA podem ser genericamente caracterizados como: silvestres, ocupacional e rural e periurbano em áreas de colonização. O padrão de transmissão silvestre ocorre em área de vegetação primária, mantido na natureza pelos animais silvestres, com participação secundária de animais domésticos. O homem, considerado hospedeiro acidental, ao entrar em contato com áreas onde ocorrem os ciclos enzoóticos primários, não teria importância na manutenção do ciclo. Em áreas de colonização antiga, em especial em regiões do interior do País, existem evidências de que a transmissão silvestre ainda ocorre nas florestas remanescentes (BRASIL, 2007).

Os ciclos enzoóticos secundários, diretamente influenciados pelo homem, são determinados pelo nível de adaptação dos hospedeiros e dos insetos vetores para os novos *habitats* criados pela ação antrópica. Na região Sudeste, a intervenção humana no meio ambiente alterou de modo significativo as características epidemiológicas da doença. Em São Paulo, após o desmatamento de áreas florestais no noroeste do estado, a doença inicialmente tornou-se mais rara. Nas últimas décadas, no entanto, a incidência da LTA vem aumentando, em decorrência do surgimento de novos focos em áreas de colonização antiga (GOMES; CAMARGO-NEVES, 1998; TOLEZANO, 1994).

O padrão de transmissão ocupacional está associado ao desmatamento para a colonização de novas terras, construção de estradas, instalação de povoados, desenvolvimento de atividades agropecuárias, instalação de frentes de trabalho para extração de madeira, mineração, dentre outras. Como exemplo, a incidência cada vez mais elevada de LTA no estado do Tocantins, provavelmente resultante de mudanças ecológicas, secundárias aos impactos ambiental na região, devido à construção de usinas hidrelétricas, atividades agrícolas e a criação de novas áreas de assentamento (VILELA et al., 2008). Na Região Centro-Oeste, estudos realizados em áreas que sofreram mudanças ambientais devido às atividades humanas revelam aumento na incidência da doença (DORVAL et al., 2009; GALATI et al., 1996).

Constituem, ainda, atividades de risco os treinamentos militares, as expedições científicas e atividades de lazer relacionadas ao ecoturismo em áreas de

transmissão de LTA (SHAW, 2007). A associação com atividades profissionais pode estar ausente em áreas onde surgiram condições para a transmissão domiciliar. É o que se verifica em Manaus, no estado do Amazonas, onde a expansão urbana aproximou a população dos focos naturais da doença (GUERRA et al., 2007).

No entanto, o padrão de transmissão predominante é verificado em localidades rurais e periurbanas localizadas em áreas de colonização e estão relacionados ao processo de exploração de plantações de cana de açúcar, cacau, entre outros, além de processos migratórios, ocupação de encostas e aglomerados em centros urbanos, onde se observam áreas de vegetação secundárias ou residuais e remanescentes de floresta primárias, como a Mata Atlântica e Amazônica. Nestas regiões, podem ocorrer ciclos zoonóticos peridomésticos, nos quais, a transmissão ocorre no ambiente peridomiciliar, com hospedeiros reservatórios domésticos e sinantrópicos, característicos de áreas de colonização antiga. A ocorrência da transmissão de LTA em áreas periurbanas é verificada em Jacarepaguá, Paraty e Campo Grande, no estado do Rio de Janeiro, focos na periferia de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais e Vitória no Espírito Santo (BRASIL, 2007; MARZOCHI, 1992; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; PASSOS, et al, 1993).

As alterações ecológicas acima referidas, juntamente com as mudanças climáticas, provavelmente têm contribuído para a propagação da LTA no Brasil nos últimos anos (SHAW, 2007). Neste contexto, os vetores parecem se adaptar rapidamente aos novos ambientes, como as áreas degradadas, em associação com os animais domésticos e reservatórios silvestres e sinantrópicos e, conseqüentemente, a conjunção destes fatores contribui para aumentar a distribuição e incidência da doença no País (COSTA et al., 2007; SHAW, 2008).

Os estudos epidemiológicos dos focos naturais da leishmaniose são complexos, e ainda existem no Brasil regiões que revelam a presença da doença a partir do adoecimento de indivíduos que entram em contato com as florestas. A LTA pode ser caracterizada como uma doença que apresenta particularidades que variam de acordo com a região de instalação e manutenção de seu ciclo de transmissão. O entendimento da dinâmica de produção da doença em nível local é cada vez mais discutido como essencial para o estabelecimento de medidas de controle mais efetivas (GRIMALDI; TESH; MCMAHON-PRATT, 1989).

1.9 Ciclos de transmissão da LTA

O ciclo de transmissão da *L. (L.) amazonensis* ocorre em florestas primárias e secundárias da Amazônia (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e sudoeste do Maranhão), especialmente em áreas de igapó e de floresta tipo “várzea”. Sua presença amplia-se para o Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-Oeste (Goiás) e Sul (Paraná) (BRASIL, 2007; MARZOCHI, 1992).

A doença humana pode ocorrer com a presença de lesão cutânea ulcerada, geralmente única. Alguns indivíduos podem desenvolver um aspecto peculiar da leishmaniose tegumentar, que é a forma difusa caracterizada pela presença de nódulos isolados ou agrupados, máculas, papúlas e placas infiltradas envolvendo extensas áreas cutâneas (MARZOCHI, 1992). Não existe tratamento eficaz para esta forma da doença até o momento, embora se registre melhora das lesões iniciais com a infiltração de medicamentos e aplicação de calor local.

O principal vetor é *L. flaviscutellata*, que tem hábitos noturnos, voo baixo, altamente atraída por roedores e pouco antropofílica (SHAW; LAINSON; WARD, 1972; VILELA et al., 2007). O parasito foi isolado de roedores silvestres do gênero *Proechymis* e *Oryzomys* (LAINSON; SHAW, 1998). Embora o papel desempenhado por estes animais silvestres no ciclo de transmissão não esteja bem estabelecido, existem evidências que indicam estes roedores como reservatórios desta espécie de *Leishmania*.

A transmissão da *L. (V.) guyanensis* apresenta-se aparentemente limitado ao norte da Bacia Amazônica (Amapá, Acre, Roraima, Amazonas e Pará), é encontrada principalmente em florestas de terra firme. Vários mamíferos silvestres tais como a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*) (LAINSON; SHAW, 1987), gambá (*Didelphis albiventris*) e roedores do gênero *Proechimys guyanensis* foram encontrados naturalmente infectados, indicando-os como possíveis reservatórios desta espécie de *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1968; 1973).

A doença humana é caracterizada com frequência por lesões cutâneas múltiplas em consequência de picadas simultâneas do vetor. Raramente, ocorre comprometimento mucoso. A doença atinge, principalmente, indivíduos do sexo masculino em fase produtiva, em decorrência de atividades ocupacionais

relacionadas aos desmatamentos, garimpos e exercícios militares (MARZOCHI, 1992).

Os vetores conhecidos da *L. (V.) guyanensis* são *L. umbratilis* (LAINSON; SHAW; PÓVOA, 1981), bastante antropofílico e a principal espécie de flebotomíneo envolvida na transmissão, encontrado em alta densidade em troncos e copa de árvores, e *L. anduzei*, considerado um possível vetor secundário (RANGEL; LAINSON, 2009).

O ciclo de transmissão da *L. (V.) lainsoni* foi identificado nos estados do Pará, Rondônia e Acre, tem como possível reservatório natural o roedor *Agouti paca* (SILVEIRA et al., 1991) e como vetor a *L. ubiquitousalis* (SILVEIRA et al., 1991; LAINSON et al., 1992). O parasito causa lesões cutâneas únicas (BRASIL, 2007).

A *L. (V.) naiffi* ocorre nos estados do Pará e Amazonas, o parasito foi isolado e caracterizado do tatu (*Dasypus novemcinctus*). Seus principais vetores são *L. squamiventris*, *L. paraensis* e *L. ayrozai*. Têm sido registrados casos raros da doença humana, normalmente caracterizada por lesões cutâneas únicas, ulceradas, que geralmente evoluem para a cura (LAINSON; SHAW, 1989; LAINSON et al., 1990).

O ciclo de transmissão da *L. (V.) shawi* ocorre nas regiões nordeste e sudeste do estado do Pará e região oeste do Maranhão. O parasito foi isolado de macacos (*Cebus apella* e *Chiropotes satanás*), preguiças (*Choloepus didactylus* e *Bradypus tridactylus*) e da cotia (*Nasua nasua*). O vetor envolvido na transmissão é a *L. whitmani*. A forma clínica da doença é caracterizada por lesões cutâneas únicas (LAINSON et al., 1989; LAINSON; SHAW, 1998).

A transmissão da *L. (V.) lindenbergi* foi observada em militares que realizavam treinamento em uma área de reserva florestal em Belém, estado do Pará. Não existem relatos de infecções em animais ou flebotomíneos. *L. antunesi*, muito abundante na região, aparece como possível vetor (SILVEIRA et al., 2002).

A *L. (V.) braziliensis* é o agente da leishmaniose cutâneo-mucosa, foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita e incriminada como agente etiológico da LTA. É a espécie mais importante no Brasil e está amplamente distribuída em todo o País. Apresenta padrões de transmissão com particularidades regionais, embora com alguma similaridade intrarregional (MARZOCHI, 1992).

Em São Paulo (TOLEZANO; MARCORIS; DINIZ, 1980), no Rio de Janeiro (RANGEL et al., 1999), Espírito Santo (SOUZA-ROCHA et al., 2007) e Minas Gerais

(SANTOS et al., 2003), o vetor comum incriminado é *L. intermedia*, embora *L. whitmani* apresente densidade importante. O parasito foi isolado de felídeos (*Felis catus*) no Rio de Janeiro, canídeos (*Canis familiares*) no Ceará, São Paulo, Bahia, Rio de Janeiro e Espírito Santo, e equídeos (*Equus caballus*, *Equus asinus*) nos estados do Ceará, Bahia e Rio de Janeiro, ressaltam-se, entretanto, que o papel destes animais no ciclo de transmissão da *L. (V.) braziliensis* ainda não está bem estabelecido (FALQUETO et al., 1986; GOMES; GALATI, 1989; MAYRINK et al., 1979).

Nos Estados de Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008; MAYRINK et al., 1979; PASSOS; SILVA; FALCÃO, 1991), Mato Grosso do Sul e Paraná, o vetor incriminado é *L. whitmani*, sendo a espécie mais abundante e comum no peridomicílio e domicílio (GALATI et al., 1996). No Pará, o parasito foi isolado e caracterizado dos vetores *L. complexa* e *L. wellcomei*. No sul do Brasil, *L. neivai* é sugerida como vetor (SILVA et al., 2008).

Na Bahia, os estudos realizados na localidade de Três Braços, região cacauera com resquícios de Mata Atlântica primitiva, demonstraram que a *L. whitmani* era a espécie de vetor envolvido (RYAN et al., 1990; VEXENAT; BARRETO; MARSDEN, 1986). Não foram identificados reservatórios e o padrão de transmissão envolvido, embora tenha sido possível a determinação do parasito, os aspectos clínicos e tratamento de pacientes (CUBA CUBA et al., 1985; FRANÇA et al., 1991; JONES et al., 1987; MARSDEN, 1994). No Ceará, os estudos realizados na região de Baturité apresentam resultados heterogêneos. O vetor possivelmente envolvido na transmissão florestal era a *L. wellcomei* (READY; RIBEIRO, 1983), enquanto que *L. whitmani* e *L. migonei* estariam associados à transmissão peridomiciliar (AZEVEDO et al., 1990; AZEVEDO; RANGEL; QUEIROZ, 1990; DE QUEIROZ et al., 1994).

1.10 Diagnóstico

O diagnóstico da LTA é realizado a partir do exame clínico, de dados epidemiológicos e laboratoriais de indivíduos que apresentam lesões características da doença. O diagnóstico clínico apresenta dificuldades pelo fato de existir diversas

doenças que se assemelham com a LTA e as manifestações clínicas da doença, que dependem do tipo de resposta imunocelular que o indivíduo desenvolve, da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro (MARZOCHI, 1992). O diagnóstico laboratorial convencional apresenta limitações, não existindo, até o momento, um teste padrão ouro para diagnóstico da doença, necessitando-se da combinação de diferentes técnicas para a obtenção de resultados mais precisos (BRITO et al., 2000; 2001).

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose constitui-se dos métodos parasitológico, imunológico e moleculares. O diagnóstico parasitológico consiste na demonstração do parasito, que pode ser realizada através de diferentes técnicas de pesquisa direta e indireta. O exame usualmente utilizado consiste na pesquisa direta em microscopia óptica das formas amastigotas em material obtido da borda da lesão por escarificação, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa. Após a realização do esfregaço ou *imprint*, as lâminas devem ser coradas por Giemsa, Leishman ou Panótico. Este teste apresenta uma sensibilidade de 50-79% e depende do número de parasitas presentes na lâmina. A positividade do teste é inversamente proporcional ao tempo de evolução da doença. Uma limitação dessa técnica é a incapacidade de determinar a espécie do parasito (BENSOUSSAN et al, 2006).

O isolamento de promastigotas em cultura de material obtido através de fragmentos de biópsias e aspirados de borda de lesões é altamente específico, contudo, apresenta baixa sensibilidade. Isto devido à contaminação e variação de meios de culturas na manutenção do parasito *in vitro*. Outra forma de diagnóstico parasitológico é o isolamento *in vivo*, no qual as amostras são inoculadas em hamster (*Mesocricetus auratus*). Estes métodos permitem a confirmação e posterior identificação da espécie de *Leishmania* envolvida (BENSOUSSAN et al., 2006; RODRIGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2006).

A biópsia histopatológica apresenta limitações no diagnóstico da LTA, devido à sua baixa sensibilidade e por apresentar resultados frequentemente semelhantes aos de outras doenças dermatológicas. É de grande utilidade no diagnóstico diferencial de processos ulcerativos indefinidos, especialmente no de neoplasias (BADARÓ; DUARTE, 2005).

O diagnóstico imunológico é realizado pelo teste intradérmico e sorológicos. A intradermorreação de Montenegro (IDRM) fundamenta-se na resposta de

hipersensibilidade tardia. A IDRM é amplamente empregada e de grande valor presuntivo no diagnóstico de LTA, devido à alta sensibilidade e especificidade (superior a 90%), especialmente nos casos em que os parasitos são escassos ou ausentes, sendo também bastante útil em inquéritos epidemiológicos nas áreas endêmicas (VEGA-LÓPEZ, 2003).

Os métodos sorológicos de detecção de anticorpos circulantes são bastante utilizados, como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o teste imunoenzimático (ELISA) que são úteis no diagnóstico de LTA em lesões extensas e múltiplas, sendo de grande valia no diagnóstico precoce de lesões mucosas. Embora o teste de Western blot seja outra possibilidade diagnóstica e apresente sensibilidade (91%) e especificidade (100%) superior a RIFI e ao ELISA, também apresenta limitações, podendo apresentar reações cruzadas com outros tripanosomatídeos, especialmente com a doença de Chagas e leishmaniose visceral (BRITO et al., 2000). Contudo, o Western blot apresenta vantagens quando utilizado após instituição da terapêutica e cura clínica da forma cutânea, os títulos, quando positivos, diminuem ou desaparecem após alguns meses, podendo ser de utilidade no controle da cura (BRITO et al., 2001). Apesar da sensibilidade desses testes ser bastante elevada nas formas cutâneas e nas formas mucosa, em geral podem negativar na forma cutânea difusa (MENDONÇA et al., 1988).

Os exames moleculares são métodos que vêm sendo amplamente utilizados em pesquisas. Entretanto, as exigências técnicas e o custo relativamente alto ainda limitam seu emprego na rotina de diagnóstico. Um estudo de revisão identificou uma precisão diagnóstica de LT de 88% na utilização da reação em cadeia de polimerase (PCR), quando comparado a outros métodos, como pesquisa direta (51%), cultura (47%) e o exame histopatológico (35%) (DAVIES et al., 2000). Estudo de validação de abordagens moleculares, realizado em Pernambuco, demonstra sensibilidade para o subgênero *Viannia* de 94,3%, e para o gênero *Leishmania* de 89,6% e uma especificidade de 100% (RODRIGUES et al., 2002). Além da sensibilidade diagnóstica da técnica de PCR, outras vantagens são a rapidez, a variedade de amostras que podem ser utilizadas para análise, o diagnóstico de lesões crônicas, que podem evoluir para formas atípicas e as lesões mucosas, nas quais, a escassez de parasitos influenciam na sensibilidade diagnóstica pelos métodos parasitológicos convencionais. A detecção do DNA do parasito pode ser feito através de PCR por hibridização, realizada com o uso de sondas que permitem a distinção de complexos

e espécies de *Leishmania*. Outra metodologia empregada recentemente é a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), capaz de promover a quantificação acurada e o monitoramento, em tempo real, do produto amplificado. Esta técnica, inovadora, vem sendo utilizada em diversas amostras, possibilitando a realização de estudos relacionados à carga parasitária, interação hospedeiro-parasito e monitoramento da terapia (FRANCINO et al., 2006).

A utilização de métodos de diagnóstico laboratorial visa não só à confirmação dos achados clínicos, mas pode fornecer importantes informações epidemiológicas, como a identificação da espécie circulante, contribuindo com as medidas a serem adotadas para o controle da doença.

1.11 Tratamento

Na abordagem terapêutica, os antimoniais pentavalentes têm representado a base do tratamento da leishmaniose nas últimas décadas. A anfotericina B é a droga de segunda escolha, quando não se obtém resposta com o tratamento com o antimonial ou na impossibilidade do seu uso. Apesar de poucos estudos realizados no Brasil, outra possibilidade terapêutica é a utilização da pentamidina (BRASIL, 2007). Formulações lipídicas da anfotericina B têm sido utilizadas esporadicamente no tratamento das formas cutâneas e mucosas da LTA em pacientes imunocompetentes ou com alguma forma de imunossupressão, incluindo indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (BROWN et al., 2005). Os estudos das drogas existentes são controversos, porque não há um protocolo padronizado com variáveis constantes. Tratamentos alternativos têm sido testados, como por exemplo, pacientes portadores de leishmaniose cutânea foram randomizados para receber, antimoniato de N-metilglucamina, calor local gerado por radiofrequência (50°C, 30s) ou placebo. As curas clínica e parasitológica com a termoterapia foram semelhantes às obtidas com antimoniato de N-metilglucamina (VELASCO-CASTREJON, 1997).

Na forma cutânea, o critério de cura é definido pelo aspecto clínico das lesões que deve apresentar reepitelização das lesões e regressão total da infiltração e eritema em até três meses após a conclusão do esquema terapêutico. E, na forma

mucosa, a cura é definida pela regressão de todos os sinais, comprovados através do exame clínico e otorrinolaringológico até seis meses após a conclusão do esquema terapêutico (KOFF; ROSEN, 1994; BRASIL, 2007).

A diversidade de espécies de *Leishmania* no Brasil configura quadros clínicos variados, com respostas terapêuticas diversas. Os antimoniais pentavalentes, apesar de sua comprovada eficácia, necessitam de estudos para determinar, de forma mais precisa, a padronização de esquemas terapêuticos, o mecanismo de ação e sua farmacocinética. O tratamento da LTA representa um grande desafio porque as drogas disponíveis apresentam elevada toxicidade e nenhuma delas tem demonstrado ser plenamente eficaz. A recidiva, a falha terapêutica em pacientes imunodeprimidos e a resistência ao tratamento são fatores que motivam a busca de uma droga ideal, considerando que o tratamento é de grande valia para o controle da doença devido às dificuldades de prevenção atual e à complexidade da epidemiologia da doença (FALQUETO; SESSA, 2005; MARZOCHI, 1992).

As limitações verificadas no tratamento refletem-se também nas medidas de controle. A diversidade de fatores que envolvem a transmissão desta endemia constitui um grande obstáculo para a definição de estratégias de controle adequadas. A multifatorialidade envolvida na transmissão da LTA impõe que essas estratégias sejam flexíveis e distintas, adequadas a cada área ou região. Ressalta-se, no entanto, que a caracterização do tipo de transmissão ainda é insuficiente em vários aspectos para subsidiar medidas efetivas de controle e demonstra a necessidade da obtenção de recursos metodológicos mais eficientes para se combater a doença (BRASIL, 2007; FORATTINI et al., 1976; GOMES; CAMARGO-NEVES, 1998; MARZOCHI, 1992).

1.12 Medidas de controle

É importante que cada área de transmissão seja considerada como uma singularidade biológica e assim estudada. Os estudos das populações de flebotomíneos devem definir as espécies vetoras, sua dinâmica, flutuação sazonal, dispersão, grau de antropofilia, endofilia, exofilia e infecção natural das espécies envolvidas; a identificação e caracterização do tipo de transmissão são de grande

importância para nortear as medidas de controle (FORANTTINI et al., 1976; GOMES; GALATI, 1989).

O conhecimento dos animais reservatórios e a realização de inquéritos para melhor evidênciação do papel dos reservatórios nos ambientes peri e extra domiciliares e também dos mamíferos silvestres e sinantropicos é importante para a seleção de estratégias adequadas para medidas de controle de reservatórios, quando indicadas (MARZOCHI, 1992).

O diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos humanos, através da estruturação de rede básica para atendimento da demanda passiva e da busca ativa, com o registro dos casos humanos quanto à forma clínica, sexo, idade e procedência, visando a traçar o perfil da população acometida. Investigação de focos e adoção de medidas preventivas pertinentes e adequada à situação local, permitiriam o conhecimento mais adequado dos fatores envolvidos na transmissão e forneceria subsídios para a implantação de políticas públicas de atendimento à saúde e prevenção mais efetivas (BRASIL, 2007; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

Por outro lado, é necessário buscar a minimização do contato homem-vetor através da aplicação de inseticidas, quando indicada, ou da adoção de medidas de proteção individual. Ressalta-se que o emprego de inseticidas contra flebótomos está indicado em situações de transmissão peridomiciliar e domiciliar, sendo inexecutável a sua aplicação em áreas florestais (BRASIL, 2007; GOMES; CAMARGO-NEVES, 1998). A escolha da formulação do inseticida e a época mais adequada à sua aplicação deverá ser orientada por estudos entomológicos, considerando ainda fatores biológicos, climáticos e ambientais (GOMES; CAMARGO-NEVES, 1998). O controle de vetores, pelo emprego de inseticidas tem demonstrado eficácia variada (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

2 JUSTIFICATIVA

Em Pernambuco, a LTA incide em todas as regiões, com predominância dos casos na região da Zona da Mata, com o registro de mais de 60% do total de casos notificados (BRANDÃO FILHO et al., 1999). Amostras de *Leishmania* spp. isoladas de pacientes procedentes desta região têm sido identificadas e caracterizadas como *L. (V.) braziliensis* com perfis isoenzimáticos de variantes (ANDRADE et al, 2005a; BRANDÃO FILHO, 2001; BRITO et al., 1993).

Estudos sobre a infecção natural em animais silvestres e domésticos realizados em Amaraji, na localidade de Refrigério, Zona da Mata Sul do estado de Pernambuco, identificou roedores silvestres e sinantrópicos infectados por *Leishmania* (formas amastigotas características presentes em *imprints* de baço) e seis amostras do parasito provenientes de roedor silvestre (*Bolomys lasiurus* = *Necromys lasiurus*) e sinantrópico (*Rattus rattus*) foram identificadas e caracterizadas como *L. (V.) braziliensis*, com perfis isoenzimáticos variantes (BRANDÃO FILHO et al, 2003a). O inquérito epidemiológico realizado em cães evidenciou que, apesar do aspecto físico normal do animal, 18,5% demonstraram positividade à pesquisa de anticorpos pelo método de imunofluorescência indireta (BRANDÃO FILHO, 2001).

A principal espécie envolvida na transmissão na Zona da Mata Sul é *L. whitmani*, com mais de 98% de predominância na fauna de flebotomíneos identificada (BRANDÃO FILHO, 2001; CAMPBELL- LENDRUM et al., 1999). Na Zona da Mata Norte no município de Paudalho, *L. complexa* e *L. choti* apresentam predominância na fauna flebotomínica local (ANDRADE et al., 2005b; ANDRADE, 2004; BALBINO et al., 2005; BRANDÃO FILHO et al., 1998).

Diante do exposto, verifica-se a complexidade dos fatores envolvidos na transmissão da LTA e ressalta-se que o pouco conhecimento dos reservatórios de *L. (V.) braziliensis* constitui importante obstáculo para caracterizar a ecoepidemiologia da LTA associado a esta espécie. Infecções por *L. (V.) braziliensis* foram descritas em várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos, no entanto, existem poucas evidências que comprovassem o papel destes animais como reservatórios desta espécie. Neste sentido, os achados encontrados por Brandão Filho et al., (2003a, 2003b) representaram a principal contribuição sobre a

identificação de reservatórios de *L. (V.) braziliensis*, com identificação do parasito isolado e associações com a ecoepidemiologia da LTA na Zona da Mata Sul de Pernambuco.

O principal critério para a definição de uma espécie como reservatório, é que esta (s) espécie (s) garantam a circulação da *Leishmania* na natureza dentro de um recorte de tempo e espaço. Neste sentido, deve-se considerar que a interação reservatório e parasito é um sistema complexo, dinâmico e multifatorial que envolve o homem, o animal doméstico, o parasito, o vetor e o animal reservatório dentro de um determinado ambiente. Essas relações encontram-se em constante mudança em função das alterações do meio ambiente e das interações entre as seres vivos. Sendo assim, apenas o acompanhamento de longo prazo e o atendimento a critérios pré-estabelecidos poderão definir uma espécie animal como reservatório de um agente patogênico e, partir daí resultar em informações consistentes o suficiente para nortear as medidas de controle.

Para determinar uma espécie como hospedeiro reservatório, é necessário estabelecer os seguintes parâmetros: *status* taxonômico correto do animal; distribuição geográfica do hospedeiro e do parasito dentro da área de distribuição do hospedeiro; distribuição microrregional do parasito e reservatórios em distintos ecossistemas dentro de um mesmo bioma; prevalência da infecção entre machos, fêmeas, adultos e jovens de possíveis hospedeiros; dinâmica das populações de hospedeiros no tempo (identificação dos efeitos de um determinado parasito na população e/ou indivíduo; flutuação sazonal; estabilidade da infecção e transmissibilidade) e que esta espécie seja infecciosa para o vetor, no caso que envolvam a transmissão por insetos vetores (ASHFORD, 1996).

O conhecimento dos reservatórios de *L. (V.) braziliensis* deve contribuir para o estabelecimento da história natural da LTA relacionada a essa espécie de parasito. A história natural de uma doença é o nome dado ao conjunto de processos interativos compreendendo as interrelações do agente, do hospedeiro suscetível e do meio ambiente. Tem desenvolvimento em dois períodos sequenciados: o período epidemiológico e o período patológico (LEAVEL; CLARK, 1976).

O conhecimento da história natural da LTA favorece o domínio das ações preventivas necessárias, considerando que um dos fundamentos da prevenção é romper elos na cadeia de transmissão, o conhecimento destes fatores, portanto, é fundamental para as atividades de prevenção e controle. Em estudos realizados em

Refrigério, Amaraji, na Zona da Mata Sul de Pernambuco, trinta e oito amostras de *Leishmania* foram obtidas de pacientes, roedores e hamsters sentinelas. Todas elas foram identificadas e caracterizadas como *L. (V.) braziliensis*. Do total dos isolamentos, seis amostras foram isoladas de roedores silvestres e sinantrópicos, sendo cinco obtidas de *Necromys lasiurus* e uma de *Rattus rattus*. Um total de 460 amostras de DNA foram extraídas de baço de animais silvestres e sinantrópicos e processadas para a detecção de *Leishmania* spp. do subgênero *Viannia*, através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). *Nectomys squamipes*, *Necromys lasiurus* e *Rattus rattus*, neste estudo, foram os animais que apresentaram maior percentual de positividade das amostras (BRANDÃO FILHO et al., 2003a, 2003b; BRANDÃO FILHO, 2001).

No Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti (CMNIC) localizado em Paudalho, na Zona da Mata Norte do estado de Pernambuco, foram isoladas e caracterizadas sete amostras de *L. (V.) braziliensis* através da reação com painel de anticorpos monoclonais específicos e perfil eletroforético com isoenzimas. De 1996 a 2005 foram registrados 123 casos autóctones de LTA após treinamentos no CIMNC. Esta região caracteriza-se em particular por estar situada em uma área preservada da Mata Atlântica, onde é mantido o ciclo enzoótico primário da *L. (V.) braziliensis*, com a ocorrência de casos humanos quando são realizados treinamentos em locais situados próximos ou inseridos na área da mata primária e da mata secundária circundante (ANDRADE, 2004; ANDRADE et al., 2005a, 2005b).

A diversidade de espécies verificada no gênero *Leishmania*, nos reservatórios invertebrados e vertebrados reflete a complexidade da LTA e as dificuldades de controle e reafirmam a necessidade de mais estudos relacionados à ecoepidemiologia da doença para um maior entendimento dos diversos ciclos de transmissão desta importante endemia. Diante das evidências de que roedores silvestres e sinantrópicos são reservatórios de *L.(V.) braziliensis* e da lacuna na história natural dessa doença relacionada aos reservatórios espera-se, com o presente estudo, contribuir para uma melhor compreensão da transmissão da LTA na Zona da Mata do Estado de Pernambuco e para o estabelecimento de medidas de controle mais efetivas. Neste sentido, este estudo tem como justificativa a realização de ensaios que reforcem as evidências encontradas no estudo sobre os hospedeiros reservatórios que mantêm o ciclo de transmissão da *L.(V.) braziliensis* na Zona da Mata de Pernambuco e contribuir para a melhor compreensão do papel

destas espécies na manutenção desta importante endemia na região de estudo e no País.

3 HIPÓTESE

Pequenos roedores silvestres e sinantrópicos são os reservatórios que mantêm o ciclo de transmissão da *L. (V) braziliensis* na Zona da Mata de Pernambuco.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Caracterizar a infecciosidade experimental de pequenos roedores silvestres e sinantrópicos, encontrados previamente com infecção natural, para incriminação de hospedeiros reservatórios de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Estabelecer colônias de animais silvestres e sinantrópicos previamente selecionados para realização dos ensaios de infecciosidade experimental;
- b) Estabelecer colônia de flebotomíneos para realização dos xenodiagnósticos;
- c) Identificar a fauna de roedores silvestres e sinantrópicos nas áreas de estudo;
- d) Avaliar a infecção natural por *Leishmania* spp. em animais silvestres e sinantrópicos;
- e) Avaliar a infecciosidade experimental de pequenos roedores silvestres e sinantrópicos, como hospedeiros reservatórios de *L. (V.) braziliensis* para o flebotomíneo *L. longipalpis*;
- f) Isolar e caracterizar *Leishmania* spp. em amostras de lesões de militares com diagnóstico de LTA.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo experimental realizado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). Foram utilizados 60 animais (20 *Rattus rattus*, 20 *Necromys lasiurius* e 20 *Nectomys squamipe*) (Figuras 1, 2 e 3), divididos em dois grupos experimentais de 30 animais (10 *Rattus rattus*, 10 *Necromys lasiurius* e 10 *Nectomys squamipe*). Como grupo controle foi utilizado dois hamsters (*Mesocricetus auratus*) para cada grupo de dez animais da mesma espécie. Para a realização dos ensaios de infecciosidade experimental, foi estabelecida inicialmente uma colônia de animais das espécies previamente selecionadas para o estudo e uma colônia de flebotomíneos.



Figura 1 - *Rattus rattus*, roedor sinantrópico utilizado como animal experimental.
Fonte: Brandão Filho (2001).



Figura 2 - *Necromys lasiurus*, roedor silvestre utilizado como animal experimental.
Fonte: Fonte: Brandão Filho (2001).



Figura 3 - *Nectomys squamipes*, roedor silvestre utilizado como animal experimental.
Fonte: Bonvicino, Oliveira e D'Andrea (2008).

5.2 Áreas de capturas dos animais

As capturas de animais foram realizadas no Campo de Instrução Militar Marechal Newton Cavalcanti (CIMNC), localizado no município de Paudalho, Zona da Mata Norte do Estado de Pernambuco, a cerca de 40 km do Recife e na localidade de Refrigério, no município de Amaraji, Zona da Mata Sul do Estado de Pernambuco, localizado a aproximadamente 85 km do Recife (Figura 4). O CIMNC é uma unidade militar fundada em 1944 com a finalidade de servir como um centro de

instrução militar. A localidade possui 6.280 hectares de área, o clima é quente e úmido. As terras da região começaram a ser exploradas no século XVI, com o corte do pau-brasil. Em 1660, foram construídos engenhos de cana-de-açúcar e, em 1944 foi fundada no local uma unidade militar do Exército Brasileiro que tem a finalidade de servir como um campo de instrução militar. Possui um pavilhão central de comando, duas vilas com 16 casas contíguas, 14 casas de vigias posicionadas ao longo de todo o perímetro do CIMNC, oito galpões utilizados para os eventuais alojamentos de tropas em treinamento e seis áreas destinadas a treinamentos e exercícios militares. A vegetação predominante é constituída de matas secundárias, com resquícios de Mata Atlântica primitiva (Figuras 5 e 6).

O município de Amaraji possui clima quente e úmido com índice pluviométrico médio anual superior a 1.000mm e está localizado a 289m acima do nível do mar. A cobertura vegetal remanescente é classificada como floresta subcaducifólia caracterizada por árvores sempre verdes, de folhas largas, troncos relativamente delgados, densas e implantadas em solo recoberto por camada de húmus. A população total está estimada em cerca de 20.000 habitantes, cerca de 30% da população é residente na zona rural. A principal atividade econômica é a agropecuária, destacando-se a exploração da cana-de-açúcar e banana (Figuras 7 e 8).

A escolha dos locais de estudo deve-se ao fato de que Amaraji ser um dos municípios que apresenta a maior incidência de LTA nos últimos quinze anos no estado de Pernambuco. Em Refrigério, além de apresentar importante incidência de casos de LTA, foram identificadas espécies de roedores com evidências de que atuem com os reservatórios de *L. (V.) braziliensis*. O CIMNC foi escolhido por apresentar forte evidência da manutenção de um ciclo enzoótico de LTA, com a ocorrência de surtos após treinamentos militares.

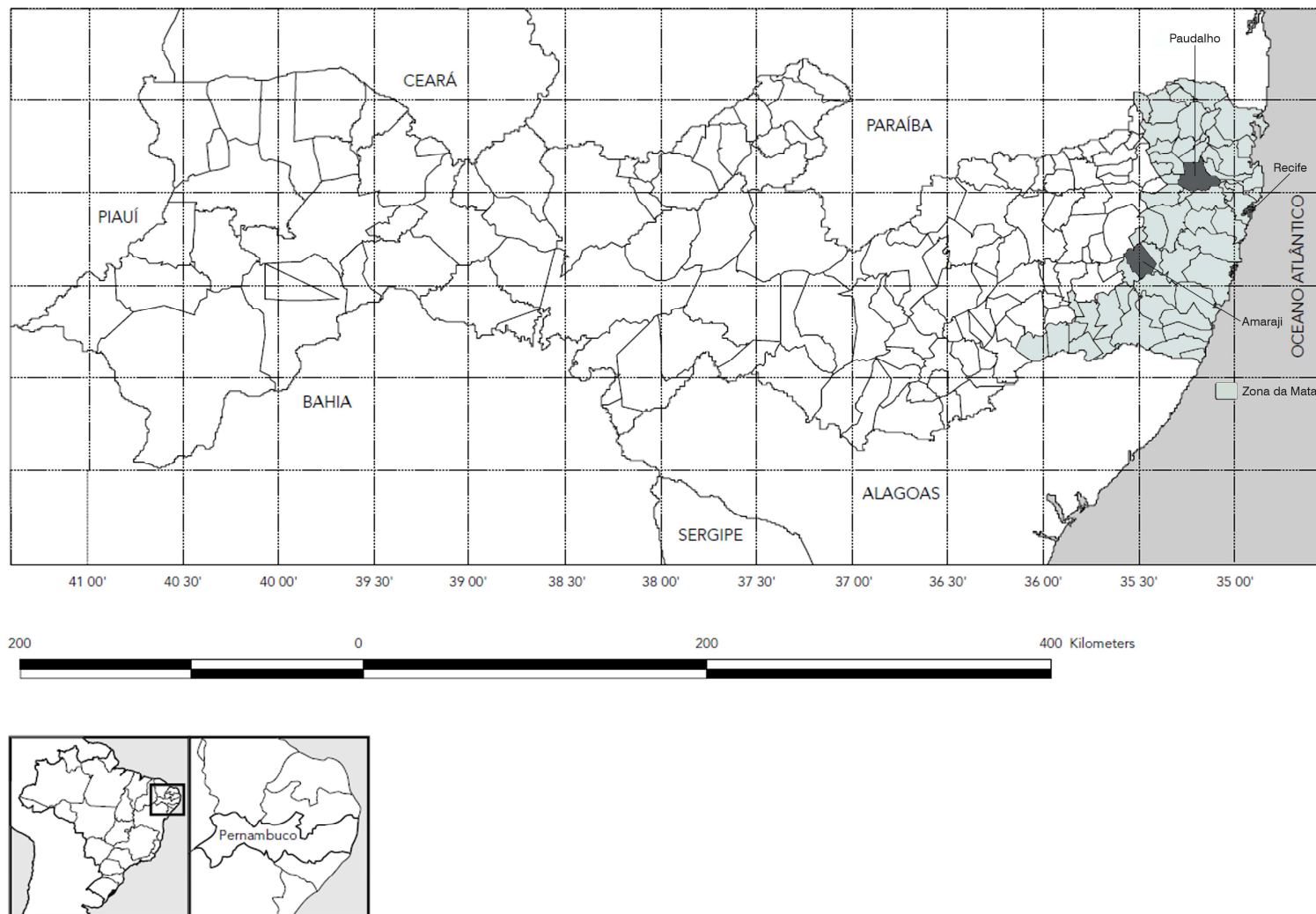


Figura 4 – Mapa geográfico com a localização dos municípios de Paudalho e Amaraji na Zona da Mata de Pernambuco.



Figura 5 – Vista panorâmica do Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti, Paudalho, Recife, Pernambuco.
Fonte: Andrade (2004).



Figura 6 – Sede do Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti.
Fonte: Andrade (2004).



Figura 7 – Habitações típicas da localidade de Refrigério, Amaraji, Pernambuco.
Fonte: Brandão Filho (2001).



Figura 8 – Vista panorâmica da localidade de Refrigério, Amaraji, Pernambuco.
Fonte: Brandão Filho (2001).

5.2.1 Capturas dos animais

Foram realizadas capturas mensais de pequenos animais silvestres e sinantrópicos com duração de cinco dias no período de fevereiro de 2007 a fevereiro de 2009. As capturas foram realizadas nos ecótopos correspondentes aos resquícios de floresta Atlântica primitiva e mata secundária, utilizando armadilhas em arame do tipo Tomahawk (Figura 9). Foram utilizadas 80 armadilhas por dia em dimensões padronizadas para pequenos animais (roedores e marsupiais).

As armadilhas eram instaladas pela manhã e, no dia seguinte, os animais capturados eram transferidos para gaiolas de transportes. Realizavam-se mudanças nas posições das armadilhas diariamente, de modo a permitir a cobertura de toda a área das localidades de estudo. Foi realizada uma identificação preliminar dos animais no campo, com base em caracteres morfológicos externos, como tamanho e forma do corpo, coloração e tipo de pelagem, além do registro das características ambientais dos locais de captura de cada espécie.

Os animais capturados foram transportados para o biotério experimental de animais silvestres em nível de biossegurança animal 3 (NA-3) do CPqAM/FIOCRUZ. Após quarentena, as espécies *Necromys lasiurus*, *Nectomys squamipe* e *Rattus rattus*, que já haviam apresentado evidências prévias de infecção natural por *L. (V.) braziliensis* (BRANDÃO FILHO, 2001), foram colonizadas no biotério para a realização dos ensaios de infecciosidade, utilizando flebotomíneos também colonizados no CPqAM/FIOCRUZ. Os demais animais foram eutanasiados para pesquisa da infecção natural, conforme relatado a seguir.



Figura 9 – Modelo de armadilha tipo Tomahawk utilizada para capturas de pequenos roedores silvestres e sinantrópicos.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.2 Eutanásia e pesquisa de infecção natural

A eutanásia dos animais foi realizada utilizando-se câmara de CO₂ (CARDOSO, 2006). De cada animal eutanasiado, foi coletado 1,5 ml de sangue e fragmentos de aproximadamente 50mg de pele (orelha), baço e fígado. Outro fragmento de baço foi coletada e imerso sequencialmente em solução salina com antibiótico (estreptomicina e penicilina) a 1% posteriormente as amostras foram maceradas e inoculadas em meio de cultivo NNN – Neal, Novy e Nicolle (WALTON; SHAW; LAINSON, 1977) modificado (3,4 ml de água destilada, 0,6 de sangue de coelho desfibrinado e 40g de blood agar base - DIFCO). As culturas foram incubadas a 24°C e observadas em intervalos de três dias, acompanhadas durante 21 dias para tentativa de isolamento de *L. (V.) braziliensis*. Todo o procedimento de eutanásia foi realizado dentro das normas (International Organization for Standardization – ISO/15189) de segurança.

Todas as amostras, exceto as de sangue, foram armazenadas para detecção de DNA do parasito através de PCR específica para *Leishmania* spp. do subgênero *Viannia* (DE BRUIJN; BARKER, 1992).

5.3 Estabelecimento da colônia de animais

Para o início da colônia, foram formados dez pares de cada espécie de animal. Os animais foram individualmente registrados e identificados. Os acasalamentos foram monogâmicos e permanentes, com cada casal contribuindo somente com um novo casal para a geração seguinte com o objetivo de assegurar a heterozigose e a frequência gênica. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas com temperatura, luz, ventilação, umidade e ruído controlados (ANDRADE, 2006; COUTO, 2006), até atingirem a idade média de 35 a 45 dias quando foram utilizados para os ensaios de infecção experimental.

5.4 Estabelecimento da colônia de *Lutzomyia longipalpis*

Com a finalidade de fornecer insetos para a realização dos ensaios de infecciosidade, foram coletados exemplares de flebotomíneos adultos no município de Passira, estado de Pernambuco. O objetivo da colônia foi o de obter somente uma geração (F1). As capturas foram realizadas utilizando armadilhas luminosas modelo CDC e armadilhas de Shannon, fazendo uso de capturadores manuais.

A espécie de flebotomíneo utilizada foi a *Lutzomyia longipalpis* e a identificação da espécie foi realizada através da análise dos caracteres da morfologia externa. Essa identificação foi posteriormente confirmada pela análise da morfologia interna por ocasião da dissecação dos insetos. A nomenclatura e classificação dos flebotomíneos seguem o método descrito por Young; Duncan (1994). Optou-se pela utilização de *L. longipalpis* devido às dificuldades que inviabilizaram o estabelecimento de uma colônia de *L. whitmani* e considerando que

L. longipalpis possui alta competência vetorial por ser considerado um vetor permissivo que se infecta com várias espécies de *Leishmânia* (KAMHAWI, 2006).

Os insetos capturados no campo foram transportados para o insetário do CPqAM no interior de gaiolas específicas, envolvidas por saco plástico contendo um chumaço de algodão embebido em água destilada. As gaiolas foram mantidas no interior de uma caixa de isopor durante o transporte. Vinte e quatro horas após a chegada ao insetário, as fêmeas capturadas foram submetidas a um repasto sanguíneo utilizando-se um hamsters (*Mesocricetus auratus*), previamente anestesiados com cloridrato de ketamina a 10% administrado, por via intramuscular.

Após o repasto, as fêmeas foram mantidas com os machos na gaiola de transporte e, após quarenta e oito horas, foram transferidas com auxílio de capturador manual, para pequenos potes de plástico de 4,5 cm de diâmetro por 4,0 cm de altura (Figura 10). Os potes menores foram acomodados em caixas maiores que comportavam em média quatro potes menores. As caixas foram mantidas em estantes no insetário com temperatura que variava de 25°C a 26°C e umidade de 70% a 80% e observadas diariamente para verificação da postura e eclosão dos adultos. Os adultos recém emergidos foram transferidos para gaiolas envolvidas por saco plástico contendo um chumaço de algodão embebido em água destilada e foram alimentados com mel de abelha diluído na proporção de 1:1 em água destilada embebidos em filetes de algodão (BRAZIL et al., 1997; GOMES BRAZIL; BRAZIL, 2000). Após sete dias da eclosão, as fêmeas foram utilizadas para realização dos ensaios de infecciosidade experimental conforme relatado a seguir.



Figura 10 – Modelo de pote plástico utilizado para manter os flebotomíneos após a realização do repasto sanguíneo.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.5 Ensaio de Infectiosidade experimental com *Necromys lasiurus*, *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus*.

5.5.1 Parasitos

Foram utilizadas formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MBOL/BR/2000/CPqAM95) isoladas de roedor (*Necromys lasiurus*) provenientes de Refrigério, Amaraji, Pernambuco, identificadas através da análise com isoenzimas e anticorpos monoclonais, caracterizada como zimodemo IOC-Z74, Variante 4, Serodemo 1 (BRANDÃO FILHO et al., 2003a; 2003b). As cepas foram mantidas em nitrogênio líquido até serem cultivadas em meio Agar Sangue Base (Difco 45), suplementado com 20% de sangue de coelho desfibrinado, como descrito por Walton, Shaw e Lainson, (1977). Sendo assim mantidas, até atingir um crescimento na ordem de $5,5 \times 10^6$ /ml no primeiro experimento e de $2,8 \times 10^5$ /ml no segundo experimento para permitir a infectividade quando inoculadas em animais. As culturas de *Leishmania* mantidas em meio definido tiveram sua infectividade testada em hamsters.

5.5.2 Infecção experimental

A infecção experimental foi realizada de acordo com protocolo adotado para verificar a suscetibilidade de *Proechimys* (*P. guyannensis*) para infecção experimental com *L. (L.) chagasi* (LAINSON; ISHIKAWA; SILVEIRA, 2002).

Foram realizados dois experimentos com grupo de 30 animais cada; no primeiro experimento, foram inoculados 10 *Necromys lasiurus*, 10 *Nectomys squamipes* e 10 *Rattus rattus*, com uma cultura na concentração de $5,5 \times 10^6$ /ml de parasitos obtida da cepa de *Necromys lasiurus*. Os inóculos foram realizados na pata posterior esquerda (0,025ml), orelha esquerda (0,025ml) e no intraperitônio (0,05ml) (Figura 11). O segundo experimento foi realizado nas mesmas condições, exceto pela concentração da cultura utilizada que foi de $2,8 \times 10^5$ /ml. Como grupos controles foram inoculados nas mesmas condições dois hamsters para cada grupo de dez animais. Os animais inoculados foram mantidos no biotério de biossegurança animal (NA3) do CPqAM/FIOCRUZ, e acompanhados diariamente para a verificação de perda de pelo, aparecimento de lesões e perda de peso. O período de observação foi de seis meses para 50% dos animais de cada grupo e de um ano para os 50% restantes.

Após o período de observação os animais foram eutanasiados e amostras obtidas de sangue, pele (orelha), fígado e baço foram processadas para detecção do parasito, conforme descrito no subitem 5.2.2. Amostras de pele, fígado e baço dos animais silvestres e sinantrópicos e animais experimentais foram processadas para detecção do DNA do parasito.



Figura 11 – Técnica de inoculação da cultura de *L. (V.) braziliensis* nos animais.
Fonte: Elaborada pela autora.

5.6 Infeciosidade experimental para os flebotomíneos (xenodiagnóstico)

Após o sétimo dia de emergência, as fêmeas de flebotomíneos eram transferidas para gaiolas convencionais para realização dos ensaios de infeciosidade. Foi utilizada uma média de 25 fêmeas de flebotomíneos para a realização do repasto sanguíneo em um animal anestesiado e previamente infectado conforme descrito no subitem 5.5.2. Os animais foram anestesiados com cloridrato

de ketamina a 10% na dosagem de 0,10ml para cada 200 gramas de peso corporal (Figura 12) e permaneceram nas gaiolas para que os flebotomíneos realizassem o repasto sanguíneo por aproximadamente 40 minutos (Figura 13).

Após o repasto, as fêmeas alimentadas foram transferidas com o auxílio de sugador manual para potes de plástico (Figura 10) acondicionados em caixas maiores. As caixas foram mantidas em estantes no insetário com temperatura que variava de 25°C a 26°C e umidade de 70% a 80%. No interior das caixas, foram mantidos chumaços de algodão levemente umedecidos em água destilada para manutenção da umidade, os insetos foram alimentados com mel de abelha diluído na proporção de 1:1 em água destilada embebidos em filetes de algodão colocados na parte superior dos potes. Os flebotomíneos foram mantidos até o sétimo dia quando se iniciava a dissecação para pesquisa de formas promastigotas através da visualização direta em microscopia ótica.



Figura 12 – Técnica de anestesia dos animais experimentais.
Fonte: Elaborada pela autora.

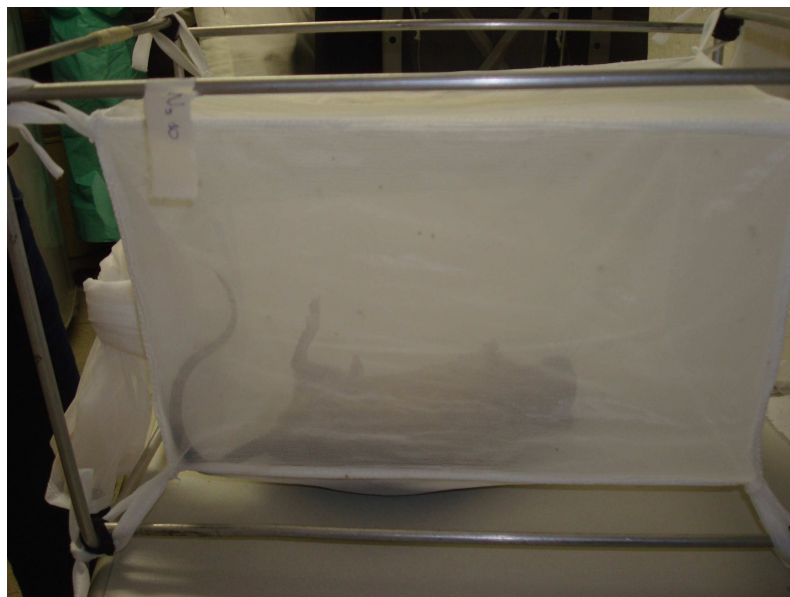


Figura 13 – Animal anestesiado em gaiola para realização do xenodiagnóstico.
Fonte: Elaborada pela autora.

5.6.1 Dissecção dos flebotomíneos

A dissecção foi iniciada no sétimo dia e concluída até o décimo dia; todos os flebotomíneos que permaneciam vivos foram dissecados. Os flebotomíneos foram submetidos à temperatura negativa; em seguida, foram lavados com soro fisiológico contendo uma gota de detergente e dissecados, utilizado-se estiletos, em lâmina de vidro, com uma gota de solução salina estéril. Após cobertos com lamínula, os espécimes foram examinados em microscópio óptico com aumento de 400 vezes, para identificação da espécie, por meio das espermatecas e observação de infecção por flagelados.

Os insetos dissecados foram colocados em tubo eppendorf para armazenamento e as lâminas que apresentavam formas sugestivas de *Leishmania* foram fixadas com metanol e coradas para posterior análise microscópica.

A identificação dos flebotomíneos foi realizada pela sistemática clássica, de acordo com Young; Duncan (1994).

Todos os flebotomíneos obtidos da infecção experimental em animais foram armazenados em tubos do tipo eppendorf e conservados a -70°C . Os flebotomíneos dissecados foram armazenados individualmente e os flebotomíneos mortos antes da

dissecção foram acondicionados em “pools” de cinco ou frações deste número e armazenados para posterior extração e amplificação de DNA.

5.7 Extração do DNA dos exemplares de flebotomíneos

Para extração do DNA de flebotomíneos utilizou-se o Illustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin kit (GE Healthcare)®, com algumas modificações. Inicialmente, foi realizada criteriosa maceração da amostra, com adição de 1 ml de PBS e centrifugação em 12.000xg durante 2 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado. Foi adicionado ao sedimento 100µl de Lysis solution 1 e ressuspenso através da homogeneização por vortex durante 15 segundos e adicionado 10µl de proteinase K e homogeneizado em vortex durante 15 segundos. O lisado foi incubado a 56°C durante 1 hora, seguida de outra incubação a 70°C durante 10 minutos. Após centrifugação a 6.000 xg por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf e adicionado 200µl etanol a 100% gelado. O sedimento foi mantido a -20°C por 18 horas, em seguida foi centrifugado a 6.500 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento, seco em temperatura ambiente. O pellet do DNA foi hidratado em 50µl de tampão TE (Tris-base 10mM, pH 8,0; Na₂EDTA-H₂O 1mM, pH 8), realizada a quantificação do DNA de todas as amostras e armazenado a -20°C até o uso.

5.7.1 Amplificação do DNA do cinetoplasto de *Leishmania* por PCR

O DNA extraído foi amplificado para o subgênero *Leishmania* (*Viannia*), utilizando-se os *primers* B1 (5´- GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG -3´) e o B2 (5´- CTA ATT GTG CAC GGG GAG G - 3´) que amplificam um fragmento de 750 pares de base da região do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA). O volume total da reação foi de 25µl, sendo composto por 2mM dNTP, 5U/µl de *Taq* DNA Polimerase, 25mM de MgCl₂ e 10 x PCR buffer e 2µl de DNA. A amplificação do DNA foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient®. A reação iniciou com uma

desnaturação a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos, cada um deles dividido em três etapas: desnaturação (94°C 30 segundos), anelamento (65°C 1,0 minuto) e polimerização (72°C 1 minuto).

Dez microlitros dos produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1% para o alvo de 750 pb corado com brometo de etídeo, marcador de peso molecular λ DNA + Hind III fragment. Os produtos da amplificação foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados com um sistema de documentação polaroid (Imaging system).

5.8 Extração do DNA dos animais experimentais

A extração do DNA de animais experimentais foi realizada utilizando-se o Illustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin kit (GE Healthcare)® de acordo com as instruções do fabricante.

5.8.1 Amplificação do DNA do cinetoplasto de *Leishmania* por PCR

A detecção de DNA foi realizada através do método de PCR, utilizando-se como alvo a região do minicírculo do kDNA com *primers* específicos para o subgênero *Viannia*, de acordo com De Bruijn; Barker (1992), os quais amplificam um fragmento de 750 pb. O produto amplificado foi estocado a 4°C até a sua análise, realizada em eletroforese em gel de agarose conforme descrito no subitem 4.7.1.

5.9 População humana

Todos os militares que participaram de treinamento no CIMNC no período de estudo foram atendidos no Hospital Militar de Área do Recife (HMAR), e encaminhados para o Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN), para a

realização dos exames de intradermoreação reação de Montenegro (IDRM) e pesquisa direta do parasito. Os militares com diagnóstico de LTA realizaram biopsias nas lesões que reuniam condições para realização das mesmas e punção aspirativa na tentativa de isolamento de *Leishmania* spp.

Amostras biológicas obtidas através de biópsias e punções aspirativas foram processadas no CPqAM/FIOCRUZ para isolamento do parasito através da inoculação do material em meio de cultivo Agar Sangue Base (Difco 45) (EVANS, 1989) e também inoculadas no peritônio de hamsters.

A identificação (tipagem) dos flagelados foi realizada através da utilização de um painel de vinte e três anticorpos monoclonais específicos (B2, B5, B12, B11, B13, B18, B19, CO1, CO2, CO3, D13, L1, L12, M2, N2, N3, V1, WA2, W1, W2, WH1, WIC e T3) (SHAW; ISHIKAWA; LAINSON, 1989).

5.10 Análise dos dados

Realizou-se a análise descritiva dos dados a partir de tabelas de distribuição de frequências. O teste qui-quadrado e o exato de Fisher foram aplicados para verificar a associação entre amostras positivos na PCR e o total de amostras testadas por espécies de roedores silvestres e sinantrópicos capturados no CIMNC.

5.11 Aspectos éticos

Foram respeitados os aspectos éticos e implicações legais, de acordo com a resolução n° 196 de 10/10/1996 do Conselho Nacional de Saúde - CSN que aprova as diretrizes e normas reguladoras da pesquisa envolvendo seres humanos. O estudo possui licença da Comissão de Ética para uso de animais (CEUA) da FIOCRUZ e licença do IBAMA e foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do CPqAM/FIOCRUZ.

6 RESULTADOS

6.1 Animais silvestres e sinantrópicos

Foram capturados 117 animais silvestres e sinantrópicos no CIMNC no período de fevereiro de 2007 a fevereiro de 2009. Os animais capturados em Refrigério foram utilizados para a formação da colônia, aqueles capturados no CIMNC foram usados para a realização da pesquisa de infecção natural e para formação da colônia de animais.

As capturas realizadas nas áreas de floresta primitiva na região do CIMNC foram caracterizadas pela dificuldade de deslocamento nas matas, observação intensa da presença de serpentes e capturas negativas. As capturas positivas foram realizadas em regiões de “várzeas”, próximas a plantações, ao açude, às vilas, às casas dos vigilantes e do pavilhão central de comando.

As espécies coletadas (Tabela 1) foram encontradas predominantemente próximo às casas dos vigias, que estão posicionadas ao longo de todo o perímetro do CIMNC, onde normalmente são mantidas pequenas plantações de banana, mandioca e cana-de-açúcar. *Rattus rattus*, *Galea spixii* e *Akodon arviculoides* foram encontrados em horta cultivada próximo a sede do CIMNC e próximos as vilas. Foi também registrada a presença de *Rattus rattus*, *Nectomys squamipes*, *Thrichomys apereoides* e *Necromys lasiurus* em região de mata primitiva próximo à “várzea”, em plantações de capim e bananeiras. 72% (84/117) dos animais foram classificados como adultos e 28% (33/117) como animais jovens. Não foi constatada diferenças significativas entre as amostras positivas na PCR e na pesquisa direta realizadas nos animais silvestres e sinantrópicos capturados no CIMNC (Tabela 2).

O DNA do parasito foi detectado através de PCR específica para *Leishmania* spp. do subgênero *Viannia* (Figura 14) de amostras coletadas de pele de 9,4% (11/117) dos animais capturados no CIMNC.

Tabela 1 - Distribuição dos animais silvestres e sinantrópicos, segundo espécies e sexo, capturados no Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti, Paudalho, Recife, Pernambuco, 2007 – 2009.

Espécie	Sexo				Total	
	Fêmea		Macho		n	%
	n	%	n	%		
<i>Rattus rattus</i>	14	23,0	14	25,0	28	24,0
<i>Nectomys squamipes</i>	12	19,0	12	22,0	24	20,0
<i>Thrichomys apereoides</i>	13	21,0	09	16,0	22	19,0
<i>Galea spixii</i>	08	13,0	08	15,0	16	14,0
<i>Akodon arviculoides</i>	05	8,0	04	7,0	09	8,0
<i>Holochilus sciureus</i>	-	-	05	9,0	05	4,0
<i>Oxymycterus angularis</i>	05	8,0	-	-	05	4,0
<i>Metachirus nudicaudatus</i>	02	3,0	01	2,0	03	2,5
<i>Oryzomys subflavus</i>	02	3,0	01	2,0	03	2,5
<i>Necromys lasiurus</i>	01	2,0	01	2,0	02	2,0
TOTAL	62	100,0	55	100,0	117	100,0

Nota:

n – número de animais

% - frequência relativa

Tabela 2 – Distribuição das espécies de roedores silvestres e sinantrópicos, coletados no Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti, Paudalho, Recife, Pernambuco, segundo a positividade de amostras de baço, fígado e pele no teste de PCR e em microscopia óptica, 2007-2009.

Espécies	Total de amostras testadas n	Amostras positivas na PCR		Amostras positivas na pesquisa direta		Teste exato de Fisher p
		n	%	n	%	
		<i>Rattus rattus</i>	28	05	17,8	
<i>Nectomys squamipes</i>	24	02	8,3	02	8,3	0,6957
<i>Thrichomys apereoides</i>	22	02	9,1	01	4,5	0,5000
<i>Galea spixii</i>	16	00	00	00	00	1,0000
<i>Akodon arviculoides</i>	09	00	00	00	00	1,0000
<i>Holochilus sciureus</i>	05	00	00	00	00	1,0000
<i>Oxymycterus angularis</i>	05	01	20,0	00	00	0,5000
<i>Metachirus nudicaudatus</i>	03	00	00	00	00	1,0000
<i>Oryzomys subflavus</i>	03	00	00	00	00	1,0000
<i>Necromys lasiurus</i>	02	01	50,0	00	00	0,5000
TOTAL	117	11	9,4	07	6,0	0,4617⁽¹⁾

Nota:

(1) Teste do Qui-quadrado

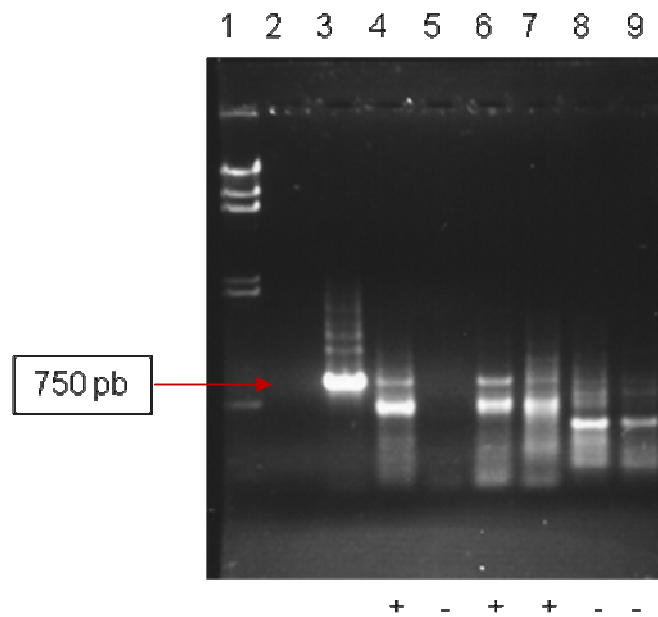


Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose corado pelo brometo de etídio, mostrando produtos amplificados a partir de primers específicos para o subgênero *Viannia*. Produtos de amplificação da PCR com os iniciadores B1/B2: 1 – Marcador de Peso Molecular, 2 – Controle negativo, 3 – Controle positivo, 4 e 6 – amostras positivas de *Necromys lasiurus*, 7- amostra positiva de *Nectomys squamipes*, animais do primeiro experimento.

6.2 Ensaios de infecciosidade experimental do primeiro experimento

Os animais submetidos ao primeiro experimento foram observados diariamente e, cerca de 40 dias após o inóculo, 90% (09/10) dos *Necromys lasiurus*, 30% (03/10) dos *Nectomys squamipes* e 20% (02/10) dos *Rattus rattus* apresentaram uma ou mais alterações caracterizadas com perda de pelo, emagrecimento ou lesões nos locais do inóculo ou na cauda.

De um modo geral, os *Necromys lasiurus* submetidos à infecção experimental apresentaram perda de pelo, lesão na orelha no local do inóculo e lesão na cauda. 02 *Necromys lasiurus* foram mortos: um morto acidentalmente durante a limpeza das gaiolas e um encontrado morto na gaiola. Dois meses após o inóculo, as lesões dos animais evoluíram para a cicatrização e remissão dos sintomas. Foi realizada a pesquisa direta de formas amastigotas do material obtido por escarificação de lesões nos locais do inóculo. Três lâminas foram consideradas positivas.

Nos espécimes de *Nectomys squamipes*, dois apresentaram lesão sugestiva de LTA na orelha esquerda. Em um animal, a lesão foi confirmada pela pesquisa direta. Todas as lesões evoluíram para cicatrização. Dois animais, que inicialmente não apresentaram alterações, aproximadamente 120 dias após o inóculo, apresentaram perda de pelo, evoluindo para dificuldade de deambular e intenso emagrecimento. Um dos animais evoluiu para agravamento dessa dificuldade associado à dispnéia e morreu aproximadamente 30 dias após o início dos sintomas. Optou-se por realizar a eutanásia do outro animal que apresentava os mesmos sintomas. Os demais animais permaneceram sem alterações.

Do total de 10 *Rattus rattus*, 01 apresentou lesão na orelha esquerda e 01 lesão na cauda. A pesquisa direta de formas amastigotas destas lesões foi positiva. A lesão de orelha de um dos animais evoluiu para a cicatrização e a lesão de cauda não cicatrizou. Os demais animais permaneceram sem alterações e foi verificado ganho de peso e crescimento dos mesmos.

Os hamsters controle permaneceram sem alterações por aproximadamente 90 dias. Após esse período, apresentaram perda de peso e edema na pata posterior esquerda, evoluindo para lesão no local do inóculo. 01 hamster que apresentava perda de peso e pequenas lesões nodulares disseminadas pelo corpo, associadas à dificuldade de locomoção e lesões na boca e focinho, foi eutanasiado 15 dias após o início das alterações, apresentando intensa hepatoesplenomegalia. 01 hamster foi encontrado morto antes da realização do xenodiagnóstico. Com exceção deste, as demais amostras foram processadas em meio de cultura e obteve-se crescimento do parasito, com visualização de promastigotas no exame microscópico.

6.2.1 Xenodiagnóstico.

Após seis meses da infecção, foi realizado o xenodiagnóstico em um total de 08 *Necromys lasiurius*, 08 *Nectomys squamipes*, 10 *Rattus rattus* e 05 hamsters controles. Do total de aproximadamente 570 fêmeas submetidas ao xenodiagnóstico, 338 foram dissecadas. Observou-se que 7,7% (26/338) apresentavam formas do parasito compatível com promastigotas em movimentos no tubo digestivo (Tabela 3). Dos 26 animais submetidos ao xenodiagnóstico, 06

apresentaram resultados positivos de infectividade no teste de PCR (Figura 14) Do total de fêmeas de flebotomíneos dissecadas, 08 exemplares foram positivas através de PCR específica para *Leishmania* spp. do subgênero *Viannia* (Tabela 4 e Figura 15).

Tabela 3 – Distribuição dos animais submetidos ao primeiro ensaio de infecciosidade, segundo a positividade da pesquisa de formas promastigotas em microscopia óptica dos flebotomíneos dissecados.

Animais Experimentais	Flebotomíneos				Total	
	Positivos		Negativos		n	%
	n	%	n	%		
<i>Necromys lasiurus</i>	19	5,6	58	17,2	77	22,8
<i>Nectomys squamipes</i>	05	1,5	75	22,2	80	23,7
<i>Rattus rattus</i>	02	0,6	179	52,9	181	53,5
TOTAL	26	7,7	312	92,3	338	100,0

Tabela 4 - Resultados do xenodiagnóstico do primeiro experimento, utilizando *L. longipalpis*, realizado em *Necromys lasiurus*, *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus* colonizados em laboratório e infectados com *L. (V.) braziliensis* na concentração de $5,5 \times 10^6$ /ml.

Identificação do animal	Total de flebotomíneos dissecados	Resultado do xenodiagnóstico (*)	Positividade da PCR (flebotomíneo)	Resultado da PCR (animais)
NI – 01	28 / 44	00/28	01/28	Negativo
NI – 02	14 / 33	02/14	02/14	Positivo ⁽⁶⁾
NI – 03	-	Animal morto	-	Negativo
NI – 04	13 / 33	08/13	02/13	Positivo ⁽¹⁾
NI – 05	05 / 25	01/05	Negativo	Negativo
NI – 06	07 / 24	03/07	01/05	Positivo ⁽⁶⁾
NI – 07	02 / 20	02/02	Negativo	Negativo
NI – 08	-	Animal morto	-	Positivo ⁽⁶⁾
NI – 09	02 / 19	01/02	Negativo	Negativo
NI – 10	06 / 22	02/06	Negativo	Negativo
Ns – 11	12 / 12	00/12	Negativo	Negativo
Ns – 12	32 / 32	00/32	Negativo	Negativo
Ns – 13	09 / 30	01/09	Negativo	Negativo
Ns – 14	-	Animal morto	-	Positivo ⁽²⁾
Ns – 15	-	Animal morto	-	Positivo ⁽⁶⁾
Ns – 16	01 / 22	01/01	Negativo	Negativo
Ns – 17	12 / 12	00/12	Negativo	Negativo
Ns – 18	09 / 09	00/09	Negativo	Negativo
Ns – 19	01 / 16	01/01	Negativo	Negativo
Ns – 20	04 / 20	02/04	01/04	Negativo
Rr – 21	32 / 32	00/32	Negativo	Negativo
Rr – 22	26 / 26	00/26	Negativo	Negativo
Rr – 23	19 / 19	00/19	Negativo	Negativo
Rr – 24	22 / 22	00/22	Negativo	Negativo
Rr – 25	06 / 22	02/06	Negativo	Negativo
Rr – 26	21 / 21	00/21	Negativo	Negativo
Rr – 27	19 / 19	00/19	Negativo	Negativo
Rr – 28	16 / 16	00/16	Negativo	Negativo
Rr – 29	12 / 12	00/12	Negativo	Negativo
Rr – 30	08 / 08	00/08	01/08	Negativo

Nota:

(*) Número de flebotomíneos positivos / total de flebotomíneos vivos dissecados após 7 dias do xenodiagnóstico

(1) Positivo em amostras de pele, fígado e baço.

(2) Positivo em amostras de pele e baço

(3) Positivo em amostras de baço.

(4) Positivo em amostras de fígado e pele.

(5) Positivo em amostras de fígado.

(6) Positivo em amostras de pele.

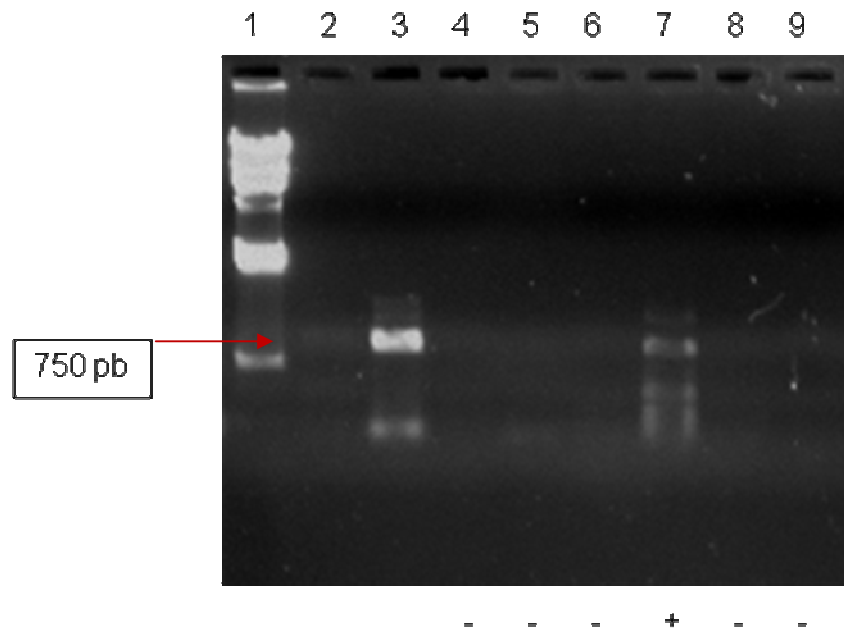


Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose corado pelo brometo de etídio, mostrando produtos amplificados a partir de primers específicos para o subgênero *Viannia*. Produtos de amplificação da PCR com os iniciadores B1/B2: 1 – Marcador de Peso Molecular, 2 – Controle negativo, 3 – Controle positivo, 7 – amostra positiva de *L. longipalpis* após xenodiagnóstico, em *Necromys lasiurus*, animal do primeiro experimento.

6.3 Ensaios de infecciosidade experimental do segundo experimento.

Os animais submetidos ao segundo experimento (10 *Necromys lasiurus*, 10 *Nectomys squamipes* e 10 *Rattus rattus*) foram observados diariamente. Até a realização do xenodiagnóstico, não apresentaram alterações. Após 03 meses de infecção, um *Rattus rattus*, morto acidentalmente, teve o parasito reisolado em cultura.

Dos seis hamsters utilizados como controle, 03 apresentaram edema na pata posterior esquerda. Em 02 desses animais, o edema evoluiu para lesão; 05 hamsters morreram aproximadamente seis meses após a inoculação, somente 01 hamster sobreviveu após a infecção e foi submetido ao xenodiagnóstico.

6.3.1 Xenodiagnóstico

Após sete meses da infecção, foi realizado o xenodiagnóstico, utilizando-se 10 *Necromys lasiurus*, 10 *Nectomys squamipes*, 09 *Rattus rattus* e 01 hamster controles. Foram utilizados para o xenodiagnóstico aproximadamente 678 fêmeas, destas, 467 foram dissecadas. Observou-se que 37,3% (174/467) das fêmeas dissecadas apresentavam estruturas em movimentos no tubo digestivo compatível com promastigotas (Tabela 5). Dos 29 animais submetidos ao xenodiagnóstico, 15 apresentaram resultados positivos na PCR (Figura 16). Do total de fêmeas de flebotomíneos dissecadas, 27 amostras foram positivas através de PCR específica para *Leishmania* spp. do subgênero *Viannia* (Tabela 6, Figuras 17 e 18).

Tabela 5 – Distribuição dos animais submetidos ao segundo ensaio de infecciosidade segundo a positividade da pesquisa de formas promastigotas, analisados em microscopia óptica após a dissecação dos flebotomíneos.

Animais Experimentais	Flebotomíneos				Total	
	Positivos		Negativos		n	%
	n	%	n	%		
<i>Necromys lasiurus</i>	80	17,1	135	28,9	215	46,0
<i>Nectomys squamipes</i>	56	12,0	85	18,2	141	30,2
<i>Rattus rattus</i>	38	8,2	73	15,6	111	23,8
TOTAL	174	37,3	293	62,7	467	100,0

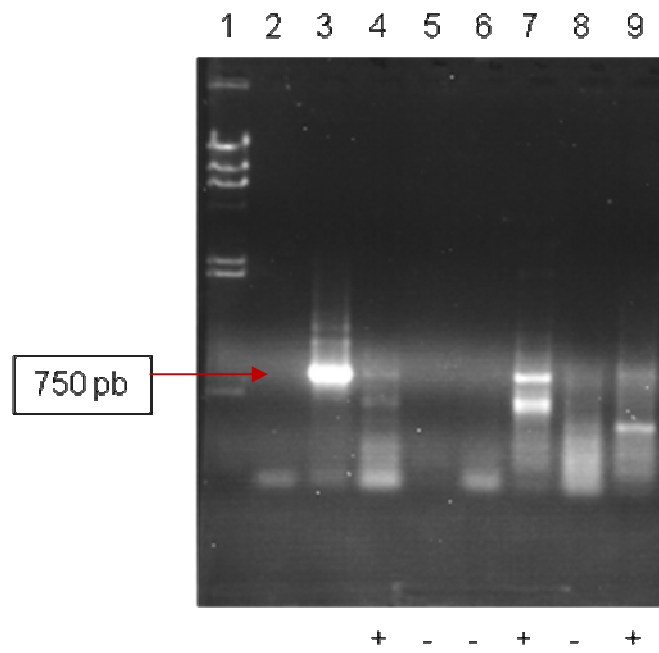


Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose corado pelo brometo de etídio, mostrando produtos amplificados a partir de primers específicos para o subgênero *Viannia*. Produtos de amplificação da PCR com os iniciadores B1/B2: 1 – Marcador de Peso Molecular, 2 – Controle negativo, 3 – Controle positivo, 4 – amostra positiva de *Nectomys squamipes*, 7- amostra positiva de *Necromys lasiurus*, 9 – Amostra positiva de *Rattus rattus*, animais do segundo experimento.

Tabela 6 - Resultados do xenodiagnóstico, do segundo experimento, utilizando *L. longipalpis*, realizado em *Necromys lasiurus*, *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus* colonizados em laboratório e infectados com *L. (V.) braziliensis* na concentração de $2,8 \times 10^5$ /ml.

Identificação do animal	Total de flebotomíneos dissecados	Resultado do xenodiagnóstico (*)	Positividade da PCR (flebotomíneo)	Resultado da PCR (animais)
Ns – 01B	28 / 32	10/28	Negativo	Positivo ⁽⁵⁾
Ns – 02B	22 / 27	09/22	01/22	Negativo
Ns – 03B	15 / 19	06/15	Negativo	Positivo ⁽¹⁾
Ns – 04B	19 / 19	13/19	Negativo	Negativo
Ns – 05B	19 / 22	09/19	01/19	Positivo ⁽²⁾
Ns – 06B	14 / 19	01/14	Negativo	Positivo ⁽⁶⁾
Ns – 07B	05 / 15	02/05	Negativo	Negativo
Ns – 08B	04 / 30	01/04	Negativo	Negativo
Ns – 09B	12 / 22	04/12	Negativo	Positivo ⁽⁶⁾
Ns – 10B	03 / 37	01/03	Negativo	Positivo ⁽⁶⁾
Rr – 11B	17 / 17	06/17	Negativo	Positivo ⁽³⁾
Rr – 12B	17 / 20	07/17	02/17	Positivo ⁽⁶⁾
Rr – 13B	21 / 21	06/21	05/21	Positivo ⁽⁶⁾
Rr – 14B	-	Animal morto	-	Positivo ⁽¹⁾
Rr – 15B	05 / 12	02/05	Negativo	Negativo
Rr – 16B	03 / 18	01/03	Negativo	Negativo
Rr – 17B	02 / 11	01/02	Negativo	Positivo ⁽⁶⁾
Rr – 18B	10 / 15	01/10	01/10	Negativo
Rr – 19B	02 / 15	00/02	Negativo	Negativo
Rr – 20B	34 / 36	14/34	Negativo	Negativo
NI – 21B	17 / 29	06/17	Negativo	Positivo ⁽⁴⁾
NI – 22B	25 / 29	05/25	03/25	Negativo
NI – 23B	25 / 29	11/25	02/25	Negativo
NI – 24B	34 / 35	11/34	11/34	Positivo ⁽⁶⁾
NI – 25B	25 / 29	09/25	01/25	Positivo ⁽⁵⁾
NI – 26B	22 / 23	11/22	Negativo	Positivo ⁽⁶⁾
NI – 27B	20 / 22	08/20	Negativo	Negativo
NI – 28B	20 / 20	08/20	Negativo	Negativo
NI – 29B	09 / 19	04/09	Negativo	Negativo
NI – 30B	09 / 17	03/09	Negativo	Negativo
NI – 31B	09 / 19	04/09	Negativo	Negativo

Nota:

(*) Número de flebotomíneos positivos / total de flebotomíneos vivos dissecados após 7 dias do xenodiagnóstico

(1) Positivo em amostras de pele, fígado e baço.

(2) Positivo em amostras de pele e baço

(3) Positivo em amostras de baço.

(4) Positivo em amostras de fígado e pele.

(5) Positivo em amostras de fígado.

(6) Positivo em amostras de pele.

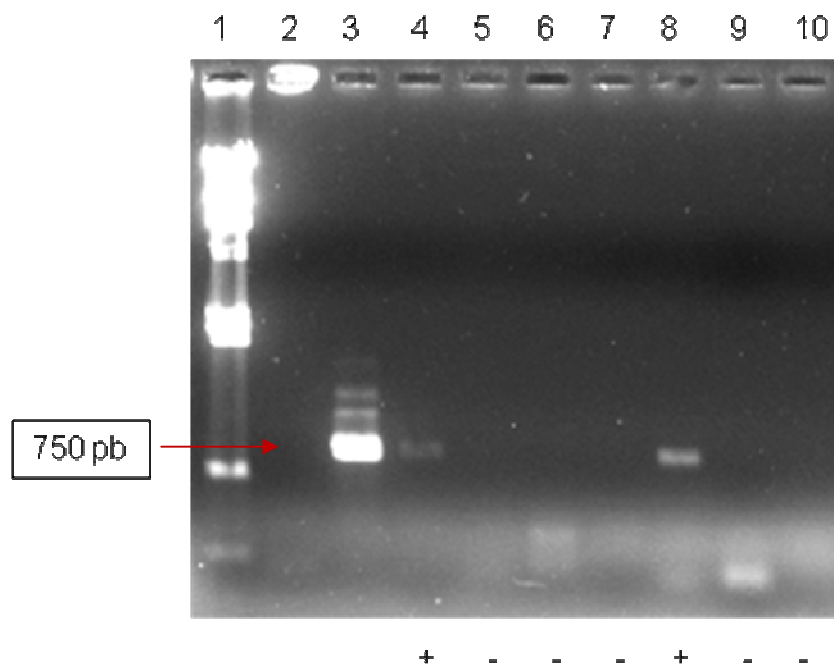


Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose corado pelo brometo de etídio, mostrando produtos amplificados a partir de primers específicos para o subgênero *Viannia*. Produtos de amplificação da PCR com os iniciadores B1/B2: 1 – Marcador de Peso Molecular, 2 – Controle negativo, 3 – Controle positivo, 4 e 8 – amostras positivas de *L. longipalpis* após xenodiagnóstico em *Necromys lasiurus* e *Rattus rattus*, animais do segundo experimento.

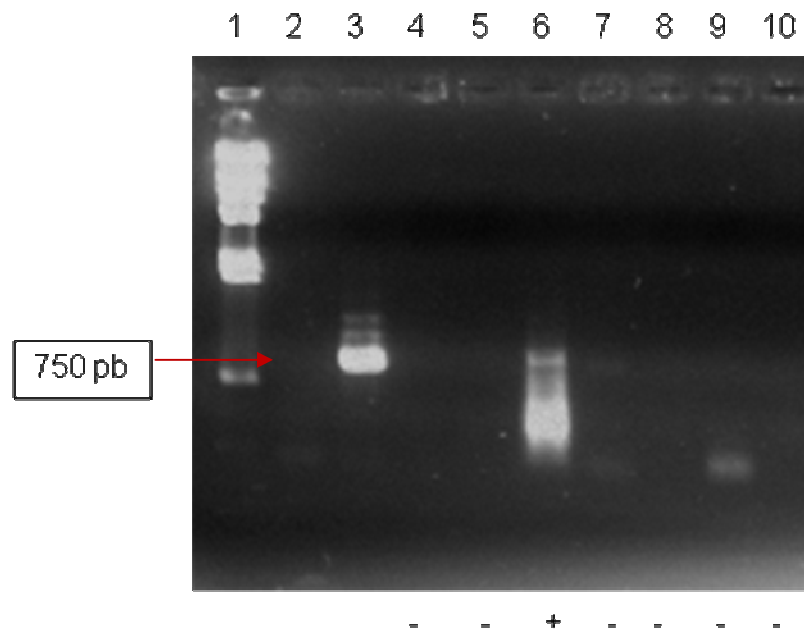


Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose corado pelo brometo de etídio, mostrando produtos amplificados a partir de primers específicos para o subgênero *Viannia*. Produtos de amplificação da PCR com os iniciadores B1/B2: 1 – Marcador de Peso Molecular, 2 – Controle negativo, 3 – Controle positivo, 6 – amostra positiva de *L. longipalpis* após xenodiagnóstico em *Nectomys squamipes*, animal do segundo experimento.

6.4 População humana

De janeiro de 2006 a março de 2010, foram confirmados 74 casos de LTA em militares que participaram de treinamentos no CIMNC. Todos os casos foram diagnosticados pelos critérios clínico, epidemiológico e laboratorial. 100% foram positivos ao teste de IDRMC com resultados variando de 6 a 23 mm de endurecimento. O exame parasitológico direto foi positivo em 45,95% (34/74).

O período de incubação médio da doença foi de 33,6 dias, 89,19% (66/74) dos militares apresentavam lesão única e 6,76% (05/74) duas lesões. As lesões variaram de 0,3 a 2,5 cm de diâmetro e localizavam-se nas regiões da face, pavilhão auricular, mãos, região do braço e antebraço, punho, pescoço.

Das 25 biopsias e punções aspirativas de lesões, obteve-se 12 isolados de formas compatíveis com *Leishmania* spp., que foram identificadas como *Leishmania (V.) braziliensis* através de anticorpos monoclonais e caracterizadas por eletroforese de isoenzimas. As amostras de *L. (V.) braziliensis* apresentaram perfil de reconhecimento antigênico similar em relação aos anticorpos monoclonais utilizados

e foram agrupadas no sorodemo 1. A caracterização das amostras por perfis de mobilidade eletroforética com isoenzimas revelou três novas variantes de *L. (V.) braziliensis* e foram agrupadas no zimodemo 105, 26 e 75 (Tabela 7).

Tabela 7. Caracterização de *Leishmania* spp. através de isoenzimas e anticorpos monoclonais das amostras isoladas de pacientes com LTA que realizaram treinamento no CIMNC, Zona da Mata de Pernambuco, Brasil.

N°	Código	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	
		Caracterização	
		Isoenzimas	Monoclonais
01	MHOM/BR/02/JCS	IOC / Z -105	Sorodemo 1
02	MHOM/BR/02/OCL	IOC / Z - 26	Sorodemo 1
03	MHOM/BR/02/LRPS	...	Sorodemo 1
04	MHOM/BR/02/DVF	IOC / Z - 75	Sorodemo 1
05	MHOM/BR/02/HBO	IOC / Z - 75	Sorodemo 1
06	MHOM/BR/02/MVRGR	IOC / Z - 75	Sorodemo 1
07	MHOM/BR/02/JSB	...	Sorodemo 1
08	MHOM/BR/02/RFM	...	Sorodemo 1
09	MHOM/BR/02/LIS	IOC / Z - 27	Sorodemo 1
10	MHOM/BR/02/CEN	IOC / Z - 75	Sorodemo 1
11	MHOM/BR/02/CM	IOC / Z - 75	Sorodemo 1
12	MHOM/BR/02/MACP	IOC / Z - 75	Sorodemo 1

7 DISCUSSÃO

A LTA tem grande relevância como problema de saúde pública no Brasil, devido ao aumento da incidência e distribuição geográfica, ao potencial de urbanização da doença e à maior prevalência dos casos em populações em situação de pobreza e com maior dificuldade de acesso aos serviços de assistência à saúde. Outros fatores importantes são as dificuldades com o tratamento, ausência de vacinas humanas e a necessidade do estabelecimento de medidas de controle mais efetivas.

Estima-se que cerca de 185 milhões de pessoas no mundo estão sob o risco da infecção, com a ocorrência de 295.900 casos novos anuais, destes 59.300 ocorrem nas Américas (ASHFORD; DESJEUX; RAADT, 1992). Casos autóctones de LTA são verificados em todos os estados brasileiros. Considerando as notificações dos últimos dez anos (1995 a 2005), registra-se, anualmente, uma média de 32.405 casos no Brasil, 70% destes ocorrem no Norte e Nordeste (BRASIL, 2007). Em Pernambuco, a média de registros da doença, nos últimos dez anos (1995 a 2005) foi de 772 casos notificados (PERNAMBUCO, 2010). Verifica-se um aumento na expansão geográfica e incidência da doença, especialmente para o agreste e sertão. No entanto, a maior prevalência de casos de LTA ainda é registrada na Zona da Mata (BRANDÃO FILHO, 2001).

A Zona da Mata apresenta determinantes históricos, sociais e ambientais que favorecem a persistência e a difusão da LTA. Esta região em Pernambuco foi a primeira a ser explorada economicamente, ainda na primeira metade do século XVI. No início, através da extração e comercialização do pau-brasil e, posteriormente, com o cultivo massivo da cana-de-açúcar e a implantação dos engenhos para a produção do açúcar. A produção açucareira permanece sendo a principal atividade econômica da região, que apresenta um quadro social em que se evidencia a pobreza e a falta de oportunidades, ampliadas pelo uso predatório dos recursos naturais, crescimento urbano desordenado e o baixo investimento em políticas públicas com a finalidade de promover o desenvolvimento humano. Esses fatores, associados à alta prevalência da doença nessa região, tornam as medidas de controle e prevenção da ocorrência de casos um grande desafio.

A doença na região é mais prevalente em indivíduos do sexo masculino e com idade superior a 20 anos (BRASIL, 2008; BRANDÃO FILHO, 2001), o que sugere um padrão de transmissão ocupacional, embora seja verificada a adaptação do ciclo de transmissão ao ambiente peridomiciliar, tendo em vista que se observa a incidência da doença em todas as faixas etárias, independente de gênero (BRANDÃO FILHO et al., 1999, BRANDÃO FILHO, 2001).

Este estudo teve como objetivo geral avaliar se pequenos roedores silvestres e sinantrópicos encontrados previamente com infecção natural na região da Zona da Mata de Pernambuco (BRANDÃO FILHO, 2001; BRANDÃO FILHO et al., 2003a, 2003b) são categoricamente infectivos para flebotomíneos, para comprovar espécies como os reservatórios que mantêm o ciclo de transmissão da *L. (V) braziliensis* na Zona da Mata de Pernambuco. Os resultados obtidos apontam para a participação de *Necromys lasiurus*, *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus* como fontes de infecção e prováveis reservatórios de *L. (V.) braziliensis* nesta região.

Partindo do princípio de que a compreensão da dinâmica da ocorrência e expansão de doenças relacionadas a reservatórios silvestres está, em geral, vinculada ao conhecimento da biologia das espécies de animais reservatórios envolvidas na transmissão da doença e em particular, dos fatores que envolvem seus hábitos, sua reprodução e eventuais aumentos populacionais, e, ainda, sua distribuição e adaptação no espaço geográfico, as capturas dos animais silvestres e sinantrópicos realizados no CIMNC foram mais prevalentes nos locais em que a ação humana exerceu algum tipo de alteração sobre o meio ambiente. As atividades humanas provocam alterações no ecossistema, interferindo em seu funcionamento natural ou, ainda, provocando alterações que levam a novos equilíbrios, diferentes dos que existiam anteriormente (TOMMASI, 1979).

No CIMNC, *Necromys lasiurus* foram capturados em capinzal circundado por floresta primitiva e em áreas cultivadas. Esses animais têm hábitos terrestres. Habitam formações abertas e florestais do Cerrado e da Mata Atlântica. Encontram-se distribuído no leste do estado do Pará, em todos os estados da região Nordeste, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, norte do Rio Grande do Sul, sudoeste de Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins e Minas Gerais (BONVICINO; OLIVEIRA; D'ANDREA, 2008).

As espécies de *Nectomys squamipes* foram coletadas em áreas de "várzea", regiões próximas ao açude ou áreas alagadas, próximas a córregos, esse animal é

considerados semiaquático. Encontram-se amplamente disseminados no Brasil, habitam formações florestais da Mata Atlântica e da Floresta Amazônica, além de matas de galeria do Cerrado, da Caatinga e do Pantanal. Ocorrem do estado de Pernambuco ao norte do Rio Grande do Sul e nas bacias dos rios São Francisco, Paraíba do Sul e Paraná (BONVICINO; OLIVEIRA; D'ANDREA, 2008).

As capturas de *Rattus rattus* foram registradas em locais que sofreram a ação do homem, como em pequena áreas de cultivo, mesmo quando essas se encontravam circundadas por áreas de vegetação primitiva, ou nos locais próximos à sede, às casas das vilas ou dos vigias do CIMNC, e também em áreas que se limitam com a cidade de Araçoiaba, Pernambuco. Os *Rattus rattus* são originalmente do Velho Mundo, introduzidos pela colonização Européia; têm hábito de viver em lugares secos, próximo a habitações humanas, armazéns de grãos e entre pavimentos (WOODS; KILPATRICK, 2005). O *Rattus rattus* é registrado em todos os estados do Brasil, geralmente encontrados próximos às habitações humanas, sendo mais raros registros mais distantes de habitações, em geral próximos a estradas por onde são transportados grãos que lhe podem servir de alimento (BONVICINO; OLIVEIRA; D'ANDREA, 2008). Situação semelhante registrada no CIMNC, onde os mesmos foram também encontrados longe de habitações humanas, nas proximidades de pequenas plantações de subsistência.

Todos os animais coletados não apresentaram lesões ou evidências clínicas da doença LTA, apesar da positividade de onze espécies através de PCR e microscopia óptica. A hipótese de que espécies de *Leishmania* em seu *habitat* primitivo teriam se adaptado ou estariam se adaptando a animais ali existentes, inclusive domésticos, e que, essa adaptação poderia atingir um estado de equilíbrio no qual os hospedeiros passariam a desempenhar a função de reservatório do parasito (FORATTINI, 1960) é reforçada pela observação de que, entre animais silvestres, a infecção tende a ser benigna e inaparente, sugestiva de uma relação equilibrada resultante de uma antiga associação entre hospedeiro e parasito (LAINSON; SHAW, 1987).

Das dez espécies capturadas, neste estudo, as mais prevalentes foram *Rattus rattus*, *Nectomys squamipes* e *Thrichomys apereoides*. Amostras extraídas de pele, das espécies *Rattus rattus*, *Nectomys squamipes*, *Thrichomys apereoides*, *Necromys lasiurus* e *Oxymycterus angularis*, consideradas positivas, através da técnica de PCR específicas para o gênero *Leishmania*, subgênero *Viannia*. Em

estudo longitudinal realizado em Amaraji, Zona da Mata Sul do estado de Pernambuco, das onze espécies capturadas, as mais prevalentes foram *Nectomys squamipes*, *Necromys lasiurus* e *Rattus rattus*. Diferente do CIMNC, não foi verificada ocorrência de outras espécies encontradas no CIMNC, como *Thrichomys apereoides*. Amostras extraídas de baço das espécies *Nectomys squamipes*, *Necromys lasiurus* e *Rattus rattus* foram positivas na pesquisa direta e em PCR específicas para o gênero *Leishmania*, subgênero *Viannia* (BRANDÃO FILHO, 2001; BRANDÃO FILHO et al., 2003; BRANDÃO FILHO; SHAW, 2006; OLIVEIRA et al., 2005). Estudo realizado em um espécime de coleção do museu nacional, o roedor *Thrichomys apereoides*, coletado em 1953 na região da serra de Baturité, no estado do Ceará, demonstrou, através da PCR, a presença de DNA de *L. amazonensis* (CANTARINO, 1998). A competência de *Thrichomys laurentius* como hospedeiro que apresenta evidências na manutenção da infecção por *L. (V.) braziliensis* foi verificado por Roque et al (2010) em estudo de infecção experimental realizado no Rio de Janeiro. Mais estudos sobre a infecciosidade de *Thrichomys* spp. são necessários para a comprovação categórica do papel dessa espécie na transmissão de *Leishmania braziliensis*. Não foram encontrados registros na literatura da detecção de DNA através de PCR específicas para o gênero *Leishmania*, subgênero *Viannia* em *Oxymycterus angularis*.

No Ceará, três isolados em cultura foram obtidas a partir de *Rattus rattus*. Os isolados foram caracterizados por eletroforese de isoenzimas e hidridização com sondas de DNA específicas para *Leishmania*. As amostras foram identificadas com evidências para *L. (Viannia) braziliensis* (VASCONCELLOS et al., 1994).

O índice médio de 9,4% de detecção de *Leishmania* por PCR em fragmentos de amostras de pele, fígado e baço dos animais silvestres e sinantrópicos foi menor se comparado com o índice médio de 17,6%, obtidos em Amaraji, Pernambuco, em espécies de roedores e marsupiais (BRANDÃO FILHO, 2001; BRANDÃO FILHO et al., 2003a) e similares aos obtidos em estudos realizados em áreas endêmicas para *L. chagasi* (10,8%) na Colômbia (TRAVI et al., 1998) e para *L. peruviana* (5,4%), na região dos Andes no Peru (LLANOS-CUENTAS et al., 1999).

A colônia de animais experimentais produziu animais suficientes para atender às necessidades de quantidade, condições sanitárias adequadas e espécies necessárias para cada experimento. Por se tratar de material biológico vivo, deve-se garantir a integridade física dos animais, levando-se em consideração as

contaminações microbiológicas, a genética, a nutrição e a correta manipulação, a fim de evitar que ocorram conclusões inválidas nos experimentos ou que se aumente desnecessariamente o número de animais utilizados (POLITI; PIETRO; SALGADO, 2008). Neste estudo, a perda de animais por manipulação foi de 3,33% (02/60). A morte de dois animais do primeiro experimento que apresentaram alterações clínicas importantes deveu-se provavelmente à carga parasitária alta, inoculada nesses animais. A preservação dos animais do segundo experimento permite concluir que a concentração da cultura utilizada neste experimento foi a mais adequada, apesar de que o número de promastigotas utilizados nas inoculações desses animais possivelmente é superior àquela que permite a infectividade em animais na natureza.

O emprego de animais de laboratório em conjunto com o conhecimento sobre o padrão de transmissão das doenças permite a compreensão de processos fisiológicos e patológicos importantes (POLITI; PIETRO; SALGADO, 2008). Além disso, os resultados de estudos experimentais possibilitam uma melhor compreensão do padrão de produção das doenças em um contexto mais simples do que a complexidade das interações que ocorrem na natureza.

Para manter a qualidade sanitária no estabelecimento de uma colônia de animais, diversos aspectos devem ser considerados, como o tempo de quarentena, a realização de exames microbiológicos nos animais, o modo de transporte, o sistema de barreiras de segurança e a padronização das condições de manutenção e de experimentação (HESLLER; MORELAND, 1984; INTERNATIONAL VETERINARY INFORMATION SERVICE, 2003). Neste estudo, as medidas rigorosas de higiene e controle parasitológicos associadas à quarentena dos animais provenientes do campo e a utilização dos micro e macroisoladores como sistema de barreiras podem ter sido determinantes no estado de saúde dos animais e consequente sucesso dos experimentos.

As cepas utilizadas nos ensaios experimentais apresentaram um rendimento na ordem de 10^7 flagelados/ml no primeiro experimento e de 10^5 flagelados/ml no segundo experimento alcançando, portanto, uma população suficiente para permitir hipoteticamente a infectividade quando inoculados em animais. A infectividade foi ainda comprovada com os resultados obtidos nos hamsters controle, que apresentaram culturas e lâminas de amostras de baços positivas. Para o diagnóstico, o método mais específico para LTA consiste no isolamento em cultura,

sendo o hamster o mais utilizado para o isolamento *in vivo*, por apresentar elevada sensibilidade e alta especificidade (WEIGLE et al., 1987).

A *L. (V.) braziliensis* foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita e incriminada como agente etiológico da LTA. Apesar da importância da *L. (V.) braziliensis*, alguns aspectos de seu ciclo de transmissão ainda não estão totalmente caracterizados, até porque, sua epidemiologia e ecologia assumem características bastante diversas conforme a área geográfica de ocorrência de transmissão da infecção. A doença associada a essa espécie também é a mais prevalente, com maior abrangência no território brasileiro, sendo caracterizada pela diversidade de manifestações clínicas, limitações de tratamento, diversidade de vetores e o pouco conhecimento sobre os reservatórios primários e secundários envolvidos na manutenção de ciclos de transmissão silvestre e peridoméstico. Esse conjunto de fatores torna o controle da doença um grande desafio.

A utilização de *L. longipalpis* nos ensaios experimentais não compromete os resultados, uma vez que esse flebotomíneo é considerado um vetor permissivo que apresenta adaptações evolutivas que permitem o desenvolvimento de várias espécies de *Leishmania*. Ressalta-se, no entanto, que a classificação dos flebotomíneos em vetores permissivos e vetores específicos é uma simplificação da verdadeira complexidade da interação dos vetores com os parasitos e que alguns vetores poderiam apresentar padrões intermediários de interações, possibilitando o desenvolvimento de algumas espécies de *Leishmania* (VOLF; MYSKOVA, 2007).

A capacidade de propagação de *Leishmania* nos vetores permissivos é devido a diversas adaptações evolutivas dos mesmos, incluindo a secreção de lipofosfoglicano (LPG), que protege o parasita de enzimas digestivas, a produção de quitinases, que degradam a válvula estomodeal do flebotomíneo, a secreção de um neuropeptídeo que detém o peristaltismo do intestino médio e intestino posterior, e permite a fixação da *Leishmania* no intestino do vetor, evitando a expulsão do mesmo e garantindo que o parasito complete o seu ciclo de vida, na sua sobrevivência e propagação (KAMHAWI, 2006).

A transmissão de *Leishmania* por espécies de flebotomíneos diferentes daqueles associados aos ciclos enzoóticos selvagens podem ocorrer. Os vetores permissivos (VOLF; MYSKOVA, 2007) podem se infectar a partir de um mamífero contaminado, podendo assumir a função do vetor clássico, especialmente em áreas em que ocorrem a doença e os vetores classicamente incriminados não são

detectados. No Brasil, a *L. longipalpis* é um potencial vetor de outras espécies de *Leishmania*, tais como *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* (SHAW, 2007). Recentemente, foram encontrados *L. flaviscutellata* infectadas com *L. (V.) guyanensis* (FOUQUE et al., 2007) e infecções de *L. (L.) amazonensis* foram encontradas em cães de uma região onde predominam casos de LV e onde o principal vetor é *L. longipalpis* (TOLEZANO et al., 2007), o que sugere que a *L. longipalpis* tem potencial de transmitir mais de uma espécie de *Leishmania*. Esses achados demonstram que as infecções em mamíferos e flebotomíneos não estão seguindo o padrão clássico dos ciclos enzoótico silvestres. No Brasil, existem registros de casos humanos de LV em áreas consideradas não endêmicas. Na cidade de São Paulo, o registro de um caso autóctone de LV em criança e a identificação de mais seis crianças sororreagentes é particularmente importante por não ter sido encontrada *L. longipalpis* na região (IVERSSON et al., 1982). Em Cotia, São Paulo, um gato naturalmente infectado com *L. chagasi* foi encontrado e, até o momento, *L. longipalpis* não foi encontrado na região (SAVANI et al., 2004). Em Pernambuco, em área endêmica de leishmaniose tegumentar e visceral, *L. migonei* foi o flebotomíneo que apresentou maior densidade populacional, não tendo sido registrada a presença de *L. longipalpis* (CARVALHO et al., 2007). Esses achados sugerem que mais estudos epidemiológicos e experimentais são necessários para confirmar a transmissão da doença em locais onde os vetores aceitos estão ausentes, mas ocorrem casos clínicos.

Deve-se considerar, ainda, que as condições necessárias para a manutenção de todas as espécies de *Leishmania* são bastante semelhantes. Algumas espécies de mamíferos são hospedeiros reservatórios de mais de uma espécie de *Leishmania* e muitas espécies podem se infectar e até produzir lesões. Os flebotomíneos que se domicíliam podem tornar-se vetores de leishmaniose visceral e cutânea e outras espécies de flebotomíneos, que até o momento não são aceitas como vetoras de determinado tipo de *Leishmania* podem estar atuando como tal (ASHFORD, 1996).

O primeiro relato que evidenciou a importância dos roedores na epidemiologia da LTA foi feito em 1957, por Hertig, no Panamá, onde se detectou *Leishmania* sp. a partir de hemocultura em 10% dos 110 exemplares de *Proechimys semispinosus* e *Hoplomys gymminurus*, que não apresentavam nenhuma lesão aparente. Forattini et al., (1960, 1972, 1973) conseguiram demonstrar infecção de roedores por isolamento do parasito em cultura de sangue e pele.

A LTA associada a *L (V.) braziliensis* vem assumindo características distintas no decorrer do tempo nos diferentes biomas do País. O parasito tem sido demonstrado em alguns mamíferos silvestres e sinantrópicos, entre os quais, roedores de diferentes gêneros, como *Akodon* (FORATTINI et al., 1972), *Proechimys* (LAINSON; SHAW, 1973), *Rattus* (BRANDÃO FILHO et al., 1994; VASCONCELLOS et al., 1994), *Oryzomys* (FORATTINI et al., 1972, 1973; LAINSON; SHAW, 1969), *Rhipidomys* (LAINSON et al., 1981), *Nectomys* e *Necromys* (BRANDÃO FILHO et al., 1994) e em marsupial *Didelphis* (BRANDÃO FILHO et al., 1994; LAINSON; SHAW, 1973). As amostras encontradas nestes animais, contudo, não foram identificadas e caracterizadas categoricamente como *Leishmania*, tendo sido relatadas apenas como base nas características morfológicas e no comportamento do parasito em meio de cultivo *in vitro* ou *in vivo*.

Além dos relatos do parasito em animais silvestres e sinantrópicos, devem-se considerar também os numerosos registros de infecção por *Leishmania* em animais domésticos como cães (*canis familiaris*), equinos (*Equus caballus*) e, mais raramente, em gatos. Esses registros têm ocorrido em diversas regiões rurais e periurbanas do Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina. Considerando que a transmissão da LTA tem crescido no ambiente doméstico, associado aos registros de infecção nesses animais, fortalece-se a suspeita de que os mesmos poderiam atuar como reservatórios secundários de *Leishmania* sp (REITHINGER; ESPINOZA; DAVIES, 2003). Os cães (*Canis familiaris*) têm sido apontados como reservatórios secundários, responsáveis pela manutenção do ciclo doméstico de LTA em região endêmica de Viana, Zona da Mata do Espírito Santo, Sudeste do Brasil (FALQUETO et al., 1986, 1991). Por outro lado, estudos com *L. whitmani* em cães infectados revelaram que o inseto infectava-se com *L. braziliensis*, quando alimentados em lesões ulceradas, no entanto, não se infectavam, quando alimentados em pele íntegra (VEXENAT; BARRETTO; ROSA, 1986). Resultados semelhantes foram obtidos por Pirmez et al. (1988), que não conseguiram isolar o parasita da pele normal de cães infectados. O papel destes animais como reservatórios das espécies de *Leishmania* e a participação dos mesmos na transmissão da LTA permanecem inconclusivos.

A diversidade de espécies verificadas no gênero *Leishmania*, nos reservatórios invertebrados e vertebrados, reflete a complexidade da doença e as dificuldades de controle e reafirma a necessidade de estudos relacionados à

ecoepidemiologia da doença. O conhecimento dos reservatórios de *L. (V.) braziliensis* deve contribuir para o estabelecimento da história natural da LTA relacionada a essa espécie do parasito, favorecendo as ações preventivas necessárias para o controle da LTA. Neste estudo, foi considerado um conjunto de critérios estabelecidos na literatura, para a incriminação de uma espécie animal como reservatório de uma doença.

Para determinar uma espécie de vertebrado como reservatório, alguns parâmetros deverão ser observados, tais como identificar os reservatórios vertebrados na área de transmissão da doença, estabelecer o *status* taxonômico correto, caracterizar a prevalência e a distribuição geográfica do animal, identificar e caracterizar o parasito dentro da área de distribuição do hospedeiro, verificar se a espécie é infecciosa para o vetor (ASHFORD, 1996).

A identificação de infecção natural em *Necromys lasiurus*, *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus*, neste estudo, associada às pesquisas prévias em Amaraji, Pernambuco, nas quais foi realizado o isolamento e identificação de amostras de *L. (V.) braziliensis* em *Necromys lasiurus* e *Rattus rattus*, e a detecção de infecção natural em *Nectomys squamipes* (BRANDÃO FILHO, 2001; BRANDÃO FILHO et al., 2003a, 2003b), reforçam a hipótese de que esses animais são reservatórios de *L. (V.) braziliensis*.

A caracterização taxonômica do animal foi realizada com base em caracteres morfológicos externos. Ressalta-se, no entanto, que essa caracterização ainda é considerada uma tarefa difícil, dada a grande diversidade de espécies (WOODS; KILPATRIK, 2005) e as lacunas no conhecimento taxonômico ainda persistentes, relacionados aos roedores encontrados no Brasil (BONVICINO; OLIVEIRA; D'ANDREA, 2008). As espécies mais prevalentes encontradas em Amaraji foram *Nectomys squamipes*, *Necromys lasiurus* e *Rattus rattus*, representando, respectivamente, 33,2%, 22,4% e 17,6%, em capturas realizadas em um período de aproximadamente dois anos (BRANDÃO FILHO, 2001). No CIMNC, os animais mais prevalentes foram *Rattus rattus* (24,0%) e *Nectomys squamipes* (20,0%), as capturas de *Necromys lasiurus* não foram expressivas, representando apenas 2,0% do total de animais capturados.

A identificação e caracterização de *L. (V.) braziliensis* como a espécie circulante no CIMNC é bastante consistente neste estudo, visto que o parasito foi isolado de lesões de doze pacientes (Apêndice 1), confirmando a circulação dessa

espécie, que havia sido isolada anteriormente no CIMNC em sete pacientes e em um hamster sentinela (ANDRADE et al., 2005a). Em Amaraji, o parasito já foi isolado de pacientes, hamster sentinela, vetores, animais silvestres e sinantrópicos (BRANDÃO FILHO, 2001; BRANDÃO FILHO et al., 2003a, 2003b). Esses resultados são bastante significativos diante da reconhecida dificuldade de cultivo, isolamento e manutenção deste parasito (CUBA CUBA et al., 1985)

A capacidade dos animais em transmitir o agente infeccioso para os vetores e manter a sobrevivência do parasito no animal vertebrado foi demonstrada nas espécies estudadas através dos resultados alcançados neste estudo, demonstrados na detecção de *Leishmania* na pesquisa direta, através da dissecação de flebotomíneos submetidos ao xenodiagnóstico, na positividade da PCR específica para *Leishmania* spp. do subgênero *Viannia* nos flebotomíneos e em fragmentos de baço, fígado e, especialmente, em pele dos animais experimentais. Os resultados obtidos no desenvolvimento deste estudo indicam que a hipótese inicial formulada de que pequenos roedores silvestres e sinantrópicos são os reservatórios que mantêm o ciclo de transmissão da *L. (V.) braziliensis* na Zona da Mata de Pernambuco foi confirmada.

Os animais experimentais suportaram bem a infecção artificial, mesmo considerando que a carga parasitária inoculada foi alta. Nos ensaios de infecciosidade *Necromys lasiurus*, foi o animal que apresentou a maior capacidade de reprodução da infecciosidade experimental. Esse animal foi apontado como reservatório primário de *L. (V.) braziliensis* na Zona da Mata Sul do estado de Pernambuco (BRANDÃO FILHO, 2001), através do isolamento e identificação de amostras desse parasito através de métodos classicamente aceitos para identificar e caracterizar *Leishmania* spp.

Na determinação do padrão de transmissão, é importante considerar as particularidades regionais associadas à ecologia da área endêmica, utilização do meio ambiente pelo homem, os diferentes padrões de virulência das subpopulações de parasitos e as diferentes populações de hospedeiros e vetores. Outro aspecto importante a ser considerado diz respeito às espécies de mamíferos silvestres sinantrópicos.

O conjunto desses fatores pode influenciar o caráter infectivo das espécies de reservatórios de um local para outro, determinando padrões de transmissão peculiares a cada área endêmica, o que nem sempre permite extrapolar dados de

uma região para outra. Algumas áreas endêmicas, no entanto, apresentam características semelhantes, o que possibilita comparações entre os ciclos de transmissão da doença.

Embora estes conceitos sejam amplamente aceitos, ainda não foram incorporados de fato, uma vez que a maioria dos estudos que abordam reservatórios são, ainda, apenas verticais, não levando em consideração o cenário ecológico. Um estudo sobre reservatórios sem esta visão tem alta probabilidade de resultar em conclusões equivocadas, mesmo porque apenas a presença de uma determinada espécie infectada por um parasito não é suficiente para defini-la como reservatório. Nesse sentido, estudos sobre infecção experimental de espécie que possam atuar como reservatório de um determinado parasito esclarece pontos importantes na complementação do quadro epidemiológico. Nas regiões de estudo, as evidências encontradas em diversas pesquisas realizadas (ANDRADE et al., 2005a, 2005b; BRANDÃO FILHO, 2001; BRANDÃO FILHO et al., 2003a, 2003b) que caracterizaram o perfil ecoepidemiológico da transmissão da LTA, relacionado aos parasitos (Apêndice 1), associado à expressão da doença na população humana (Apêndice 2), permitem reafirmar que esses pressupostos foram considerados nas conclusões deste estudo.

Outro aspecto importante a ser considerado é a utilização da técnica de PCR, considerada altamente sensível e específica, devido à capacidade de detectar pequenas quantidades do DNA do parasito em diversas amostras, sendo, assim, foi capaz de amplificar sequências de kDNA em insetos e animais (BAÑULS; HILDE; PRUGNOLLE, 2007; BARKER, 1989; PITTA-PEREIRA, et al., 2005). Contudo, essa sensibilidade pode variar de acordo com os iniciadores, com a presença de inibidores no trato digestivo do flebotomíneos e degradação do DNA (DE BRUIJN; BARKER, 1992). No entanto, a detecção de *Leishmania* tem sido utilizada com sucesso nos estudos de competência vetorial dos flebotomíneos, em áreas onde as taxas de infecção desses insetos são baixas (MICHALSKY et al., 2002). Diversos iniciadores têm sido utilizados, como o MP1L/MP3H (NEITZKE et al., 2008), no entanto, os iniciadores B1/B2 mostram-se muito sensíveis e são utilizados com sucesso na identificação de *L. (V.) braziliensis* em sangue, tecidos e em flebotomíneos naturalmente infectados (DE BRUIJN; BARKER, 1992; MICHALSKY et al., 2002).

O método de conservação a seco e a dissecação prévia dos flebotomíneos para pesquisa de formas promastigotas não comprometeu a extração do DNA e os resultados da PCR. Em estudo de padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos, a utilização do método de conservação a seco mostrou-se adequado (PAIVA et al., 2007).

As primeiras notificações de casos de LTA no CIMNC ocorreram em 1996, com a ocorrência de um surto de LTA na região com o registro de 26 casos autóctones em militares que realizaram treinamento na unidade. Um inquérito epidemiológico através da aplicação do teste de intradermoreação de Montenegro e do levantamento entomológico foi realizado na localidade e no efetivo militar que participou das atividades de treinamento durante o período que ocorreram os casos da doença. Foi identificada uma prevalência de 24,1% de infecção nos militares através da aplicação do teste de intradermoreação de Montenegro. No levantamento entomológico para flebotomíneos, *L. choti* apresentou predominância de 89,9% entre os flebotomíneos identificados (BRANDÃO FILHO et al., 1998).

A ocorrência de leishmaniose tem sido relatada em militares procedentes de áreas não endêmicas que se deslocam para regiões em conflito ou para treinamentos em regiões endêmicas (SHAW, 2007). No Brasil, a ocorrência da doença tem sido relatada após treinamentos ou em cursos de formação de guerra na selva, realizados próximo a Manaus, no estado do Amazonas (GUERRA et al., 2003), em Belém, no estado do Pará (SILVEIRA et al., 2002) e em Pernambuco (ANDRADE et al., 2005a; BRANDÃO FILHO et al., 1998).

Os isolamentos *L. (V.) braziliensis* foram obtidos a partir de amostras coletadas de lesões cutâneas de pacientes e inoculadas em hamster, que, após um período médio de seis meses, foram eutanasiados. Todas as amostras apresentaram o mesmo perfil de reação na caracterização com painel de anticorpos monoclonais específicos. A caracterização das amostras por perfis de mobilidade eletroforética em isoenzimas revelou três novas variantes de *L. (V.) braziliensis* circulando na região, em relação à cepa de referência utilizada. O mais prevalente foi o zimodemo IOC/Z75, observado exclusivamente no CIMNC, e o mais frequente, representando seis das doze amostras isoladas. Maior heterogeneidade, no entanto, foi encontrada na Zona da Mata Sul, no município de Amaraji, Pernambuco, que identificou quatro novas variantes de *L. (V.) braziliensis* circulando na região. Estudos realizados em populações de *L. (V.) braziliensis* oriundas de diversas

regiões endêmicas nas Américas, verificada através da caracterização utilizando métodos bioquímicos, imunológicos e análise genotípica, têm demonstrado também grande heterogeneidade (CUPOLILLO et al., 1995; CUPOLILLO; MOMEN; GRIMALDI, 1998).

A heterogeneidade observada nessas espécies poderia estar relacionada à existência de ciclos concomitantes ocorrendo em uma mesma área, nos quais clones do parasito estariam sendo selecionados pelos diferentes hospedeiros primários, secundários e vetores envolvidos na cadeia de transmissão e manutenção de cada ciclo, ou mesmo pela interface do envolvimento de hospedeiros comuns, circulando entre ambos os ciclos.

De uma maneira geral, a manutenção da LTA em Amaraji, Pernambuco, é possivelmente representada por um ciclo enzoótico silvestre envolvendo *Necomys lasiurus* e *Nectomys squamipes* como reservatório primário, com o possível vetor primário representado por *L. complexa* ou *L. whitmani* e um ciclo zoonótico, no qual ocorreria a ligação na transmissão entre os *habitats* dos reservatórios primário acima referenciados e possíveis reservatórios secundário representados por *Rattus rattus*, cães e equinos, sendo o homem hospedeiro acidental (BRANDÃO FILHO, 2001; BRANDÃO FILHO et al., 2003a, 2003b).

Apesar de vários estudos enfatizarem a predominância do ciclo zoonótico na ecoepidemiologia da LTA em áreas desmatadas e de colonização antiga no Brasil, com vetores de hábitos peridomiciliares, a transmissão no CIMNC apresenta evidências da manutenção de um ciclo enzoótico, com a ocorrência de surtos periódicos da doença, posteriores à realização de treinamentos nas áreas de floresta Atlântica remanescente e de vegetação secundária (ANDRADE, 2004; ANDRADE et al., 2005a, 2005b).

Os fatores que possibilitam a manutenção da LTA nas regiões de estudo são as mesmas que determinam a persistência da doença no País, com o agravante de que os reservatórios vertebrados relacionada à *L. (V.) braziliensis* ainda não estão estabelecidos. A LTA no Brasil caracteriza-se pela diversidade de espécies de animais e vetores envolvidos, a manutenção de elevada prevalência e expansão das áreas de ocorrência da doença. Esses fatores estão fortemente associados às modificações ambientais provocadas pela ação antrópica e a ocupação desordenada de áreas florestais, onde os ciclos zoonóticos ocorrem. Destaca-se, ainda, que as ocupações desses espaços podem levar à adaptação dos

flebotomíneos e dos animais reservatórios aos ambientes peridomiciliares e possibilitar o estabelecimento de novos focos de LTA e/ou a expansão das áreas existentes. Estes fatores têm como principal consequência o aumento na ocorrência de casos, especialmente entre as populações em condições de vida desfavoráveis, mais suscetíveis à doença.

Diante da complexidade desses fatores, o risco de infecção fora das áreas endêmicas tende a aumentar (SHAW, 2007). O grande desafio é estabelecer medidas de controle em situações tão complexas e singulares. A análise da situação epidemiológica atual evidencia a necessidade de se obter recursos mais eficientes e factíveis para o controle desta doença (GOMES; CAMARGO-NEVES, 1998), traduzidos pelo aprimoramento das ações de controle a partir dos resultados de estudos sobre reservatórios, vetores e espécies de *Leishmania* envolvidas em cada área de transmissão.

A identificação e caracterização de amostras de *L. (V.) braziliensis* em *Necromys lasiurus* em Amaraji, Zona da Mata Sul do estado de Pernambuco, a evidência da infecção natural obtida na detecção de DNA de *Leishmania (Viannia)* spp. em *Rattus rattus* e *Nectomys squamipes* (BRANDÃO FILHO, 2001; BRANDÃO FILHO et al., 2003a, 2003b). Essas evidências prévias, associadas ao sucesso nos ensaios de infecciosidade experimental de *Necromys lasiurus*, *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus*, traduzidas pela visualização do parasito na pesquisa direta e na detecção do DNA das três espécies de animais em amostras de fígado, baço e pele. O fato dos flebotomíneos terem se alimentado nestes roedores e as formas promastigotas características detectadas na dissecação dos flebotomíneos e confirmados pela PCR, sugerem fortemente que essas espécies de roedores são reservatórios adequados para *L. (V.) braziliensis* e importantes na ecoepidemiologia da LTA na Zona da Mata de Pernambuco.

8 CONCLUSÕES

Os roedores silvestre *Necomys lasiurius*, *Nectomys squamipes* e sinantrópico *Rattus rattus* são infectivos e prováveis hospedeiros reservatórios de *L. (V.) braziliensis*.

As espécies de *Necomys lasiurius* e *Nectomys squamipes* demonstraram maior infectividade nos ensaios experimentais.

L. (V.) braziliensis foi a única espécie identificada e caracterizada neste estudo, apresentando, em relação à cepa de referência utilizada, perfil isoenzimático de variante.

A fauna de pequenos roedores silvestres e sinantrópicos predominante na Zona da Mata é composta de *Nectomys squamipes*, *Rattus rattus* e *Thrichomys apereoides*.

Os animais que apresentaram maior prevalência na infecção natural por *Leishmania* sp. foram *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus*.

O flebotomíneo *L. longipalpis* apresenta capacidade de infectar-se com *L. (V.) braziliensis* em ensaios experimentais.

A ocorrência de casos humanos após treinamentos militares evidencia que a *L. (V.) braziliensis* participa do ciclo enzoótico primário na região do estudo.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. Biossegurança em Biotérios. In: ANDRADE A, PINTO SC, OLIVEIRA RS. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006. p.381-387.

ANDRADE, M. S. et al. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.38, p.229-233, 2005a.

ANDRADE, M. S. et al. Sand fly fauna in a military training area endemic for American tegumentary leishmaniasis in the Atlantic Rain Forest region of Pernambuco, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.21, n. 6, p.1761-1767, 2005b.

ANDRADE, M. S. **Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil**. 2004. Dissertação (Mestrado) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2004.

ANTINORI, S. et al. Leishmaniasis among organ transplant recipients. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v.8, n.3, p.191-199, 2008.

ARAGÃO, H. B. Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. **Brasil Médico**, Rio de Janeiro, v.1, p. 129-130, 1922.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, New York, v.30, p.269-281, 2000.

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 14, n. 5, p. 523-532, 1996.

ASHFORD, R. W.; DESJEUX, P.; RAADT, P. Estimation of Risk of Infection and Number of cases of Leishmaniasis. **Parasitology Today**, Cambridge, v.3, p.104-105, 1992.

AZEVEDO, A. C. R. et al. Natural infection of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* by *Leishmania* of the *Braziliensis* complex in Baturité, Ceará State, Northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, p. 251, 1990.

AZEVEDO, A. C. R.; RANGEL, E. F.; QUEIROZ, R. G. *Lutzomyia migonei*: naturally infected with peripylarian flagellates in Baturité, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, p.199, 1990.

BADARÓ, R; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose visceral (Calazar). In: FOCACCIA, R. **Veronesi**: tratado de infectologia.3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. v.2, p.1559-1588.

BALBINO, V. Q. et al. Sand flies (Diptera: Psychodidae) species in Pernambuco State, northeastern Brazil, incriminated as vectors of cutaneous leishmaniasis in the Amazon region. **Zootaxa**, New Zealand, v.1078, p.25-32, 2005.

BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in Parasitology**, London, v.64, p.1-109, 2007.

BARKER, D. C. Molecular approaches to DNA diagnosis. **Parasitology**, London, v.99, p.125-146, 1989.

BENSOUSSAN, E. et al. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 1435–1439, 2006.

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

BRANDÃO FILHO, S. P.; SHAW J. J. Molecular tools versus parasite isolation for evaluation the hosts of *Leishmania braziliensis*. **Parasitology**, London, v. 22, n. 11, 2006.

BRANDÃO FILHO, S. P. et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the endemic cutaneous Leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brasil. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, London, v. 97, n.3, p. 291-296, 2003a.

BRANDÃO FILHO, S. P. et al. Further evidence supporting the water rat *Nectomys squamipes*, as primary reservoir of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic regions of cutaneous Leishmaniasis in Pernambuco State, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, suppl. 13, p. 167, 2003b.

BRANDÃO FILHO, S. P. **Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar americana associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis* na Zona da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil**. 2001. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BRANDÃO FILHO, S. P. et al. Epidemiological Surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, London, v.93 p. 488-494, 1999.

BRANDÃO FILHO, S. P. et al. Leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 31 p. 575-578, 1998.

BRANDÃO FILHO, S. P. et al. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: Eco-epidemiological aspects in 'Zona da Mata' region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.89, p.445-449, 1994.

BRASIL. Rede Interagencial de Informações para a Saúde. **Indicadores e Dados Básicos** – Brasil – 2008. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br>>. Acesso em: 11 maio. 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília: Ed. do Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ed. do Ministério da Saúde, 2006.

BRAZIL, R. P. et al. Biology of *Lutzomyia lenti* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae). **Anais da Sociedade de Entomologia do Brasil**, Londrina, v.26, p.191-193, 1997.

BRITO, M. E. F. et al. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, p.203-206, 2001.

BRITO, M. E. F. et al. Identification of potentially diagnostic *Leishmaniasis braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 7, n. 2, p.318-321, 2000.

BRITO, M. E. F. et al. Human cutaneous leishmaniasis due to a new enzymatic variant of *Leishmania (Viannia) Braziliensis* occurring in Pernambuco, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 88, p. 633-634, 1993.

BROWN, M. et al. Successful liposomal amphotericin B treatment of *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. **The British Journal of Dermatology**, London, v.153, p.203-205, 2005.

BRUMPT, E.; PEDROSO, A. Pesquisas epidemiológicas sobre a leishmaniose tegumentar americana das florestas no Estado de São Paulo. **Anais Paulista de Medicina e Cirurgia**, São Paulo, v.1, p. 97-136, 1913.

CAMPBELL-LENDRUM, D. H. et al. Experimental comparison of anthropophily between geographically dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae). **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v.13, p.299-309, 1999.

CANTARINO, L. M. **Leishmaniose Tegumentar Americana: Uso de Técnicas da Biologia Molecular (PCR) no Diagnóstico de Infecção em Roedores de Coleção do Museu Nacional – UFRJ**. 1998. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1998.

CARDOSO, C. V. P. Eutanásia. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006. p.275-279

CARVALHO, M. R. et al. Phlebotomine sandfly species from an American visceral leishmaniasis area in the Northern Rainforest region of Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.23, p.1227-1232, 2007.

CARVALHO, G. M. et al. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, New Rochelle, v.8, p.407-414, 2008.

COSTA, S. M. et al, *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and the epidemiology of American

cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102, p. 149-153, 2007.

COUTO, S. E. R. Criação e manejo de cobaias. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de laboratório**: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006.p.71-79.

CUBA CUBA, C. A. et al. A focus of mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia, Brazil: characterization and identification of *Leishmania* stocks isolated from man and dogs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 79 p. 500-507, 1985.

CUPOLILLO, E. et al. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology Today**, Cambridge, v.16, p.142-144, 2000.

CUPOLILLO, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.93, p.663-668, 1998.

CUPOLILLO, E. et al. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Molecular Biochemical Parasitology**, Amesterdam, v.73, p.145-155, 1995.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **American Journal and Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.50, p.296-311, 1994.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDAO FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.48, n.3, p.151-156, 2006.

DAVIES, C. R. et al. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.16, p.925-950, 2000.

DE BRUIJN, M.; BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, Basel, v.52, p. 45-58, 1992.

DE QUEIROZ, R. et al. Cutaneous leishmaniasis in Ceara State in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of

Leishmania braziliensis in baturité municipality. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore , v. 50 p. 693-698, 1994.

DORVAL, M. E. et al. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of an endemic area in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.104, p. 695-702, 2009.

EVANS, D. **Handbook on isolation characterization and cryopreservation of leishmania**. Geneva: World Health Organization, 1989.

FALQUETO, A.; SESSA, P. A. Leishmaniose tegumentar americana. In: FOCACCIA, R. **Veronesi: tratado de infectologia**, 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. v.2, p.1543-1557.

FALQUETO, A. et al. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86, p.499-500,1991.

FALQUETO, A. et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado de Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.8, p. 155-163, 1986.

FORATTINI, O. P. et al. Observações sobre a transmissão da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.10, n.1, p.31-43, 1976.

FORATTINI, O. P. et al. Nota sobre infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.7, p.181-184, 1973.

FORATTINI, O. P. et al. Infecção natural de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.6, p. 255-261, 1972.

FORATTINI, O. P. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.2, p.195-203, 1960.

FOUQUE, F. et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with changing patterns in the transmission of the human cutaneous leishmaniasis in

French Guiana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102, p.35-40, 2007.

FRANÇA, F. et al. An outbreak of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86 p. 169-174, 1991.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.137, p.214-221, 2006.

GALATI, E. A. B. et al. Study of the phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in area of cutaneous leishmaniasis in the Mato Grosso state, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, p. 115-128, 1996.

GOMES, A. C.; CAMARGO-NEVES, V. L. F. Estratégias e perspectivas de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 31, p. 553-558, 1998.

GOMES BRAZIL, B.; BRAZIL, R. P. Sexing sand fly pupae (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, p.471-472, 2000.

GOMES, A. C.; GALATI, E. A. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 7. Capacidade vetorial flebotomínea em ambiente florestal primário do sistema da Serra do Mar, região do Vale do Ribeira, estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 23, p.136-142, 1989.

GRIMALDI JR, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. **Clinical and Microbiology Reviews**, Washington, v. 6 p. 230-250, 1993.

GRIMALDI JR, G.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Journal and Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.41, p.687-725, 1989.

GUERRA, J. A. et al. American tegumentary leishmaniasis in children: epidemiological aspects of cases treated in Manaus, Amazonas, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23 p. 2215-2223, 2007.

GUERRA, J. A. O. et al. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.36, p.587-590, 2003.

HERTIG, M.; FAIRCHILD, G. B.; JOHNSON, C. M. Leishmaniasis transmission-reservoir project. **Annual Report of the Gorgas Memorial Laboratory**, Washington, 1956, p. 9-11, 1957.

HESLLER, J. R.; MORELAND, A. F. Design and management of animal facilities. In: FOX, J. G.; COHEN, B.J.; LOEW, F.M. ed. **Laboratory animal medicine**. Orlando: Academic Press, 1984.

IVERSSON, L. B. et al. Investigação epidemiológica de um novo caso de leishmaniose visceral ocorrido na Grande São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.16, p.205-209, 1982.

INTERNATIONAL VETERINARY INFORMATION SERVICE. Quality Assurance/surveillance monitoring programs for rodent colonies. In: REUTER, J.D.; SUCKOW, M.A. ed. **Laboratory Animal Medicine and Management**, New York: IVIS, 2003.

JONES, T. C. et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis brasiliensis*. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 156 p. 73-83, 1987.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends Parasitology**, Oxford, v. 22, p. 439-445, 2006.

KOFF, A. B.; ROSEN, D. R. Treatment of cutaneous leishmaniasis, **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v.31 p. 693-708, 1994.

LAINSON, R.; ISHIKAWA, E.A.Y.; SILVEIRA, F.T. American visceral leishmaniasis: wild animal hosts. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.96, p. 630-631, 2002.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In FEG COX, J.P.; KREIER, D.; WAKELIN (eds.), Topley & Wilson's microbiology & microbiol infections. **Parasitology**, London, v. 5, p. 242-266, 1998.

LAINSON, R. et al. A further observations on *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae), the sand fly vector of *Leishmania (Viannia) lainsoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.87, p.437-439, 1992.

LAINSON, R. et al. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (V.) naiffi* Lainson & Shaw 1989. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v. 65, p.282-284, 1990.

LAINSON, R., SHAW, J. J. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp.n., a parasite of armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v. 64 p. 3-9, 1989.

LAINSON, R. et al. *Leishmania (Viannia) shawi* sp.n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v. 64 p. 200-207, 1989.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographic distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.), **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. v. 1, p.1-120.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; PÓVOA, M. 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". **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, London, v.75, p. 530-536, 1981.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. **Biology of the Kinetoplastida**. London: Academic Press, 1979.v. 2, p. 1-116.

LAINSON, R.; SHAW, J.J . Leishmanias and leishmaniasis of the New World, with particular reference to Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v.7, p.1-19, 1973.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Some reservoir-hosts of *Leishmania* in wild animals of Mato Grosso State, Brazil. Two distinct strains of parasites isolated from man and rodents. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, London, v.63, p.408-409, 1969.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in Brazil. I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis. Incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the

vector in the lower Amazonian basin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.62 p.385-395, 1968.

LEAVEL, H.; CLARK, E. G. **Medicina Preventiva**, São Paulo: McGraw-Hill, 1976.

LINDEMBERG, A. A úlcera de Bauru e seu micróbio. **Revista Médica São Paulo**, São Paulo, v.12, p.121-128, 1909.

LLANOS-CUENTAS, E. A. et al. Natural infections of *Leishmania peruviana* in animals in the Peruvian Andes. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, London, v.93, p.15-20, 1999.

MARCONDES, C. B. Phlebotomine sand flies in a focus of dermal leishmaniasis in the eastern region of the Brazilian state of Santa Catarina: preliminary results (Diptera: Psychodidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.38 p.353-355, 2005.

MARSDEN, P. D. Personal experience with diagnostic and therapeutic aspects of human *Leishmania (Viannia) Braziliensis* in Tres Braços. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89 p. 485-487, 1994.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Leishmanioses em áreas urbanas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.30, p.162-165, 1997.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.10, supl. 2, p. 359-375, 1994.

MARZOCHI, M. C. A. Curso – Doenças Infecto-Parasitárias. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 63, p.82-104, 1992

MARZOCHI, M. C. A. A leishmaniose tegumentar no Brasil. In:_____. **Grandes Endemias Brasileiras**. Brasília: Ed. Universidade de Brasília, 1989.

MATTA, A. Sur le leishmanioses tégumentaires. Classification générale des leishmanioses. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses Filiales**, Paris, v.9, p.494-503, 1916.

MAYRINK, W. et al. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, state of Minas Gerais, Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v.73, p.123-137,1979.

MENDONÇA, S. C. F. et al . Indirect imunofluorescencetestin New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.83, p.347-355, 1988.

MICHALSKY, E. M. et al. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (diptera: psychodidae: phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 5, p.255-259, 2002.

MOREIRA, J. Distribuição geográfica. **Gazeta Médica**, Bahia, 1895.

NEITZKE, H. C. et al. Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.41, n.1, p. 17-22, 2008.

OLIVEIRA, F. S. et al. PCR- based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amesterdam, n.129, p.219-227. 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Control of leishmaniasis**. Report of a WHO Expert Committee. Geneva, 2006. (WHO Technical Report Series, 118th Session).

PAIVA, B. R. et al . Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.23, n.1, p.87-94, 2007.

PASSOS, V. M. A. et al. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of Belo Horizonte, MG, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, p.103-110,1993.

PASSOS, V. N. A.; SILVA, R. E; FALCÃO, A. L. Fauna flebotomínica de municípios da região metropolitana de Belo Horizonte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.24, s. 11, p.107, 1991.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. **Plano Estadual de Saúde / Pernambuco 2008/2010**. Disponível em: < <http://www.saude.pe.gov.br>>. Acesso em: 11 maio. 2010.

PESSOA, S. B.; PESTANA, B. R. Infecção natural do *Phlebotomus migonei* por formas em leptomonas, provavelmente de *Leishmania braziliensis*. **Acta Médica**, v.5, p.106-111, 1940.

PITA-PEREIRA, D. et al. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of South Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. **American Journal and Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.80, p.593-595, 2009.

PITA-PEREIRA, D. et al. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.99, p.905-913, 2005.

POLITI, F. A. S.; PIETRO, R. C. L. R.; SALGADO, H. R. N. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, São Paulo, v.29, n.1, p.17-28, 2008.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.104, n.7, p. 937-954, 2009.

RANGEL, E. F. et al. Aspectos da ecologia de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) e a fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) em área de transmissão da *Leishmania (V.) braziliensis* no Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 32, s.1, p.115, 1999.

READY, P. D.; RIBEIRO, A. L. Presence of *Psychodopygus wellcomei*: a proven vector of *Leishmania braziliensis* in Ceará State. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 78 p. 235-236, 1983.

REITHINGER, R.; ESPINOZA, J. C.; DAVIES, C. R. The transmission dynamics of canine american cutaneous leishmaniasis in Huánuco, Peru. **American Journal and Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 69, n.5, p.473-480, 2003.

- RIOUX, J. A. et al. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v.65, p.111-125, 1990.
- RODRIGUES, E. H. G. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in na área of endemicity in Northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.40, p. 3572-3576, 2002.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, I. et al. Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico, and Spain. **Experimental Parasitology**, New York, v. 112, n. 1, p. 44-51, 2006.
- ROQUE, A. L. R. et al. *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: Patterns of Experimental Infection. **PLoS Neglected Tropical Disease**, Washington, v.4(2), e589, 2010.
- ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, London, v.2, p.1261-1262, 1903.
- RYAN, L. et al. The importance of rapid diagnosis of new cases of cutaneous leishmaniasis in pin-pointing the sandfly vector. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, London, v.84, p.786, 1990.
- SANTOS, S. O. et al. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*, Corumbá, Mato Grosso do Sul state. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.36, p.633-634, 2003.
- SANTOS, S. O. et al. The incrimination of *Lutzomyia (L.) cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v.12, p.101-103, 1998.
- SAVANI, E. S. et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amesterdam, v.120, p.229-233, 2004.
- SHAW, J. **How climatic and environmental variations affect the eco-epidemiology of the leishmaniasis and their control**. Palestra proferida no III Workshop de Genética e Biologia Molecular de Insetos Vetores de Doenças Tropicais, 2008.

SHAW, J. J. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102, 541-547, 2007.

SHAW, J. J. Taxonomy of the Genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, p.471-478, 1994.

SHAW, J. J.; ISHIKAWA, E.; LAINSON, R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.83, p.783-784, 1989.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Ecology and epidemiology: New World. In PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press, 1987., v. I, p. 291-363.

SHAW, J. J.; LAINSON, R.; WARD, R. D. Leishmaniasis in Brazil. VII. Further observations on the feeding habitats of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) with particular reference to its biting habits at different heights. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, London, v.66, p.718-723, 1972.

SILVA, A. M. et al. Diversity, distribution and abundance of sand flies (Diptera: Psychodidae) in Paraná state, Southern Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.37, p.209-225, 2008.

SILVEIRA, F. T. et al. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará state, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n.sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon Region. **Parasite**, Paris, v.9, p.43-50, 2002.

SILVEIRA, F. T. et al. Cutaneous leishmaniasis in Amazonian: isolation of *Leishmania (Viannia) lainsoni* from the rodent *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae) in the state of Pará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.33, p.18-22, 1991.

SOUZA-ROCHA, L. et al. Genetic structure of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* population from two ecologic regions in Brazil where transmission of *Leishmania (Viannia) braziliensis* reflects distinct eco-epidemiologic features. **American Journal and Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.76, p. 559-565, 2007.

TOLEZANO, J. E. et al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.149, p. 280-284, 2007.

TOLEZANO, J. E. Ecoepidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in the State of Sao Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 427- 434, 1994.

TOLEZANO, J. E.; MARCORIS, S. A. G.; DINIZ, J. M. P. Modificação na epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Vale do Ribeira, estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.40, p.49-54, 1980.

TOMMASI, L. R. **A degradação do meio ambiente**, 4 ed., São Paulo: Nobel, 1979.

TRAVI, B. L. et al. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, London, v.92. p.275-278. 1998.

VASCONCELOS, I. A. B. et al. The identity of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturite, Northeast Brazil. **American Journal and Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 50, p.158-164, 1994.

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v.16, n.2, p.97-101, 2003.

VELASCO-CASTREJON, O. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with localized current field (radio frequency) in Tabasco, Mexico. **American Journal and Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.57, p.309-312, 1997.

VEXENAT, J. A.; BARRETO, A. C.; MARSDEN, P. D. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do Estado da Bahia. III. Fauna flebotomínica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81 p. 293-301, 1986.

VEXENAT, J. A.; BARRETTO, A. C.; ROSA, A. C. O. C. Infecção experimental de *Lutzomyia whitmani* em cães infectados com *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.81, n.1, p.125-126, 1986.

VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (Nota Preliminar). **Brasil Médico**, Rio de Janeiro, v.25, p.411, 1911.

VILELA, M. L. et al. **Sand fly survey in the influence área of Peixe Angical Hydroelectric Plant, state of Tocantins, Brazil**. Poster session. 6th International Symposium on Phlebotomine Sandflies, Lima, 2008.

VILELA, M. L. et al. Estudos dos vetores das leishmanioses em áreas de influência do Aproveitamento Hidroelétrico Peixe Angical, estado de Tocantins. XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.40, s.I, p.127, 2007.

VOLF, P.; MYSKOVA, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. **Trends in parasitology**, Oxford, v.23, n.3, p.91-92, 2007.

WALTON, B. C.; SHAW, J. J.; LAINSON, R. Observations on the *in vitro* cultivation of *Leishmania braziliensis*. **Journal Parasitology**, Lawrence, v.63, p.1118-1119, 1977.

WEIGLE, K. A. et al. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. **American Journal and Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.36, p.489-496, 1987.

WOODS, C. A.; KILPATRICK, C. W. *Infraorder Hystricognathi*. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Eds.). **Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference**. 3. ed. Baltimore: John Hopkins University Press, 2005. v. 2, p. 1538-1600.

YOUNG, D., DUNCAN, M. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomya* sand flies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: *Psychodidae*). **Memories of American Entomologic Institute**, Gainesville, p. 1-88, 1994.

APÊNDICE A – Artigo publicado

Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil

Maria Edileuza F. Brito¹, Maria S. Andrade¹, Mitzi G. Mendonça², Cláudio J. Silva³, Ericka L. Almeida¹, Bruna S. Lima¹, Simone M. Félix¹, Frederico G. C. Abath^{1†}, Grazielle C. da Graça⁴, Renato Porrozzi⁴, Edna A. Ishikawa⁵, Jeffrey J. Shaw⁶, Elisa Cupolillo⁴ and Sinval P. Brandão-Filho¹

¹ Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brazil

² Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Brazil

³ Núcleo de Vigilância a Saúde e Meio Ambiente, Moreno, Brazil

⁴ Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

⁵ Instituto Evandro Chagas and Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil

⁶ Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Summary

OBJECTIVES To identify the aetiological agents of cutaneous leishmaniasis and to investigate the genetic polymorphism of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an area with endemic cutaneous leishmaniasis (CL) in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil.

METHODS *Leishmania* spp. isolates came from three sources: (i) patients diagnosed clinically and parasitologically with CL based on primary lesions, secondary lesions, clinical recidiva, mucocutaneous leishmaniasis and scars; (ii) sentinel hamsters, sylvatic or synanthropic small rodents; and (iii) the sand fly species *Lutzomyia whitmani*. Isolates were characterised using monoclonal antibodies, multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer region rDNA locus.

RESULTS Seventy-seven isolates were obtained and characterised. All isolates were identified as *Leishmania (Viannia) braziliensis* serodeme 1 based on reactivity to monoclonal antibodies. MLEE identified 10 zymodemes circulating in the study region. Most isolates were classified as zymodemes closely related to *L. (V.) braziliensis*, but five isolates were classified as *Leishmania (Viannia) shawi*. All but three of the identified zymodemes have so far been observed only in the study region. Enzootic transmission and multiclonal infection were observed.

CONCLUSIONS Our results confirm that transmission cycle complexity and the co-existence of two or more species in the same area can affect the level of genetic polymorphism in a natural *Leishmania* population. Although it is not possible to make inferences as to the modes of genetic exchange, one can speculate that some of the zymodemes specific to the region are hybrids of *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) shawi*.

keywords *Leishmania*, leishmaniasis, MLEE, molecular typing, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) shawi*

Introduction

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a zoonotic disease caused by multiple species of the genus *Leishmania* and is an important health problem in Brazil, with an incidence of about 35 000 cases per year (Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde 2007). In humans, infections may not be readily apparent, but in many cases present with a clinical spectrum ranging from

localised, sometimes self-healing cutaneous lesions (CL) to severe, mutilating mucocutaneous lesions (MCL) or diffuse CL (Grimaldi & Tesh 1993; Carvalho *et al.* 1994). A high prevalence of infection has been reported in Pernambuco State, in the remaining Atlantic rainforest in northeastern Brazil. Between 1990 and 2000, 3268 cases were reported in Pernambuco (Brandão-Filho 2001), and there has been an approximately 10-fold increase in transmission over the last 10 years (Brandão-Filho *et al.* 1999).

There have been reports of sympatry of different *Leishmania (Viannia)* species in areas where ACL is

†Deceased

endemic. In the Brazilian Amazon region, leishmaniasis is caused by at least six *L. (Viannia)* species (Lainson & Shaw 1987; Silveira *et al.* 2004). This subgenus appears to be monophyletic and autochthonous to the New World (Cupolillo *et al.* 1994, 2000). Biochemical and molecular methods have revealed significant heterogeneity in the *L. (Viannia)* group (Cupolillo *et al.* 1995, 2001). So far, 9 species have been named, and most are genetically heterogeneous. Strains of *Leishmania (Viannia) braziliensis* represent an extremely diverse population, with some zymodemes widely distributed (IOC/Z27) and others related to a particular endemic focus (Cupolillo *et al.* 2003). In some states such as Rio de Janeiro and Espírito Santo, the population of *L. (V.) braziliensis* seems to be monomorphic, but clonal diversity has been reported in other regions such as ACL endemic areas of Pernambuco (Brandão-Filho *et al.* 2003; Cupolillo *et al.* 2003).

Previous studies from our group have addressed the correlation between transmission cycle complexity and polymorphism in natural populations of *Leishmania*.

Furthermore, we have shown that transmission cycles that do not involve sylvan animals are associated exclusively with IOC/Z27, whereas heterogeneity of zymodemes was observed in areas where small rodents were implicated in the transmission cycle (Cupolillo *et al.* 1998, 2003; Brandão-Filho *et al.* 2003). Here, we aim to extend our previous studies by identifying the *Leishmania* species circulating in the Atlantic rainforest (Zona da Mata) in the Pernambuco State, northeastern Brazil (Brito *et al.* 1993; Brandão-Filho *et al.* 2003; Cupolillo *et al.* 2003 to better understand the observed genetic polymorphisms.

Materials and methods

Study area and *Leishmania* isolates

The study was carried out in the municipalities of Amaraji (8° 23'59"S, 35° 27'09"W), Moreno (8° 9'S, 35° 04'W) and Paudalho (7° 53'48"S, 35° 10'47"W), located 90, 28 and 30 km from Recife, respectively (Fig. 1). The pre-

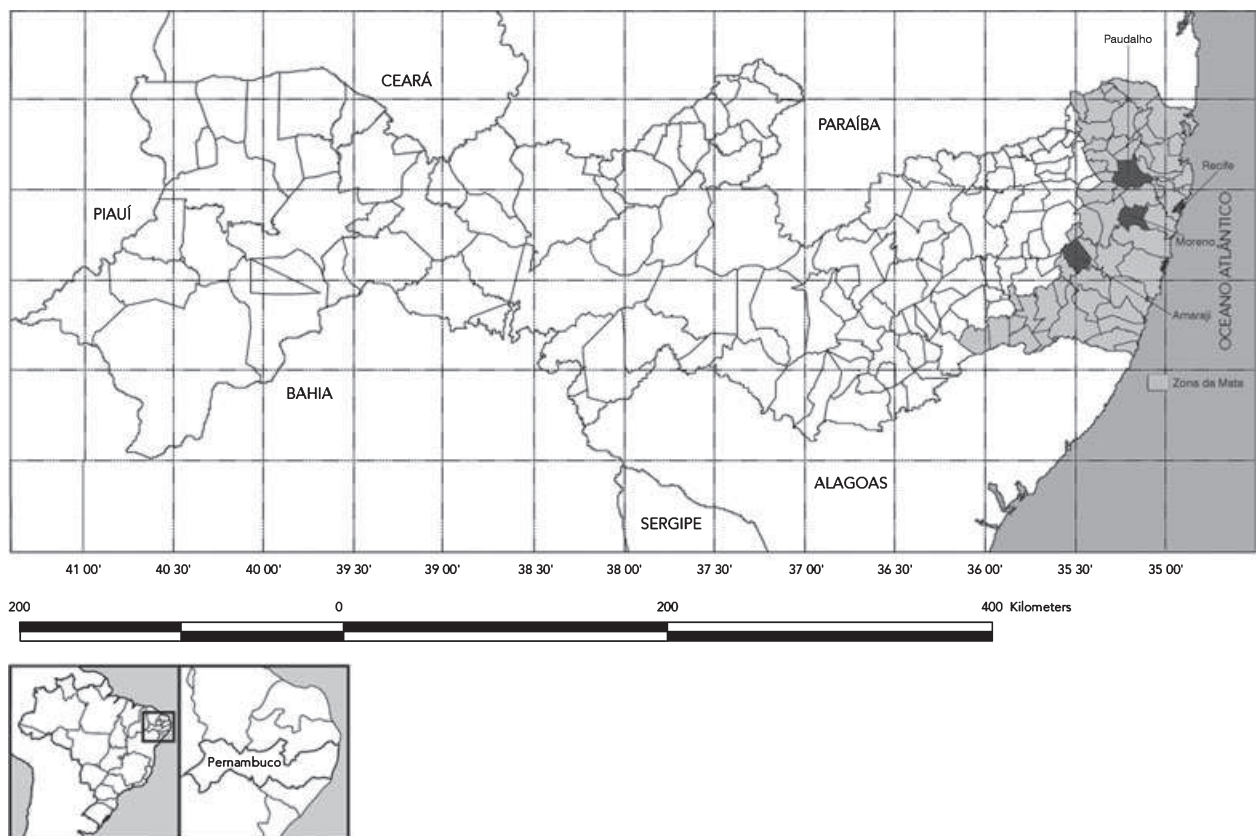


Figure 1 Map of the geographical study area in 'Zona da Mata' of Pernambuco with the site origins of *Leishmania* stocks. Fifty-five isolates were from Amaraji municipality, twelve from Moreno and ten from Paudalho.

dominant agricultural crops in these areas are sugarcane, cassava and banana on plantations. The municipalities are similar in terms of climate and land use, although Amaraji has a higher abundance of remnant forest patches.

Most of the *Leishmania* spp. were isolated from patients, most of whom were men between 9 and 56 years of age (median 23 years). Patients received clinical care in the Clinic of Dermatology of the Hospital das Clínicas (Universidade Federal de Pernambuco), and the material was processed in the Instituto Aggeu Magalhães of the Fundação Oswaldo Cruz, both located in Recife. The study was approved by the Ethical Committee of Instituto Aggeu Magalhães, and all enrolled individuals provided written consent.

Some *Leishmania* isolates were obtained from sentinel hamsters, sylvatic or synanthropic small rodents, and from sand fly.

Sample preparation

Parasites were isolated by inoculating a small fragment of each lesion biopsy in tubes containing culture medium [4% blood agar base supplemented with 7.5% rabbit blood and Schneider's insect medium containing 12% inactivated foetal bovine serum (FBS), 1% streptomycin and 100 UI/ml penicillin], and then incubated at 25 °C. A portion of the biopsy was triturated and then inoculated into hamsters (*Mesocricetus auratus*) which were sacrificed 3–8 months later and spleen and skin fragments from the sacrificed hamsters were inoculated into the culture medium. All isolates and reference strains were deposited in the *Leishmania* collection at the Oswaldo Cruz Institute (CLIOC; WFCC-WDCM 731). To prepare the parasites for antibody typing and multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), we followed the methods described by Shaw *et al.* (1989) and Cupolillo *et al.* (1994).

Serodeme analysis

Samples were tested with a modified indirect immunofluorescence technique (Shaw *et al.* 1987, 1989) using a fluorochrome conjugated with avidin/biotin and a panel of 23 leishmanial-specific monoclonal antibodies (Grisard *et al.* 2000): B2, B5, B12, B11, B13, B18, B19, CO1, CO2, CO3, D13, L1, LA2, M2, N2, N3, V1, WA2, W1, W2, WH1, WIC and T3. The B and N series react with species of the subgenus *L. (Viannia)*; M2, T3, D13, M11, M12, WIC.79.3, WA2 and V1 react with parasites of the subgenus *L. (Leishmania)*; CO1, CO2, CO3 and L1 are group-specific and react with members of subgenera *Endotrypanum* and some species of the genus *Trypanosoma*.

MLEE and numerical analysis

Sample preparation and electrophoretic mobility analysis of enzymes in agarose gels was performed as described previously (Cupolillo *et al.* 1994). Allelic variation was assessed for acid phosphatase (ACP; E.C.3.1.3.2.), glucose-phosphate isomerase (GPI; E.C.5.3.1.9), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH; E.C.1.1.1.49), isocitrate dehydrogenase NAD and NADP (IDHNAD and IDH-NADP; E.C.1.1.1.42), malate dehydrogenase (MDH; E.C.1.1.1.37), malic enzyme (ME; E.C. 1.1.1.40), nucleoside hydrolase (NH; E.C.3.2.2.1), peptidase (PEPD; E.C.3.4.13.9), phosphoglucomutase (PGM; E.C.1.4.1.9) and 6-phospho-gluconate dehydrogenase (6PGDH; E.C.1.1.1.43). Isolates were compared with WHO reference strains for *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *Leishmania (Viannia) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533) and *Leishmania (Viannia) shawi* (MCEB/BR/1984/M8408).

After electrophoresis, electromorphs were numbered according to their electrophoretic mobility as previously described (Cupolillo *et al.* 1994). The electromorphic positions of all enzymes were used to construct a binary matrix (presence/absence) that was used to calculate the similarity between the zymodemes with Dice's (Dice 1945) coefficient. A principal coordinate analysis was conducted using the similarity matrix; coordinates were plotted in a three-dimensional space with the minimum spanning tree superimposed. All analyses were conducted with NTSYS (version 2.1; Exeter software, Setauket, NY, USA).

Intergenic region typing

To discriminate between the various *L. (Viannia)* species, genomic restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the internal transcribed spacer region (ITS) between the small and large rDNA loci [polymerase chain reaction (PCR)-RFLP ITSrDNA] was performed as described elsewhere (Cupolillo *et al.* 1995, 2003) with the restriction enzyme *Bst*UI.

Cloning of *Leishmania (Viannia)* promastigotes

Eleven *Leishmania* isolates were selected for cloning (three primary isolates from patients who presented clinical recidiva and eight randomly selected isolates that represented distinct zymodemes). Samples were maintained in a biphasic culture system of Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) plus *Drosophila* Schneider's medium containing 20% fetal bovine serum (FBS) and 2% human urine. Logarithmic phase promastigotes were harvested, washed thrice in

Table 1 Electromorph positions observed in each zymodeme for all enzymatic loci used to characterise *Leishmania (Viannia)* isolates circulating in Pernambuco State, Brazil

IOC/Z	Enzymes														n (%)			
	G6PDH	MDH	IDHNADP	ME	6PGDH	GPI	PGM	NH1	NH2	PEPD	FUM	HK	MPI	ACP		PEP2	ACON	IDHNAD
26	4, 6, 8	1.2	2	2	4	7	3	2	5	2	2	1	3	4	4	1	5	5 (6.5)
27	5.7	1	1	4	4	6	4	4	3	6	3.4	1	3	4	4	1	5	5 (6.5)
45	5.7	1	2	4	4	6	3	4	3	6	3.4	1	3	2	4	1	5	18 (23.4)
72	5.7	1	2	3	4	6	3	4	3	6	3.4	1	3	2	4	1	5	9 (11.7)
73	5.7	1	2	5	4	6	3	4	3	6	3.4	1	3	2	4	1	5	7 (9.0)
74	5.7	1	2	4	4	6	4	4	3	6	3.4	1	3	2	4	1	5	20 (26.0)
75	5.7	1	2	3	4	6	4	4	3	6	3.4	1	3	2	4	1	5	6 (7.8)
78	5.7	1	1	5	4	6	4	4	3	6	3.4	1	3	4	4	1	5	1 (1.3)
105	5.7	1	2	5	4	6	4	4	3	6	3.4	1	3	4	4	1	5	5 (6.5)
106	5.7	1	1	5	4	6	3	4	3	6	3.4	1	3	4	4	1	6	1 (1.3)

IOC/Z, zymodemes. IOC/Z26 and IOC/Z27 are considered to be references for *L. (V.) shawi* and *L. (V.) braziliensis*, respectively (Cupolillo *et al.* 1994). n (%), number of isolates classified in each zymodeme and the frequency of this zymodeme in the studied population is given within parentheses. ACP, acid phosphatase; GPI, glucose-phosphate isomerase; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; IDHNAD and IDHNADP, isocitrate dehydrogenase NAD and NADP; MDH, malate dehydrogenase; ME, malic enzyme; NH, nucleoside hydrolase; PEPD, peptidase; PGM, phosphoglucomutase; 6PGDH, 6-phospho-gluconate dehydrogenase; FUM, fumarase.

phosphate buffer saline (PBS) and counted in a Neubauer chamber. All isolates were adjusted to a concentration of 10^6 parasites per ml and progressively diluted to a concentration of 0.5 parasites per 200 μ l. The diluted parasite suspension was distributed in 96-well plates and incubated at 25 °C. Each well was assayed for promastigotes for at least 20 days with an inverted microscope, and the contents of all positive wells were transferred to tubes filled with the NNN medium. The volume of the medium was doubled every other day until a clonal culture was established.

Results

Of the 77 *Leishmania* isolates, 67 were obtained from patients, most of whom were men between 9 and 56 years of age (median 23 years). Seven isolates were obtained from rodents (*Bolomys lasiurus*, $n = 5$; *Rattus rattus*, $n = 1$; and *Nectomys squamipes*, $n = 1$) and two were obtained from sentinel hamsters. One isolate was obtained from *Lutzomyia whitmani*.

All 77 isolates were typed as *L. (V.) braziliensis* serodeme 1 based on reactivity to monoclonal antibodies. Among the stocks analysed by MLEE using 12 enzymatic loci, we identified 10 zymodemes circulating in the study region. Five isolates were characterised as zymodeme IOC/Z 27, identical to the *L. (V.) braziliensis* reference strain isolated from Para and 5 isolates were characterised as *L. (V.) shawi*. Most isolates were classified as zymodemes closely related to *L. (V.) braziliensis* (Table 1).

For the eight zymodemes identified in the studied area [excluding those representing the reference strains for *L. (V.) shawi* and *L. (V.) braziliensis*], the zymographic patterns observed were compatible with *L. (V.) braziliensis* for most of the enzymes studied. There were three exceptions: (i) IDH, for which two zymodemes presented the same patterns as *L. (V.) braziliensis* but others presented a pattern identical to that of *L. (V.) shawi*; (2) ME, for which two zymodemes presented patterns identical to that of *L. (V.) braziliensis* and the others exhibited variable patterns that were inconsistent with both *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) shawi*; and (3) PGM, for which 50% of the identified zymodemes exhibited the same pattern as *L. (V.) braziliensis* and 50% exhibited the same pattern as *L. (V.) shawi* (Table 1).

The principal coordinate analysis indicated that all zymodemes are much more closely related to *L. (V.) braziliensis* than to *L. (V.) shawi*. Furthermore, analysis indicated that the minimum length is obtained when IOC/Z45 (the most frequent zymodeme detected after IOC/Z74, grouping 23% of the isolates) is considered to be a hypothetical ancestor. Several zymodemes appear to

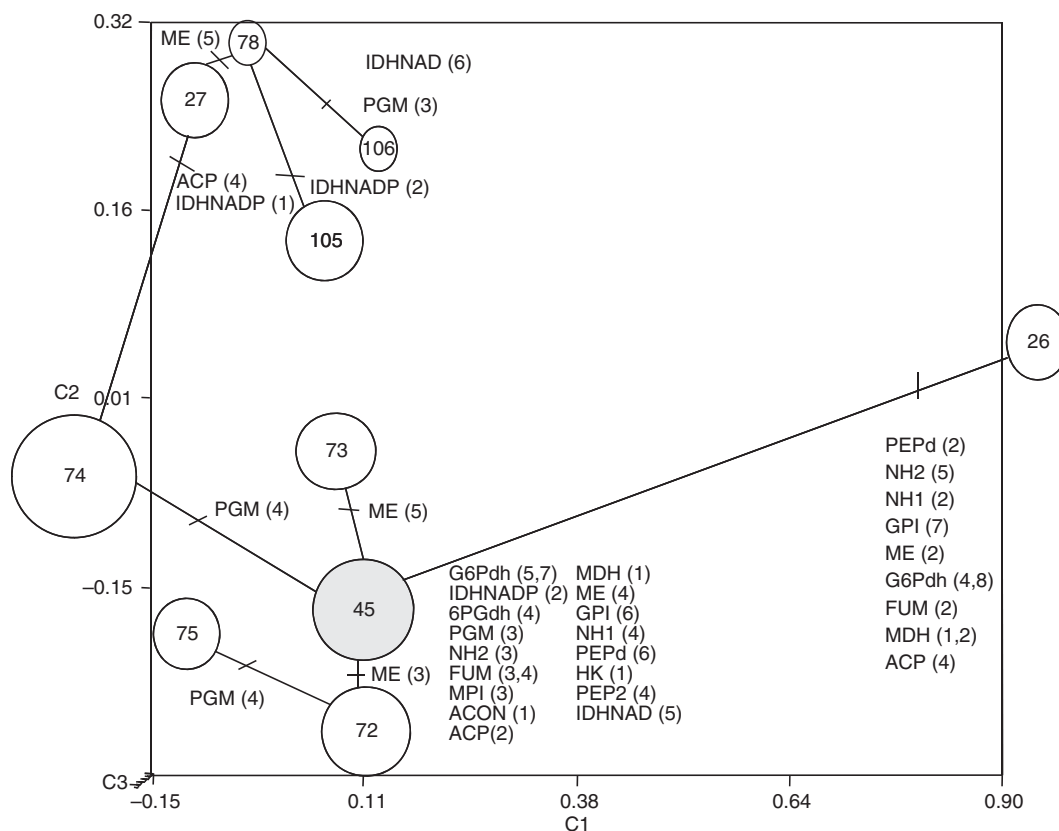


Figure 2 Plot of the three principal coordinate axes with superimposed minimum-length spanning tree showing the relationships among *Leishmania* (*Viannia*) zymodemes circulating in Pernambuco State. The grey circle (zymodeme IOC/Z45) represents the hypothetical ancestor. Each zymodeme is represented by a circle; the variation in the size of each circle indicates the number of isolates in each zymodeme. Alleles (electromorphs) for each locus assayed are shown inside rectangles; any observed changes in alleles are indicated at each branch. Monomorphic loci are shown in bold.

cluster in distinct groups: (i) IOC/Z27, 78, 105 and 106 and (ii) IOC/Z45, 72, 73, 74 and 75. IOC/Z74 links these two groups (Fig. 2). However, the distance between the two groups is very small (data not shown).

More than 75% of the *Leishmania* isolates were from Amaraji (Fig. 1), including all of the isolates from rodents and sandflies. Zymodemes IOC/Z26 and IOC/Z27 were observed in the three sites whereas all other zymodemes were observed in one or two sites. IOC/Z75 was exclusively observed in Paudalho and was the most frequent zymodeme in this region; six of the nine samples isolated in the area were typed as IOC/Z75. The single IOC/Z106 isolate was found in Moreno. All zymodemes except IOC/Z26, IOC/Z27 and IOC/Z78 have to date been observed only in the study region of 'Zona da Mata' (Fig. 1).

Isolates obtained from sentinel hamsters ($n = 2$) were typed as IOC/Z72. Despite the variety of rodent species

found to be positive for *L. (V.) braziliensis* (*B. lasiurus*, *R. rattus* or *N. squamipes*), all isolates from rodents were classified as the same zymodeme (IOC/Z74). The single isolate from *Lut. whitmani* was also IOC/Z74. This was the most frequent zymodeme, classifying 20 of the 77 isolates characterised.

Most isolates came from patients with primary lesions ($n = 61$). Three patients experienced reactivation of primary lesions, and parasites were isolated from the secondary lesion. One patient experienced two reactivation events; isolates were obtained from both these lesions. The isolates obtained from the primary lesions of these patients were classified as zymodemes IOC/Z45 and IOC/Z72 ($n = 2$). In the first case, the isolate obtained from the secondary lesion was the same zymodeme as the primary isolate. In the other two cases, the isolates obtained from the secondary lesions were distinct from the zymodemes found in the primary lesions. In the first case, the primary

isolate was typed as IOC/Z72 and the second as IOC/Z74; in the other case, the first isolate was typed as IOC/Z45, the second as IOC/Z74 and the third (from the patient with two reactivation events) was also typed as IOC/Z74.

Only two samples could be isolated from MCL. The strains belonged to different zymodemes (IOC/Z105 and IOC/Z73), neither of which was exclusive to MCL. Only one isolate was obtained from a scar, and was typed as IOC/Z73.

The isolates were also typed by PCR-RFLP of the ITS rDNA region using *Bst*UI. Most isolates showed an RFLP pattern compatible with *L. (V.) braziliensis*. However, isolates characterised as IOC/Z75 were more compatible with *L. (V.) shawi*, as were the isolates characterised as IOC/Z26 (data not shown).

Eleven isolates were selected for cell cloning using the procedures described before. The minimum number of clones obtained was 13, and the maximum was 29. All clones obtained were analysed by MLEE using the same panel of enzymes that was used to type the isolates. In all samples analysed, each clone belonged to the same zymodeme as the parental strain, indicating that the cultures were monoclonal.

Discussion

This study confirms the presence of *L. (V.) braziliensis* variants in a small, confined area and reveals new variants, thus contributing to the understanding of heterogeneity in *L. (Viannia)* spp. Indeed, MLEE analysis demonstrated the presence of 10 circulating zymodemes in the well-defined 'Zona da Mata' of Pernambuco and indicated that *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) shawi* are present in this region. Previously, we had reported the isolation of *L. (V.) braziliensis* from patients with ACL and from different rodent species in Pernambuco (Brito *et al.* 1993; Cupolillo *et al.* 1994; Brandão-Filho *et al.* 2003; Brandão-Filho & Shaw 2006). The heterogeneity observed among *L. (V.) braziliensis* parasites from this region is noteworthy (Brito *et al.* 1993; Brandão-Filho *et al.* 2003; Cupolillo *et al.* 2003), particularly in contrast to the homogeneity of parasites isolated from other northeastern and southeastern regions of Brazil.

Among the enzymes used for zymodeme characterisation, 6PGDH and G6PDH are the most useful for identifying *L. (Viannia)* species. Although the 6PGDH pattern of *L. (Viannia)* is identical to that of *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) shawi*, the electromorphs produced by G6PDH are divergent between these two species. All isolates analysed in the present work produced the same 6PGDH electromorph, which corresponded to *L. (V.) braziliensis* or *L. (V.) shawi*. However, the G6PDH electromorphs of almost all isolates

were identical to that of *L. (V.) braziliensis*, although five isolates presented a profile identical to that of *L. (V.) shawi*. This was the case not only for G6PDH, but also for all of the other enzymes studied. All of the zymodemes identified were more related to *L. (V.) braziliensis* than to *L. (V.) shawi*. Almost all the isolates presented a pattern identical to that of *L. (V.) braziliensis* in PCR-RFLP ITSrDNA analysis; only isolates identified as *L. (V.) shawi* or classified as IOC/Z75 produced an RFLP pattern identical to that of *L. (V.) shawi*.

Interestingly, even the five strains typed as *L. (V.) shawi* by MLEE or PCR-RFLP of ITS1 had the monoclonal antibody-reactive profile expected for *L. (V.) braziliensis*. Previous studies have shown that putative hybrids between *L. (V.) braziliensis* and *Leishmania (V.) panamensis* are heterogeneous; some strains react only with *L. (V.) panamensis*-specific antibodies and others apparently possess no species-specific epitopes and react only with the antibody specific to the *L. braziliensis* complex (Momen *et al.* 1994). *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* are already known to be polymorphic based on patterns of reactivity with species-specific monoclonal antibodies (Grimaldi & McMahon-Pratt 1991). Our results also indicate polymorphism in the *L. (V.) shawi* population, and that the population circulating in Pernambuco expresses epitopes similar to those of *L. (V.) braziliensis*.

No isoenzymatic pattern compatible with hybrids between *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) shawi* was observed, although it is interesting to note that for some zymodemes the electromorphic composition appears to be a combination of *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) shawi* electromorphs.

Although the validity of some *Leishmania* species remains controversial (Bañuls *et al.* 1999), studies conducted so far consider *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) shawi* to be distinct, monophyletic species. It is not possible to infer the mode of reproduction based on our results, but we speculate that most of the zymodemes identified in this study occupy a hybrid zone between *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) shawi*. In some cases, hybrid zones are complex mosaics in which relatively pure populations and hybrids are observed. The presence of such zones helps organisms in adapting to different habitats.

In the computation of the minimal-length spanning tree IOC/Z45 was identified as the hypothetical ancestor. Analysis indicated the presence of two clusters, which was corroborated by hierarchical analysis (data not shown). IOC/Z74, the most prevalent zymodeme in our isolates, linked the two groups. This zymodeme was observed only in Amaraji and included isolates from rodents and sandflies, suggesting its participation in a zoonotic transmission cycle.

M. E. F. Brito *et al.* **Species diversity of *Leishmania* parasites**

As previously mentioned, the municipalities where this study was conducted are similar in terms of climate and land use, although the presence of the remaining Atlantic forest is more evident in Amaraji. Eight of the ten zymodemes identified in this study were observed in Amaraji, but this was not unexpected as more than 75% of the isolates were obtained in this area. Therefore, we do not consider it appropriate to speculate that the *Leishmania* population in Amaraji is more heterogeneous than in other areas, as this result could be attributed to sampling biases. However, it is interesting to note that IOC/Z26 and IOC/Z27 were observed in all three regions, and that IOC/Z75 was exclusively observed in Paudalho but was the most frequent zymodeme in that region.

An association between *L. (V.) braziliensis* and sylvatic reservoirs (*B. lasiurus* and *N. squamipes*) has been described in this area previously (Brandão-Filho *et al.* 1994), but this study also demonstrates infection in the domestic rodent *R. rattus*. The presence of intra-specific variants may be the result of selection by different reservoirs, including sylvatic and synanthropic rodents involved in the peridomestic (zoonotic) and sylvatic (enzootic) transmission cycles that occur simultaneously in this region (Brandão-Filho *et al.* 2003). *Lutzomyia whitmani* and *Lutzomyia complexa* have been suggested as vectors of *L. (V.) braziliensis* and therefore likely to participate in the transmission cycles in this region (Brandão-Filho 2001). *Lutzomyia whitmani* was found to be infected specifically by zymodeme IOC/Z74, indicating that this sandfly species may be the vector linking both types of transmission cycles. This species is most abundant in the peridomestic environment (in animal sheds near houses) but we also collected it in the remnant primary forest.

Despite the efforts of many researchers, the isolation of *L. (V.) braziliensis* from possible animal reservoirs is not a common thing. Some authors have indicated the infection of sylvatic animals by *L. (V.) braziliensis* based on PCR results (Oliveira *et al.* 2005; Schallig *et al.* 2007). Our group succeeded with the isolation of *Leishmania* parasites from sylvatic and synanthropic animals caught in the studied region (present study and Brandão-Filho *et al.* 2003). Assuming that IOC/Z27 is the most frequent (if not the only) *L. (V.) braziliensis* zymodeme circulating in most regions where ACL is endemic, our results suggest that this zymodeme is associated with a domestic transmission cycle and is probably not able to infect and/or be maintained in a sylvatic environment.

Leishmania (V.) braziliensis infection results in a variety of clinical manifestations in humans, including localised CL that can heal spontaneously, MCL that may become

severe and mutilating or disseminated CL (Grimaldi & Tesh 1993; Carvalho *et al.* 1994; Lainson & Shaw 2005). Despite the polymorphisms of *L. (Viannia)* spp. populations, reflected by the presence of several species and clones (or genotypes), past studies have found either no or weak association between clone type and clinical outcome (Cuervo *et al.* 2004; Schrieffer *et al.* 2004). In the present study, two distinct zymodemes (IOC/Z73 and IOC/Z105) were associated with MCL, but were not exclusive for this clinical manifestation. Interestingly, the zymodeme IOC/Z73 was identified in CL, MCL and scar samples, although this was not the most frequent zymodeme observed in this study. Three patients experienced reactivation, as judged by the appearance of a lesion at a previous scar site. In one case, the same zymodeme was found for both the primary and secondary isolates. However, in the other two cases, the zymodemes were not identical. Assuming that each zymodeme is a clone, this finding suggests a multiclonal primary infection, and that different clones can persist even after treatment; this should result in either more aggressive manifestation of the disease, as in MCL, or in a silent persistence of the parasite. The manifestation of the disease probably depends on host factors (e.g. immunological status). For malaria, it has been demonstrated that the co-existence of two or more genetically distinct clones in the same host increases the evolution rate of important phenotypes, such as increased virulence, transmissibility and drug resistance, through intra-host competition (Havryliuk & Ferreira 2009).

Other important aspects of the clonal composition of circulating *Leishmania* spp. strains must be considered. Although our results indicate that all of the analysed strains are monoclonal, with all clones presenting a pattern identical to that of the parental strain, we cannot exclude the possibility that the culture medium used in the study acts as a filter. The identification of different zymodemes in primary and reactivated lesions suggests that mixed infections occur at least occasionally. The success in isolating and maintaining a certain zymodeme in culture may depend on the proportions of different zymodemes in the infection.

In conclusion, the results presented in this study confirm that transmission cycle complexity and the co-existence of two or more species living in sympatry in the same area affect the level of genetic polymorphism in natural *Leishmania* populations.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant 410481/2006-8), Fundação de Amparo à Ciência e Tecn-

M. E. F. Brito *et al.* **Species diversity of *Leishmania* parasites**

ologia de Pernambuco (FACEPE), Fundação Oswaldo Cruz (Programa PAPES/CNPq, grant 400135/2006-0), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho (Cientista do Nosso Estado), European Union (LeishEpiNetSA, EU-FP6: INCO-CT2005-015407) and Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP). The authors are very grateful to the field and laboratory staff of the participating institutions for their dedicated assistance and in particular to the population of the municipalities for their help and collaboration.

Mitzi G. Mendonça, Claudio J. Silva, Ericka L. Almeida, Bruna S. Lima, Simone M. Felix and Grazielle C. Graça had contributed to this study by providing laboratory and medical assistance for diagnosis in different periods of the work. Maria E.F. Brito, Maria S. Andrade, Frederico G.C. Abath, Renato Porrozzi and Edna Ishikawa participated in study design; Jeffrey J. Shaw, Elisa Cupolillo and Sinval P. Brandão-Filho participated in study design and in the preparation of the manuscript.

References

- Bañuls AL, Brisse S, Sidibé I, Noël S & Tibayrenc MA (1999) Phylogenetic analysis by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting of the *Leishmania* genome project Friedlin reference strain. *Folia Parasitology (Praha)* **46**, 10–14.
- Brandão-Filho SP (2001) Eco-epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis* na Zona da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil. PhD. Thesis. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Brandão-Filho SP & Shaw JJ (2006) Molecular tools versus parasite isolation in the identification of reservoir hosts of *Leishmania braziliensis*. *Trends in Parasitology* **22**, 500–501.
- Brandão-Filho SP, Carvalho FG, Brito MEF, Almeida FA & Nascimento LA (1994) American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: eco-epidemiological aspects in Zona da Mata region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **89**, 445–449.
- Brandão-Filho SP, Campbell-Lendrum DH, Brito MEF, Shaw JJ & Davies CR (1999) Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **93**, 488–494.
- Brandão-Filho SP, Brito MEF, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E & Shaw JJ (2003) Wild and sylvatic host of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco, State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **97**, 291–296.
- Brito MEF, Brandão SP, Sales NRS, Cupolillo E, Grimaldi G Jr & Momen H (1993) Human cutaneous leishmaniasis due to a new enzymatic variant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* occur in Pernambuco, Brazil. *Memória Instituto Oswaldo Cruz* **88**, 633–634.
- Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A & Mardsen P (1994) Clinical and disseminated immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* **56**, 315–325.
- Cuervo P, Cupolillo E, Nehme N, Hernandez V, Saravia N & Fernandes O (2004) *Leishmania (Viannia)*: genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. *Experimental Parasitology* **108**, 59–66.
- Cupolillo E, Grimaldi G & Momen H (1994) A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene* **50**, 296–311.
- Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H & Beverley SM (1995) Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **73**, 145–155.
- Cupolillo E, Momen H & Grimaldi G Jr (1998) Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Brasil* **93**, 663–668.
- Cupolillo E, Medina-Costa E, Noyes H, Momen H & Grimaldi G Jr (2000) A revised classification for *Leishmania* and endotrypanum. *Parasitology Today* **16**, 142–144.
- Cupolillo E, Aguiar Alves F, Brahim LR *et al.* (2001) Recent advances in the taxonomy of the New World Leishmanial parasites. *Medicine Microbiology and Immunology* **190**, 57–60.
- Cupolillo E, Brahim LR & Toaldo CB (2003) Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 3126–3132.
- Dice LR (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* **26**, 297–302.
- Grimaldi G Jr & McMahon-Pratt D (1991) Leishmaniasis and its etiologic agents in the New World: an overview. In: *Progress in Clinical Parasitology* (ed. T Sun) Field & Wood Medical Public Inc., Philadelphia, pp. 73–118.
- Grimaldi G & Tesh RB (1993) Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews* **6**, 230–250.
- Grisard EC, Steindel M, Shaw JJ *et al.* (2000) Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. *Acta Tropica* **74**, 89–93.
- Havryliuk T & Ferreira MU (2009) A closer look at multiple-clone *Plasmodium vivax* infections: detection methods, prevalence and consequences. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **104**, 67–73.
- Lainson R & Shaw J (1987) Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniases in Biology and Medicine, Biology and Epidemiology* (eds W Peters & R Killick-Kendrick) Academic Press, London, pp. 1–120.
- Lainson R & Shaw JJ (2005) New World leishmaniasis. In: *Microbiology and Microbial Infectious Diseases*, 10th edn (eds SH Gillespie, D Wakelin, FEG Cox & DD Despommier) Arnold, London, pp. 313–349.

M. E. F. Brito *et al.* **Species diversity of *Leishmania* parasites**

- Momen H, Cupolillo E & Grimaldi G Jr (1994) Population genetics of *Leishmania* in the New World. In: *Current Trends in Leishmania Research* (ed. KP Chang) Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, pp. 115–121.
- Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP & Pacheco RS (2005) PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Veterinary Parasitology* **129**, 219–227.
- Schallig HD, da Silva ES, van der Meide WF, Schoone GJ & Gontijo CM (2007) *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector Borne Zoonotic Diseases* **7**, 387–393.
- Schriefer A, Schriefer AL, Góes-Neto A *et al.* (2004) Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infection and Immunology* **72**, 508–514.
- Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (2007) *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar*, 2nd edn. Ministério da Saúde do Brasil, Brasília.
- Shaw JJ, Lainson R, Ryan L, Braga RR, McMahon-Pratt D & David JR (1987) Leishmaniasis in Brazil XXIII. The identification of *Leishmania braziliensis braziliensis* in wild-caught sandflies, using monoclonal antibodies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **81**, 69–72.
- Shaw JJ, Ishikawa E & Lainson R (1989) A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein labelled avidin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **83**, 783–784.
- Silveira FT, Lainson R & Corbett CE (2004) Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* **99**, 239–251.

Corresponding Authors Sival P. Brandão-Filho, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE CEP 50670-420, Brasil. Tel.: +55 81 21012562; Fax: +55 81 21012640; E-mail: sival@cpqam.fiocruz.br
Elisa Cupolillo, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ, Brasil. CEP 21045-900. Tel.: +55 21 38658177; Fax: +55 21 22094110; E-mail: ecupoli@ioc.fiocruz.br

APÊNDICE B – Artigo publicado

Novo surto de leishmaniose tegumentar americana em área de treinamento militar na Zona da Mata norte do Estado de Pernambuco

New american tegumentary leishmaniasis outbreak in a military training center in Zona da Mata region northern State of Pernambuco

Maria Sandra Andrade^{1,2}, Maria Edileuza Felinto Brito¹, Salomão Thomaz da Silva², Edna Ishikawa³, Silvia Maria Santos Carvalho¹ e Sinval Pinto Brandão-Filho¹

RESUMO

Relata-se novo surto de LTA em militares com 71 casos confirmados pelos critérios clínico, epidemiológico e laboratorial. Obteve-se o isolamento de sete amostras, identificadas como *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A ocorrência de surtos nesta região confirma o caráter endêmico, cuja magnitude parece estar relacionada a não adoção de medidas de proteção individual.

Palavras-chaves: Leishmaniose tegumentar americana. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Ecopidemiologia. Mata Atlântica.

ABSTRACT

Report a new outbreak of ATL in militaries with 71 new cases confirmed by clinical, epidemiological and laboratorial criterions. Seven new *Leishmania* stocks were obtained and characterized as *Leishmania (Viannia) braziliensis*. The occurrence of outbreaks in the region, confirms the endemic nature, whose magnitude seems to be directly related with the non adoption of individual protection.

Key-words: American tegumentary leishmaniasis. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Eco-epidemiology. Atlantic rainforest.

No Estado de Pernambuco, o número de casos notificados de leishmaniose tegumentar americana (LTA) tem crescido nos últimos anos¹³. A região da Zona da Mata de Pernambuco responde por 64,2% do total de casos notificados⁵. É importante registrar que, a partir de 2000, verifica-se também um aumento da ocorrência de LTA no Sertão¹³, o que demonstra que a doença no estado apresenta não só um aumento no número de casos, como também uma importante expansão espacial.

Em 1996, foi documentado o primeiro surto de LTA no Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti (CIMNC), com o registro de 26 casos autóctones em militares que realizaram treinamento na localidade. Um inquérito epidemiológico identificou uma prevalência de 24,1% de infecção nesta população⁴. A análise das notificações de 1996 a 2007 de casos de LTA em militares após treinamentos no CIMNC permite verificar um registro médio de 16 casos autóctones por ano. No entanto, observam-se picos no número de casos, seguidos de períodos de não ocorrência ou de ocorrência relativamente baixa de LTA na região.

Surto de LTA em militares, além da região de estudo^{3,4}, têm sido relatados na região Norte do país⁹. A transmissão no CIMNC apresenta características epidemiológicas peculiares por se tratar de uma região com vasta área de mata primária remanescente e áreas fragmentadas de mata secundária. A relevância deste estudo está relacionada à necessidade de um maior entendimento das características da transmissão na localidade e também pela necessidade de desenvolvimento de estratégias e ferramentas mais efetivas de prevenção e controle da LTA¹⁰.

Este estudo, do tipo descritivo, relata a ocorrência de um surto de LTA, envolvendo militares que participaram de treinamento no CIMNC no período de julho a agosto de 2006. O Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti localiza-se no município de Paudalho, Zona da Mata Norte do Estado de Pernambuco, a cerca de 40km do Recife, ocupando uma área de 6.280 hectares, com clima quente e úmido.

A população do estudo foi constituída por militares que participaram de treinamento no CIMNC em 2006. Os critérios de inclusão na amostra foram à participação em treinamentos nesta área e apresentar lesões suspeitas de LTA, após o seguimento de seis meses da realização do treinamento. Os militares que apresentaram lesões sugestivas de LTA realizaram teste de hipersensibilidade retardada (intradermoreação de Montenegro) e pesquisa direta do parasito. Foram realizadas biópsias nas lesões para o isolamento de *Leishmania*.

Amostras biológicas obtidas de biópsias e punções aspirativas de lesões cutâneas foram processadas no Laboratório de

1. Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE. 2. Hospital Geral de Recife, Exército Brasileiro, Recife, PE. 3. Instituto Evandro Chagas, Belém, PA. Apoio Financeiro: CNPq, Projeto 410.481/2006-8.

Endereço para correspondência: Dr. Sinval Pinto Brandão-Filho. CPqAM/FIOCRUZ. Av. Moraes Rego s/n, Campus UFPE. 50670-420 Recife PE.

Tel: 55 81 2101-2562

e-mail: sinval@cpqam.fiocruz.br

Recebido para publicação em 31/05/2009

Aceito em 15/09/2009

Imunoparasitologia do Instituto Aggeu Magalhães para isolamento do parasito, através da inoculação do material em meio de cultivo Agar Sangue Base⁷. As amostras também foram inoculadas em hamsters (*Mesocricetus auratus*), com o mesmo objetivo. A identificação ou tipagem dos flagelados foi realizada através de reações com um painel de vinte e três anticorpos monoclonais específicos (B2, B5, B12, B11, B13, B18, B19, CO1, CO2, CO3, D13, L1, L12, M2, N2, N3, V1, WA2, W1, W2, WH1, WIC e T3)¹⁴.

Definiram-se como categorias de análise, os dados referentes à distribuição de participantes nos treinamentos militares, os resultados da IDRM, o diagnóstico e tratamento realizados. Os dados foram tabulados, utilizando-se o programa Excel/Microsoft Office e a análise descritiva foi realizada através da distribuição das frequências relativas.

O trabalho foi aprovado na Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ.

Em 2006, 5.803 militares participaram de treinamentos militares no CIMNC, com duração média de 5 dias; 2.295 participaram de treinamentos em julho e agosto, destes 74 apresentaram lesões suspeitas de LTA (Tabela 1). Dos 74 casos considerados suspeitos para LTA, 71 (95,9%) foram confirmados pelo critério clínico, epidemiológico e laboratorial e 100% deles foram positivos ao teste de IDRM, com resultados variando de 6 a 23mm de endureção. O exame parasitológico direto foi positivo em 47,9% (34/71) dos casos.

TABELA 1

Distribuição dos participantes de treinamentos e casos de leishmaniose tegumentar americana registrados no Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti, Paudalho, Pernambuco, em 2006.

Meses	Participantes		Casos	
	nº	FR (%)	nº	FR (%)
Abril	1.220	21,0	-	-
Mai	1.096	18,9	-	-
Junho	193	3,3	-	-
Julho	1.064	18,3	10	14,1
Agosto	1.231	21,2	61	85,9
Setembro	50	0,9	-	-
Outubro	555	9,6	-	-
Novembro	394	6,8	-	-
Total	5.803	100,0	71	100,0

FR: frequência relativa

O período médio de incubação foi de 33,6 dias; 92,9% (66/71) dos militares apresentavam lesão única e 7,1% (5/71) duas lesões. Estas variavam de 0,3 a 2,5cm de diâmetro e localizavam-se nas regiões da face, pavilhão auricular, mãos, região dos braços e antebraços, punho, pescoço. Dos militares acometidos por LTA, apenas 9,9% (7/71) deles relataram o uso de repelente durante o treinamento militar.

Os militares com diagnóstico confirmado foram tratados com antimoniatto de N-metil glucamina (Glucantime®), seguindo o esquema terapêutico de uma ampola/dia, aplicada por via intramuscular, durante 20 dias seguidos. Todos os militares apresentaram completa cicatrização das lesões após a conclusão do primeiro ciclo do tratamento.

Das 23 biópsias e punções aspirativas de lesões, obteve-se 7 isolados de formas compatíveis com *Leishmania* spp, que foram identificadas como *Leishmania (Viannia) braziliensis*, sorodemo 1, através do perfil de reações com anticorpos monoclonais específicos.

Os treinamentos militares são considerados atividade de risco para LTA⁸. O relato de casos da doença em militares após treinamento tem acontecido com frequência na Região Amazônica⁹. No CIMNC, após o primeiro surto investigado em 1996⁴, tem se verificado a ocorrência de um número importante de casos de LTA após os treinamentos militares¹.

A forma cutânea localizada é a predominante e está associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis*, o que se observa também nos achados verificados em outros estados da região Nordeste, como o Maranhão, Ceará, Bahia⁶ e também em outra área de Pernambuco³. Devemos ressaltar também que no seguimento de dez anos dos casos autóctones registrados no CIMNC, não foi verificada a forma mucosa da doença, como observada em Amaraji, na Zona da Mata Sul de Pernambuco³, e em Três Braços, Bahia¹¹.

A resposta satisfatória ao tratamento com antimoniatto de N-metil glucamina neste surto, e em outros casos na mesma região^{1 2}, apresenta concordância com estudos que também obtiveram respostas terapêuticas satisfatórias, com apenas uma série de baixa dosagem desta droga de primeira escolha¹². A busca ativa de casos de LTA, após treinamentos no CIMNC, possibilitando o diagnóstico precoce e tratamento imediato, provavelmente contribuiu para o sucesso do tratamento.

Considerando-se a série histórica de casos de LTA na região, verifica-se que se trata de uma importante área de transmissão¹. No entanto, ressalta-se que, após a intensificação das atividades de prevenção e controle por parte das organizações militares (OM), em seguida ao surto de 1996, houve importante controle da LTA na região. Contudo, o relato dos militares acometidos de LTA sobre a não utilização de repelente durante os treinamentos e a presença de lesões em áreas dos antebraços e braços, regiões do corpo que poderiam estar protegidas pelo uniforme, permite-nos levantar a hipótese de ter havido descontinuidade das medidas de prevenção por parte das seções de saúde das OM antes e durante a realização dos treinamentos no CIMNC, no período em que ocorreu este novo surto.

Ao contrário do que se observa em vários estudos no Brasil sobre a ecoepidemiologia da LTA, em relação à predominância do ciclo zoonótico, com os casos ocorrendo em áreas desmatadas e de colonização antiga, e com vetores de hábitos domiciliares e peridomiciliares, a ocorrência deste novo surto no CIMNC, associada aos achados prévios^{1 4}, reforçam as evidências da manutenção do ciclo enzoótico, com o surgimento de casos após treinamentos. A magnitude dos novos casos parece estar relacionada com a não observação das medidas de proteção individual pelos militares durante a realização dos treinamentos.

A análise do panorama atual sobre surtos e a expansão da LTA revelam a necessidade de novas reflexões sobre as implicações

da heterogeneidade do quadro ecoepidemiológico evolutivo da LTA em relação à necessidade de se obter recursos profiláticos mais eficientes para controlar a transmissão da doença¹⁰. O aprimoramento dessas ações depende também de mais estudos voltados para o melhor conhecimento da biologia de reservatórios e vetores envolvidos na cadeia de transmissão, possibilitando também esclarecer a história natural da LTA associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Como forma de controle para situações como a do CIMNC, sugere-se que os treinamentos militares sejam planejados de forma a ocorrerem em períodos nos quais estudos na região^{2, 4} evidenciaram uma menor incidência de vetores e de casos humanos, o que possibilitaria a minimização do contato homem-vetor com possível redução do número de casos.

Ressalta-se ainda a necessidade da utilização de medidas de proteção individual e a realização de palestras educativas sobre LTA, como uma rotina permanente de procedimentos a serem adotados por ocasião dos treinamentos e retorno dos militares às suas organizações militares, para que não ocorra descontinuidade das atividades de prevenção e controle.

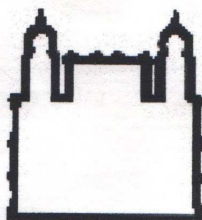
AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo suporte financeiro, e ao comando da Sétima Região Militar do Exército Brasileiro, pelo apoio logístico.

REFERÊNCIAS

1. Andrade MS, Brito MEF, Silva ST, Lima BS, Almeida EL, Albuquerque EL, Marinho Jr JF, Ishikawa E, Cupolillo E, Brandão-Filho SP. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 38:229-233, 2005.
2. Andrade MS, Valença HF, Silva AL, Almeida FA, Almeida EL, Brito MEF, Brandão-Filho SP. Sandfly fauna in a military training area for American tegumentary leishmaniasis in the Atlantic rain forest region of Pernambuco State, Brazil. Cadernos de Saúde Pública 21:1761-1767, 2005.
3. Brandão-Filho SP. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar americana associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis* na Zona da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.
4. Brandão-Filho SP, Brito MEF, Martins CAP, Sommer IB, Valença HF, Almeida FA, Gomes J. Leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 31:575-576, 1998.
5. Brandão-Filho SP, Campbell-Lendrum DH, Brito MEF, Shaw JJ, Davies CR. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 93:488-494, 1999.
6. Costa JML, Balby ITA, Rocha EJSR, Silva AR, Rebêlo JMM, Ferreira LA. Estudo comparativo da leishmaniose tegumentar americana em crianças e adolescentes procedentes das áreas endêmicas de Buriticupu (Maranhão) e Corte de Pedra (Bahia), Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 31:279-288, 1998.
7. Evans D. Handbook on isolation characterization and cryopreservation of leishmania. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1989.
8. Falqueto A, Sessa PA. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Focaccia R (org) Tratado de infectologia. Editora Atheneu, São Paulo, p.1543-1557, 2005.
9. Guerra JAO, Talhari S, Paes MG, Garrido M, Talhari JM. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36:587-590, 2003.
10. Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil: As leishmanioses tegumentares. Jornal Brasileiro de Medicina 63: 82-104, 1992.
11. Marsden PD. Personal experience with diagnostic and therapeutic aspects of human *Leishmania (Viannia) Braziliensis* in Tres Braços. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 89: 485-487, 1994.
12. Oliveira-Neto MP, Schubah A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C. A low dose antimony treatment in 159 patients with american cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). The American Journal of Tropical Medicine Hygiene 57:651-655, 1997.
13. Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. Leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco. Diretoria de Informação da Secretaria Estadual de Saúde. Boletim Epidemiológico. a.1 n° 3. 2002.
14. Shaw JJ, Ishikawa E, Lainson R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 83:783-784, 1989.

ANEXOS



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

TERMO ADITIVO AO CERTIFICADO DE LICENÇA Nº L-056/05

A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – em atenção à solicitação do Dr. Sinval Pinto Brandão Filho, autoriza o presente Aditivo que altera a vigência desta licença, referente ao Protocolo intitulado: “Eco-epidemiologia das leishmanioses na Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil: Incriminação de hospedeiros reservatórios, vetores e caracterização do padrão de transmissão”.

Ressaltamos que a nova data de validade desta licença é 25 de outubro de 2009.

Rio de Janeiro, 10 de fevereiro de 2009.

Dr.ª. Norma Vollmer Labarthe

Coordenadora da CEUA

FIOCRUZ



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DA INFECCIOSIDADE DE PEQUENOS ROEDORES SILVESTRES E SINANTRÓPICOS PARA INCRIMINAÇÃO DE HOSPEDEIROS RESERVATÓRIOS DE *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Eu, abaixo assinado, dou o meu consentimento livre e esclarecido para participar como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ). Fui informado que o objetivo principal da pesquisa é identificar a prevalência da leishmaniose tegumentar americana, através da intradermoreação e isolar e caracterizar *Leishmania* spp, em amostras de lesões de militares com diagnóstico de LTA. Estou ciente que este documento é feito em duas vias, ficando uma em minha posse e a outra com o pesquisador.

Serei submetido a responder um questionário, a inoculação na pele do braço de uma substância para o exame, a coleta de sangue venoso, biópsia e aspirado de lesão, com o material descartável, e que todo procedimento será feito por profissionais de saúde de reconhecida capacidade, podendo ser considerado isentos de riscos.

Obtive a informação que independente do resultado positivo ou negativo, receberei o resultado por escrito, e uma vez identificada a doença serei tratado e acompanhado clinicamente.

Antes de minha participação no referido projeto de pesquisa, fui incentivado a pedir esclarecimento adicional que julgasse necessário, esclarecido por um participante do projeto.

Os autores da pesquisa se comprometem a preservar a minha privacidade e me asseguraram a confidencialidade dos dados e informações coletadas garantindo que os resultados obtidos serão utilizados apenas para alcançar os objetivos do trabalho, expostos acima, incluídos sua publicação na literatura científica especializada. Autorizo, que esta Instituição poderá estocar amostras sanguínea para posteriores estudos.

Voluntário

data

Assinatura da testemunha

data

Assinatura do médico responsável- HMAR

data

Endereço profissional: Ambulatório do Hospital Militar de Área do Recife (HMAR), Rua: Gervásio Pires, 516, Boa Vista - Recife-PE. Fone: (81) 2123-4933.