

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Estudo dos hospedeiros de *Leishmania* em área de ocorrência das
leishmanioses no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

por

Eduardo de Castro Ferreira

Belo Horizonte
Fevereiro/2010

TESE DDIP-CPqRR

E.C. FERREIRA

2010

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Estudo dos hospedeiros de *Leishmania* em área de ocorrência das leishmanioses
no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

por

Eduardo de Castro Ferreira

Tese apresentada com vistas à obtenção do
Título de Doutor em Ciências na área de
concentração: Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientação: Célia Maria Ferreira Gontijo

Co-orientação: Aristóbolo Mendes da Silva

Belo Horizonte
Fevereiro/2010

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

F383e
2010

Ferreira, Eduardo de Castro.

Estudo dos hospedeiros de *Leishmania* em área de ocorrência das leishmanioses no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil / Eduardo de Castro Ferreira. – Belo Horizonte, 2010.

xvii, 131 f. il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 116 - 148

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose/diagnóstico 2. Reservatórios de doenças/parasitologia 3. Doenças do Cão/parasitologia 4. Reação em Cadeia da Polimerase/métodos I. Título. II. Gontijo, Célia Maria Ferreira. (Orientação). III. Silva, Aristóbolo Mendes da (Co-Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Estudo dos hospedeiros de *Leishmania* em área de ocorrência das leishmanioses
no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

por

Eduardo de Castro Ferreira

Foi avaliado pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo (Presidente)

Dr. Reginaldo Peçanha Brazil

Dr. Eduardo Sérgio da Silva

Dr. Alexandre Barbosa Reis

Dr. Olindo Assis Martins Filho

Suplente: Márcio Sobreira Silva Araújo

Tese defendida e aprovada em 26/02/2010

“ O que hoje somos se deve a
nossos pensamentos de ontem
e nossos pensamentos atuais
são os que constroem
nossa vida de amanhã” .
(DHAMMAPADA)

Dedicatórias

Esta Tese é dedicada à minha esposa e companheira, Cíntia, pelo amor que nos une e por todos os momentos em que abriu mão de minha companhia para que eu pudesse concretizar este sonho; aos meus pais, Antônio e Maria Inês, pelo incentivo; aos meus Irmãos (Patrícia, Leonardo e Gustavo) pelo carinho e respeito; e a todos aqueles que de forma direta ou indireta poderão beneficiar-se dos frutos deste trabalho.

Agradecimentos

A Deus, pela vida e por todas as pessoas maravilhosas que ele colocou em meu caminho.

Aos meus Pais, Antonio e Inês pelo incentivo constante em minha formação e amor incondicional.

À minha esposa Cíntia, pela felicidade de compartilharmos uma vida juntos, pelas vezes em que abriu mão de seus sonhos para que pudesse concretizar os meus. Pela força que me deu quando eu estava realizando meu estágio em Madrid, me fazendo companhia, mesmo quando tínhamos um oceano nos separando.

Aos meus irmãos Patrícia, Leonardo e Gustavo por todo amor e união, força indispensável para que eu chegasse até aqui.

À Tathi, pela amizade e por cuidar tão bem do Arthur, ao próprio Arthur, por encher nossa família de alegria, e à Flávia, por seu carinho e atenção.

À minha avó Stella.

À Gessilda, Maria, Renato, Paulo Henrique, e Janaina pelo carinho.

Aos meus amigos Sabrina, Helenita, Tia Marlene, Tio Ademir, Anderson, Maria Geralda, Gilson, simplesmente por existirem e serem como são.

À Dra. Célia M. F. Gontijo, minha orientadora e amiga que mais uma vez confiou na minha capacidade e me deu condições de desenvolver este trabalho.

Ao Dr. Aristóbolo Mendes da Silva, pela orientação e contribuições em minha formação.

Ao Dr. Israel Cruz, por sua orientação em meu estágio no Instituto de Saúde Carlos III, Madrid, Es; pela amizade que nasceu deste estágio e por tudo que me ensinou.

À Comunidade Econômica Européia (LeisEpiNetSA), na pessoa do Coordenador Michael A. Milles, pela competente coordenação do grupo e financiamento do projeto.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da minha bolsa de Doutorado e da bolsa do PDEE.

Ao Programa de Apoio a Projetos Estratégicos da FIOCRUZ (PAPES IV), pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório de Leishmanioses do CPqRR, na pessoa do Dr. Edelberto Santos Dias, pela possibilidade de desenvolvimento de meu trabalho.

Ao Laboratório de Leishmanioses do ISC III, na pessoa do Dra Carmen Cañavate pela possibilidade de desenvolvimento de meu trabalho.

Aos amigos que fiz no Serviço de Parasitologia do ISC III em especial à: Teresa, Javier Nieto, Javier Moreno, Esperanza , Carmen Chicharro, Begoña, Ruben, Marta, Fany, Alejandra, Maria, Ana e José, muchas gracias!

À coordenação do curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde do CPqRR e aos demais professores do curso pela oportunidade e pelo conhecimento transmitido.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, pela oportunidade de desenvolver o presente trabalho.

À Regional Nordeste da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte e ao Centro de Controle de Zoonoses pelo apoio, em especial à veterinária Sofia Alves Nogueira Valério.

A todos os amigos e colegas do laboratório de Leishmanioses, pelo convívio e amizade

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

Aos Motoristas, Toninho, Cláudio, Gilvan, Augusto e Kleber, por seus serviços prestados durante a coleta do material em campo.

A todos os animais que foram eutanasiados para a realização deste trabalho.

Aos moradores de Regional Nordeste do Município de Belo Horizonte, que contribuíram com a execução deste trabalho, dando seu consentimento.

Enfim, a todos aqueles que fazem ou fizeram parte da minha história meu muito obrigado, de coração.

Sumário

Lista de Figuras	X
Lista de Tabelas	XIII
Lista de Abreviaturas e Símbolos	XIV
Resumo	XVI
Abstract	XVII
1 Introdução	18
1.1 <i>Leishmania</i> e leishmanioses	18
1.1.1 Leishmanioses neotropicais	21
1.2 Leishmaniose visceral (LV)	23
1.2.1 Leishmaniose visceral canina (LVC)	28
1.3 Leishmaniose tegumentar americana (LTA)	29
1.3.1 Leishmaniose tegumentar canina	31
1.4 Urbanização das leishmanioses	33
1.5 Hospedeiros ou reservatórios ?	35
1.6 Diagnóstico da leishmaniose	39
1.6.1 PCR	40
1.7 Identificação da espécie de <i>Leishmania</i>	44
1.8 Quantificação da carga parasitária pela PCR quantitativa em tempo real (RTQ-PCR)	46
1.9 Justificativa	49
2 Objetivos	50
2.1 Objetivo geral	50
2.2 Objetivos específicos	50
3 Materiais e Métodos	51
3.1 Área de estudo	51
3.2 Captura dos pequenos mamíferos	55
3.3 Avaliação do estado clínico dos animais e coleta das amostras	56
3.4 Método parasitológico para detecção de <i>Leishmania</i> sp.	56
3.5 Coleta de amostras caninas	57
3.6 Detecção de DNA de <i>Leishmania</i> sp a partir de amostras biológicas	58
3.6.1 Extração do DNA das amostras de pele, baço e fígado	58
3.6.2 Extração do DNA de sangue e da medula	59
3.6.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	59
3.6.3.1 Controle endógeno da PCR para diferentes espécies de mamíferos, hospedeiros de <i>Leishmania</i> spp.	59
3.6.3.2 Nested PCR (LnPCR) dirigida a um fragmento do gene SSUrRNA de <i>Leishmania</i>	62
3.6.3.3 PCR kDNA dirigida a um fragmento da região conservada de kDNA de <i>Leishmania</i>	64
3.7 Métodos moleculares para identificação de <i>Leishmania</i> sp	66
3.8 Quantificação da carga parasitária por real time PCR	69
3.9 Análise estatística	74
4 Resultados	75
4.1 Pequenos mamíferos capturados	75
4.2 Exame clínico e parasitológico dos pequenos mamíferos (Melo, 2008).	76

4.3 Padronização da PCR para o gene interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP)	77
4.3.1 Análise comparativa da eficiência da amplificação da PCR dirigida às seqüências dos genes β -actina, β -globina e IRBP	78
4.3.2 Sequenciamento de IRBP como ferramenta auxiliar na identificação do hospedeiro	80
4.4 Detecção do DNA de <i>Leishmania</i>	83
4.5 Identificação das espécies de <i>Leishmania</i> envolvidas na infecção	85
4.6 Quantificação da carga parasitária	88
5 Discussão	93
5.1 Uma abordagem epidemiológica	93
5.2 Uma abordagem molecular	103
6 Conclusões	115
7 Referências Bibliográficas	116

Lista de Figuras

- Figura 1: Ciclo de transmissão dos parasitos do gênero *Leishmania* e o processo da urbanização das leishmanioses 21
- Figura 2: Casos confirmados de LTA e LV em Minas Gerais no período de 2001 a 2006 23
- Figura 3: Casos Humanos de Leishmaniose Visceral ocorridos no município de Belo Horizonte/MG, 1994-2009 27
- Figura 4: Casos Humanos de Leishmaniose Tegumentar Americana ocorridos na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte/MG, 2001-2009, * dados parciais (SMS/PBH, atualizado em 08 de janeiro de 2010). 31
- Figura 5: Área de estudo. Região Metropolitana de Belo Horizonte, Regional Nordeste indicada pela seta (A); detalhe esquemático da Regional Nordeste mostrando os bairros (B) 52
- Figura 6: Área verde onde foram colocadas armadilhas (junho/2006 a junho/2007) para captura viva de pequenos mamíferos na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG 53
- Figura 7: Área peri domiciliar onde foram colocadas armadilhas (junho/2006 a junho/2007) para captura viva de pequenos mamíferos na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG 54
- Figura 8: Alinhamento das seqüências de diferentes mamíferos (GenBank) com os iniciadores IRBP1 e IRBP2 61
- Figura 9: Desenho esquemático do resultado da Ln-PCR destinada a amplificar um fragmento do gene SSUrRNA de *Leishmania* 63

Figura 10: Géis de agarose 1,5 % mostrando os produtos de amplificação das PCRs R1R2 (603 pb) e R3R4 (353 pb). Canaletas: PM Øx 174; 1 Controle negativo (sem DNA); 2 3,4 e 5, DNA de *L.(L.) infantum* cepa JPC em diferentes diluições seriadas (de 20 ng/µl a 20 pg/ µl). 64

Figura 11: Gel de agarose 2,5 % mostrando os produtos de amplificação da PCR k-DNA (120 pb). Canaletas:PM Øx 174; 1 Controle negativo (sem DNA); 2 a 8, DNA de *L.(L.) infantum* cepa JPC em diferentes diluições seriadas (de 20 ng/µl a 20 fg/ µl). 66

Figura 12: Alinhamento das seqüências do fragmento do gene SSUrRNA de espécies de *Leishmania*, depositadas no GenBank 69

Figura 13: Curva Padrão para os experimentos de RTQ-PCR realizada a partir da amplificação de diluições seriadas da cepa M2904 de *L. braziliensis* 71

Figura 14: Pequenos mamíferos capturados, por espécie e ambiente, no período de junho/2006 a novembro/2007 na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG. 75

Figura 15: Géis de poliacrilamida 6% mostrando os produtos de amplificação da PCR IRBP com temperatura de anelamento em A: 63 °C, B: 60 °C e C: 57 °C. Canaletas: 1- PM Øx174; 2, 5 e 8 - DNA de medula de cão (positivo PCR *Leishmania*); 3, 6 e 9 – DNA de medula de *Necromys* (negativo PCR *Leishmania*); 4, 7 e 10 – DNA de medula de *Didelphis* (positivo PCR *Leishmania*). 78

Figura 16 Alinhamento da seqüência obtida pela amplificação de fragmento de IRBP com seqüências de *A. azarae* *N. lasiurus* (retiradas do Genbank) e com os iniciadores específicos 81

Figura 17: Alinhamento da seqüência obtida pela amplificação de fragmento de Citocromo b com seqüências de *A. azarae* *N. lasiurus* (retiradas do Genbank) e com os iniciadores específicos 82

Figura 18: Resultado da identificação da espécie de *Leishmania*, pelo seqüenciamento do produto da LnPCR, por hospedeiro e por ambiente, Área verde e Área peri domiciliar: Complexo *L. braziliensis* (*Lb*); Complexo *L. donovani* (*Ld*); infecção mista Complexos *L. braziliensis* e *L. donovani* (*Lb+Ld*); Complexo *L. mexicana* (*Lm*); não identificado (N id).

87

Figura 19: Picos de “melting” de RTQ-PCR kDNA para *Leishmania braziliensis* M2904 (tracejado em azul 83,06°C) e *Leishmania infantum* JPC (tracejado em rosa 84,55°C) em diferentes diluições.

88

Figura 20: Picos de Melting de RTQ-PCR kDNA Pico maior em azul *L. braziliensis* M2904 os dois picos em alaranjado abaixo dele amostra de DNA de pele de *R. norvegicus*. O Pico em rosa *L. infantum* JPC e os dois verdes abaixo dele amostra de DNA extraído de pele de cão

89

Figura 21: Representação gráfica dos resultados de RTQ-PCR realizado com amostras de DNA extraído de Cães (pele de orelha) e Pequenos Mamíferos (pele de orelha e pele de cauda) A. Representação gráfica dos resultados RTQ-PCR realizado com amostras de DNA extraído de Cães Roedores e Marsupiais B

90

Figura 22: Representação gráfica dos resultados RTQ-PCR realizado com amostras de: A - DNA extraído de pele de cães com diferentes formas clínicas (CA - cães assintomáticos; CS - cães sintomáticos) e de sangue de cães infectados por *L. braziliensis* e com *L. infantum*; B - DNA extraído de pele de orelha e de pele de cauda de Pequenos Mamíferos

91

Lista de Tabelas

Tabela 1	Condições da PCR para a amplificação de fragmentos dos genes β -globina, β -actina e IRBP	62
Tabela 2	Condições das PCRs dirigidas ao kDNA: kDNA 1a e b realizadas no Laboratório de Leishmanioses do CPqRR kDNA 2 realizado no Laboratório de Leishmanioses do ISC III	65
Tabela 3	Enzimas de restrição e tamanhos dos fragmentos obtidos após a digestão do kDNA das espécies <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) infantum</i> .	67
Tabela 4	Programa de amplificação para "Touchdown" RTQ-PCR	73
Tabela 5	Lista dos pequenos mamíferos capturados, por espécie e ambiente, no período de junho/2006 a novembro/2007 na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG.	75
Tabela 6	Análise comparativa da eficiência de amplificação das seqüências dos genes IRBP β -actina e β -globina pela PCR em amostras de DNA de possíveis hospedeiros de <i>Leishmania</i> infectados ou não infectados.	79
Tabela 7	Positividade de diferentes técnicas de PCR em espécies de hospedeiros de <i>Leishmania</i>	83
Tabela 8	Positividade das PCRs específicas para <i>Leishmania</i> realizadas em DNA extraído de diferentes tecidos de cães e pequenos mamíferos	84
Tabela 9	Identificação da espécie de <i>Leishmania</i> pela PCR-RFLP kDNA	85
Tabela 10	Identificação da espécie de <i>Leishmania</i> pelo seqüenciamento do produto da LnPCR	86

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Ba: Baço
BH: Belo Horizonte
CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCZ: Centro de Controle de Zoonoses
CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou
COBEA: Colégio Brasileiro de Animais de Experimentação
Ct: Cycle threshold
Cytb: Citocromo b
DAT: Direct Agglutination Test - (Teste de Aglutinação Direta)
DNA: Ácido desoxirribonucleotídeo
dNTP: Desoxirribonucleotídeos 5' fosfato
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay - (Ensaio Imunoenzimático)
Fg: fentogramas
Fi: Fígado
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz
IBAMA: Instituto Brasileiro para o Meio Ambiente
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFI: Imunofluorescência Indireta
IRBP: Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein
ISC III: Instituto de Salud Carlos III
ITS-1: Internal Transcribed Spacers-1
kDNA: DNA do cinetoplasto
LIT: Liver Infusion Tryptose - (Infusão de fígado triptose)
LT: Leishmaniose Tegumentar
LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana
LnPCR: *Leishmania* Nested PCR
Lu: Lutzomyia
LV: Leishmaniose visceral
LVC: Leishmaniose visceral canina
Me: Medula
MG: Minas Gerais

MS: Ministério da Saúde
μL: microlitros
mM: Milimolar
μM: micromolar
ng: nanograma
NNN: Meio de cultura de Novy, McNeal e Nicolle
OD: Densidade óptica
OMS: Organização Mundial de Saúde
PBS: Phosphate Buffer Solution – (Tampão salina fosfato)
pb: Pares de bases
Pc: Pele de cauda
PCR: Polymerase Chain Reaction – (Reação em cadeia da polimerase)
PDEE: Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior
PM: Peso Molecular
Po: Pele de orelha
RMBH: Região Metropolitana de Belo Horizonte
RFLP: Restriction Fragment Length Polimorfism – (Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição)
RTQ-PCR: Real Time Quantitative-PCR
Sg: sangue
SINAN: Sistema Nacional de Agravos Notificados
SMF: Sistema mononuclear fagocitário
SMS/PBH: Secretaria Municipal de Saúde/ Prefeitura de Belo Horizonte
SSUrRNA: Small subunit Ribosomal RNA
TM: Temperature melting
Un: unidades
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
UV: ultravioleta
WHO: World Health Organization

Resumo

Leishmania braziliensis e *L. infantum* são as espécies causadoras das leishmanioses prevalentes no Brasil e responsáveis pelas formas Tegumentar (cutânea e mucocutânea) e Visceral, respectivamente. A identificação de reservatórios de *Leishmania* sp. é crucial para o estabelecimento de medidas eficientes de controle. A quantificação parasitária em diferentes amostras clínicas pode ser útil na indicação da participação de um determinado hospedeiro como fonte de infecção. O cão é considerado o reservatório doméstico da LV, sendo também aventada a hipótese de ser uma importante fonte de infecção de LT e, a participação de roedores e marsupiais na epidemiologia das leishmanioses já foi descrita por vários autores. Belo Horizonte, nos últimos 20 anos, caracterizou-se como região endêmica para leishmanioses. Estudos epidemiológicos para busca ativa de reservatórios silvestres destas doenças são escassos no país. O objetivo deste trabalho foi detectar a presença de *Leishmania* em cães e pequenos mamíferos capturados na Regional Nordeste de Belo Horizonte, MG. Foram utilizadas amostras coletadas de 162 cães domiciliados na região e de 99 pequenos mamíferos capturados (Roedores, Marsupiais e Carnívoros). As amostras biológicas colhidas dos animais (cães e pequenos mamíferos) foram utilizadas para a detecção molecular de *Leishmania*. Embora baixa a concordância apresentada pelas PCRs dirigidas às regiões do kDNA e do SSUrRNA, a prevalência da infecção foi considerada elevada, tanto em cães (entre 18,5 e 75%) como em pequenos mamíferos (entre 31 e 92%). O seqüenciamento do produto amplificado pela PCR dirigida ao SSUrRNA apresentou maior eficiência na identificação da espécie de *Leishmania* em amostras clínicas, em relação ao perfil de restrição gerado pela RFLP dos produtos da PCR dirigida ao kDNA, sendo possível constatar inclusive casos de infecção mista por *L. braziliensis* e *L. infantum* em roedores coletados no peri - domicílio. Entre os cães, prevaleceram as infecções por *L. infantum* e *L. braziliensis*, sendo importante destacar que em amostras de dois cães, o parasito foi identificado como *L. amazonensis*, o que não é muito comum nesta região. A RTQ-PCR mostrou-se uma ferramenta eficiente na detecção, identificação e quantificação de *Leishmania* em amostras de cães e pequenos mamíferos, o que aumenta a perspectiva de seu uso em estudos da epidemiologia molecular das leishmanioses.

Abstract

Leishmania braziliensis and *L. infantum* are leishmaniasis causing species prevalent in Brazil and responsible respectively for the cutaneous (cutaneous and mucocutaneous) and Visceral forms. The identification of *Leishmania sp.* reservoirs is crucial for the establishment of efficient measures of control. Quantifying parasites in different clinical samples may be useful in indicating the involvement of a particular host as a source of infection. The dog is considered the domestic reservoir of VL, and is also postulated to be an important source of infection of TL, the contribution of marsupials and rodents in the epidemiology of leishmaniasis has been described by several authors. In the last 20 years Belo Horizonte was characterized as an endemic area for leishmaniasis. Epidemiological studies for active search of wild reservoirs of these diseases are scarce in the country. The objective of this study was to detect the presence of *Leishmania* in dogs and small mammals captured in the Northeast Region of Belo Horizonte, MG. Samples were collected from 162 dogs domiciled in the region and 99 small mammals (rodents, marsupials and carnivores) captured. Biological samples taken from animals (dogs and small mammals) were used for molecular detection of *Leishmania*. Although low agreement between PCRs protocols directed at regions of kDNA and SSUrRNA, the prevalence of infection in both dogs (between 18.5 and 75%) and small mammals (between 31 and 92%) was also considered high. The sequencing of the amplicons addressed to SSUrRNA showed higher efficiency in identifying *Leishmania* species in clinical samples in relation to the restriction profiles generated by RFLP of kDNA PCR products, and it was possible to note cases of mixed infection by *L. braziliensis* and *L. infantum* in rodents collected in peridomestic area. Among the dogs, prevalent infections were caused by *L. infantum* and *L. braziliensis*, it is important to emphasize that in samples of two dogs, the parasite was identified as *L. amazonensis*, which is not very common in this region. The RTQ-PCR proved to be an effective tool in detection, identification and quantification of *Leishmania* in samples of dogs and small mammals, which increases the perspective of its use in studies of molecular epidemiology of leishmaniasis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Leishmania* e leishmanioses

Os parasitos do gênero *Leishmania* são organismos unicelulares, digenéticos, pertencentes ao sub-reino Protozoa, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, (Ross, 1903). Este gênero constitui-se de um grupo de espécies morfológicamente muito similares, biologicamente distintas com características genéticas, bioquímicas e imunológicas diferenciadas. A estrutura do DNA extra nuclear do cinetoplasto (kDNA), presente nestes organismos, constitui uma característica marcante da ordem Kinetoplastida possuindo peculiaridades únicas e um mecanismo ímpar de replicação (Shlomai, 1994).

O gênero *Leishmania* apresenta em seu ciclo biológico as formas amastigotas, com flagelo interno e cinetoplasto visível em forma de bastão. Estas formas vivem e multiplicam-se no interior de células do sistema monocítico fagocitário (SMF) dos hospedeiros vertebrados, que são mamíferos de diferentes ordens entre elas roedores, marsupiais, edentados, carnívoros e primatas.

A transmissão do parasito entre os hospedeiros vertebrados ocorre pela picada de fêmeas de insetos pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, (Martins *et al.*, 1978). Ao picarem um animal parasitado estes insetos podem, juntamente com o sangue, sugar formas amastigotas, que no interior de seu tubo digestório, transformam-se em promastigotas e aí multiplicam-se.

No trato alimentar do inseto vetor são encontradas as formas promastigotas e paramastigotas com flagelos longos (Chang *et al.*, 1985; Walters, 1993). As formas promastigotas também são cultivadas em meios axênicos (Evans, 1987), como o LIT (Liver Infusion Tryptose) e o NNN (Novy Mc Nel e Nicolle).

A multiplicação faz-se por divisão binária em ambos os hospedeiros, vertebrados e invertebrados, embora existam evidências que não descartam a possibilidade de troca de material genético (Bastien *et al.*, 1992).

As promastigotas, após seu desenvolvimento, migram para as partes anteriores do tubo digestório do flebotomíneo, atingindo o aparelho picador

sugador do inseto. O mesmo inseto infectado, em um segundo repasto em outro animal poderá inocular as formas promastigotas metacíclicas infectantes. No hospedeiro vertebrado estas formas poderão penetrar em células do SMF, transformando-se em amastigotas em seu interior e multiplicando-se (Chang, 1985).

Atualmente são conhecidas cerca de trinta espécies de *Leishmania* que infectam mamíferos, agrupadas e classificadas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Lainson & Shaw, 1987). De acordo com esta classificação, as espécies pertencentes ao subgênero *L. Leishmania* desenvolvem-se de forma exclusiva na porção média e anterior do intestino (seção Suprpylaria), e as espécies do subgênero *L. Viannia*, desenvolvem-se nas partes anterior e média, como também no intestino posterior na região do piloro (seção Peripyalaria) dos flebotomíneos (Lainson & Shaw, 1979).

As Leishmanioses compreendem um grupo de doenças parasitárias, amplamente distribuídas em países tropicais e subtropicais, em ciclos zoonóticos e antroponóticos, variando em gravidade, desde formas cutâneas com auto-cura, lesões únicas na pele a severas mutilações na mucosa, ou infecções nas vísceras (Ashford, 2000; Lainson & Shaw, 1987).

As Leishmanioses permanecem como um grave problema de saúde pública, uma vez que estão largamente distribuídas por 88 países em todos os continentes com exceção da Oceania, com prevalência global estimada em 12 milhões de casos e incidência anual de 1,5 – 2 milhões de casos. Sendo que aproximadamente 1 – 1,5 milhões de casos são causados pelas leishmanioses cutâneas e 500.000 causados pelas formas viscerais da doença.

Estes agravos de ampla variação topo geográfica em sua ocorrência apresentam uma distribuição geralmente focal, sendo que sua área de abrangência coincide com o mapa sócio-econômico da pobreza pelo mundo (Alvar *et al.* 2006).

Entre os casos da forma tegumentar, 90% ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Iran, Peru, Arábia Saudita e Sudão; enquanto que para a forma visceral, 90% dos casos concentram-se em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão.

A maioria destes países é classificada como em desenvolvimento sendo que, em todos, as leishmanioses ocorrem nas regiões mais pobres. Assim, a

morbi-mortalidade desses agravos é motivo de grande preocupação uma vez que, nas áreas sob maior risco, há grande proporção de miseráveis em situação de má-nutrição, debilidade imunológica e inadequadas condições de higiene e moradia o que pode ser ainda mais grave quando ocorre a co-infecção com HIV. Atualmente as leishmanioses apresentam uma distribuição geográfica mais ampla do que antigamente, sendo agora reportadas em áreas onde não eram endêmicas (WHO, 2002).

Podem ser consideradas as mais complexas e diversas de todas as doenças transmitidas por vetores, em sua ecologia e epidemiologia, englobando cerca de 21 espécies de parasitos, capazes de infectar o homem e diversas espécies de reservatórios e flebotomíneos vetores. Cerca de 30 espécies de flebotomíneos são vetores comprovados de *Leishmania* (Ashford, 2000; Lainson & Shaw, 1987).

A epidemiologia das leishmanioses somente pode ser compreendida através do conhecimento de todos os elos que compõem seu ciclo de transmissão, como reservatórios e vetores envolvidos e suas relações ecológicas.

Estudos da ecologia dos flebotomíneos baseiam-se, principalmente, na cuidadosa identificação da fauna flebotomínica em focos da doença. Assim, o fator primordial que impulsiona os estudos dos flebotomíneos é a sua capacidade vetorial para *Leishmania* (Saraiva, 2008).

Atualmente, já foram descritas mais de 800 espécies de flebotomíneos e estima-se que 10% delas sejam capazes de transmitir *Leishmania*. Tal capacidade já foi evidenciada em 19 espécies, das quais 11 pertencem ao gênero *Phlebotomus* e oito ao gênero *Lutzomyia* (*Lu.*) (Marcondes, 2007). Diferentes espécies de *Lutzomyia*, os flebotomíneos do novo mundo, são responsáveis pela transmissão das muitas espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose tegumentar americana (LTA) e da leishmaniose visceral (LV). Há também fortes evidências de que outras 14 espécies, nove do gênero *Phlebotomus* e cinco do gênero *Lutzomyia*, também sejam vetores de leishmanioses (Killick-kendrick, 1990).

1.1.1 Leishmanioses neotropicais

As leishmanioses neotropicais são zoonoses presentes na natureza, transmitidas através dos vetores infectados entre reservatórios silvestres e domésticos, sendo o homem um hospedeiro acidental. O ciclo, inicialmente silvestre e rural, já se encontra presente em grandes cidades, como resultado da adaptação de vetores e reservatórios ao ambiente urbano, processo este conhecido como a urbanização das leishmanioses (figura 1). A epidemiologia das leishmanioses do Novo Mundo é bastante complexa devido à participação de várias espécies de flebotomíneos vetores e de mamíferos hospedeiros (Silva *et al.*, 2005).

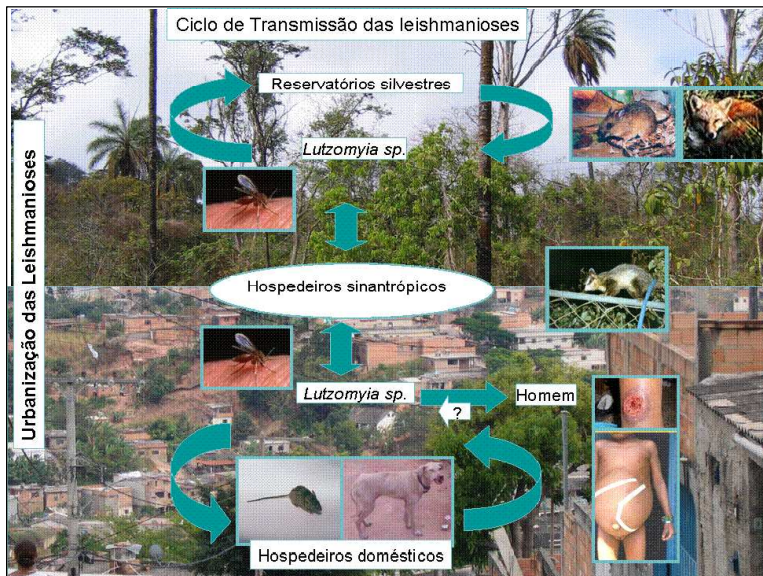


Figura 1. Ciclo de transmissão dos parasitos do gênero *Leishmania* e o processo da urbanização das leishmanioses.

Quanto maior a diversidade de vetores e reservatórios, maior o número de táxons que pode ser encontrado no mesmo foco.

No Novo Mundo, o gênero *Leishmania* ocorre desde a península de Yucatã, no México até o norte da Argentina, por onde se distribuem pelo menos

17 táxons, causando diversas formas clínico-epidemiológicas (Thomaz-Soccol, 1993; Dedet *et al.*, 1993). Destes, 10 são assinalados no homem.

Em função da diversidade e complexidade biológica do parasito, dos vetores e dos hospedeiros, a leishmaniose apresenta um caráter variado de manifestações clínicas. Dessa forma, é considerada, não uma doença simples e sim, um complexo de doenças.

A importância das leishmanioses neste continente, onde a doença humana apresenta-se basicamente sob duas formas clínicas: Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) com suas variações; reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas graves, com altas taxas de mortalidade nos casos de LV não tratados e alta morbidade nos casos de LT, que podem muitas vezes levar a lesões destrutivas e desfigurantes (Dedet & Pratlong, 2000).

No Brasil, existe uma grande variedade de espécies do protozoário e as leishmanioses apresentam-se como zoonoses em franca expansão geográfica (Dunaiski, 2006).

Segundo dados do DATASUS, no Brasil foram registrados 33949 casos de LTA e 2859 de LV em 2001. A LTA tem sido notificada em todos os 26 estados e no Distrito Federal. A LV tem sido notificada em 22 estados, atingindo as cinco regiões geográficas do país. A maior incidência de LTA, entre os anos de 2001 e 2006, encontra-se no Norte, com 39% do total das notificações, seguida pelas regiões Nordeste (32%), Sudeste (10%), Centro-Oeste (16%) e Sul (3%). A maior incidência de LV, entre os anos de 2001 e 2006, encontra-se no Nordeste (58,62%), seguida pelas regiões Sudeste (17,05%), Norte (16,04%), Centro-Oeste (8,22%) e Sul (0,08%). As espécies de *Leishmania* associadas à doença no homem são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *L. (L.) infantum*. (MS, 2000 e MS, 2006).

Em Minas Gerais o número de casos de leishmaniose, tanto tegumentar quanto visceral tem aumentado significativamente como mostrado na figura 2. Em termos percentuais, os casos de LTA e de LV confirmados em Minas

Gerais representam respectivamente 6,01% e 11,61% dos casos confirmados no Brasil (DATASUS).

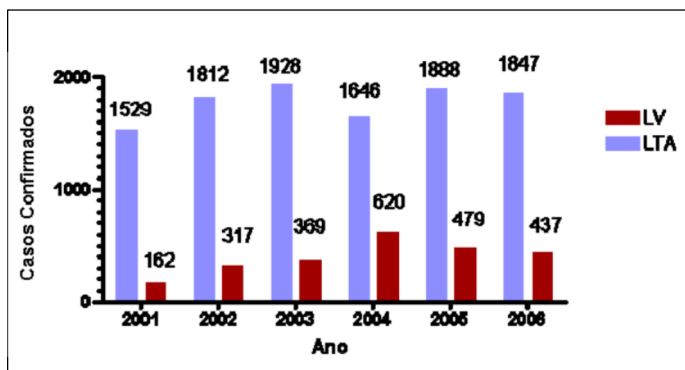


Figura 2. Casos confirmados de LTA e LV em Minas Gerais no período de 2001 a 2006 (DATASUS).

1.2 Leishmaniose visceral (LV)

A LV é uma doença de caráter crônico, potencialmente fatal para o homem, tendo como agentes etiológicos as espécies do gênero *Leishmania* pertencentes ao complexo *L. (L.) donovani*, (Lainson e Shaw, 1987). São elas a *L. (L.) donovani* (Ross, 1903) e *L. (L.) infantum* (Nicolle, 1908), presentes no Velho Mundo e *L. (L.) chagasi*, (Cunha e Chagas, 1937), presente no Novo Mundo.

Existiam divergências em relação à utilização do nome específico *L. chagasi* para designar o agente etiológico da LV no Novo Mundo. Estas controvérsias estavam relacionadas com a origem da doença no Novo Mundo (Mauricio, 2000). Duas hipóteses tentam explicar a origem da LV no continente Americano.

A primeira sugere que a *L. chagasi* é autóctone, tendo canídeos silvestres como hospedeiros primários e fontes de infecção para o cão e o homem (Lainson e Shaw, 1987). Esta proposição ganhava algum suporte a partir da bem equilibrada relação parasito-hospedeiro em *Cerdoconyon thous*, o que indica uma associação antiga quando comparada com a infecção fulminante e fatal muitas vezes observada em cães domésticos, esta sugestiva de uma associação parasito-hospedeiro mais recente. Embora, quando criados

em cativeiro, canídeos silvestres como o cachorro vinagre (*Speothos venaticus*) e a raposa (*Lycalopex vetulus*) possam desenvolver sintomas como aqueles apresentados pelos cães (Luppi *et al.*, 2008).

A outra hipótese considera que a LV é causada pela *L. infantum* que foi introduzida na América Latina pelos europeus e seus cães, ou pelos escravos. Esta afirmativa tem suporte em dados obtidos por técnicas bioquímicas (isoenzimas) sorológicas (anticorpos monoclonais) e de biologia molecular que evidenciam a similaridade entre *L. infantum* e *L. chagasi* (Killick-Kendrick *et al.*, 1980; Grimaldi Jr *et al.*, 1987; Maurício *et al.*, 2000; Alvarenga 2007; Lukes *et al.*, 2007). Além disso, existem características comuns na epidemiologia da doença no Brasil e na região do Mediterrâneo, tais como a existência de canídeos como reservatórios silvestres e domésticos, a prevalência maior em crianças e manifestações clínicas diversas.

O complexo *Leishmania donovani*, é atualmente dividido em apenas duas espécies válidas, a *Leishmania infantum*, que prevalece na Europa, Norte da África e nas Américas Central e do Sul; e a *Leishmania donovani*, que prevalece no Leste da África, Índia e em partes do Oriente Médio (Lukes *et al.* 2007). Sendo esta a hipótese mais aceita, neste trabalho, *L. infantum* e *L. chagasi* serão considerados sinônimos.

A LV apresenta diferentes quadros epidemiológicos no mundo, ocorrendo em vastas áreas tropicais e subtropicais do globo. Pode apresentar-se como uma zoonose, como acontece no Brasil e no Mediterrâneo, sendo os canídeos as principais fontes de infecção para os vetores, e como antroponose, como ocorre na África, Bangladesh, Índia e Nepal, sendo o homem a fonte de infecção para os vetores (WHO, 2002).

É endêmica em 88 países, sendo que 90% dos casos de LV notificados no mundo ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão.

No Novo Mundo ocorre na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Paraguai, Venezuela, Guatemala, Guadalupe, Honduras, Martinica, México, e El Salvador (Lainson e Shaw, 1987; Shaw, 2007).

No Brasil, são registrados 90% dos casos de LV que ocorrem em todo o continente americano. Na década de 90, aproximadamente noventa por cento (90%) dos casos notificados de LV ocorreram na Região Nordeste. À medida que a doença expande-se para as outras regiões e atinge áreas urbanas e

periurbanas, esta situação vem modificando-se. Até o final da década de 90 existiam casos de leishmanioses em 18 dos 27 estados da Federação, distribuídos em quatro das cinco regiões do país. No período de 2000 a 2002, a Região Nordeste apresentou uma redução para 77% dos casos do país (MS, 2006). Recentemente, vêm sendo notificados casos humanos de LV e LTA nos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul (De Freitas *et al.*, 2006).

Na LV, os parasitos alcançando as células do sistema monocítico fagocitário (SMF) dos órgãos internos, principalmente, baço, fígado e medula óssea, provocam quadros cuja gravidade depende do tempo de evolução clínica e da resposta imunológica do indivíduo parasitado, podendo originar casos assintomáticos, moderados e graves, inclusive com óbitos quando não são adequadamente tratados (Tafari *et al.*, 1989; Grimaldi Jr e Tesh, 1993; Lainson, 1997; Santa Rosa e Oliveira, 1997).

A importância da leishmaniose visceral no Brasil reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição, mas também na possibilidade de assumir formas clínicas muito graves e às vezes fatais, apesar da existência de tratamento específico, que também pode apresentar problemas como a baixa tolerância por parte dos pacientes, devido aos efeitos colaterais, e a resistência adquirida pelo parasito. Segundo dados do Ministério da Saúde ocorrem cerca de 4 mil casos anuais da doença (MS,2006).

O primeiro caso de LV, supostamente adquirido no Brasil, ocorreu no início do século XX em um paciente adulto italiano proveniente de Mato Grosso, que emigrara 14 anos antes para o Brasil, e foi diagnosticado no Paraguai (Migone, 1913). Acredita-se que a infecção ocorreu na região de Porto Esperança, Mato Grosso. Não obstante tratar-se de um indivíduo oriundo do Mediterrâneo, o longo tempo decorrido desde que deixara a zona endêmica levou à suposição de que se tratava de um caso autóctone.

No entanto, a comprovação definitiva da existência de calazar autóctone na América só ocorreu quando Mazza e Cornejo (1926) publicaram a observação de dois casos em crianças que nunca haviam deixado a Argentina. Em uma delas observaram a presença de *Leishmania* ao realizarem punção esplênica.

Formas amastigotas foram encontradas em fígado de pacientes suspeitos de febre amarela em vários estados do Nordeste e no Pará (Penna,

1934), tendo sido o agente etiológico mais tarde denominado *L. (L.) chagasi* por Cunha e Chagas em 1937.

Chagas (1936) e Chagas *et al.* (1938) foram quem pela primeira vez suspeitaram da existência de um animal silvestre como reservatório de *L. chagasi* no Novo Mundo. Este fato foi confirmado pelos pesquisadores Deane e Deane (1954) e por Alencar (1961), no Ceará, quando estabeleceram a importância epidemiológica da raposa da espécie *Dusicyon vetulos* como fonte de infecção e manutenção da doença.

Posteriormente, uma segunda espécie de raposa, *Cerdocyon thous*, foi encontrada naturalmente infectada por *L. (L.) chagasi* (Silveira *et al.*, 1982; Lainson, 1985; Mello *et al.* 1988; e Silva *et al.*, 2000).

Nos últimos anos a incidência de casos de LV aumentou na região Sudeste do Brasil, sendo a doença registrada em diversas cidades, incluindo a capital do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte (Luz *et al.*, 2001).

O primeiro caso de leishmaniose visceral diagnosticado em Belo Horizonte e no Estado de Minas Gerais foi publicado por Versiani (1943). Tratava-se de um indivíduo de Alagoas que provavelmente infectara-se fora de Minas Gerais, uma vez que veio de região endêmica da doença.

O primeiro caso autóctone de LV humano em BH foi relatado no ano de 1959, em uma criança de um ano e dez meses, que nunca havia saído da cidade. O modo pelo qual a criança contraiu a infecção permaneceu obscuro (Rezende e Bastos, 1959). Em 1989, em Sabará, foi diagnosticado o segundo caso humano autóctone da doença na Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) (Genaro *et al.*, 1990).

Em cães, o primeiro caso da doença foi registrado na região nordeste de BH, em 1992. Inquéritos sorológicos realizados na área encontraram prevalência de 8,5 e 9,0% nos bairros Fernão Dias e São Paulo respectivamente (Oliveira *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, o número de casos de leishmaniose visceral, tanto humana quanto canina, na RMBH, aumentou de forma expressiva, indicando uma elevação da taxa de transmissão da doença nessa área (Silva *et al.*, 2001). Segundo dados da Gerência de Controle de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde da prefeitura de Belo Horizonte (SMS/PBH), o registro de casos ocorridos no município no período compreendido entre 1994 e 2009

(dados parciais) revela um aumento do número de casos humanos, sendo que ao longo destes 15 anos, o número de casos confirmados na regional nordeste corresponde a 21,6% do total de casos do município (Figura 3), e uma soropositividade canina em torno de 10%, durante anos consecutivos (2005 a 2008).

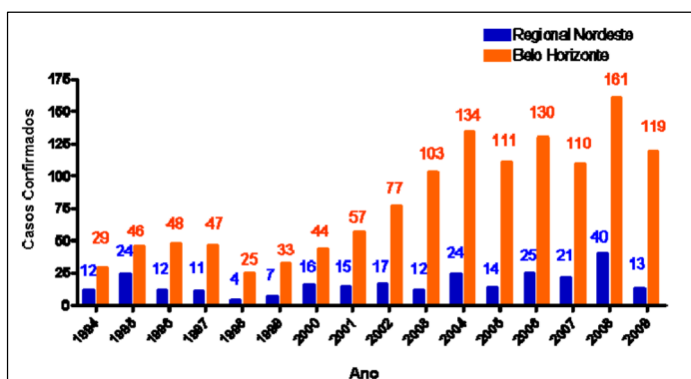


Figura 3: Casos Humanos de Leishmaniose Visceral ocorridos no município de Belo Horizonte/MG, 1994-2009 (SMS/PBH, atualizado em 08 de janeiro de 2010).

Ao contrário da *L. (L.) donovani*, na cadeia de transmissão de *L. (L.) infantum*, o homem serve apenas como uma fraca fonte de infecção para os flebotomíneos e a infecção depende largamente da presença de cães infectados na área (Lainson e Shaw, 1987).

O cão e a raposa apresentam um intenso parasitismo cutâneo, que permite a fácil infecção dos flebotomíneos (Deane e Deane, 1954). É provável que existam outras fontes de infecção em algumas situações específicas, e que o homem esteja envolvido na cadeia de transmissão (Coutinho *et al.*, 2005; Nascimento *et al.*, 1996; Badaró *et al.*, 1994; Deane e Deane, 1955).

1.2.1 Leishmaniose visceral canina (LVC)

Os cães têm sido implicados como importantes reservatórios da LV desde a descoberta da leishmaniose visceral canina (LVC) em um inquérito canino realizado na Tunísia. De 145 cães examinados pelo método parasitológico utilizando material coletado através de punção na medula óssea, três animais mostraram-se positivos, ficando assim registrado o primeiro foco de calazar canino no mundo (Nicolle e Conte, 1908).

As primeiras observações feitas no Brasil sobre a LVC foram realizadas por Chagas *et al.* (1937), na região Norte. Porém a doença só foi caracterizada quando estudada por Deane (1956) em área endêmica do Estado do Ceará. A LVC assim como a doença humana está bastante disseminada no país e algumas localidades endêmicas revelam altas taxas de prevalência de LVC com a presença abundante do vetor (Vieira e Coelho, 1998; MS,2006).

A infecção canina é considerada importante por várias razões, dentre as quais se destacam: o convívio do cão em estreita aproximação com o homem; o fato de servir de fonte de repasto para o vetor, atraindo-o para perto do homem; sua alta densidade populacional aliada à susceptibilidade que apresenta à *L. (L.) infantum*; além do grande número de cães assintomáticos com intenso parasitismo cutâneo (Killick-Kendrick *et al.*, 1997).

O calazar canino é de início insidioso (Laveran e Havet, 1917) com acentuado emagrecimento. O sinal mais freqüente é geralmente apresentado na superfície cutânea, com grandes áreas de alopecia, eritema e descamação (Alencar, 1959). Porém, algumas vezes, os cães infectados apresentam aspecto aparentemente normal, mas com alto grau de parasitismo da pele e vísceras (Deane e Deane, 1955). O período de evolução da doença no cão pode ser bastante longo, podendo chegar a mais de um ano. O animal torna-se apático com pouca mobilidade, o que provoca um aumento acentuado das unhas (Alencar, 1959). Uma característica importante é a permanência da doença clinicamente inaparente por longos períodos.

No período compreendido entre 1993 e 1997, os distritos de Belo Horizonte com maiores incidências de calazar humano sobrepuseram-se àqueles que apresentaram a doença canina (Belvilacqua *et al.*, 2001). Utilizando a análise espacial Oliveira *et al.* (2001) observaram uma forte evidência de que os casos humanos de LV no município de BH no período de

1994 – 1997 ocorreram em áreas onde a taxa de prevalência em cães era alta, dados corroborados por Margonari *et al.* (2006).

Embora os cães assintomáticos sejam considerados por alguns autores com pouca ou nenhuma importância epidemiológica, Dye (1992) e Molina *et al.* (1994) demonstraram que as taxas de infecção dos vetores não estão correlacionadas com a condição clínica dos animais. Guarga *et al.* (2000) realizaram o xenodiagnóstico direto em cães infectados com *L.(L.) infantum* e não observaram diferença estatisticamente significativa nas taxas de infecção das fêmeas de *Phlebotomus perniciosus* quando analisados os diferentes grupos clínicos.

Entretanto, Michalsky (2004) ao estudar a infecção em *Lu. longipalpis* alimentadas em cães infectados com *L.(L.) infantum* observou diferença entre as taxas de infecção quando o xenodiagnóstico foi realizado em animais assintomáticos (5,4%) ou sintomáticos (28,35%).

Portanto, quando somente cães sintomáticos são considerados em estudos epidemiológicos, a prevalência da infecção é subestimada. Estes resultados suportam o ponto de vista de Molina *et al.* (1994) no qual apenas o sacrifício dos cães sintomáticos com sorologia positiva como estratégia para o controle da LV é insuficiente, devido à importância que os cães assintomáticos têm na epidemiologia da doença. As medidas de controle devem ser direcionadas aos cães infectados, isto é, portadores de *Leishmania*, independente da manifestação de sinais clínicos.

1.3 Leishmaniose tegumentar americana (LTA)

A LT é uma doença que desde a Antiguidade vem atingindo o homem. Relatos sobre ela podem ser encontrados na literatura do primeiro século d.C., na Ásia Central. A moléstia era conhecida como “úlceras de Balkh”, nome derivado da cidade de Balkh que é uma área altamente endêmica de LT, no norte do Afeganistão. Outros nomes já foram dados a estas lesões, tais como “botão do Oriente”, “úlceras de Delhi”, “botão de Biskra”, “úlceras de Bagdad”, “úlceras de Ashkabad” e outros, normalmente baseados na região onde elas ocorriam de forma endêmica (Brumpt & Pedroso 1913, Grevelink & Lerner 1996).

No Novo Mundo, existem evidências de que a LT já ocorria no continente antes mesmo da chegada dos colonizadores.

A LTA é causada por uma variedade de espécies de *Leishmania* dermatrópicas dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, que inclui um grupo de doenças comumente referidas por suas características clínico-patológicas como forma cutânea, cutâneo-mucosa e cutânea difusa.

O período de incubação pode variar de duas semanas a vários meses. As lesões cutâneas constituem úlceras rasas, circulares, com bordas elevadas e bem definidas e com assoalho da úlcera de aspecto granular. Nas infecções pela *L. (V. braziliensis)*, a linfadenopatia regional geralmente precede o surgimento de ulcerações por uma a doze semanas. O diagnóstico definitivo depende do encontro e identificação de amastigotas em tecido ou promastigotas em meio de cultura (Gontijo e Carvalho, 2003).

A LTA foi inicialmente associada a áreas de mata primária e zonas rurais, estando a maior diversidade de espécies destes parasitos na região amazônica. Acomete mais freqüentemente os trabalhadores que invadem as florestas tropicais ou moram próximo a elas. O ciclo biológico nesses ambientes mantém-se a partir dos vários hospedeiros vertebrados que podem atuar como reservatórios: roedores, edentados (tatu, tamanduá e preguiça) e marsupiais (gambá) (Lainson 1988). Além disso, a transmissão das leishmanioses esteve associada a algumas espécies de flebotomíneos que até então apresentavam comportamento silvestre (Marzochi 1989).

No Estado de Minas Gerais, tem sido registrada a ocorrência de surtos desde a metade do século passado, e durante muito tempo, foram relacionados com atividades de desmatamento para a construção de estradas e implantação de projetos agro-pastoris (Orsini 1945, Martins *et al.* 1956, Furtado *et al.* 1966). Porém, ao longo das últimas décadas, a epidemiologia da doença tem sofrido alterações, com a ocorrência de surtos em áreas de colonização antiga (Hermeto *et al.* 1994, Gontijo *et al.*, 1995), além do aparecimento de casos em áreas periurbanas de cidades como Caratinga (Mayrink *et al.* 1979) e vários municípios da região metropolitana de Belo Horizonte (Passos *et al.* 1993).

Em Belo Horizonte, a LTA começou a ser estudada em 1940 a partir da detecção de 13 casos humanos por Orsini (1945). Furtado *et al.* (1966) estudaram a origem desses casos e sugeriram que a transmissão poderia ter

ocorrido em áreas periurbanas da Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) ou poderiam ser casos importados de outros municípios.

Passos *et al.* (1993), através de um estudo de campo no município de BH, evidenciaram a possibilidade da transmissão domiciliar da doença em áreas periurbanas. Foi constatada a predominância de *Lu. whitmani* (vetor da LTA) no peri domicílio das regiões de Boa Vista e Venda Nova em Belo Horizonte (Passos *et al.* 1998).

Nos anos consecutivos, o aumento do número de casos humanos de LTA procedentes da RMBH foi registrado pela Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais. Desde então, a LTA é considerada endêmica na região metropolitana de Belo Horizonte. Considerando-se apenas o município de Belo Horizonte, no ano de 2009, foram registrados 32 casos confirmados de LTA, segundo o município de residência (SINAN, 2010).

A LTA também está presente na Regional Nordeste de BH (Figura 4) de acordo com dados da Gerência Regional de Epidemiologia – Nordeste da Secretaria Municipal de Saúde de BH (GEREPI-NE/SMS-BH).

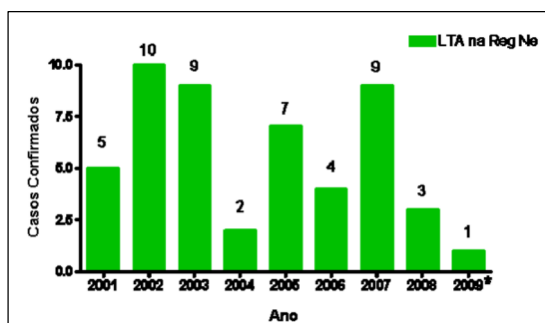


Figura 4: Casos Humanos de Leishmaniose Tegumentar Americana ocorridos na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte/MG, 2001-2009, * dados parciais (SMS/PBH, atualizado em 08 de janeiro de 2010).

1.3.1 Leishmaniose tegumentar canina

Historicamente, no Velho Mundo, a leishmaniose cutânea causada pela *L. (L.) tropica* já era considerada uma antroponose urbana, associada ao cão doméstico em elevada frequência (Marzochi & Marzochi, 1994).

Apesar de ser uma zoonose originalmente silvestre, a LTA causada pela *L. (V.) braziliensis* tem sido descrita por diversos autores ocorrendo em ambientes domésticos, tendo sido aventada a possibilidade de que animais domésticos e peri domésticos, e em especial o cão, seriam importantes fontes de infecção nesses locais (Falqueto et al., 1986; Marzochi & Marzochi, 1994; Pirmez et al., 1988).

A LTA nesses animais pode apresentar-se como uma doença crônica com manifestações semelhantes as da doença humana. Os cães geralmente apresentam lesões únicas, localizadas principalmente nas orelhas e pernas, com parasitismo escasso (Pirmez et al., 1988). Até o momento, não há evidências científicas que comprovem o papel destes animais como reservatórios das espécies de *Leishmania* relacionadas às formas tegumentares, sendo considerados hospedeiros acidentais da doença.

Porém, o papel do cão na epidemiologia da LTA é ainda uma questão controversa. Em algumas áreas endêmicas de ocorrência da *L. (V.) braziliensis* existem evidências de transmissão domiciliar, e de que cães infectados estariam associados a casos humanos, sugerindo o papel do cão como reservatório (Cunha et al., 2006).

Em certas áreas do Vale do Rio Doce, estado de Minas Gerais, e em área rural do estado do Espírito Santo, a LTA é considerada uma zoonose mantida por cães domésticos (Mayrink et al., 1979, Falqueto et al., 1986, Sessa et al., 1994). Falqueto et al. (1991), sugerem que o cão é um importante mantenedor do ciclo no peri domicílio baseado no fato de que a infecção humana foi mais freqüente na presença de cães infectados com *L. (V.) braziliensis*.

Alguns autores consideram o cão apenas um hospedeiro acidental (Lainson e Shaw 1970, Le Pont et al., 1989). Outros autores avaliam o papel do cão como um elo entre a doença dos animais silvestres e o homem (Coutinho et al., 1985, Pirmez et al., 1988). Dunaiski (2006) em estudo epidemiológico da LTA na região do Vale do Ribeira, no estado do Paraná, não observou fatores que associassem o cão à transmissão para humanos.

Vários questionamentos ainda permanecem quanto ao papel do cão como reservatório do parasito causador da LT, uma vez que as evidências que

existem para suportar tal hipótese sejam somente circunstanciais (Reithinger *et al.*, 1999).

1.4 Urbanização das leishmanioses

As leishmanioses vêm ocorrendo de forma endêmico-epidêmica apresentando diferentes padrões de transmissão, relacionados não somente à penetração do homem em focos silvestres, mas freqüentemente em áreas de expansão de fronteiras agrícolas. Tem-se evidenciado a presença da doença em áreas de colonização antiga, demonstrando uma possível adaptação dos vetores e reservatórios a ambientes modificados. São um importante problema de saúde pública pela sua magnitude, transcendência e pouca vulnerabilidade às medidas de controle (Dunaiski, 2006).

É amplamente aceito que as leishmanioses são doenças dinâmicas, sendo as circunstâncias da transmissão continuamente alteradas em relação aos fatores ambientais e do comportamento humano. Modificações no habitat dos hospedeiros naturais e dos vetores, as migrações humanas decorrentes de conflitos ou condições sócio-econômicas precárias têm contribuído para a mudança no panorama epidemiológico das leishmanioses (Gramiccia & Gradoni, 2005).

No final da década de 80, a urbanização da LV no Brasil é intensificada em Teresina, PI e São Luís, MA. Na década de 90, a doença estabelece-se em Montes Claros, MG, Camaçari, BA e Recife, PE (Marzochi e Marzochi, 1994; Monteiro *et al.*, 1994). Dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam peri urbanização e urbanização da LV, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro, RJ, Belo Horizonte, MG, Araçatuba, SP, Santarém, PA, Corumbá, MS, Teresina, PI, Natal, RN, São Luís, MA, Fortaleza, CE, Camaçari, BA e mais recentemente as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas, MS, Campo Grande, MS, e Palmas, TO (MS, 2006).

Neste contexto, os cães são considerados importantes reservatórios e talvez os responsáveis por essa mudança no perfil epidemiológico da LV (Marzochi *et al.*, 1994), uma vez que os casos caninos precedem os humanos e devido a grande discrepância entre o número de cães infectados e o de casos humanos notificados (Oliveira *et al.*, 2001; Beviliacqua *et al.*, 2001).

Belo Horizonte é uma região que vem apresentando casos humanos tanto de LV quanto de LT há mais de 10 anos, bem como a presença de flebotomíneos vetores demonstrando a ocorrência de transmissão ativa da infecção (Souza *et al.*, 2004).

As leishmanioses têm sido foco de atenção e preocupação dos órgãos de saúde pública do município que têm implementado as medidas de controle recomendadas pelo Ministério da Saúde, baseadas no tripé de ações: eliminação de cães soropositivos, combate ao inseto vetor e tratamento dos casos humanos. Porém essas medidas não foram eficientes para conter o ciclo de transmissão e o que está sendo observado é o aumento do número de casos humanos e caninos. Este fato sugere que a epidemiologia das leishmanioses em Belo Horizonte, especialmente em relação à LV, apresenta um quadro mais complexo do que o classicamente descrito. A persistência das leishmanioses em áreas alteradas indica a ocorrência de uma transmissão secundária, peri doméstica destes parasitos.

A exemplo do que vem ocorrendo em Belo Horizonte (Passos *et al.*, 1993), o ciclo peri - urbano de transmissão de LTA tem sido observado em outros centros urbanos como na periferia da cidade de Manaus no Amazonas (Barrett & Senra, 1989).

Com o desaparecimento das florestas primárias, roedores infectados e com hábitos sinantrópicos, invadindo com maior frequência as casas, podem servir como fonte de infecção para flebotomíneos bem adaptados ao ambiente modificado como *Lu. whitmani* e *Lu. intermedia* (Gontijo *et al.*, 2002). A ação antrópica ao meio ambiente apresenta-se como fator importante para a aquisição da infecção, sendo identificada como um dos fatores de risco para o estabelecimento da transmissão (Vanzeli *et al.* 2007).

Em estudos realizados em focos ativos de LTA foi observada a ocorrência da doença em ambos os sexos, com vários indivíduos da mesma família incluindo mulheres e crianças infectadas (Gontijo *et al.*, 2002). Estas observações associadas à coleta de um grande número de flebotomíneos vetores e antropofílicos no peri domicílio ou mesmo no intradomicílio são indicativas de que a transmissão possa ter ocorrido no ambiente peri domiciliar (Passos *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 2004).

A complexidade na luta contra as infecções leishmanióticas explica-se pela grande diversidade de agentes etiológicos, grande número de espécies de flebotomíneos que podem ser vetores, e de mais de uma centena de espécies de animais que podem ser reservatórios (OMS, 1990). Para cada área de transmissão são necessários estudos epidemiológicos para investigar a(s) espécie(s) de *Leishmania* circulante(s), bem como os vetores e reservatórios presentes para que se possam propor medidas de controle mais específicas e eficientes.

A escassez de recursos e a atual falta de infra-estrutura dos serviços de saúde, especialmente no que concerne ao diagnóstico da infecção por *L. (L.) infantum* na população canina e humana, tornam as atuais medidas de controle pouco eficientes. Este quadro favorece a perpetuação do ciclo vicioso entre pobreza e doença em muitos estados brasileiros, nos quais a LV permanece como mais uma doença negligenciada (Dantas-Torres & Brandão Filho, 2006).

1.5 Hospedeiros ou reservatórios ?

Os ciclos de transmissão das leishmanioses dependem dos movimentos de seus reservatórios e a identificação destes hospedeiros é de fundamental importância para o controle efetivo da transmissão.

Vários animais domésticos já foram encontrados infectados por *Leishmania*, tais como eqüinos (Rolão *et al.*, 2005), suínos (Brazil *et al.*, 1987) e felinos (Pennisi *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2005).

O cão ainda é considerado o mais importante reservatório doméstico da LV e tem sido responsabilizado pelo surgimento e manutenção de focos endêmicos e epidêmicos da doença nos grandes centros urbanos (Silva *et al.*, 2001). Os cães preenchem as condições necessárias para serem reservatórios de *L. (L.) infantum*, por serem altamente susceptíveis à infecção, por apresentarem intenso parasitismo cutâneo e também pelo seu convívio junto ao homem (Dantas-Torres *et al.*, 2006).

Em áreas endêmicas de LT e LV são frequentes as observações de cães infectados com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* respectivamente (Silva *et al.*, 2001, Gontijo *et al.*, 2002, Madeira *et al.*, 2003). Estudos de variabilidade genética intra-específica mostram que os isolados que circulam nas populações humana e canina possuem os mesmos esquizodemas. Esse

fato sugere o envolvimento do cão no ciclo de transmissão peri domiciliar das formas tegumentar e visceral das leishmanioses (Lopes *et al.*, 1984, Silva *et al.*, 2001).

A busca pelos reservatórios silvestres naturais das leishmanioses tegumentar e visceral vem sendo um dos mais atraentes objetivos de pesquisadores em todo o Mundo desde as primeiras décadas do século XX, com ênfase aos roedores a partir do momento que algumas espécies dos mesmos foram incriminadas como reservatórios de *Leishmania* (Nery Guimarães *et al.*, 1968).

No Brasil, a participação de roedores na epidemiologia das leishmanioses já foi descrita por vários autores. Em 1970, no estado do Mato Grosso foi detectada pela primeira vez a infecção por *L. braziliensis* nos roedores do gênero *Oryzomys* (Lainson & Shaw, 1970). Anos mais tarde, estes mesmos autores, trabalharam na região de Monte Dourado, norte do estado do Pará, procurando determinar o(s) reservatório(s) silvestre(s) para os agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar e encontraram o roedor *Proechimys guyannensis* freqüentemente parasitado 15/57 (26%) por *L. (L.) amazonensis* (Lainson & Shaw, 1972). Outros hospedeiros de *L. (L.) amazonensis* são pequenos roedores silvestres como *Oryzomys sp.* (Lainson & Shaw, 1968) e *Akodon spp.* (Telleria *et al.*, 1999).

O alto índice de infecção do gênero *Oryzomys* (18/36 ou 50%) no Mato Grosso, bem como nas florestas de Utinga, locais distantes milhares de quilômetros, também levava a crer tratar-se de um importante hospedeiro do(s) agente(s) causal(ais) da leishmaniose tegumentar (Lainson & Shaw, 1970). Além disso, o aspecto das lesões, geralmente do meio para a base da cauda e por vezes abarrotada de parasitos, faz deste roedor uma excelente fonte de infecção para o vetor (Nery-Guimarães *et al.*, 1968, Lainson & Shaw, 1968, Lainson & Shaw, 1970).

Em 1972, Forattini *et al.*, conseguiram isolar *Leishmania*, em roedores das espécies *Akodon arviculoides* e *Oryzomys nigripes* de área endêmica para LTA no estado de São Paulo. Os autores aventam a possibilidade de, o gênero *Oryzomys* ser importante reservatório do parasito neste estado, à semelhança do que foi observado por Lainson & Shaw (1970) para *O. concolor* no Mato

Grosso. Um ano mais tarde e na mesma região estes autores isolaram o mesmo parasito, *L. (V.) braziliensis* a partir de *O. capito laticeps*.

Na Venezuela, este parasito também foi isolado de *Rattus rattus* (rato preto) e *Sigmodon hispidus* (rato do algodão) o que enfatiza a importância dos roedores como prováveis reservatórios da LTA (De Lima *et al.*, 2002).

Brandão-Filho *et al.*, (2003) em Amaraji no estado de Pernambuco conseguiram isolar *L. (V.) braziliensis* em *Bolomys lasiurus* (atualmente *Necromys lasiurus*) e *Rattus rattus*. Carvalho (2005) detectou DNA de *L. (L.) chagasi* por PCR em amostra coletada do roedor silvestre *Nectomys squamipes* (rato da água) capturado em São Vicente Férrer, Zona da Mata Norte do Estado do Pernambuco. Em levantamento da fauna de roedores sinantrópicos e silvestres no município de Araçuaí, Minas Gerais, 18 espécimes do total de 62 roedores capturados estavam infectados por espécies dos complexos *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. donovani*. Parasitos destes três complexos de *Leishmania* foram identificados em espécimes de *Trichomys apereoides*, *Cerradomys subflavus* e *Rattus rattus* o que indica que esta última espécie possa participar do ciclo zoonótico doméstico das LV e LT em área urbana, devido aos seus hábitos sinantrópicos (Oliveira *et al.*, 2005).

Melo (2008), observou que de um total de 60 roedores capturados em Belo Horizonte/MG, 30% foram considerados infectados por espécie pertencente ao complexo *L. braziliensis*, utilizando a PCR dirigida ao kDNA seguida de hibridização.

Em algumas áreas, os marsupiais, que são animais sinantrópicos, podem também ser apontados como reservatórios de *Leishmania*. Espécies de marsupiais já foram encontradas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*, como o *Didelphis* pela *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* (Sherlock *et al.* 1984, Silva *et al.* 2005, Schallig *et al.* 2007) e espécies de gambás infectadas por *L. (L.) amazonensis* (Lainson & Shaw, 1998).

Em Belo Horizonte/MG, de um total de 34 marsupiais do gênero *Didelphis* capturados, a taxa de infecção detectada por PCR foi de 23,5% e o agente etiológico envolvido foi caracterizado como pertencente ao complexo *L. (V.) braziliensis* (Melo, 2008).

Estes animais costumam ser encontrados com facilidade em florestas alteradas pela ação antrópica. São vistos com frequência nos quintais das

residências situadas nas bordas das matas visitando galinheiros e latas de lixo em busca de alimento. Apresentam hábitos crepusculares e noturnos. Escondem-se em ocos de árvores onde passam o dia dormindo. Apesar de nômades, seu “home range” fica em torno de 2,5 km (Nowak, 1991). Estudos colocam estes animais na lista de preferências alimentares tanto pela *Lu. longipalpis*, no Brasil (Sherlock *et al.*, 1984), assim como pela *Lu. evansi* na Colômbia (Travi *et al.*, 1994).

Gambás infectados, assim como os cães podem apresentar duas formas da doença: uma sub clínica, com apenas discretas alterações inflamatórias no fígado, baço e linfonodos, perceptíveis somente pela histopatologia e outra forma grave, onde são encontrados macrófagos repletos de parasitos na pele e órgãos linfóides, necrose esplênica e esteatose hepática (Travi *et al.*, 1998). Portanto, em virtude de sua íntima associação com moradias humanas e o reduzido “home range” tornando possível o compartilhamento dos vetores e parasitos com o homem e o cão (Travi *et al.* 1994), vários pesquisadores apontam este animal como um forte candidato a reservatório (Arias *et al.*, 1981; Arias & Naiff, 1981). Servindo de fonte para o repasto sangüíneo de diferentes espécies de flebotomíneos, seria o elo perfeito entre os ciclos silvestre e periurbano (Cabrera *et al.*, 2003). As espécies de *Didelphis* infectadas podem desempenhar um importante papel na epidemiologia das leishmanioses nos centros urbanos, além da manutenção do parasito na enzootia silvestre, o que faz com que sejam as espécies mais pesquisadas.

Shaw (1988) reconhece dois principais tipos de hospedeiros vertebrados para o caso da leishmaniose zoonótica americana: 1 hospedeiro primário (reservatório), que refere-se ao vertebrado que alberga o parasito no ambiente silvestre e que seria responsável pela manutenção da infecção sem a necessidade da co-existência de um outro hospedeiro; 2. hospedeiro secundário, que diferente do primário, é um animal infectado, porém, incapaz de manter um ciclo enzoótico indefinidamente.

A detecção de DNA de *Leishmania* em uma espécie animal em particular é uma forte evidência, mas não é o suficiente para definir tal espécie de hospedeiro como reservatório da infecção. A confirmação do papel de determinadas espécies como reservatórios de *Leishmania* sp. depende de

outros aspectos entre eles: o encontro da espécie de flebotomíneo vetor naturalmente infectado na mesma região em que foi coletado o suposto reservatório; a sobrevivência do hospedeiro por tempo suficiente para garantir a transmissão da infecção; a prevalência da infecção elevada entre os hospedeiros (acima de 20%); manutenção do parasitismo no sangue periférico ou em lesões na pele em quantidade suficiente para infectar o vetor; e a presença da mesma espécie de *Leishmania* no reservatório e nos humanos (Silva *et al.*, 2005).

A identificação de reservatórios primários da infecção por *Leishmania* é crucial para o desenvolvimento e avaliação de medidas de controle da transmissão. Antigamente para realizar a caracterização da espécie de *Leishmania* envolvida era necessário o isolamento do parasito, o que nem sempre é possível, especialmente quando a espécie em questão é *L. (V.) braziliensis*. Atualmente, esta caracterização das espécies de *Leishmania* pode ser mais facilmente realizada através de métodos baseados na PCR (Schoönian *et al.*, 2003, Brandão Filho e Shaw 2006, Silva *et al.*, 2006).

Segundo Shaw (2007), apenas quando for obtido um melhor entendimento da diversidade genética das espécies de *Leishmania* e dos reservatórios envolvidos no ciclo enzoótico de cada uma delas, será possível avaliar qual o método ou métodos de controle mais eficazes.

1.6 Diagnóstico da leishmaniose

Independente do enfoque dado às medidas de controle, o diagnóstico preciso da leishmaniose canina é extremamente importante, pois a taxa de infecção canina pode ser um sinal, tanto para a ocorrência de epidemias quanto para o aumento do número de casos humanos nas áreas endêmicas, onde normalmente a ocorrência do calazar canino precede a doença em humanos.

Diversas abordagens sorológicas são comumente usadas no diagnóstico da LV. Em particular, os testes de aglutinação direta com base em antígenos liofilizados e comercialmente disponíveis (DAT), o Ensaio imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (IFI) (Ferreira *et al.*, 2007). Os testes sorológicos são raramente usados no diagnóstico LT, porque a sensibilidade pode ser variável, devido ao número de anticorpos circulantes

contra parasitos causadores que tende a ser baixo. A especificidade também pode ser variável, especialmente em áreas onde há outros patógenos (por exemplo, *Trypanosoma cruzi*) que apresentem reação cruzada nos testes dirigidos aos anticorpos anti-*Leishmania*.(Ferreira *et al.*, 2007).

Métodos sorológicos podem ser úteis, porém, apresentam problemas como as reações cruzadas e a diferenciação entre infecção atual e passada, não sendo acurados em pacientes imunossuprimidos (Piarroux *et al.*, 1994; Wilson, 1995; Hu *et al.*, 2000; Ikononopoulos *et al.*, 2003).

O diagnóstico conclusivo depende do achado do parasito, o que é muito difícil, sendo assim, a detecção da presença de anticorpos anti - *Leishmania* ou antígenos do parasito, através de técnicas de imunodiagnóstico são mais utilizadas e podem ser confirmadas por técnicas de biologia molecular.

Desta forma, não existe um método que possa ser classificado como padrão-ouro para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp (Wilson, 1995). Diante das limitações apresentadas pelos métodos de diagnóstico convencionais, existe a necessidade de desenvolver-se uma ferramenta que seja capaz de promover um diagnóstico acurado. Assim, há cerca de dez anos, os métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos para identificação de grupos e espécies de *Leishmania* em variadas amostras clínicas, isolados de cultura, bem como *pool* de flebotomíneos (Michalsky *et al.*, 2002; Schoönian *et al.*, 2003 e Carvalho, 2006), havendo destaque para a reação em cadeia da polimerase (PCR - polymerase chain reaction).

1.6.1 PCR

Atualmente, os métodos de biologia molecular e as técnicas bioquímicas são excelentes ferramentas utilizadas no diagnóstico das leishmanioses, capazes de proporcionar resultados rápidos e seguros quando aplicados. Métodos diagnósticos utilizando o DNA têm sido exaustivamente explorados visando superar as inúmeras limitações que os métodos diagnósticos de rotina apresentam, especialmente em trabalhos que visam a correta detecção, identificação e caracterização dos parasitos, em infecções humanas, caninas e em reservatórios (Carvalho, 2006; Cortes *et al.*, 2004; Gontijo, 2000; Volpini *et al.*, 2004,).

A PCR reproduz in vitro a habilidade natural de replicação do DNA, podendo ser repetida em larga escala. A metodologia requer, primeiramente, o conhecimento, pelo menos parcial, do DNA alvo de um determinado organismo, para o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores (primers) ou sondas que irão hibridizar-se especificamente à seqüência alvo (Yang & Rothman, 2004).

Com o aumento do número de genomas de patógenos sendo seqüenciados, a exploração dos bancos de dados gerados associada ao uso de ferramentas de bioinformática permite o desenvolvimento de iniciadores de PCR empregados em testes diagnósticos; resultando, desde a década passada, na disponibilidade comercial de muitos ensaios baseados nesta técnica, os quais continuam a expandir-se (Cavalcanti, 2008; Martinez, 2006).

Vários trabalhos têm demonstrado que os ensaios moleculares permitem uma detecção mais rápida e sensível de diversas doenças parasitárias além da possibilidade de caracterização dos microrganismos envolvidos na infecção. Degrave *et al.* (1994) desenvolveu e reviu vários sistemas de detecção de DNA de *Leishmania* baseados na PCR.

A amplificação do DNA de *Leishmania* pela PCR pode ser gênero específica (Rodgers, 1990), como pode ser específica para os diferentes complexos (De Bruijin & Barker, 1992; Eresh *et al.*, 1994; Alonso 1999; Cortes *et al.*, 2004).

Podem ser utilizados como alvos o DNA nuclear e o DNA do cinetoplasto (kDNA), cujo minicírculo é considerado um alvo ideal para a detecção de *Leishmania* através de PCR, pois ele apresenta 10.000 cópias por célula, e estas estão distribuídas em cerca de dez classes diferentes de seqüências. Além disso, a seqüência do minicírculo já é conhecida para maioria das espécies de *Leishmania* e apresenta variações que possibilitam a diferenciação dos diversos grupos ou complexos de espécies (Aransay *et al.*, 2000).

Vários grupos de pesquisadores têm desenvolvido iniciadores para PCR dirigidos à região variável do minicírculo de kDNA, que identificam isolados de *Leishmania* ao nível de subgênero ou complexos, responsáveis pelas leishmanioses no Novo Mundo. De Bruijin & Barker (1992) desenharam e padronizaram a utilização de um par de iniciadores altamente sensível e específico para espécies do complexo *L. braziliensis*. Eresh *et al.* (1994)

desenvolveram um par de iniciadores altamente específico para as espécies do complexo *L. mexicana*. Cortes *et al.* (2004) desenvolveram um par de iniciadores específico para as espécies do complexo *L. donovani*.

Outras seqüências alvo também podem ser utilizadas na PCR, como o SSUrRNA (Van Eys *et al.* 1992, Cruz *et al.* 2002 e 2006) e a região espaçadora entre os transcritos internos ou "internal transcribed spacer" (ITS-1) deste gene (Nasereddin *et al.* 2006, Schönian *et al.* 2003).

Além de seu bom desempenho em estudos clínicos, a PCR tem sido uma ferramenta eficiente em estudos epidemiológicos, na tentativa de incriminar animais silvestres ou domésticos como hospedeiros ou reservatórios da doença. Esta técnica está sendo aplicada para analisar as diversas amostras obtidas destes animais em campo, uma vez que é difícil a detecção e identificação dos organismos infectantes pelos métodos convencionais (Alexander *et al.* 1998, Reithinger *et al.* 2000, Silva *et al.* 2000, Brandão Filho *et al.* 2006, Silva *et al.* 2001, Solano-Gallego *et al.* 2001, De Lima *et al.* 2002, Quaresma 2009, Melo 2008).

A PCR, em relação aos métodos sorológicos, apresenta como vantagem a especificidade, principalmente quando se trabalha com animais de campo, reservatórios de outros protozoários como é o caso do *Didelphis/Trypanosoma* (Barretto & Ribeiro, 1979). Além disso, em se tratando de um inquérito epidemiológico para o qual o que interessa é a presença de infecção atual e não passada, a PCR seria o método mais indicado uma vez que o DNA, ao contrário da imunidade celular ou humoral, persiste apenas por algumas horas após a morte do parasito (Disch *et al.*, 2004; Prina *et al.*, 2007).

A alta sensibilidade e especificidade, a habilidade de detectar e identificar o protozoário envolvido, e o fato de poder ser aplicada diretamente em amostras clínicas, produzindo um resultado confiável dentro de poucas horas, são vantagens indiscutíveis da PCR em relação aos métodos de diagnóstico tradicionais (Ikonomopoulos *et al.*, 2003).

Apesar dos avanços tecnológicos, os métodos de amplificação da molécula de DNA apresentam limitações que incluem resultados falso-positivos, decorrentes de contaminação com DNA, e resultados falso-negativos, relacionados com a presença de inibidores da PCR (Yang; Rothman, 2004).

Nos resultados falso-positivos, na maioria dos ensaios patógeno-específicos, a fonte predominante de contaminação é derivada de produtos amplificados em reações anteriores que podem ser transportados por meio dos reagentes, tubos, pipetas e bancadas. Boas práticas de laboratório e separação física das áreas de pré-amplificação e pós-amplificação podem reduzir os riscos de contaminação. O uso de métodos baseados na irradiação ultravioleta, tratamento químico ou digestão enzimática também são úteis para evitar tais contaminações (Carrol *et al.*, 1999; Corless *et al.*, 2000).

Resultados falso-negativos podem decorrer de um volume amostral abaixo do permissível para a reação, além de problemas associados com o processamento. Exemplos de inibidores da polimerase que possam estar presentes nas amostras de DNA: fenol, proteinase K, excesso de EDTA, hemoglobina e outras proteínas de hemácias, SDS, elevadas concentrações de sal. Tais obstáculos podem ser superados com tratamento adequado da amostra por meio de uma correta extração e purificação do DNA e remoção destes inibidores (Bessetti, 2007; Gribben *et al.*, 1991; Yang & Rothman, 2004).

A maioria das técnicas utilizadas nas análises moleculares requer DNA de boa qualidade, não fragmentado (Grutzmacher *et al.*, 2006) ou purificado, sem a presença de inibidores da reação (Holden *et al.* 2003).

Para avaliar a degradação da amostra ou a inibição da PCR utilizada em diagnósticos, é necessária a realização de uma PCR dirigida a um gene constitutivo, comum aos diferentes hospedeiros. Em estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório (Quaresma *et al.*, 2009), com amostras exclusivamente de cães, o fragmento alvo das reações de PCR era uma porção do gene da β -globina. No entanto, esta reação não apresentou bons resultados para amostras provenientes de roedores e marsupiais, com positividade inferior a 50%, provavelmente por uma similaridade imperfeita entre os iniciadores utilizados e as seqüências de bases para o gene dos dois grupos (Dados não publicados). Estas observações geram a necessidade de buscar uma metodologia alternativa, através da utilização de iniciadores cujos alvos fossem outros genes constitutivos e que permitissem a detecção do DNA de espécies pertencentes a diferentes grupos de mamíferos, sobretudo canídeos, roedores e marsupiais devido à importância destes grupos no contexto da epidemiologia das leishmanioses.

1.7 Identificação da espécie de *Leishmania*

As primeiras tentativas de classificação dos parasitos do gênero *Leishmania* em espécies ocorrem a partir da descrição do gênero por Ross em 1903, inicialmente considerando apenas os aspectos clínicos e epidemiológicos da doença humana.

É importante salientar que no gênero *Leishmania* a morfologia não é um bom caráter para distinguir espécies, pois as diferenças observadas são pequenas e sutis. No entanto, cada vez mais têm sido descobertos novos caracteres, a partir de métodos mais avançados, que auxiliam na caracterização taxonômica das espécies deste gênero.

A identificação da espécie envolvida na infecção é extremamente relevante para o prognóstico das leishmanioses, bem como para a prescrição do tratamento adequado, uma vez que espécies diferentes requerem tratamentos diferentes. Em regiões onde várias espécies de *Leishmania* coexistem em simpatria, é importante o uso de técnicas que possibilitem a identificação da espécie envolvida, uma vez que tal informação é muito valiosa em estudos epidemiológicos, onde a distribuição das espécies de *Leishmania* entre humanos e diferentes hospedeiros e vetores é um pré-requisito para o delineamento e aplicação de medidas de controle apropriadas.

Com a utilização de técnicas moleculares nos estudos epidemiológicos, muitos conhecimentos acerca das relações entre as espécies, bem como entre cepas da mesma espécie poderão ser gerados, contribuindo para o entendimento do comportamento do parasito, sua relação com os vetores e hospedeiros nos diversos ambientes onde a transmissão ocorre (Quaresma, 2007).

Atualmente são considerados bons marcadores, desde as análises de isoenzimas e determinantes antigênicos com anticorpos monoclonais até uma série de métodos moleculares usados em análises de DNAs com especificidade variável dependendo da natureza da seqüência-alvo investigada (Floeter-Winter & Shaw, 2004).

Podem-se discriminar as espécies de *Leishmania* através da análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição gerados após digestão de amplicons com endonucleases (análise de esquizodemas ou PCR-RFLP) (Lopes *et al.* 1984, Spanakos *et al.* 2007). Endonucleases são enzimas

capazes de reconhecer e cortar pequenas seqüências, de quatro a seis pares de bases, chamados sítios de restrição, no DNA molde. As enzimas de restrição são muito específicas, então, diferentes seqüências de bases nitrogenadas podem ou não ser reconhecidas por uma endonuclease. Assim, a digestão diferenciada de DNAs de fontes distintas, por uma enzima de restrição ou por uma combinação delas, pode ser utilizada para distinguir entre duas ou mais espécies de parasito.

Diferentes autores demonstram a possibilidade de utilizar a PCR-RFLP para distinguir as espécies que ocorrem simpatricamente, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* (Schönian *et al.*, 2003; Volpini, 2003; Volpini *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2004; De Andrade *et al.*, 2006; Quaresma *et al.*, 2009).

Por esta metodologia, o fragmento de 120 pb, gerado após amplificação da região conservada do kDNA de qualquer uma destas três espécies, anteriormente citadas, ao ser digerido utilizando a enzima, *Hae* III, gera fragmentos diferentes o suficiente para discriminá-las. Uma outra enzima, *Apa* LI é capaz de distinguir espécies do subgênero *L. (Viannia)* das outras pertencentes ao subgênero *L. (Leishmania)* as quais não são digeridas pela mesma (Volpini, 2003; Volpini *et al.*, 2004; De Andrade *et al.*, 2006).

A PCR-RFLP na qual os produtos amplificados de ITS1 são digeridos pela *Hae* III pode ser aplicada em regiões endêmicas e não endêmicas, uma vez que combina sensibilidade suficiente para detectar *Leishmania* diretamente em amostras clínicas. Além disso, esta técnica tem a habilidade de identificar todas as espécies ou grupos de espécies de relevância médica, podendo ser especialmente útil em áreas onde mais de uma espécie é endêmica assim como em áreas não endêmicas, onde as infecções são importadas de outras regiões (Schönian *et al.* 2003).

Recentemente tem sido realizado o seqüenciamento de fragmentos de DNA obtidos pela amplificação de diferentes genes alvo que, junto à análise do alinhamento das seqüências obtidas, é uma forma de identificar a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (Parvizi & Ready 2008; Parvizi *et al.*, 2008; Medeiros *et al.*, 2008).

1.8 Quantificação da carga parasitária pela PCR quantitativa em tempo real (RTQ-PCR)

As infecções causadas pelas várias espécies de *Leishmania* são caracterizadas por flutuações no número de parasitos durante o curso da infecção (Leclercq *et al.*, 1996; Mattner *et al.*, 1997; Melby *et al.*, 1998). Podem ser observadas variações da carga parasitária em relação ao tempo pós-inoculação em determinado tecido, como também entre diferentes tecidos num mesmo momento após a inoculação (Melby *et al.*, 1998; Rica-Capela *et al.*, 2003).

A quantificação parasitária em diferentes amostras clínicas pode ser útil na indicação da participação de um determinado hospedeiro como fonte de infecção para o inseto vetor. Esta quantificação pode ser conseguida através da microscopia, pela enumeração de amastigotas em relação aos núcleos das células do hospedeiro (Stauber *et al.*, 1958). No entanto é uma técnica pouco sensível, consumidora de tempo e não confiável considerando que os parasitos não estão distribuídos igualmente nos tecidos e órgãos.

Ensaio de microdiluição limitante em cultura têm sido muito empregados, mas esses ensaios são muito laboriosos e apresentam a possibilidade de contaminação microbiana como um fator limitante (Bretagne *et al.*, 2001).

Devido às dificuldades de quantificação que estas técnicas apresentam, métodos baseados na PCR em tempo real têm sido desenvolvidos para a detecção e quantificação do DNA do parasito em amostras clínicas (Quaresma *et al.*, 2007). É uma técnica altamente sensível para o monitoramento contínuo dos produtos amplificados por PCR, que tem sido aplicada para a quantificação de ácidos nucléicos (Higuch *et al.* 1993, Bassler *et al.* 1995, Morrison *et al.* 1998; Abe *et al.* 1999, Donovan *et al.* 2000).

Esta técnica é baseada na detecção e quantificação em tempo real da fluorescência emitida proporcionalmente à síntese do produto de PCR. Os sinais de fluorescência necessários para detecção podem ser obtidos pela marcação dos produtos amplificados com corante fluorescente. Esta marcação pode ser realizada utilizando uma sonda que se liga à seqüência alvo (sistema *Taq-Man*) ou então uma molécula fluorescente que se intercala na dupla-fita de DNA (sistema *SYBR-Green*). Ambos os sistemas permitem o monitoramento

contínuo do acúmulo de produto de PCR gerado, pela combinação de um termociclador e um fluorímetro (Espy *et al.* 2006).

A análise da emissão de luz é feita por um detector de sinal luminoso e um amplificador de sinal que traçam um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo da PCR, a intensidade do sinal gerado reflete a quantidade do produto formado (Kubista *et al.*, 2006).

O ciclo onde o sinal de amplificação exponencial atinge uma intensidade de fluorescência superior ao limiar de detecção é denominado *Ct* (*Ciclo Threshold*) e, o momento em que o *Ct* é ultrapassado está diretamente relacionado à quantidade de DNA amplificado (Mortarino *et al.*, 2004). Portanto, denominando-se *Ct* o ponto em que a emissão de fluorescência da amostra em teste supera a referência passiva do aparelho (*background*) (Cavalcanti 2008).

A RTQ-PCR é considerada uma ferramenta muito promissora para a detecção e quantificação de parasitos, e já é empregada para diversos organismos (Hermsen *et al.*, 2001; Collantes-Fernandez *et al.*, 2002) incluindo *Leishmania* (Vitale *et al.*, 2004; Rolão *et al.*, 2004; Bretagne *et al.*, 2001; Nicolas *et al.*, 2002; Quaresma *et al.*, 2009).

A RTQ-PCR também foi utilizada na detecção e quantificação de *Leishmania* sp. em tecidos de camundongo (Nicolas *et al.*, 2002) e na quantificação de citocinas em hamsters infectados (Iñiguez *et al.*, 2006). Também foi empregada no diagnóstico da infecção humana em diferentes materiais como sangue (Mary *et al.*, 2004) e lesões de pele (Wortmann *et al.*, 2004). Nestes estudos, a RTQ-PCR mostrou-se mais sensível que o exame direto ou cultura do mesmo material.

Esta técnica apresenta vantagens em relação a PCR convencional. Por não apresentar os vários passos de manipulação pós-amplificação requeridos pela técnica convencional, minimiza os riscos de contaminação do material, além de permitir de forma simultânea a detecção, medida e comparação do número de parasitos em diferentes amostras (Vitale *et al.*, 2004; Nicolas *et al.*, 2002), combinando rapidez na obtenção dos resultados, reprodutibilidade e capacidade quantitativa (Sundsford *et al.*, 2004; Yang & Rothman, 2004).

A RTQ-PCR também se mostrou mais sensível que a técnica de PCR convencional no diagnóstico e monitoração da infecção canina. Francino *et al.* (2006) verificaram que enquanto a PCR convencional foi negativa para

amostras que apresentaram menos que 30 parasitos por mililitro de sangue periférico ou medula óssea, a PCR em tempo real apresentou sensibilidade de 0,001 parasitos, semelhante aos resultados encontrados por Mary *et al.* (2004) em humanos. Esta sensibilidade elevada é de particular importância no acompanhamento da infecção canina, uma vez que, uma importante característica da doença no cão é a presença de parasitos residuais ou latentes após o tratamento. A abordagem quantitativa é importante não somente para elucidar o “status” de positividade de cães em áreas endêmicas, mas também para monitorar o número de parasitos no pós-tratamento ou em triagens de quimioterápicos (Francino *et al.*, 2006).

Segundo Quaresma (2007), a RTQ-PCR apresenta-se como uma metodologia promissora para estudos de quantificação da carga de DNA de *Leishmania*, visto que as técnicas até então utilizadas são laboriosas e pouco sensíveis, principalmente, para detecção de cargas parasitárias baixas.

Com relação à LV, a técnica vem sendo utilizada em cães e em pacientes humanos, possibilitando a realização de estudos relacionados à carga parasitária, interação hospedeiro-parasito e monitoramento da terapia (Francino *et al.*, 2006; Mary *et al.*, 2004; Mortarino *et al.*, 2004; Nicolas *et al.*, 2002; Roura *et al.*, 1999; Rolão *et al.*, 2004; Vitale *et al.*, 2004; Wortmann *et al.*, 2004).

Mary *et al.* (2004) demonstraram uma boa correlação entre a quantificação de *L. infantum* em amostras de sangue e o *status* clínico dos pacientes, permitindo discriminar entre pacientes sintomáticos, pacientes curados e portadores assintomáticos, promovendo o diagnóstico e monitoramento da terapia com segurança e rapidez.

Há também a possibilidade da utilização da RTQ-PCR para o diagnóstico e identificação. A técnica permite não só a quantificação de DNA em várias amostras biológicas, como também a distinção de espécies ou cepas de vários microrganismos de importância médica realizada pela análise das curvas de dissociação dos produtos de PCR (Logan *et al.*, 2001). Nicolas *et al.* (2002) diferenciaram *L. major*, *L. donovani*, *L. tropica* e *L. infantum*, de acordo com a temperatura de “melting” (TM), a qual é uma função do índice GC/AT, comprimento e seqüências do produto amplificado estes resultados foram corroborados por Monbrison *et al.* (2007). A análise da curva oferece uma

alternativa rápida para a identificação de espécies no diagnóstico ou estudos epidemiológicos das leishmanioses e também no monitoramento de parasitoses assintomáticas.

1.9 Justificativa

Belo Horizonte é uma região que vem apresentando casos humanos tanto de leishmaniose visceral quanto de leishmaniose tegumentar há mais de 10 anos, bem como a presença de flebotomíneos vetores demonstrando a ocorrência de transmissão ativa da infecção.

As leishmanioses têm sido foco de atenção e preocupação dos órgãos de saúde pública do município que têm implementado as medidas de controle recomendadas pelo Ministério da Saúde do Brasil e baseadas no tripé de ações: eliminação de cães soropositivos, combate ao inseto vetor e tratamento dos casos humanos. Porém essas medidas não foram eficientes para conter o ciclo de transmissão e o que está sendo observado é o aumento do número de casos humanos e caninos. Este fato sugere que a epidemiologia das leishmanioses em Belo Horizonte, especialmente em relação à leishmaniose visceral, apresenta um quadro mais complexo do que o classicamente descrito. A persistência das leishmanioses em áreas alteradas indica a ocorrência de uma transmissão secundária, peri doméstica destes parasitos.

Portanto, são necessários estudos mais aprofundados sobre outros possíveis reservatórios de *Leishmania* no município de Belo Horizonte. A detecção e quantificação de *Leishmania* em roedores e marsupiais possibilitarão definir a importância destes animais no ciclo epidemiológico da doença, como por exemplo, a existência de um ciclo peri doméstico de manutenção do parasito. Esta estratégia integrada fornecerá subsídios para o estabelecimento de medidas de controle e vigilância epidemiológica mais eficazes na área.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Detectar e identificar as espécies de *Leishmania* e quantificar a carga parasitária em mamíferos domésticos, silvestres e sinantrópicos capturados em área de transmissão de leishmaniose visceral e tegumentar no município de Belo Horizonte, Minas Gerais.

2.2 Objetivos específicos

- ☐ Verificar, pela PCR, a presença de *Leishmania* em cães, roedores e marsupiais de área endêmica de LV e LT.
- ☐ Padronizar PCR direcionada a gene constitutivo de mamíferos para utilização em reações de controle da qualidade do DNA.
- ☐ Identificar a espécie de *Leishmania* nas amostras positivas dos animais avaliados.
- ☐ Quantificar a carga de parasitos nos diferentes hospedeiros e nos diferentes tecidos.
- ☐ Avaliar o papel de cães e pequenos mamíferos hospedeiros de *Leishmania* no ciclo de transmissão das leishmanioses na área urbana estudada.

3 Materiais e métodos

3.1 Área de estudo

O município de Belo Horizonte (19°46'35" e 20°03'34" sul; 43°51'27" e 44°03'47" oeste) está localizado a 852 m acima do nível do mar. Possui clima tropical de altitude, temperatura média em torno de 21°C, índice pluviométrico médio de 1450 mm/ano (www.ibge.gov.br). Trata-se de uma região intensamente urbanizada, cuja economia é baseada na atividade industrial de transformação e no comércio/serviços. Desde a década de 80 este município permanece como área endêmica onde são registrados casos humanos de leishmaniose visceral e tegumentar.

BH é dividida em nove áreas político-administrativas: Barreiro, Centro Sul, Leste, Nordeste, Noroeste, Norte, Oeste, Pampulha e Venda Nova. A Regional Nordeste do município de Belo Horizonte (RENE-BH) foi escolhida por ter apresentado, entre 2001 e 2005 (cinco anos anteriores ao início deste trabalho), número significativo de casos humanos de leishmaniose visceral (83 casos acumulados com média de 16,6 casos/ano) aliado à alta soroprevalência canina (média anual de 5,6 %), bem como vários casos de leishmaniose tegumentar.

A RENE-BH tem uma área de 39,60 Km² (cerca de 10% do total do município). A metade desta área, ou seja, 19,46 Km² está ocupada por áreas verdes compostas por parques, sítios e pastos. A área urbanizada é composta por 68 sub-regiões entre bairros, vilas e aglomerados subnormais. Possui uma população de 273.892 habitantes (Censo IBGE/2000) (figura 5).

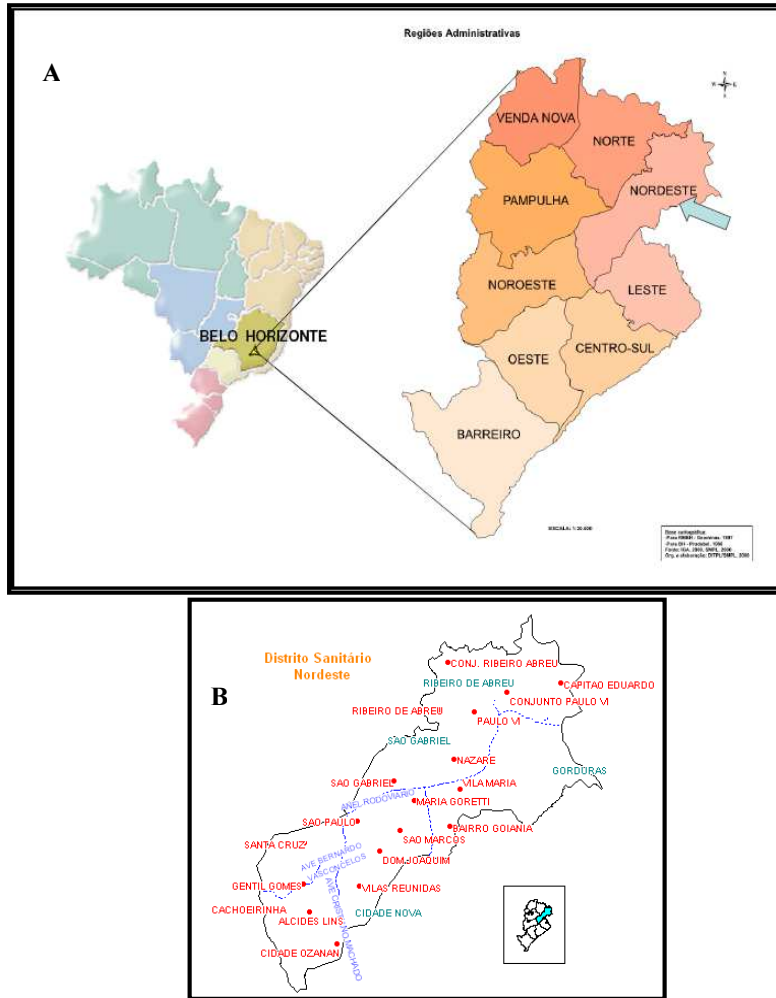


Figura 5: Área de estudo. Região Metropolitana de Belo Horizonte, Regional Nordeste indicada pela seta (A); detalhe esquemático da Regional Nordeste mostrando os bairros (B).

Conforme descrito anteriormente, a RENE-BH é composta, em grande parte, por áreas de transição com baixa densidade demográfica, correspondentes a pequenos sítios, parques e matas secundárias. Neste

trabalho, estas regiões foram genericamente denominadas “área verde” (figura 6) para diferenciá-las daquela peri domiciliar (figura 6), correspondente a quintais e anexos.

A área verde escolhida para colocação das armadilhas é uma região de pequenos sítios chamada “Capitão Eduardo”. Esta Região está localizada na porção mais ao norte da regional, às margens do Rio das Velhas, limítrofe ao município de Sabará onde foram registrados os primeiros casos autóctones de LTA em BH (Passos *et al.*, 1990). A vegetação na área é em sua maior parte do tipo pasto, composta por capim e vegetação rasteira. Outra porção contém resquícios de vegetação nativa ou secundária com algumas árvores de médio porte como bambus e palmeiras (figura 6).



Figura 6: Área verde onde foram colocadas armadilhas (junho/2006 a novembro/2007) para captura viva de pequenos mamíferos na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG.

Os pontos de coleta na área peri domiciliar, foram escolhidos por conveniência, condicionados à presença no domicílio, ou próximo a ele, de casos humanos de LV e/ou LTA nos três anos anteriores ao início da pesquisa

(2003, 2004 e 2005). Preenchida esta condição, foram escolhidas 20 residências espalhadas pela área, porém, mais concentradas na porção central e norte desta região. Nos domicílios selecionados (figura 7), foi explicado ao morador responsável o objetivo do trabalho e solicitado o consentimento para a realização da pesquisa. A colocação da armadilha e o posterior resgate de seu conteúdo estiveram condicionados à sua autorização.



Figura 7: Área peri domiciliar onde foram colocadas armadilhas (junho/2006 a novembro/2007) para captura viva de pequenos mamíferos na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG.

A seleção dos pontos de coleta de sangue dos cães também foi realizada por conveniência, priorizando cães domiciliados nas casas das ruas onde ocorreram casos humanos de LV e/ou LTA nos três anos anteriores ao início da pesquisa (2003, 2004 e 2005).

3.2 Captura dos pequenos mamíferos

Para o cálculo da amostra necessária ao estudo foram considerados alguns parâmetros de acordo com o “Cálculo de amostra para determinar prevalência” (WHO, 1995). O cálculo foi feito através da estimativa de uma proporção populacional com nível de confiança de 95%, precisão de 0,1 e prevalência de 50%. Este valor foi estimado uma vez que não se dispunha de dados prévios de prevalência e porque com 50% obtém-se o maior “n” possível. O n calculado foi de 100.

O projeto obteve licença do órgão do Ministério de Meio Ambiente do Brasil, Instituto Brasileiro para o Meio Ambiente (IBAMA) para captura e eutanásia dos animais (licença 425/05). Por esta licença o projeto obteve autorização para eutanasiar até 100 exemplares de espécies nativas e todos os exemplares das espécies exóticas como *Rattus norvegicus*, *R. rattus* e *Mus musculus* porventura capturados.

Para a captura viva dos animais, foram montadas, na área verde e nos arredores dos domicílios selecionados, armadilhas de arame galvanizado “tipo gaiola” (35x12x12 cm) utilizando isca suspensa de abacaxi e bacon.

Os pontos de captura na área verde foram distribuídos em três trilhas, cada uma contendo 15 armadilhas separadas por uma distância de cerca de 20 metros. Foram realizadas seis campanhas de captura nos meses de Junho, Setembro, Dezembro/2006 e Março, Julho e Novembro/2007. As armadilhas foram iscadas e armadas a cada manhã e resgatadas na manhã seguinte durante cinco dias consecutivos. Foi utilizado por campanha o total de 85 armadilhas/noite, sendo 40 expostas no peri domicílio e 45 na área verde. O esforço amostral previsto, ao final das seis campanhas, foi de 1200 armadilhas no peri domicílio e 1350 armadilhas na área verde, somando um total de 2550 armadilhas. Os pequenos mamíferos capturados foram transportados vivos e em condições de conforto para o laboratório de Mastozoologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para os procedimentos de exame clínico, eutanásia e coleta das amostras.

3.3 Avaliação do estado clínico dos animais e coleta das amostras

No laboratório de Mastozoologia da UFMG, cada espécime foi devidamente identificado e preenchida uma ficha com informações relativas ao local de coleta, idade (se jovem ou adulto), sexo, estado de prenhez ou lactação, aspecto geral do animal e presença de alterações na pele como alopecia, descamação, hipocromia ou hiperpigmentação. Nesta mesma ficha foram preenchidos os campos referentes aos resultados dos testes parasitológicos e moleculares.

O sacrifício animal e todos os procedimentos de coleta das amostras foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os primeiros dois exemplares de cada espécie foram taxidermizados sendo a pele e o crânio depositados na Coleção de Referência do Laboratório de Mastozoologia do Departamento de Zoologia da UFMG. A identificação das espécies foi realizada por biólogo experiente, através da consulta a literatura específica, análise de caracteres morfológicos e a comparação junto aos exemplares depositados na coleção.

Antes da coleta das amostras, o animal era mergulhado em solução de etanol a 70% para assepsia. Foram então coletadas amostras de baço, fígado, medula óssea, pele da cauda e da orelha, que foram acondicionadas individualmente em álcool etílico absoluto para realização de testes moleculares. Uma porção das amostras de baço, medula e pele da cauda foram coletadas em solução salina contendo os antibióticos estreptomicina (200 µg/mL) e penicilina (500 UI/mL) e, o antifúngico flucitosina (500 µg/mL). A coleta dos tecidos foi feita próxima a uma chama na tentativa de diminuir a contaminação por fungos. Durante a coleta foram utilizados instrumentos descartáveis ou de uso único para cada tecido para evitar contaminação.

3.4 Método parasitológico para detecção de *Leishmania* sp.

Foram confeccionadas lâminas a partir de esfregaço de medula óssea e impressão por aposição dos fragmentos de fígado, baço e pele (de orelha e de cauda). Estas lâminas foram fixadas com metanol e coradas pelo Giemsa, para

a demonstração de formas amastigotas de *Leishmania*. As leituras foram realizadas por dois leitores, considerando-se positivos os resultados em que pelo menos um deles encontrou formas amastigotas.

Os fragmentos de pele de cauda, baço e medula, coletados em solução salina contendo antibióticos e antifúngico, foram transferidos, em capela de fluxo laminar, para um novo tubo contendo um (1) mL de uma solução salina nova. Os pedaços de tecidos maiores, foram novamente recortados para retirada de um fragmento mais interno contendo em média 1 cm³. Todos estes procedimentos foram feitos na tentativa de diminuir a contaminação por fungos.

Transcorridas 24 horas, o fragmento, então submetido a esta pré-lavagem, foi dilacerado com lâmina de bisturi, em placa de petri estéril. Em seguida foi colocado em meio de cultura NNN (Novy Mc Neil e Nicolle), enriquecido com 0,4 mL de LIT (Liver Infusion Tryptose) contendo 20% de soro fetal bovino e mantido à 26°C ± 1°C. A cada sete a dez dias, uma alíquota foi observada ao microscópio óptico em aumento de dez e 40 vezes, sendo a amostra considerada positiva quando da presença de formas flageladas. Ao mesmo tempo, foi realizado o repique de 0,3 mL da cultura para um novo tubo contendo 0,5 mL de LIT. Este processo foi repetido três vezes e após a quarta semana as culturas negativas foram descartadas.

As amostras positivas foram postas a crescer através de repiques semanais contendo quantidades seqüencialmente maiores de LIT até constituírem uma massa de promastigotas com cerca de 10⁹ parasitos, contados em câmara de Neubauer. Esta massa foi então submetida à lavagem por três vezes com PBS pH 7,2 para PCR. As amostras foram estocadas a -20°C.

3.5 Coleta de amostras caninas

Nos domicílios selecionados foi explicado ao morador responsável o objetivo do trabalho e solicitado o consentimento para a realização da pesquisa. A participação dos cães no estudo foi condicionada a autorização do proprietário. Foram coletadas amostras de sangue de 92 cães (*C. familiaris*-1) dos domicílios localizados em diferentes pontos na regional, no período entre

novembro de 2007 e março de 2008.

Os animais receberam um número de identificação de acordo com a ordem de entrada na pesquisa. Os mesmos números foram utilizados para a identificação das amostras coletadas. Durante a coleta foi preenchida ficha clínico-epidemiológica com dados como o nome do cão, sexo, idade, raça, além do nome do proprietário e endereço. Os resultados dos testes moleculares foram transcritos para as fichas nos campos destinados ao diagnóstico laboratorial. Uma alíquota das amostras de sangue dos cães foi utilizada para a extração de DNA e posterior PCR.

Para a realização dos ensaios de PCR, além das amostras biológicas dos animais coletados durante a execução deste projeto, foram acrescentadas amostras de DNA extraído de sangue, medula óssea e pele de orelha de 70 cães (*C. familiaris-2*) provenientes da mesma regional, que fizeram parte de um estudo anterior.

3.6 Detecção de DNA de *Leishmania* sp a partir de amostras biológicas

3.6.1 Extração do DNA das amostras de pele, baço e fígado

Os fragmentos de pele de orelha, pele de cauda, fígado e baço, coletados dos animais capturados e acondicionados em álcool etílico absoluto a -20°C foram submetidos à extração do DNA. A cada lote de amostras extraídas foram acrescentados controles para verificação da qualidade da extração. Como controle negativo foram utilizadas amostras dos mesmos tecidos de *Mus musculus* não infectado proveniente do biotério do CPqRR e como controle positivo amostras de tecidos de *Mesocricetus auratus* experimentalmente infectado com *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903). A metodologia para extração de DNA seguiu a orientação do fabricante do Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation Kit® (Amersham Biosciences/GE).

Fragmentos de 10-20 mg do tecido foram submetidos à lise enzimática a 55°C por 12 a 16 horas para digestão das proteínas e em seguida a digestão pela RNase a 37°C por uma hora. As proteínas desnaturadas foram então

precipitadas pelo acréscimo de solução saturante. Após centrifugação o DNA foi recuperado no sobrenadante, precipitado com solução alcoólica, centrifugado, reidratado e armazenado -20°C até o momento do uso.

3.6.2 Extração do DNA de sangue e da medula

As amostras de sangue e de medula óssea conservadas e acondicionadas adequadamente foram submetidas à extração utilizando-se o Kit de Cromatografia em Coluna - GFX™ Genomic Blood DNA Purification (Amersham Biosciences/GE), conforme especificação do fabricante. Após lise das hemácias com solução de lise (10 mM KHCO₃; 155 mM NH₄Cl; 0,1 mM EDTA), obteve-se após centrifugação, uma massa de células brancas. Em seguida esta massa foi ressuspensa e submetida à extração. A mistura contendo as células brancas e a solução de extração foi então transferida para a coluna GFX e centrifugada por duas vezes. Ao novo pellet foi adicionada solução de lavagem (tampão Tris-EDTA adicionado de etanol absoluto) e então o DNA foi eluído em TE aquecido a 70°C e estocado a -20°C até o momento do uso.

3.6.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Antes de iniciar as PCRs com as amostras dos diferentes hospedeiros, foram realizados experimentos para padronizar e validar a técnica às condições de trabalho do laboratório (reagentes e equipamentos) para os diferentes alvos estudados. Parte dos experimentos descritos a seguir foi realizada no Laboratório de Leishmanioses (Centro colaborador da Organização Mundial de Saúde) do Serviço de Parasitologia do Centro Nacional de Microbiologia do Instituto de Saúde Carlos III (ISC III), Madri / Espanha, sob a orientação do Dr. Israel Cruz dentro do programa de estágio no exterior (PDEE) da CAPES.

3.6.3.1 Controle endógeno da PCR para diferentes espécies de mamíferos, hospedeiros de *Leishmania* spp.

Com o objetivo de escolher um gene que apresentasse uma seqüência mais conservada entre as diferentes espécies de mamíferos contempladas no

estudo foi realizada pesquisa no GenBank. A busca foi direcionada a seqüências depositadas de genes conservados tais como Actina, Globina, Citocromo b, Histona H4, 18s e IRBP na perspectiva de selecionar um candidato a ser utilizado como alvo de amplificação pela PCR em reações de controle endógeno da qualidade e integridade do DNA extraído. Em seguida foi feito o alinhamento de cada uma das seqüências entre os indivíduos de diferentes espécies através do programa CLUSTALW (<http://align.genome.jp/>) (Thompson *et al.*, 1994).

A partir das análises realizadas o gene selecionado foi o IRBP, para o qual foram desenhados iniciadores IRBPfwd: 5'TCC AAC ACC ACC ACT GAG ATC TGG AC 3' e IRBPrev: 5' GTG AGG AAG AAA TCG GAC TGG CC 3', que flanqueiam uma região de 227 pb com alta similaridade entre as seqüências analisadas, como mostrado na figura 8.

A PCR IRBP foi padronizada visando alcançar um desempenho otimizado, o qual foi comparado ao desempenho das PCRs utilizando os iniciadores β -globina: 5' CAACTTCATCCACGTTCCACC 3' e 5' ACACAACCTGTGTTCACTAGC 3' e β -actina: 5'CGGAACCGCTCATTGCC 3' e 5'ACCCCACTGTGCCCATCTA 3'. Estes últimos vinham sendo utilizados no laboratório de Leishmanioses do CPqRR/FIOCRUZ, funcionavam bem com amostras caninas mas apresentando resultados insatisfatórios na amplificação de amostras de roedores e marsupiais, o que nos motivou a iniciar a busca por novos alvos para a PCR. As condições das PCRs para os diferentes genes constitutivos testados estão apresentadas na tabela 1.

As reações de PCR dirigidas à amplificação de fragmentos dos genes constitutivos de mamíferos, IRBP, β -globina e β -actina foram inicialmente preparadas para um volume final de 25 μ l contendo 2 μ l da amostra de DNA a ser testada, 2,5 μ l de tampão 10x (670 mM Tris.HCl pH 8.8, 67 mM MgCl₂, 167 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM 2-ME) 1,5 μ l de dNTPs a uma concentração de 10 mM, 2,5 μ l of DMSO, 1,25 μ l de cada um dos dois iniciadores a uma concentração de 10 pmol, 0.15 μ l de TaqDNA polymerase 5U/ μ l e 13.85 μ l de água destilada estéril (condição 1).

MATERIAIS E MÉTODOS

```

          10      20      30      40      50      60
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Canis familiaris IRBP DQ205906 TCCAACACCACCACTGAGATCTGGACCTGCCCCAGTCTGGGGAAAGGTACAGCGCT
Mus musculus IRBP AB125808.seq .....A.....T.....G.....C.....G.....A.....T...
Bolomys lasiurus IRBP AY277459 .....T.A..A.....A.....G.....A.....T...
Oryzomys subflavus IRBP AY1636 .....T.....T.....A.....A.....G.....A.....T...
Rattus novergicus IRBP AJ42913 .....A.....T.....TA.....G.....A.....T..A
Rattus rattus IRBP AM408328.se .....A.....T.....TA.....G.....A.....T...
Didelphis albiventris IRBP AF2 .....T.....A.....T.....T.....G.....T.....G.....G.T.GG
Homo sapiens RBP3 NT_030772 ED .....G.....T.....A.....A.....G.....T..C
IRBP fwd.SEQ
IRBP Rev RC.SEQ
-----

          70      80      90      100     110     120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Canis familiaris IRBP DQ205906 GACAAGGACGTGGTGGTCTCACCAGCGGCCACACGGGGCGGCGGAGGACGTCCT
Mus musculus IRBP AB125808.seq .....T.....T.....A.....T.....G.....A.....C.....A.....A.TG.C
Bolomys lasiurus IRBP AY277459 .....A..T.....A.....T.....A..T..T..G..T.....T.....A.....C
Oryzomys subflavus IRBP AY1636 .....A..T.....A.....T.....A..T..T..G..T.....T.....NA.....C
Rattus novergicus IRBP AJ42913 .....T.....T.....T.....A.....T.....G.....A.....A.....A..G..
Rattus rattus IRBP AM408328.se .....T.....T.....T.....A.....T.....G.....A.....A.....C.....A..G..
Didelphis albiventris IRBP AF2 .....G..A..A.....A.....TCA..GT..T.TT..A..A..A.....TA..AG.C
Homo sapiens RBP3 NT_030772 ED .....T.....T.....A.....G..CA.G.....C.....A..G.G
IRBP fwd.SEQ
IRBP Rev RC.SEQ
-----

          130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Canis familiaris IRBP DQ205906 TACATCCTCAAGCAGATGCGCCGGGCCATCGTGGTGGGCGAGCGGACTGTCGGGGGGGCC
Mus musculus IRBP AB125808.seq .....G.....G.....C.....A.....A.....T.....G..AG..T.....
Bolomys lasiurus IRBP AY277459 .....A..A.....A.....A.....A.....T.....A..AG..A..T...
Oryzomys subflavus IRBP AY1636 .....A..A.....A.....A.....G.....A..AG..T..T...
Rattus novergicus IRBP AJ42913 .....A.....A.....T.....T.....G..AG..T..C...
Rattus rattus IRBP AM408328.se .....A.....A.....T.....T.....G..AG..T..C...
Didelphis albiventris IRBP AF2 .....A.....A.....T.....A.....A.....C..G..A.....T
Homo sapiens RBP3 NT_030772 ED C.....T.....A.....A.....A.....G..G..A.....
IRBP fwd.SEQ
IRBP Rev RC.SEQ
-----

          190     200     210     220
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Canis familiaris IRBP DQ205906 CTGGACCTCCAGAAGCTGAGGATAGGCCAGTCCGATTTCCTCCTCAC
Mus musculus IRBP AB125808.seq .....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....
Bolomys lasiurus IRBP AY277459 .....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....
Oryzomys subflavus IRBP AY1636 .....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....
Rattus novergicus IRBP AJ42913 .....A.....A.....T.....T.....C.....T.....T.....
Rattus rattus IRBP AM408328.se .....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....
Didelphis albiventris IRBP AF2 .....A..T...G.....C..C..C.....A.....A.....A.....
Homo sapiens RBP3 NT_030772 ED .....G.....G.....T.....C.....T.....
IRBP fwd.SEQ
IRBP Rev RC.SEQ
-----

```

Figura 8: Alinhamento das seqüências de diferentes mamíferos (GenBank) com os iniciadores IRBP1 e IRBP2.

Posteriormente foi utilizado o Kit ilustra puREtaq Ready-To-Go™ PCR Beads® (GE Healthcare) para cada par de iniciadores, cujos reagentes estão na concentração 2,5 U de Polimerase; 10 mM de Tris-HCl; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 200 µM dATP, dCTP, dGTP e dTTP e estabilizadores incluindo BSA. A estes reagentes foram acrescentados 1,25 µl de cada primer a 10 pmol/ µl e 2 µl de DNA para 25 µl de solução final (condição 2).

A padronização da PCR IRBP foi realizada com a condição 1 de PCR variando-se a temperatura de anelamento dos iniciadores (de 57°C a 63°C). Os ciclos de PCR utilizados para cada par de iniciadores durante o desenvolvimento deste trabalho estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Condições da PCR para a amplificação de fragmentos dos genes β -globina, β -actina e IRBP

Característica	β -globina	B-actina	IRBP
Tamanho do fragmento esperado	118bp	290bp	227bp
Seqüência dos iniciadores	5' CAA CTT CAT CCA CG T TCA CC 3' 5' ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC 3'	5'CGG AAC CGC TCA TTG CC 3' 5'ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA 3'	5'TCC AAC ACC ACC ACT GAG ATC TGG AC 3' 5' GTG AGG AAG AAA TCG GAC TGG CC 3'
Ciclos			
Desnaturação	94°C por 3 minutos	94°C por 4 minutos	94°C por 4 minutos
Inicial	94°C por 30 s	94°C por 30 s	94°C por 30 s
Denaturação	40°C por 30 s	57°C por 30 s	57°C por 30 s
Anelamento	72°C por 45 s	72°C por 1 minuto	72°C por 1 minuto
Extensão	35	35	35
No. de ciclos	72°C por 5 minutos	72°C por 5 minutos	72°C por 5 minutos
Extensão Final			

3.6.3.2 Nested PCR (LnPCR) dirigida a um fragmento do gene SSUrRNA de *Leishmania*

A LnPCR – SSUrRNA amplifica um fragmento do gene SSUrRNA que é uma região conservada entre todas as espécies de *Leishmania*. Esta técnica é utilizada para a detecção direta, sem a necessidade de isolamento do parasito, a partir de diferentes amostras biológicas (Van Eys *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 2002 e 2006). Tal metodologia, adaptada e modificada de Cruz *et al.*, (2002), permite a amplificação inicial de um fragmento de aproximadamente 603 pb, pela utilização dos iniciadores R1: 5' GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG 3' e R2: 5' GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG 3', seguida da amplificação de um fragmento de aproximadamente 353 pb, a partir do produto amplificado da primeira reação, pela utilização dos iniciadores R3: 5' TCC CAT CGC AAC

CTC GGT T 3' e R4: 5' AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3', como demonstrado na figura 9.

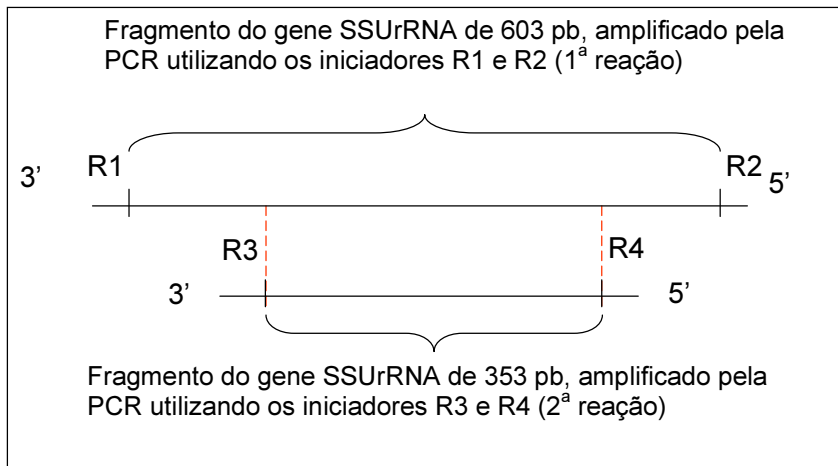


Figura 9. Desenho esquemático do resultado da Ln-PCR destinada a amplificar um fragmento do gene SSUrRNA de *Leishmania*.

A primeira reação foi preparada para um volume final de 50µl contendo 10µl de DNA da amostra a ser testada, 5 µl da solução tampão 10x - 15mM MgCl₂, 1 µl de dNTPs a 10mM, 1µl do iniciador R1 a 15µM, 1 µl do iniciador R2 a 15µM, 1,4 µl de Tth DNA polimerase a 1U/ µl (Biotools) e 30,6 µl de H₂O destilada estéril.

Em tubos contendo 1 ml de H₂O foram diluídos 25 µl de produto da primeira reação, para serem utilizados como 'template' da segunda PCR. Esta foi preparada para um volume final de 25 µl contendo 10µl do produto amplificado diluído, 2,5 µl da solução tampão 10x - 15mM MgCl₂, 0,5 µl de dNTPs a 10mM, 0,5µl do iniciador R3 a 15µM, 0,25 µl do iniciador R4 a 15µM, 0,7 µl de Tth DNA polimerase a 1U/ µl (Biotools) e 10,55 µl de H₂O destilada estéril.

A amplificação foi processada em aparelho termociclador automático (AB9800®) utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C por cinco

minutos, seguido de 30 repetições de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, para a primeira reação e desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguido de 30 repetições de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. A extensão final foi a 72°C por cinco minutos para ambas as reações.

Em todas as reações foi utilizado controle positivo com 20 ng de DNA extraído de cultura de *L. infantum* cepa JPC, e como controle negativo foi utilizado H₂O destilada estéril como "template".

Os resultados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio e examinados em exposição à luz ultravioleta (UV), com o PM de 100 pb ou o Φ x 174, sendo considerados positivos aqueles que apresentassem bandas de peso molecular correspondente ao esperado, 603 pb e 353pb, na primeira e na segunda reações respectivamente (figura 10).

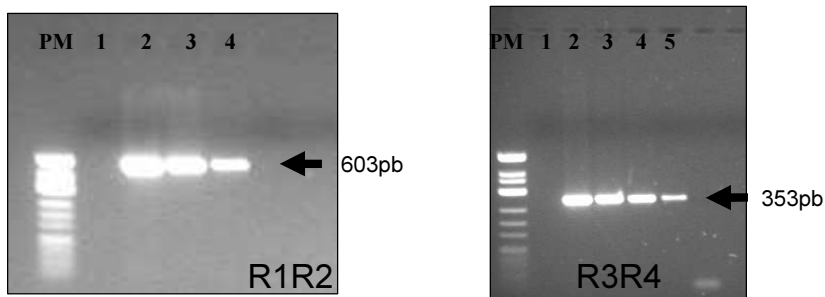


Figura 10. Géis de agarose 1,5 % mostrando os produtos de amplificação das PCRs R1R2 (603 pb) e R3R4 (353 pb). Canaletas:PM Φ x 174; 1 Controle negativo (sem DNA); 2,3,4 e 5, DNA de *L.(L.) infantum* cepa JPC em diferentes diluições seriadas (de 20 ng/ μ l a 20 pg/ μ l).

3.6.3.3 PCR kDNA dirigida a um fragmento da região conservada de kDNA de *Leishmania*

A metodologia utilizada permite amplificar um fragmento de 120 pb da região conservada do DNA minicircular do cinetoplasto (kDNA) de todas as espécies de *Leishmania* utilizando os iniciadores: A: 5' (C/G)(C/G)(G/C)

CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3' e B: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3' (Degrave *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2000).

As PCRs dirigidas ao fragmento de 120 pb do kDNA foram realizadas nos laboratórios de Leishmanioses do CPqRR e do ISC III com o uso de diferentes protocolos, resumidos na tabela 2.

Tabela 2. Condições das PCRs dirigidas ao kDNA: kDNA 1a e b realizadas no Laboratório de Leishmanioses do CPqRR kDNA 2 realizado no Laboratório de Leishmanioses do ISC III

Característica	kDNA		
	kDNA1a	kDNA1b	kDNA2
Produto de PCR	120pb	120pb	120pb
Template μ l	2	2	5
Volume final μ l	25	25	25
Enzima	Taq	Taq	Tth
Reagentes	Kit Ready-To-Go™ PCR Beads®	individuais	individuais
Marca	(Amersham Biosciences) atual GE		Biotools

No CPqRR, para o grupo cães 2, a reação de PCR, aqui chamada de kDNA 1a, foram preparadas para um volume final de 25 μ l, contendo 2 μ l de DNA, solução tampão 10x - 1,5mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 200 μ M dNTPs, 10pmoles de cada iniciador e 1,25 U de Taq DNA polimerase (Amersham Biosciences). As reações de PCR kDNA 1b tendo como template as amostras de DNA de cães (1) e dos pequenos mamíferos foram realizadas utilizando o Kit Ready-To-Go™ PCR Beads® (Amersham Biosciences), cujos reagentes estão na concentração 2,5 U de Polimerase; 10 mM de Tris-HCl; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 200 μ M dATP, dCTP, dGTP e dTTP e estabilizadores incluindo BSA. A estes reagentes foram acrescentados 10 pmol de cada primer e 2 μ L de DNA para 25 μ L de solução final.

No ISC III, kDNA 2, realizado com todas as amostras de cães e de pequenos mamíferos, as reações foram preparadas para um volume final de 25 μ l contendo 5 μ l de DNA da amostra a ser testada, 2,5 μ l da solução tampão 10x - 15mM MgCl₂, 0,5 μ l de dNTPs a 10 mM, 1,0 μ l do iniciador A a 15 pmol, 1,0 μ l do iniciador B a 15 pmol, 0,7 μ l de Tth DNA polimerase a 1U/ μ l (Biotools B&M) e 14,3 μ l de H₂O destilada estéril.

A amplificação foi processada em aparelho termociclador automático (AB 2700 e 9800®) utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C por quatro minutos, seguindo de 30 repetições de: desnaturação a 94°C por 30

segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. A extensão final foi feita a 72°C por 10 minutos.

Em todas as reações foi utilizado como controle positivo 20 ng de DNA extraído de cultura de *L. infantum* cepa JPC e como controle negativo foi utilizada H₂O destilada estéril como template. A especificidade dos iniciadores foi testada com DNA extraído de animais não infectados.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídio, examinados em exposição à luz ultravioleta (UV). Foram consideradas positivas aquelas amostras que apresentaram a banda de peso molecular correspondente a 120 pb (figura 11). O marcador de peso molecular utilizado foi o Φ x174 (Invitrogen) digerido por Hae III, apresentando 11 fragmentos de 72 a 1357 pb.

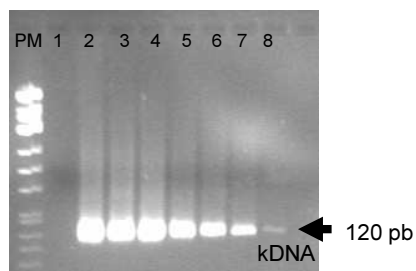


Figura 11. Gel de agarose 2,5 % mostrando os produtos de amplificação da PCR k-DNA (120 pb). Canaletas: PM Φ x 174; 1 Controle negativo (sem DNA); 2 a 8, DNA de *L.(L.) infantum* cepa JPC em diferentes diluições seriadas (de 20 ng/ μ l a 20 fg/ μ l).

3.7 Métodos moleculares para identificação de *Leishmania* sp

As amostras positivas na PCR genérica dirigida à região conservada do kDNA de *Leishmania* foram submetidas à RFLP (polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição) utilizando as endonucleases *Hae* III e *Apa* LI tamponadas. A variabilidade dos tamanhos de fragmentos obtidos após a digestão é mostrada na tabela 3.

Tabela 3: Enzimas de restrição e tamanhos dos fragmentos obtidos após a digestão do kDNA das espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*.

Espécie	Enzima de restrição	
	<i>Hae</i> III	<i>Apa</i> LI
	Tamanho dos fragmentos após a digestão	
<i>L. (L.) amazonensis</i>	116	116
<i>L. (V.) braziliensis</i>	80, 40	88, 32
<i>L. (L.) infantum</i>	120, 80, 60, 40	120

Adaptado de: Quaresma, 2007.

Embora a *Hae* III seja suficiente para discernir entre as três espécies prevalentes na área, optou-se por utilizar também a *Apa* LI em função desta enzima discriminar *Leishmania (Viannia)* de *L. (Leishmania)* e conseqüentemente possibilitar a confirmação dos resultados. Cinco µl do produto da PCR foi digerido através da adição de 1 U da enzima de restrição e o seu tampão apropriado. A mistura foi incubada a 37°C por três horas. Os fragmentos de restrição foram separados através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. A revelação foi feita pela prata 0,2% e o perfil gerado foi comparado aos perfis das cepas de referência (Volpini, 2003; Volpini *et al.*, 2004; De Andrade *et al.*, 2006).

Outra abordagem para a identificação das espécies de *Leishmania* utilizada neste trabalho foi o seqüenciamento do produto amplificado pela segunda reação da LnPCR (fragmento esperado de aproximadamente 353pb).

Todas as bandas de 353 pb com intensidade considerável foram cortadas e purificadas usando o kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), próprio para este fim, de acordo com as especificações do fabricante. O produto amplificado e purificado, eluído em 20 µl de H₂O destilada e estéril foi então utilizado como template para uma amplificação, anterior ao processo de seqüenciamento.

A reação de PCR para o seqüenciamento foi preparada para um volume final de 10 µl, formada por 4 µl do PREMIX (BigDye® Terminator v3.1 Cycle), 1 µl do iniciador na concentração de 3,2 pmol e 5 µl do produto de PCR. Este mix era então colocado em um termociclador (AB9800®) com o seguinte programa: 94°C por três minutos, seguido de 25 ciclos de: 96°C por um segundo, 65°C por 5 segundos (esta temperatura depende da temperatura de anelamento do

iniciador utilizado) e 60°C por quatro minutos. O seqüenciamento propriamente dito foi posteriormente realizado no seqüenciador automatizado *ABI PRISM 377 DNA sequencer* (*Applied Biosystems*).

A análise bioinformática das seqüências obtidas foi realizada utilizando-se os programas *Lasergene® sequence analysis software (DNASTAR)* e o *BIOEDIT*. Estas análises incluem a edição, alinhamento e a busca de sítios de restrição das seqüências estudadas.

O alinhamento das seqüências editadas com aquelas depositadas no GenBank permite a identificação de três espécies de interesse na área de estudo; *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*, como demonstrado na figura 12.

As reações de seqüenciamento, conforme descritas anteriormente, também foram utilizadas para seqüenciar fragmentos dos genes IRBP e do citocromo b de diferentes espécies de mamíferos, na tentativa de auxiliar na sua identificação.

MATERIAIS E MÉTODOS

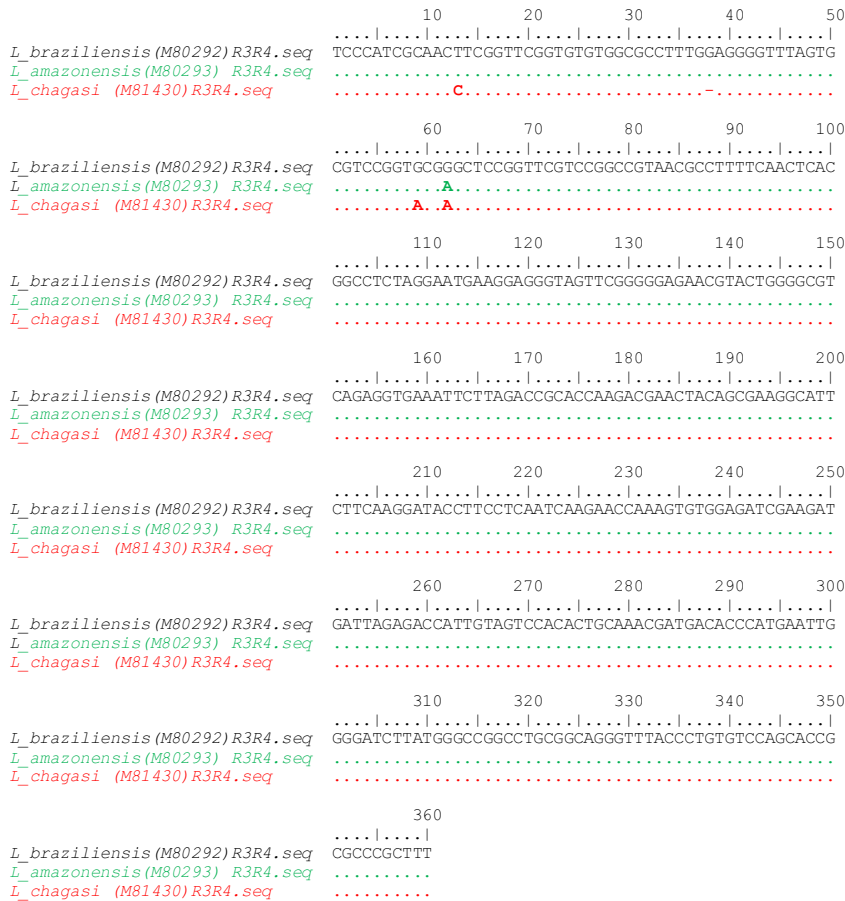


Figura 12: Alinhamento das seqüências do fragmento do gene SSUrRNA de espécies de *Leishmania*, depositadas no GenBank.

3.8 Quantificação da carga parasitária por real time PCR

O PCR quantitativo em tempo real RTQ-PCR é uma metodologia que utiliza marcadores fluorescentes e um sistema óptico eletrônico que capta e avalia a emissão de fluorescência permitindo o monitoramento contínuo dos produtos de PCR formados a cada ciclo da reação. O sistema de detecção com “intercaladores” não-específicos da dupla-fita de DNA foi empregado nos

experimentos. O “intercalador” SYBR Green (Roche) fluoresce fortemente quando ligado à dupla-fita de DNA, mas tem fluorescência mínima quando está livre em solução.

Curvas padrão foram construídas a partir da utilização de diluições seriadas ao décimo de DNA de cultura das cepas M2904 de *Leishmania braziliensis* e JPC de *L. infantum*, considerando que 200 fg de DNA equivalem a um parasito (Deborggraeve *et al.*, 2008), e partindo da concentração equivalente a 2×10^4 parasitos/ μl até uma concentração equivalente a 2×10^{-1} parasitos/ μl . Constatada a inexistência de diferença entre as curvas das diferentes cepas, a curva da cepa M2904 foi posteriormente utilizada como parâmetro para normalização dos resultados em todas as reações de PCR quantitativa em tempo real dirigidas ao fragmento de kDNA de *Leishmania* (Figura 13).

A RTQ-PCR foi utilizada para determinar a quantidade de DNA de *Leishmania* presente nas diferentes amostras de tecido dos diferentes animais. Foram selecionadas as amostras de DNA extraído de pele (cães, roedores e marsupiais) e sangue (cães) de animais com resultados positivos na PCR convencional. O DNA destes animais foi submetido a amplificação e quantificação das cópias do fragmento de 120pb do kDNA de *Leishmania*. A amplificação foi realizada pelo Sistema de Detecção da Seqüência LightCycler® FastStart DNA Máster SYBR Green I (Roche). Os iniciadores utilizados foram os mesmos da PCR convencional dirigidos a região conservada do kDNA: iniciadores A e B.

As reações foram preparadas adicionando 0,66 μl de cada iniciador a uma concentração 15 pmoles por μl , 2 μl tampão 10X LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I, 1,2 μl de MgCl_2 (a uma concentração final de 2,5 mM), 4 μl de DNA e 11,48 μl água deionizada para completar o volume final da reação de 20 μl . O corante SYBR Green intercala na dupla fita de DNA permitindo quantificar o produto de PCR a cada ciclo da reação. Após aplicação das amostras, os capilares foram tampados, centrifugados e colocados no equipamento.

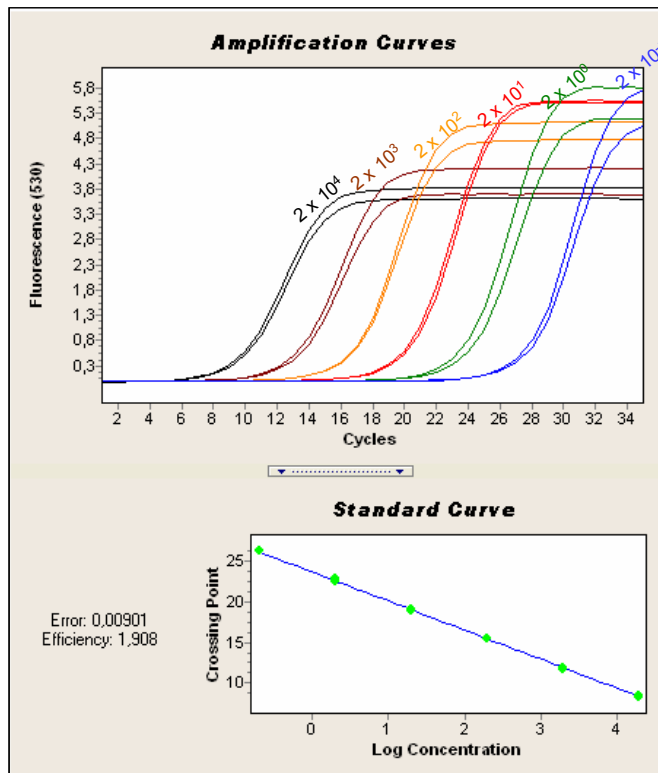


Figura 13: Curva Padrão para os experimentos de RTQ-PCR realizada a partir da amplificação de diluições seriadas da cepa M2904 de *L. braziliensis*.

O programa de amplificação foi realizado através de uma “Touchdown” RTQ-PCR, na qual a temperatura de anelamento inicial é mais alta e vai diminuindo ao longo dos ciclos, conferindo assim, mais especificidade à reação, realizada nas seguintes etapas: um ciclo de desnaturação a 95°C por 10 minutos; seguido de 35 ciclos de 95°C por 10 segundos para desnaturação, 70°C a 65°C por 5 segundos (reduzindo 1°C a cada 2 ciclos conforme a tabela 4) para anelamento e 72°C por 5 segundos para extensão com aquisição da fluorescência neste momento. Após a amplificação segue mais um ciclo para a análise das curvas de dissociação com aquisição de fluorescência contínua de acordo com a tabela 4. Finalizando o experimento a temperatura é reduzida a

40°C por 30 segundos. Os resultados foram analisados utilizando o programa LightCycler®4 (Roche), que permite avaliar a curva de dissociação, a intensidade de fluorescência da amostra a cada ciclo e quantificar o número de cópias conforme a curva padrão.

A quantidade de DNA detectada foi convertida em número de parasitos/ μ l, pelo fator citado anteriormente. Em seguida este número de parasitos/ μ l foi normalizado pela quantidade de tecido utilizado na extração de DNA, juntamente com o volume no qual este DNA foi diluído para seu uso nas reações, sendo o resultado final reportado em parasitos/mg de tecido (Tupperwar *et al.*, 2008).

Tabela 4. Programa de amplificação para "Touchdown" RTQ-PCR

CYCLING PROGRAM kDNA ab (v6)

Preincubation

PROGRAM	Denaturalization			TYPE	None	CYCLES	1
Segment Nº	Temp Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/s)	Target Temp	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acq Mode
1	95	600	20	0	0	0	None

Amplification

PROGRAM	Amplification			TYPE	Quantification	CYCLES	35
Segment Nº	Temp Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/s)	Target Temp	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acq Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	70	5	20	65	1	2	None
3	72	5	20	0	0	0	Single

Melting curve analysis

PROGRAM	Melting			TYPE	Melting curve	CYCLES	1
Segment Nº	Temp Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/s)	Target Temp	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acq Mode
1	95	0	20	0	0	0	None
2	70	15	20	0	0	0	None
3	95	0	0,1	0	0	0	Continuous

Cooling

PROGRAM	Cooling			TYPE	None	CYCLES	1
Segment Nº	Temp Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/s)	Target Temp	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acq Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

3.9 Análise estatística

Para a comparação da eficiência das técnicas de PCR entre si, as análises estatísticas utilizadas foram a Análise de Concordância de *Kappa*, a Análise de Atributos e conceitos de Sensibilidade e Especificidade.

As diferenças das frequências de positividade em cada comparação, seja entre tecidos, entre espécies, entre microambientes, foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado (χ^2) e para as comparações múltiplas foi utilizado o Método de Bonferroni. O nível de significância utilizado para todas as análises foi de 5%.

Na comparação da carga parasitária dos Cães, Marsupiais e Roedores foram utilizados testes estatísticos não paramétricos *Kruskal-Wallis* e o teste de *Wilcoxon* para duas amostras independentes.

O teste *Kruskal-Wallis* é utilizado para detectar se há diferença na carga parasitária quando se considera mais de dois grupos. O nível de significância utilizado nos testes *Kruskal-Wallis* foi de 5%, e conseqüentemente, os p-valores menores que o nível de significância indicam uma diferença estatística significativa entre os grupos.

Quando o teste de *Kruskal-Wallis* detecta diferenças entre os grupos, utiliza-se o teste de *Wilcoxon para duas amostras independentes* dois a dois para verificar entre quais grupos está essa diferença. No teste em questão, o nível de significância utilizado é de 1,67 %. Nesse momento foi utilizada a correção de *Bonferroni*. A correção de *Bonferroni* (Dohmen, 2003) é utilizada em comparações múltiplas para evitar que a taxa de erro global seja inflacionada.

Para a realização destas análises e construção dos gráficos foi utilizado o programa Graph Pad Prism 4.

4 Resultados

4.1 Pequenos Mamíferos Capturados

Durante o período de coletas, foram distribuídas ao todo 1200 armadilhas no peridomicílio e 1350 armadilhas na área verde, sendo o esforço amostral total de 2550 armadilhas conforme previsto inicialmente. Ao final das seis campanhas, foram coletados 99 espécimes (4,4% de sucesso nas capturas) entre roedores dos gêneros *Necromys*, *Mus*, *Rattus* e *Cerradomys*; gambás do gênero *Didelphis* e carnívoros do gênero *Galictis* nas áreas estudadas (Tabela 5 e figura 14).

Tabela 5: Lista dos Pequenos mamíferos capturados, por espécie e ambiente, no período de junho/2006 a novembro/2007 na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG.

Espécie	Área verde	Área peridomiciliar	Total por espécie
Rodentia	<i>M. musculus</i>	4	20 (25%)
	<i>R. rattus</i>	8	11 (19%)
	<i>R. novergicus</i>	1	8 (9%)
	<i>N. lasiurus</i>	5	0 (5%)
	<i>C. subflavus</i>	5	0 (5%)
Marsupialia	<i>D. albiventris</i>	31	3 (34%)
	<i>D. aurita</i>	1	0 (1%)
Carnivora	<i>Galictis sp.</i>	2	0 (2%)
Total	57	42	99

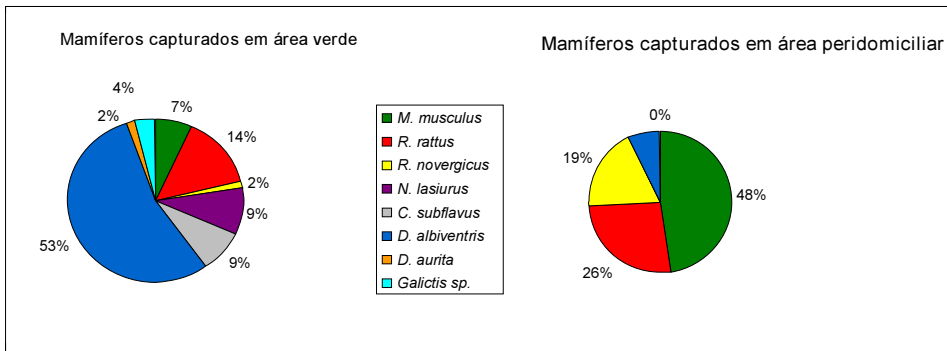


Figura 14: Pequenos mamíferos capturados, por espécie e ambiente, no período de junho/2006 a novembro/2007 na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte, MG.

Na área verde (Tabela 5 e figura 14) foi coletada a maioria dos espécimes sendo que algumas espécies foram encontradas somente nesta área: *Necromys lasiurus* (antigo *Bolomys lasiurus*), *Cerradomys subflavus* (antigo *Oryzomys subflavus*), *Didelphis aurita* e *Galictis* sp..

Didelphis albiventris, ocorreu principalmente na área verde (figura 5) demonstrando menor sinantropismo que *Mus musculus*, *Rattus rattus* e *R. norvegicus*, roedores comensais introduzidos, que foram capturados principalmente na área peridomiciliar (figura 6).

4.2 Exame clínico e parasitológico dos pequenos mamíferos (Melo, 2008).

O exame clínico destes animais não revelou nenhum sinal sugestivo da infecção por *Leishmania* sp. exceto em dois casos, da espécie *Rattus norvegicus*.

O resultado do exame direto das lâminas preparadas a partir dos tecidos coletados foi negativo para presença de *Leishmania* em todas as amostras analisadas.

A cultura foi feita para amostras de baço, medula, pele de cauda e pele de lesão, quando presente, de todos os 99 animais. Dentre as 299 tentativas de isolamento (três amostras habituais para cada animal e duas peles lesionadas), cerca de 60% tiveram que ser descartadas antes da quarta semana por estarem contaminadas por fungos.

Duas amostras foram positivas para formas flageladas, ambas oriundas da medula de *Didelphis albiventris*. Para identificação destes isolados, o material foi enviado para o IOC/FIOCRUZ para realização de teste isoenzimático. Foram também realizadas PCRs, utilizando diferentes iniciadores, para o gênero *Leishmania* (Rodgers *et al.*, 1990; Degraive *et al.*, 1994), para *Trypanosoma cruzi* (Souto *et al.*, 1996) e para *T. rangeli* (Grisard *et al.*, 1999).

A primeira amostra (amostra T) foi isolada de um animal capturado na primeira campanha, na área verde, em uma região de sítios onde a vegetação é composta em grande parte por pequenas palmeiras. No exame direto da cultura foi possível observar duas populações morfológicamente distintas de parasitos, uma mais fina e comprida e outra mais larga, porém mais curta. Nestas duas populações

a maioria dos parasitos apresentava o cinetoplasto próximo ao núcleo como nas formas epimastigotas comuns em culturas mais jovens de *T. cruzi*. Foi possível observar alguns parasitos em divisão, além da presença de algumas formas tripomastigotas.

A análise de isoenzimas foi capaz de identificar a presença de *Trypanosoma cruzi*. O DNA extraído da amostra foi negativo na PCR específica para o kDNA de *Leishmania* (Degraeve *et al.*, 1994). Porém, o material mostrou-se positivo na PCR dirigida ao gene do mini-exon de *Trypanosoma cruzi* tipo1 relacionado ao ciclo silvestre de transmissão e *Trypanosoma rangeli*, detectando-se infecção mista. Este teste foi realizado em colaboração com o Laboratório de Triatomíneos do CPqRR. Cabe ressaltar que os iniciadores específicos para o gênero *Leishmania* foram testados com amostras de DNA de *T. cruzi* e não amplificaram. PCR com iniciadores específicos para *T. cruzi* utilizando amostras de DNA de *Leishmania*, foram realizadas e os resultados também foram negativos, demonstrando a especificidade dos iniciadores, conforme previsto na literatura (Souto *et al.*, 1996; Grisard *et al.*, 1999).

A segunda amostra (amostra L) foi isolada de animal coletado na terceira campanha também na área verde. Ao exame do esfregaço da cultura, corado com solução de Giemsa, foi possível observar poucos parasitos, flagelados, muito finos e compridos apresentando núcleo próximo ao cinetoplasto. Pelo perfil isoenzimático não foi possível identificar a espécie. A PCR para o gênero *Leishmania* foi positiva, porém o produto amplificado não hibridizou com a sonda para o complexo *L. braziliensis* nem com a sonda para o complexo *L. donovani*. O parasito isolado permanece até o momento sem identificação sendo necessários outros testes para sua caracterização.

4.3 Padronização da PCR para o gene interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP)

A padronização da PCR IRBP foi realizada com a condição 1 de PCR, variando a temperatura de anelamento. A eficiência e a sensibilidade da técnica foi significativamente aumentada, sem perder a especificidade, quando utilizada a temperatura de 57°C para a maioria das amostras testadas (figura 15), exceto para

pele derivada de *N. lasiurus*, *R. novergicus*, *C. familiaris*, *R. rattus* e *C. subflavus*. Isto pode estar relacionado a presença de inibidores co-isolados no processo de extração do DNA da pele, e não de outros tecidos, nos quais a amplificação do IRBP foi realizada com sucesso. Temperaturas de anelamento mais baixas podem ainda ser testadas, dependendo dos objetivos e das amostras a serem trabalhadas.

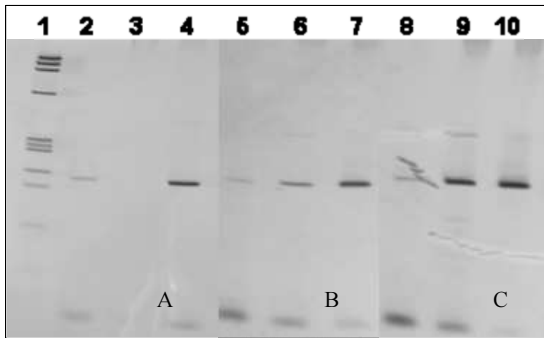


Figura 15: Géis de poliacrilamida 6% mostrando os produtos de amplificação da PCR IRBP com temperatura de anelamento em A: 63 °C, B: 60 °C e C: 57 °C. Canaletas: 1- PM Øx174; 2, 5 e 8 - DNA de medula de cão (positivo PCR *Leishmania*); 3, 6 e 9 - DNA de medula de *Necromys* (negativo PCR *Leishmania*); 4, 7 e 10 - DNA de medula de *Didelphis* (positivo PCR *Leishmania*).

4.3.1 Análise comparativa da eficiência da amplificação da PCR dirigida às seqüências dos genes β -actina, β -globina e IRBP

As condições de PCR 1 e 2 foram realizadas para os três pares de iniciadores testados e os resultados apresentados são aqueles da condição que obteve o melhor desempenho para cada par de iniciadores. Para a PCR IRBP a condição 2 foi a que apresentou melhores resultados e no caso das PCRs β -actina e β -globina foi a condição 1. Inicialmente as reações de PCR para a amplificação do fragmento de IRBP, β -globina e β -actina foram realizadas de acordo com as condições otimizadas apresentadas na Tabela 1. Amostras de pele de orelha, pele de cauda, fígado, baço e medula óssea de 6 espécies de mamíferos foram testadas.

Pela comparação dos resultados obtidos para os diferentes alvos, pode ser constatada uma sensibilidade significativamente superior na amplificação (100%) quando os iniciadores para o gene IRBP foram usados. As mesmas amostras de DNA foram submetidas à amplificação pelos os iniciadores para os genes β -actina e β -globina, apresentando uma eficiência de 40% e 20%, respectivamente (Tabela 6).

Na última coluna da tabela 6 estão mostrados os resultados da amplificação feita utilizando iniciadores para a detecção do DNA de *Leishmania*.

Diante destes resultados, optou-se por utilizar os iniciadores IRBPfwd e IRBPprev como controle endógeno da integridade do DNA em amostras de mamíferos de diferentes espécies.

Tabela 6: Análise comparativa da eficiência de amplificação das seqüências dos genes IRBP β -actina e β -globina pela PCR em amostras de DNA de possíveis hospedeiros de *Leishmania* infectados ou não infectados.

Hospedeiro	Amostra	Gene alvo			
		Hospedeiro			<i>Leishmania</i>
		Beta-actina	Beta-globina	IRBP	kDNA
<i>M. musculus</i>	Pele de orelha	+	-	+	-
	Pele de cauda	-	-	+	-
	Medula óssea	+	-	+	-
	Fígado	+	+	+	+
	Baço	-	-	+	+
<i>R. rattus</i>	Pele de orelha	-	-	+	+
	Pele de cauda	-	-	+	-
	Medula óssea	+	+	+	-
	Fígado	-	+	+	-
	Baço	-	-	+	-
<i>R. norvegicus</i>	Pele de orelha	-	-	+	-
	Pele de cauda	+	-	+	+
	Medula óssea	+	-	+	-
	Fígado	+	+	+	-
	Baço	-	-	+	-
<i>N. lasiurus</i>	Pele de orelha	-	-	+	-
	Pele de cauda	-	-	+	-
	Medula óssea	+	+	+	-
	Fígado	+	+	+	+
	Baço	-	-	+	+
<i>C. subflavus</i>	Pele de orelha	-	-	+	+
	Pele de cauda	-	-	+	-
	Medula óssea	+	-	+	-
	Fígado	-	-	+	-
	Baço	-	-	+	-
<i>D. albiventris</i>	Pele de orelha	-	-	+	-
	Pele de cauda	+	-	+	+
	Medula óssea	+	-	+	+
	Fígado	-	-	+	-
	Baço	-	-	+	-

Legenda: + positivos para a PCR, - negativos para PCR. *IRBP*: Interphotoreceptor retinoid binding protein; *Act*: actina; *Glob*: globina; *kDNA*: DNA do cinetoplasto de *Leishmania*;

4.3.2 Sequenciamento de IRBP como ferramenta auxiliar na identificação do hospedeiro

Devido às diferenças apresentadas nas seqüências do produto amplificado pela utilização dos iniciadores IRBPfwd e IRBPrev entre as diferentes espécies de mamíferos estudadas, foi realizado o seqüenciamento deste produto a partir de amostras de DNA extraídas de diferentes tecidos de pelo menos um exemplar de cada uma das espécies, e as seqüências obtidas foram alinhadas e comparadas com aquelas depositadas no GenBank e, os resultados obtidos foram utilizados como uma ferramenta auxiliar na identificação da espécie do hospedeiro.

A identificação das espécies de exemplares feitas a partir do seqüenciamento corresponderam àquelas realizadas com base na morfologia, exceto em um exemplar que inicialmente foi identificado como *Akodon sp.* e pelo seqüenciamento do fragmento de IRBP (Figura 16) foi identificado como *Necromys lasiurus*. Pelo seqüenciamento do produto amplificado em PCR dirigida a um fragmento do citocromo b de mamíferos a identificação do exemplar como *N. lasiurus* foi confirmada (Figura 17).

RESULTADOS

```

          10      20      30      40      50      60
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
91F_IRBP1      TCCAAACACCACCACCTGAGATCTGGACCTTACCCAAGGTCCCTAGGGGAGAGATACAGTGCT
91B_IRBP2 RC      .....
91B_IRBP1      .....
91F_IRBP2 RC      .....
Akodon azarae AY163578.seq      .....G..TG.....
Bolomys lasiurus AY277459.seq      .....
IRBP fwd.SEQ      .....
IRBP Rev RC.SEQ      -----

          70      80      90      100     110     120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
91F_IRBP1      GACAAAGATGTGGTAGTCCCTCACCAGTGGACATACTGGGGGTGGCTGAGGACATCACC
91B_IRBP2 RC      .....
91B_IRBP1      .....
91F_IRBP2 RC      .....
Akodon azarae AY163578.seq      .....
Bolomys lasiurus AY277459.seq      .....
IRBP fwd.SEQ      .....
IRBP Rev RC.SEQ      -----

          130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
91F_IRBP1      TACATCCTCAAGCAGATGCGCAGAGCCATAGTGGTGGGTGAGCGGACAGGGGAGGTGCC
91B_IRBP2 RC      .....
91B_IRBP1      .....
91F_IRBP2 RC      .....
Akodon azarae AY163578.seq      .....
Bolomys lasiurus AY277459.seq      .....
IRBP fwd.SEQ      .....
IRBP Rev RC.SEQ      -----

          190     200     210     220
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
91F_IRBP1      CTGGACCTCCAGAAGCTGAGAAATAGGCCAGTCCAACTTTTTCCTCAC
91B_IRBP2 RC      .....
91B_IRBP1      .....
91F_IRBP2 RC      .....
Akodon azarae AY163578.seq      .....
Bolomys lasiurus AY277459.seq      .....
IRBP fwd.SEQ      .....
IRBP Rev RC.SEQ      -----.....G..T..C.....

```

Figura 16: Alinhamento da sequência obtida pela amplificação de fragmento de IRBP com seqüências de *A. azarae* e *N. lasiurus* (retiradas do Genbank) e com os iniciadores específicos.

RESULTADOS

```

          10      20      30      40      50      60
91 B cytb1 b2.seq      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Akodon azarae EF622507.seq  CCATCCAACATTTTCATCATGATGAAACTTTGGATCTCTCCTAGGCATCTGCCTAATAATC
Bolomys lasiurus EF531693.seq  .....T.....C.....C.....C.....C.....A..T..T.CA.....G.....
CYT B2.SEQ              .....C..G.....
CYT B1 RC.SEQ          -----

          70      80      90      100     110     120
91 B cytb1 b2.seq      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Akodon azarae EF622507.seq  CAAATCCTAACAGGCCTCTTCTAGCAATACACTATACATCAGACACAACCACAGCATTC
Bolomys lasiurus EF531693.seq  .....T.....A..T..T.....C.....
CYT B2.SEQ              .....C.....
CYT B1 RC.SEQ          -----

          130     140     150     160     170     180
91 B cytb1 b2.seq      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Akodon azarae EF622507.seq  TCCTCAGTCGCACATATCTGCCGAGATGTAACATATGGATGACTAATCCGCTATCTACAT
Bolomys lasiurus EF531693.seq  .....A..T.....C.....T.....CT.....C
CYT B2.SEQ              .....G.....
CYT B1 RC.SEQ          -----

          190     200     210     220     230     240
91 B cytb1 b2.seq      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Akodon azarae EF622507.seq  GCCAACGGGGCCTCTATATTTTCATCTGTCTTTTCATTACAGTCGGCCGAGGATCTAT
Bolomys lasiurus EF531693.seq  .....T..T..A.....C.....C..T.....C.....C.....A.....
CYT B2.SEQ              .....A.....T.....
CYT B1 RC.SEQ          -----

          250     260     270     280     290     300
91 B cytb1 b2.seq      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Akodon azarae EF622507.seq  TATGGCTCTTATACTCTCTCAGAAACCTGAAACATTTGGCATTATCCTATTTCTAACCAACC
Bolomys lasiurus EF531693.seq  ..C.....C.....TC..T.....C.....T.....C..C.....T
CYT B2.SEQ              .....C..C.....T.....
CYT B1 RC.SEQ          -----

          310     320     330     340     350
91 B cytb1 b2.seq      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Akodon azarae EF622507.seq  ATAGCTACAGCATTCGTAGGGTACGTCCTCCATGAGGACAAATATCCTTCTGAGGGG
Bolomys lasiurus EF531693.seq  .....A.....T..G.....A.....A.....A.....
CYT B2.SEQ              .....T.....
CYT B1 RC.SEQ          -----

```

Figura 17: Alinhamento da sequência obtida pela amplificação de fragmento de Citocromo b com seqüências de *A. azarae* *N. lasiurus* (retiradas do Genbank) e com os iniciadores específicos.

4.4 Detecção do DNA de *Leishmania*

Os resultados dos experimentos de PCR-kDNA2 e LnPCR - SSUrRNA realizados com diluições seriadas das cepas de referência JPC e M2904 de *L. infantum* e *L. braziliensis*, respectivamente, não revelaram grande diferença com relação à sensibilidade das técnicas, sendo a PCR kDNA capaz de detectar até o equivalente a 0,1 parasitos por microlitro de ambas as cepas e a LnPCR-SSUrRNA capaz de detectar até o equivalente de 1 parasito por microlitro da cepa JPC e 10 parasitos por microlitro da cepa M2904.

Os resultados das PCRs realizadas com amostras de DNA das diferentes espécies estão apresentados na tabela 9, onde foram consideradas as positivities por indivíduo que apresentasse resultado positivo para a PCR em pelo menos um tecido. A análise dos resultados apresentados na tabela 7 demonstra uma sensibilidade maior da PCR kDNA 2 ($p < 0,05$) em relação às menos sensíveis PCRs SSUrRNA e kDNA 1, que não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre si .

Tabela 7: Positividade de diferentes técnicas de PCR em espécies de hospedeiros de *Leishmania*.

Hospedeiro	Amostra	Tecnica de PCR		
		kDNA1	kDNA2	SSUrRNA
<i>C. familiaris-1</i>	Sangue	18,5%	75,0%	30,4%
<i>C. familiaris-2</i>	*	92,9%	81,4%	48,6%
<i>M. musculus</i>	*	41,7%	100,0%	83,3%
<i>R. rattus</i>	*	26,3%	89,5%	47,3%
<i>R. norvegicus</i>	*	22,0%	100%	66,6%
<i>N. lasiurus</i>	*	20,0%	80%	60,0%
<i>C. subflavus</i>	*	40,0%	100,0%	80,0%
<i>D. albiventris</i>	*	23,5%	88,2%	61,8%
<i>D. aurita</i>	*	100,0%	100,0%	0%
<i>Galictis sp.</i>	*	100,0%	100,0%	50,0%
Total	-	43,3%	83,5%	48,3%

* Positividade em pelo menos um tecido avaliado incluindo sangue, pele de orelha e medula óssea para *C. familiaris* e pele de orelha, pele de cauda, fígado, baco e medula óssea para os demais hospedeiros.

A tabela 8 apresenta os resultados das PCRs (kDNA1,SSUrRNA e kDNA2) por grupo e por tecido. A análise estatística dos resultados das PCRs por tecido dentro de cada grupo revelou uma baixa concordância entre as técnicas. As maiores concordâncias ocorreram para comparações entre as PCRs SSUrRNA e kDNA 2 na maioria dos grupos, com exceção do grupo cães (2) que apresentou a maior concordância entre SSUrRNA e kDNA 1.

A análise estatística da positividade das PCRs, realizada dentro de cada grupo de hospedeiro, comparando as técnicas entre si por tecido, ou a positividade entre tecidos, por técnica, revelou que: para os cães 01 não houve diferença de positividade entre kDNA1 e SSUrRNA e que ambas apresentaram positividade diferente e inferior à apresentada pela PCR kDNA2; para os cães 02, quando avaliados os testes por tecido, kDNA1 não apresentou diferença estatística significativa ao kDNA2, as demais comparações dos testes dois a dois foram estatisticamente diferentes para cada tecido; entre as amostras dos pequenos mamíferos, não houve diferença estatística na positividade das PCRs kDNA1 e SSUrRNA quando o template era pele (de orelha ou de cauda) ou medula óssea, quando a comparação foi por técnica, não houve diferença estatística significativa nas seguintes comparações – kDNA1 (Po x Pc, Po x Fi, Po x Ba, Pc x Fi, Pc x Ba, Fi x Ba), SSUrRNA (Po x Me, Pc x Fi, Pc x Ba, Fi x Ba) e kDNA2 (Pc x Me, Fi x Ba).

Tabela 8: Positividade das PCRs específicas para *Leishmania* realizadas em DNA extraído de diferentes tecidos de cães e pequenos mamíferos

Hospedeiro	Amostra	Técnica de PCR		
		kDNA1	kDNA2	SSUrRNA
<i>C. familiaris-1</i>	Sangue (Sg n=92)	18,5%	75,0%	30,4%
<i>C. familiaris-2</i>	Sangue (Sg n=70)	50,7%	41,2%	21,4%
	Pele de orelha (Po n= 70)	61,4%	5,7%	24,3%
	Medula óssea (Me 70)	71,4%	55,7%	28,6%
Pequenos mamíferos	Pele de orelha (Po n=98)	14,3%	26,5%	10,2%
	Pele de cauda (Pc n=98)	16,3%	52,0%	22,4%
	Medula óssea (Me n=96)	2,1%	38,0%	5,2%
	Fígado (Fi n=98)	16,3%	77,6%	33,7%
	Baço (Ba n=98)	9,2%	71,4%	27,6%
Total	n = 790	25,4%	50,5%	22,4%

4.5 Identificação das espécies de *Leishmania* envolvidas na infecção

As técnicas utilizadas para a identificação das espécies de *Leishmania* envolvidas na infecção, tanto nos pequenos mamíferos, como nos cães, são baseadas na detecção inicial do DNA de *Leishmania* pela PCR dirigida ao kDNA ou ao gene SSUrRNA.

Os resultados da identificação da espécie de *Leishmania* pelo perfil de restrição gerado pelo corte do produto da amplificação do kDNA com as enzimas *Hae* III e *Apa* LI, apresentados na tabela 9, apontam para uma maior prevalência de *L. braziliensis* entre os pequenos mamíferos (80,6%), enquanto entre *C.familiaris*-2 a espécie que prevaleceu foi *L. infantum*. Através desta técnica não foi possível identificar *L. infantum* entre os pequenos mamíferos assim como também não foi possível identificar *L. braziliensis* entre os cães. Em nenhum dos grupos o resultado da identificação apontou para *L. amazonensis*. Em 25% das amostras analisadas não foi possível identificar a espécie de *Leishmania* presente na infecção.

Tabela 9: Identificação da espécie de *Leishmania* pela PCR-RFLP kDNA

Hospedeiro	Amostra	Espécie de <i>Leishmania</i>				
		<i>L. braziliensis</i>	<i>L. donovani</i>	<i>Lb+Ld</i>	<i>L. mexicana</i>	Não id
<i>C. familiaris</i> -2 (n=65)	*	0%	72,3%	0%	0%	27,7%
Pequenos Mamíferos (n=31)	*	80,6%	0%	0%	0%	19,4%
Total (n=96)	-	26,0%	49,0%	0%	0%	25%

* Identificação realizada em pelo menos um tecido positivo pela PCR, incluindo sangue, pele de orelha e medula óssea para *C. familiaris* e pele de orelha, pele de cauda, fígado, baço e medula óssea para os demais hospedeiros.

Quando a identificação foi realizada pelo seqüenciamento da LnPCR dirigida ao SSUrRNA os resultados, como resumidos na tabela 10 e na figura 18, foram o seguinte: Entre os *C. familiaris*-1 houve 100% de identificação sendo que em 82,1% a espécie de *Leishmania* foi identificada como *L. braziliensis* e como *L. infantum* nos 17,9% restantes; entre os *C.familiaris*-2 em

82,3% a espécie de *Leishmania* foi identificada como *L. infantum*, em 5,9% como *L. braziliensis*, em outros 5,9% como *L. amazonensis* e 5,9% permaneceram sem identificação; entre os pequenos mamíferos, em 53,1% a espécie causadora da infecção foi identificada como *L. braziliensis*, em 12,5% como *L. infantum*, em 4,7% foi constatado tratar-se de infecções mistas pelas espécies *L. braziliensis* e *L. infantum* e em 29,7% não foi possível realizar a identificação da espécie.

Tabela 10: Identificação da espécie de *Leishmania* pelo seqüenciamento do produto da LnPCR

Hospedeiro	Amostr a	Espécie de <i>Leishmania</i>				
		<i>L. braziliensis</i>	<i>L. donovani</i>	<i>Lb+Ld</i>	<i>L. mexicana</i>	Não id
<i>C. familiaris</i> -1 (n=28)	Sangue	82,1%	17,9%	0%	0%	0%
<i>C. familiaris</i> -2 (n=34)	*	5,9%	82,3%	0%	5,9%	5,9%
Pequenos Mamíferos (n=64)	*	53,1%	12,5%	4,7%	0%	29,7%
Total (n=126)	-	46,8%	32,5%	2,4%	1,6%	16,7%

* Identificação realizada em pelo menos um tecido positivo pela PCR, incluindo sangue, pele de orelha e medula óssea para *C. familiaris*-2 e pele de orelha, pele de cauda, fígado, baço e medula óssea para os demais hospedeiros.

Os três animais que apresentaram infecção mista eram roedores, dois deles da espécie *M. musculus* (os animais de número 31 e 38) e um da espécie *R. rattus* (animal de numero 65), todos eles capturados na área peri domiciliar (figura 18).

Na amostra de DNA extraída do fígado do animal 31 (*Mus musculus*) a espécie de *Leishmania* foi identificada como pertencente ao complexo *Leishmania donovani*, enquanto que na amostra extraída de baço, a espécie foi identificada como pertencente ao complexo *Leishmania braziliensis*.

O animal de número 38 (*Mus musculus*) apresentou infecção mista - nas amostras de DNA extraído de pele de cauda e medula óssea a espécie identificada foi pertencente ao complexo *Leishmania donovani*, enquanto nas amostras de DNA extraídas de fígado e baço a espécie identificada foi pertencente ao complexo *Leishmania braziliensis*.

A identificação realizada nas amostras de fígado e medula óssea do animal 65 (*Rattus rattus*) resultou em complexo *Leishmania donovani* e complexo *Leishmania braziliensis* respectivamente.

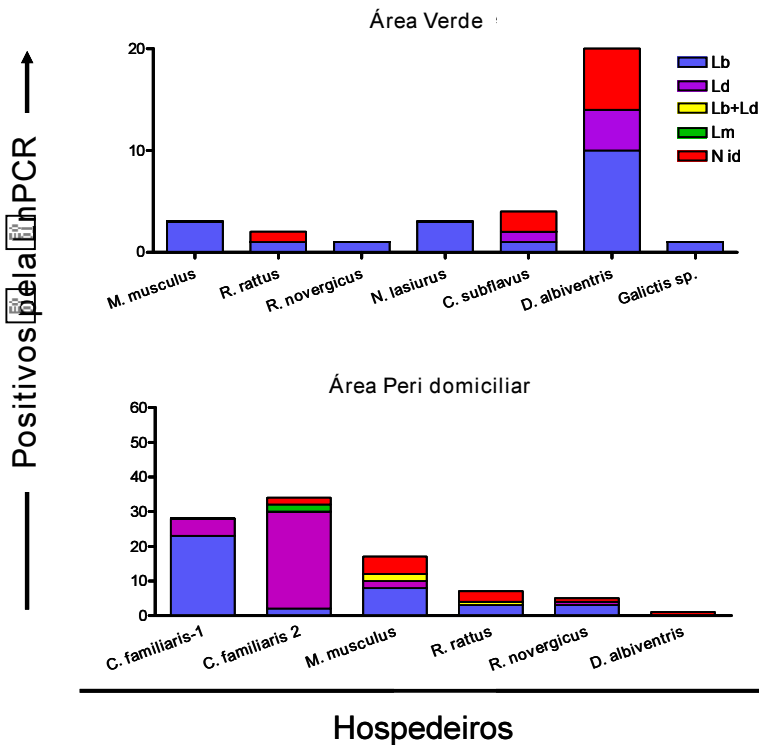


Figura 18: Resultado da identificação da espécie de *Leishmania*, pelo seqüenciamento do produto da LnPcR, por hospedeiro e por ambiente, Área verde e Área peri domiciliar: Complexo *L. braziliensis* (Lb); Complexo *L. donovani* (Ld); infecção mista Complexos *L. braziliensis* e *L. donovani* (Lb+Ld); Complexo *L. mexicana* (Lm); não identificado (N id).

A análise das tabelas 9 e 10 nos permite observar que uma vez que se tenha o produto amplificada da reação de PCR, o sequenciamento da LnPcR e mais eficiente em identificar a espécie de *Leishmania* (83,%) do que o corte com enzimas de restrição do produto da PCR dirigida ao kDNA (75%).

4.6 Quantificação da carga parasitária

Durante a padronização dos experimentos de RTQ-PCR, utilizando DNA extraído de cepas de referência de diferentes espécies de *Leishmania* (*Leishmania infantum* JPC e *Leishmania braziliensis* M2904), foi observado que a partir da análise dos picos de “melting” representados é possível distinguir a espécie *Leishmania infantum* (aproximadamente 84,55°C) de *Leishmania braziliensis* (aproximadamente 83,06°C) como mostrado na Figura 19.

Na figura 20 pode-se observar a aplicação desta análise das curvas de “melting” em experimentos de RTQ-PCR kDNA realizados a partir de DNA extraído de animais infectados, como uma ferramenta auxiliar na identificação da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção.

A possibilidade do uso da RTQ-PCR para a identificação da espécie de *Leishmania* através da análise das curvas de dissociação foi observada e comprovada em amostras de sangue dos 39 cães avaliados (20 infectados por *L. braziliensis* e 19 infectados por *L. infantum*). A identificação foi confirmada por pelo menos uma das técnicas anteriormente descritas (kDNA/RFLP ou SSUrRNA/ seqüenciamento), assim como também foi confirmada pelo seqüenciamento e cortes com enzimas de restrição de fragmentos gerados pela PCR dirigida ao ITS-1 de *Leishmania* (Dados não mostrados).

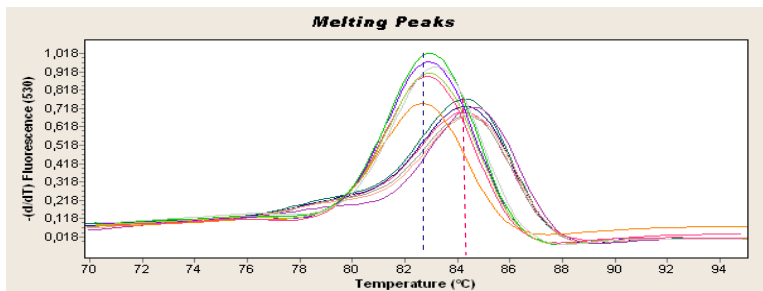


Figura 19: Picos de “melting” de RTQ-PCR kDNA para *Leishmania braziliensis* M2904 (tracejado em azul 83,06°C) e *Leishmania infantum* JPC (tracejado em rosa 84,55°C) em diferentes diluições.

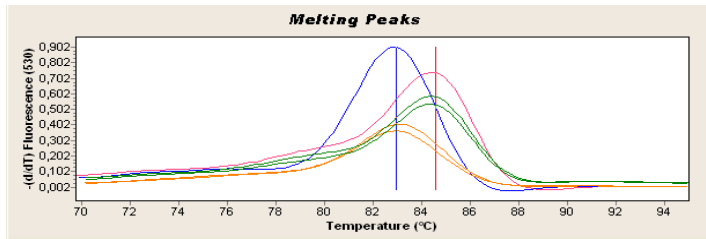


Figura 20: Picos de "melting" de RTQ-PCR kDNA: pico maior em azul- *L. braziliensis* M2904 os dois picos em alaranjado abaixo dele amostra de DNA de pele de *R. novergicus*. O pico em rosa - *L. infantum* JPC e os dois verdes abaixo dele amostra de DNA extraído de pele de cão.

Os dados obtidos a partir dos diferentes experimentos de RTQ-PCR kDNA com DNA extraído de pele de cães e pequenos mamíferos foram normalizados pela curva padrão. As diferenças estatísticas detectadas nas análises realizadas estão apresentadas em forma de gráficos.

A Figura 21 é a representação gráfica da distribuição dos resultados obtidos na quantificação da carga parasitária quando comparados os grupos Cães e Pequenos Mamíferos (incluindo Roedores e Marsupiais) 21 A. Pode ser observado que a carga parasitária é estatisticamente superior nos Cães em relação aos Pequenos Mamíferos ($P < 0,001$). Em 21 B o grupo dos pequenos mamíferos é dividido em roedores e marsupiais, onde podemos observar que não existe diferença estatística entre estes dois grupos de pequenos mamíferos ($P > 0,05$).

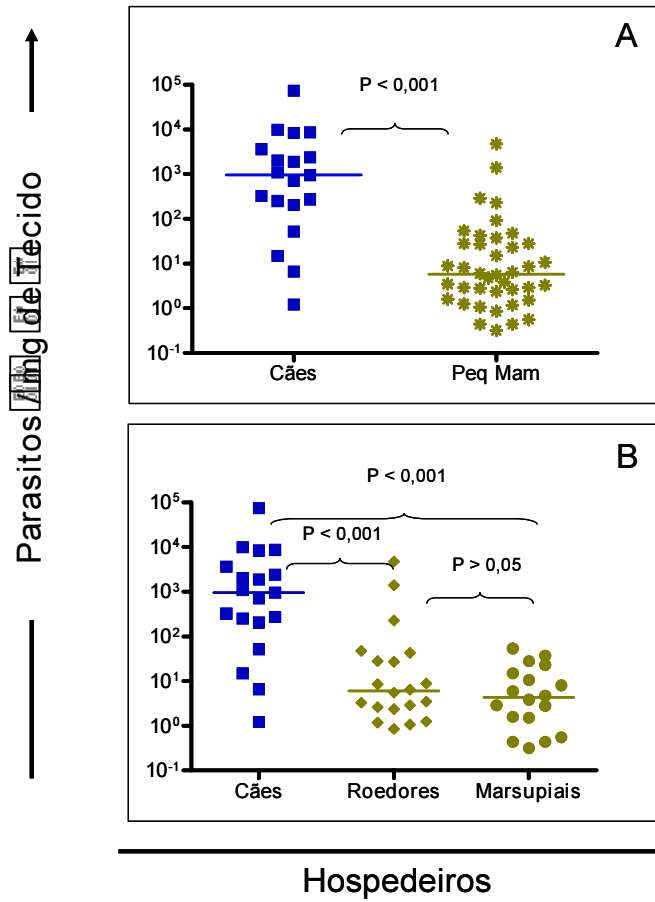


Figura 21: Representação gráfica dos resultados de RTQ-PCR realizado com amostras de DNA extraído de Cães (pele de orelha) e Pequenos Mamíferos (pele de orelha e pele de cauda) A. Representação gráfica dos resultados RTQ-PCR realizado com amostras de DNA extraído de Cães Roedores e Marsupiais B.

Pela análise da figura 22 A podemos observar que entre os cães, a carga parasitária na pele é maior no grupo dos sintomáticos em relação aos assintomáticos ($P < 0,05$) e que a carga parasitária em pele de cães infectados por *L. infantum* é estatisticamente superior à carga parasitária tanto em sangue

de cães infectados por *L. infantum* como em sangue de cães infectados por *L. braziliensis* ($P < 0,05$) e ainda, que entre as amostras de sangue, a carga parasitária é estatisticamente superior entre aqueles infectados por *L. braziliensis*, em relação aos infectados por *L. infantum* ($P < 0,05$).

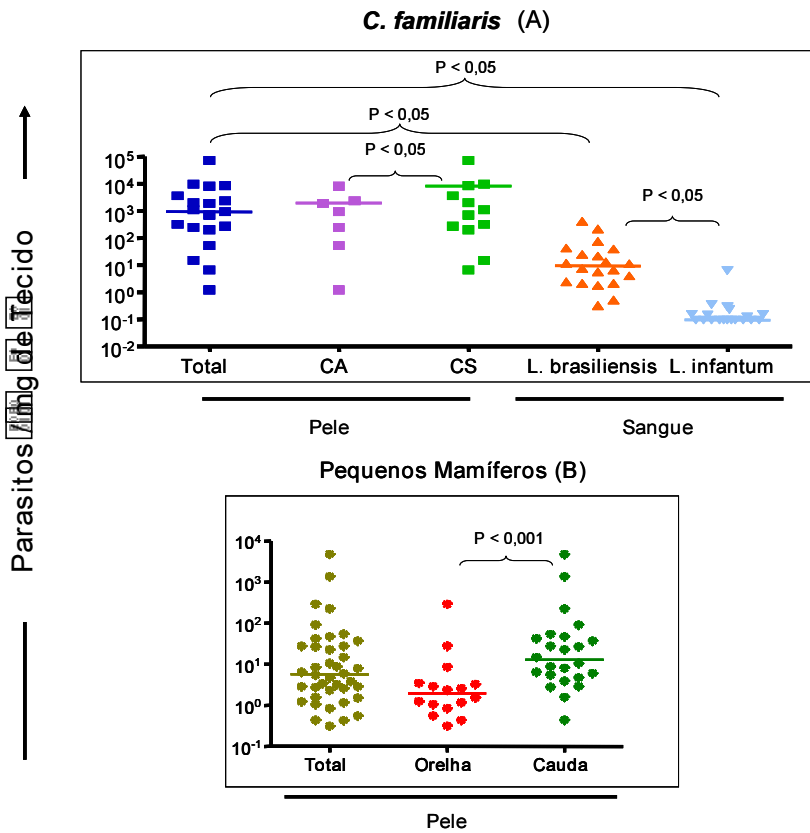


Figura 22: Representação gráfica dos resultados RTQ-PCR realizado com amostras de: A - DNA extraído de pele de cães com diferentes formas clínicas (CA - cães assintomáticos; CS - cães sintomáticos) e de sangue de cães infectados por *L. braziliensis* e com *L. infantum*; B - DNA extraído de pele de orelha e de pele de cauda de Pequenos Mamíferos.

Ao realizar a análise dos resultados de RTQ-PCR para as amostras dos Pequenos Mamíferos agrupadas em pele de orelha e pele de cauda foi observada diferença estatística significativa, que está mostrada graficamente na figura 22 B, pode-se observar que a carga parasitária na pele da cauda dos Pequenos Mamíferos é superior àquela quantificada na pele da orelha ($P < 0,001$).

5 Discussão

5.1 Uma abordagem Epidemiológica

A região metropolitana de Belo Horizonte (RMBH), considerada endêmica para as leishmanioses tegumentar e visceral há vários anos (Genaro *et al.*, 1990; Passos *et al.*, 1990) é uma área urbanizada e densamente habitada. B H é um município sem área rural característica, onde a transmissão das leishmanioses ocorre em praticamente todos os bairros da cidade, o que configura um caráter urbano de transmissão já observado por outros autores (Passos *et al.*, 1993; Luz *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2001; Margonari *et al.*, 2006).

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil (2006), na área urbana, o cão é a principal fonte de infecção para os vetores e conseqüentemente um importante mantenedor do ciclo da *L. infantum* neste ambiente. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem, sendo a eutanásia de cães soropositivos uma das medidas de controle preconizadas, além da borrifação dos domicílios, da detecção e tratamento de casos humanos e de atividades em educação e saúde. No ambiente silvestre, os reservatórios de *L. infantum* descritos até o momento são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*).

A erradicação desta zoonose permanece um grande desafio para os órgãos de saúde pública no Brasil devido à complexidade e diversidade dos cenários de transmissão. Além disso, existem várias lacunas no conhecimento das variáveis que determinam a infecção humana e canina como também ausência de estudos que comprovem a eficiência e validem as medidas de controle preconizadas.

A prefeitura de Belo Horizonte, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde, tem realizado intenso trabalho de controle de LV. Entre os anos de 2005 e 2007, cerca de 140.000 amostras de sangue canino foram analisadas para leishmanioses, 10.000 cães sorologicamente positivos foram eutanasiados, e cerca de 160.000 casas foram borrifadas, em cada ano (PBH, 2008).

Desde o registro dos primeiros casos da doença em Belo Horizonte, 1994, tem sido observada a expansão, tanto numérica, quanto espacial. Em

1994, a Regional Nordeste notificou 12 casos de LV e a Regional Leste 17, dez anos depois, em 2004, todas as nove regionais da capital mineira já notificavam casos de LV, com um total de 128 em 2004. Em Belo Horizonte foram notificados 111 casos em 2005, 113 em 2006, 110 em 2007, 161 em 2008 e 119 em 2009 (PBH, 2010).

Esta expansão numérica e territorial da doença provavelmente está relacionada à ineficiência das medidas de controle empregadas. Entre outros fatores que contribuem para tal podemos destacar o fato de que a detecção da doença canina é realizada por métodos sorológicos que podem apresentar resultados falsos negativos em cães em fase inicial da infecção ou que apresentem deficiências em seu sistema imunológico. Além disso estes testes podem apresentar reações cruzadas quando realizados em soros de cães infectados por outros patógenos, resultando em falsos positivos. Aliado a isso existe a questão da demora na entrega dos resultados e conseqüentemente a manutenção do cão infectado durante mais tempo na área, a rápida substituição de cães removidos por outros susceptíveis à infecção e a falta de conhecimento suficiente a respeito de outros possíveis hospedeiros que poderiam estar atuando como reservatórios.

A ecoepidemiologia da transmissão de *L. braziliensis* (principal agente etiológico da LTA na área de estudo) é extremamente complexa em função dos vários ecótopos onde este parasito é prevalente. Em microambientes diferentes a transmissão envolve diversas espécies de flebotomíneos ou, a mesma espécie com outros hábitos e diferentes espécies de mamíferos em uma imensidão territorial que se estende por toda a América do Sul até a América Central. Provavelmente, este parasito possui vários reservatórios, dependendo do ecótopo e das circunstâncias de transmissão (Lainson & Shaw, 1998).

É difícil estimar o número real de casos de leishmaniose tegumentar uma vez que, por tratar-se de agravo não letal, são subnotificados. Os primeiros casos de LTA na RMBH foram registrados em 1987 na cidade de Sabará (Passos *et al.*, 1990). Passos *et al.* (1993) encontraram crianças, mulheres e homens sem qualquer vínculo ocupacional com a mata, infectados ou com história prévia de infecção, além de uma alta densidade de *Lu.*

whitmani, potencial vetor de *L. braziliensis* mas apenas um cão, concluindo tratar-se de uma área de transmissão peri domiciliar ou domiciliar.

Com relação a área onde foi realizado o estudo (Regional Nordeste de BH) os dados mostram uma constância na ocorrência tanto de casos de LV como de LTA nos últimos anos. Foram notificados 15 casos de LV em 2001, 17 em 2002, 12 em 2003, 24 em 2004, 14 em 2005, 25 em 2006, 21 em 2007, 40 em 2008 e 13 em 2009 (GEEPI/SMSA/PBH/2010); com relação à LT no mesmo período foram notificados 5 casos em 2001, 10 em 2002, 9 em 2003, 2 em 2004, 7 em 2005, 4 em 2006, 9 em 2007, 3 em 2008 e 1 em 2009 (Dados parciais) (SISVE/2009 - GEREPI-NE/SMSA-BH).

Em estudo paralelo, sobre a fauna flebotomínica, no mesmo período e locais onde realizamos as coletas, foi verificado que a espécie com maior densidade populacional foi *L. whitmani*, que correspondeu a 75% dos espécimes coletados, seguida pela espécie *L. longipalpis* (11%) (Saraiva, 2008). Estes resultados contrapõem-se aqueles encontrados por outros autores em estudos entomológicos realizados em Belo Horizonte, onde *L. longipalpis* foi apontada como a espécie predominante (Souza *et al.*,2004). Além disso, *L. longipalpis* foi a espécie mais coletada na Regional Nordeste em estudo realizado entre abril de 2001 e março de 2003 por Souza e colaboradores (2004).

Entretanto, ao realizar as análises sobre a fauna da Regional Nordeste considerando separadamente as coletas realizadas na área urbana e na área verde, Saraiva (2008) constatou perfil semelhante ao descrito por Souza e colaboradores (2004). Na área urbana *L. longipalpis* foi a espécie mais abundante, correspondendo a 63% dos espécimes capturados, e *L. whitmani* foi a segunda espécie mais coletada, correspondendo a 15% do total. Na área verde a predominância foi de *L. whitmani* (87%) ficando a *L. longipalpis* com menos de 1% do total de flebotomíneos coletados. No estudo da infecção natural destes insetos foi detectada infecção por *L. infantum* e *L. braziliensis*.

Entre os pequenos mamíferos capturados, não houve diferença estatística para o número de animais oriundos da área verde ou da área peri domiciliar. A única diferença constatada foi em relação à variedade de espécies de mamíferos que foi maior na área verde. Entre os animais infectados não houve diferença quando considerado o ambiente de origem assim como não foi

observada diferença entre as proporções de infectados por *L. braziliensis* e *L. infantum* para os dois ambientes, indicando assim a existência dos ciclos de transmissão ativa nos dois ambientes estudados para as duas espécies de *Leishmania*.

Para entender a relação entre o parasito e seus hospedeiros é preciso ter em mente que estes coadaptam-se de maneira a conviverem em certa harmonia. Quanto menor for a morbidade causada pelo parasito ao hospedeiro e quanto mais constante for a incidência da infecção em dada população, mais antiga e equilibrada deve ser a relação entre eles (Ashford, 1996; Avila-Pires, 2005). Existem várias discussões sobre os conceitos acerca de hospedeiros e reservatórios (Shaw, 1988; Ashford, 1996; Haydon *et al.*, 2002; Chaves *et al.*, 2007). O termo hospedeiro é bem generalista, diz respeito a uma espécie que abriga ocasionalmente um parasito oportunista que pode ou não comprometer sua sobrevivência (Avila-Pires, 2005). Já o termo reservatório, segundo Silva *et al.* (2005), para ser corretamente empregado em relação às zoonoses que acometem humanos, necessita que o hospedeiro preencha os seguintes critérios: (a) superposição espaço/tempo com os vetores; (b) sobreviva o suficiente para garantir a transmissão; (c) apresente uma prevalência de infecção de pelo menos 20%; (d) mantenha o parasito na pele ou no sangue em quantidade suficiente para infectar facilmente o vetor; e (e) apresente a mesma espécie de parasito encontrada no homem.

A maioria das condições necessárias para incriminar-se uma espécie como reservatório foram apresentadas pelos cães e pequenos mamíferos aqui estudados: (a) foram capturados nos mesmos locais e no mesmo período em que Saraiva (2008) capturou flebotomíneos vetores tanto das espécies causadoras da LT, quanto espécies causadoras da LV ; (b) em sua maioria, os animais não apresentaram sinais que comprometessem sua sobrevivência, permitindo sua permanência por período suficiente para infectar os vetores; (c) embora algumas espécie foram capturadas em pequena quantidade, todas elas apresentaram uma positividade da infecção superior a 20% independente da técnica de PCR utilizada; (d) os pequenos mamíferos apresentaram a pele freqüentemente infectada e os cães apresentaram pele e sangue freqüentemente infectados, resta saber se a quantidade de parasitos presentes nestes tecidos seria o suficiente para infectar os vetores; (e) as espécies de

Leishmania predominantemente encontradas nestes hospedeiros (*L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*) provavelmente correspondem às espécies causadoras da infecção humana na área, uma vez que são as mesmas espécies já isoladas e identificadas de casos humanos em Belo Horizonte.

As circunstâncias da transmissão das leishmanioses são continuamente alteradas em relação aos fatores ambientais e do comportamento humano (Gramiccia & Gradoni, 2005). Segundo Wolinska & King (2009) o ambiente onde hospedeiros e parasitos interagem pode afetar substancialmente a força e especificidade da seleção, o que possibilitaria a uma dada espécie ter maior ou menor importância como mantenedora do ciclo de transmissão dependendo do ambiente em que esteja presente, não havendo espécies reservatório, mas, espécies servindo como reservatório em determinadas condições.

O direcionamento das capturas para os pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) baseou-se em estudos anteriores que apontam espécies destes grupos como possíveis reservatórios de *Leishmania* sp. (Brandão-Filho *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005). A coleta e processamento de amostras caninas devem-se ao fato de que o papel do cão como principal reservatório de *L. (L.) infantum* em áreas peri urbanas e urbanas é incontestável (Oliveira *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2001; Gontijo & Melo, 2004). Porém, achados de infecção natural deste parasito em outros animais e as dificuldades no controle apesar da maciça eliminação da população canina soropositiva, vem levantando a hipótese de transmissão secundária através da participação de outros animais no ciclo. Neste sentido os gambás são os principais candidatos a reservatórios em função de já haverem sido encontrados infectados por este parasito por diversas vezes (Sherlock *et al.*, 1984; Corredor *et al.*, 1989; Travi *et al.*, 1998 ; Cabrera *et al.*, 2003; Schallig *et al.*, 2007). Além disso, servem de fonte de infecção para *Lu. Longipalpis* (Travi *et al.*, 1998) que se alimenta nesta espécie com certa frequência (Sherlock *et al.*, 1984).

Os altos índices de positividade das PCRs tanto dirigidas ao kDNA quanto dirigidas ao SSUrRNA de *Leishmania* nos diferentes grupos estudados (cães, roedores e marsupiais) confirmam a susceptibilidade destes à infecção por *Leishmania* e ressaltam a importância do desenvolvimento de estudos

direcionados a estes animais, com o objetivo de esclarecer seu papel na cadeia de transmissão.

Independente da metodologia utilizada, todas as espécies de pequenos mamíferos apresentaram uma positividade elevada, que variou de 20% (*Necomys lasiurus* / kDNA1), chegando a 100% (*M. musculus*, *R. norvegicus*, *C. subflavus* e *Galictis sp.* / kDNA2). Entre os cães os índices também foram elevados, variando entre 18,5% (cães 01 / kDNA1) e 92,9% (cães 2 / kDNA1a). A positividade elevada, principalmente quando a pele apresenta-se frequentemente parasitada, é uma condição necessária, mas não suficiente para a incriminação destes hospedeiros como reservatórios.

A identificação dos parasitos presentes na infecção de cães e de pequenos mamíferos revelou a participação de espécies pertencentes aos complexos *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania donovani*, que associada aos resultados de Saraiva (2008), que detectou a presença destas espécies em flebotomíneos, confirmam a ocorrência de um ciclo de transmissão ativa destas diferentes espécies do parasito na área estudada.

Ainda com relação à identificação da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção em peri domicílio, é curioso o fato de que entre pequenos mamíferos e cães 01, que tiveram as amostras coletadas no mesmo período em que foi realizado o trabalho de Saraiva (2008), a espécie de *Leishmania* predominantemente encontrada tanto nos pequenos mamíferos (14/30) quanto nos cães (23/28), pertencia ao complexo *L. braziliensis*, sendo o oposto do observado por Saraiva (2008) com a grande maioria das fêmeas de flebotomíneos infectadas por *L. infantum*. Entre os cães 02 (coletados em 2002) a espécie predominante foi identificada como *L. infantum*, confirmando os resultados de Quaresma *et al.* (2009).

A ocorrência de sobreposição de áreas endêmicas para diferentes formas de leishmanioses pode levar a mudanças nos padrões da epidemiologia clássica, com a ocorrência de infecções mistas causadas por diferentes espécies de *Leishmania* (Madeira *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2002; Oliveira-Neto *et al.*, 1986; Silveira *et al.*, 1984). Madeira *et al.* (2006) reportaram o primeiro caso de co-infecção com *L. (V.) braziliensis* (isolado de lesão) e *L. (L.) infantum* (isolado de sangue e linfonodo) em cão. Devido a isso os autores

sugeriram a coleta de diferentes tecidos, sobretudo em animais de áreas onde a sobreposição ocorre. Em pequenos mamíferos observamos a ocorrência da infecção mista natural em três animais: um exemplar da espécie *Mus musculus* apresentou fígado infectado por *L. infantum* e baço infectado por *L. braziliensis*; outro *Mus musculus* apresentou pele de cauda e medula óssea infectados por *L. infantum* e fígado e baço infectados por *L. braziliensis*; um exemplar da espécie *R. rattus* apresentou fígado infectado por *L. infantum* e medula óssea infectada por *L. braziliensis*, sendo importante destacar que estes três animais foram coletados no peri domicílio de três residências distintas. Este fato é preocupante uma vez que estas duas espécies de roedores são comumente encontradas em áreas urbanas, em estreita relação com o domicílio, principalmente em habitações que apresentam condições mais precárias de higiene e maior desorganização ambiental.

Entre os cães, embora não tenha sido observada a presença de infecção mista, como anteriormente descrito na literatura (Madeira *et al.*, 2006), um fato que chama a atenção é a presença de cães infectados por *Leishmania* do complexo *L. mexicana*, (assim como observado em casos humanos em São Paulo (Medeiros *et al.*, 2008)), o que sugere a existência de um ciclo de transmissão local de *L. amazonensis*, além da transmissão de espécies dos complexos *L. braziliensis* e *L. donovani*.

Durante a infecção por *Leishmania*, o grau de parasitismo pode diferir nos órgãos, por isso é relevante para propósitos de diagnóstico a identificação dos compartimentos que apresentam maiores níveis de parasitos, com o objetivo de melhorar a sensibilidade do diagnóstico da LVC (Reis *et al.* 2006). Além disso, o conhecimento a respeito da carga de parasitos presentes na pele e no sangue, de diferentes hospedeiros, pode auxiliar na indicação do papel destes como fonte de infecção para os vetores (Silva *et al.*, 2005).

Saridomichelakis *et al.* (2007) observaram que em cães infectados por *L. infantum*, a carga parasitária não difere em pele de diferentes partes do corpo e segundo eles não há um acúmulo seletivo de parasitos no focinho, o que favoreceria a transmissão. Nossos resultados de RTQ-PCR realizado com amostras de pele de orelha e de cauda de pequenos mamíferos infectados por *L. braziliensis*, ao contrário do observado por Saridomichelakis *et al.* (2007) em pele de cães infectados por *L. infantum*, apontam para uma maior carga

parasitária nas amostras de pele de cauda em relação às de pele de orelha. Estes resultados contribuem para a compreensão de que as lesões, quando presentes nestes animais, geralmente localizam-se do meio para a base da cauda, por vezes abarrotadas de parasitos, fazendo destes excelentes fonte de infecção para o vetor (Nery-Guimarães *et al.*, 1968, Lainson & Shaw, 1968, Lainson & Shaw, 1970).

Quaresma *et al.* (2009) observaram que entre os cães, aqueles com exames convencionais positivos (parasitológico ou sorológico) a densidade parasitária foi maior do que para aqueles com exames convencionais negativos, o que indica que a carga parasitária mais elevada influencia no sucesso dos diagnósticos convencionais. Os autores observaram também que entre os cães com exame parasitológico positivo a densidade parasitária foi diferente sendo maior na medula do que no sangue, mas não observaram diferença significativa na densidade parasitária entre cães sintomáticos e assintomáticos. Em nosso estudo observamos uma diferença pequena, porém significativa, entre as cargas parasitárias nos cães sintomáticos (superior) e assintomáticos (inferior) quando avaliadas em amostras de pele.

Com relação à carga de parasitos encontrada em pele de cães e pequenos mamíferos foi observado que entre os cães a carga é muito mais elevada, a maioria das amostras testadas apresentaram uma carga acima de 10^3 P/mg de tecido, comparada à carga presente nos pequenos mamíferos que apresentaram uma carga abaixo de 10^2 P/mg. Este fato pode estar relacionado entre outras coisas à diferença da espécie de *Leishmania* envolvida, que nas amostras caninas é *L. infantum* e nas amostras dos pequenos mamíferos é *L. braziliensis*. Outra questão a ser apontada é a própria diferença entre as espécies de hospedeiros que poderia favorecer uma maior proliferação dos parasitos em um grupo em relação ao outro. Não foi observada diferença entre as cargas em roedores e marsupiais, o que juntamente com a frequência em que foram encontrados e com as taxas de positividade apresentadas pelas PCRs indica que aparentemente estes dois grupos teriam papeis semelhantes no contexto das leishmanioses na área estudada.

Foi observado também que entre as amostras de cães infectados por *L. infantum*, a densidade parasitária foi superior na pele (acima de 10^3 p/mg) em relação ao sangue (abaixo de 10^0 p/mg) e que entre as amostras de sangue

dos cães a densidade parasitária foi inferior em amostras cujo parasito era *L. infantum* (abaixo de 10^0 p/mg) em relação às amostras cujo parasito era *L. braziliensis* (acima de 10^1 p/mg). A presença de um número significativo de parasitos no sangue periférico de cães infectados por *L. braziliensis* pode sugerir sua participação como possível reservatório da LTA em áreas urbanas como aventado por diferentes autores (Madeira *et al.*, 2003). Segundo Dantas-Torres (2007) o cão doméstico seria, a princípio, meramente um hospedeiro acidental para a maioria das espécies de *Leishmania*, mas devido às mudanças apresentadas no ciclo de transmissão, provocadas pela “domesticação” da doença, não apenas o cão, mas outros animais domésticos e sinantrópicos apresentam um papel na epidemiologia da LTA, não necessariamente como reservatórios da infecção, mas atraindo os vetores para próximo do homem.

Após a captura, e antes da coleta dos diferentes tecidos dos pequenos mamíferos foi realizado o exame clínico dos animais. Não foi observado em nenhum deles lesão leishmaniótica clássica como aquelas, glabras e descamativas, nas extremidades da cauda, classicamente descritas por Nery-Guimarães *et al.* (1968), mas que está de acordo com Forattini (1960) que cita ausência de lesões leishmanióticas em animais positivos em algum teste posterior. Nos animais silvestres são freqüentes as infecções inaparentes sem lesões ou com lesões pouco graves o que é muito importante para que uma espécie seja considerada um bom reservatório (Nery-Guimarães *et al.*, 1968). Um quadro diferente é observado em infecções humanas, que tendem a apresentar reações mais intensas à invasão do parasito, caracterizando uma relação anômala e recente, em termos de evolução, o que determina um comportamento mais agressivo da doença no ser humano (Forattini, 1960). Alguns autores acreditam na possibilidade de que, no decorrer de um processo que se inicia com a sinantropização do ciclo, a zoonose possa evoluir para uma antroponose onde o homem passa a servir de fonte de infecção para flebotomíneos vetores bem adaptados ao ambiente antrópico (Rotureau, 2006).

Estes fatos apontam para a necessidade de mudar a forma de lidar com a ocorrência destes agravos, especialmente nas áreas urbanas, onde a doença apresenta características ainda desconhecidas e sua epidemiologia está em plena transição.

Quanto ao encontro de um espécime de *D. albiventris* apresentando uma infecção mista pelas espécies *T. cruzi* tipo I e *T. rangeli* caracterizando o primeiro isolamento de *T. rangeli* em Belo Horizonte e também o primeiro isolamento deste parasito a partir de medula de um animal naturalmente infectado. O *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) causa uma infecção assintomática conhecida como tripanossomíase rangeli, tendo como principal vetor o gênero *Rhodnius* que habita palmeiras. Este parasito, apesar de não causar doença no vertebrado, possui importância epidemiológica por ocorrer simpatricamente e possuir vetores e hospedeiros em comum bem como similaridade antigênica ao *T. cruzi* podendo ser confundido com este nos testes sorológicos (Dias *et al.*, 2007). Isso pode provocar erros por diagnóstico falso positivo para doença de Chagas além de tratamentos e custos sociais e econômicos desnecessários.

É conhecido o fato de que Belo Horizonte não é área endêmica para doença de Chagas, no entanto este achado comprova que o agente etiológico circula entre animais sinantrópicos que vivem em proximidade ao homem. O desmatamento das áreas verdes onde o parasito circula entre animais silvestres/sinantrópicos pode levar a aproximação destes hospedeiros infectados juntamente com os vetores ao ambiente antrópico, aumentando o risco da doença humana. Sob o ponto de vista epidemiológico o encontro de *T. cruzi* parasitando um gambá é muito coerente, pois este mamífero é um hospedeiro conhecido destes parasitos (Deane *et al.*, 1984; Ramirez *et al.*, 2002; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2004). O referido animal foi coletado na área verde onde existem muitas palmeiras, ecótopo natural dos triatomíneos da tribo Rhodnii.

Estes dados alertam mais uma vez para a importância de estudar estes pequenos mamíferos que habitam em áreas urbanas ou próximo a elas, como uma tentativa de elaboração de medidas de controle mais eficientes em conter a expansão das diferentes doenças que contam com a participação destes animais na manutenção do seu ciclo de transmissão.

5.2 Uma abordagem Molecular

Diagnósticos moleculares estão revolucionando a prática clínica de doenças infecciosas. Seus efeitos são mais significativos nos casos de doenças agudas que necessitam de ferramentas de diagnóstico preciso, fundamentais para as decisões de tratamento do paciente. A PCR é a técnica molecular melhor desenvolvida, até o momento, e tem uma vasta gama de potencialidades, e aplicações clínicas, incluindo a detecção específica de patógenos. Métodos baseados em PCR também podem ser rentáveis em relação a execução de testes tradicionais. É necessário um maior avanço da tecnologia para melhorar a automação, a sensibilidade e especificidade de detecção (Yang & Rothman, 2004).

O amplo espectro clínico das leishmanioses faz o diagnóstico dos casos, presente e passado, difícil. Entretanto, o diagnóstico diferencial é importante porque as doenças de outras etiologias que apresentam aspectos e sintomas muitas vezes semelhante ao das leishmanioses (como a hanseníase, câncer de pele e tuberculose para LTA, e malária e esquistossomose para LV) estão frequentemente presentes em áreas de endemicidade. Além disso, a severidade da doença é principalmente devido à espécie de *Leishmania* infectante, e há evidências crescentes de que a resposta terapêutica é espécie e, talvez, até mesmo cepa específica (Reithinger & Dujardin, 2007).

O diagnóstico parasitológico continua sendo o padrão ouro no diagnóstico das leishmanioses devido à sua alta especificidade. Isso é normalmente realizado através de exame microscópico de esfregaços de biópsia da lesão (LT) ou linfonodos, medula óssea e aspirado de baço (LV) em lâminas coradas pelo Giemsa. Ocasionalmente, o exame de cultura de biópsia e aspirado também é realizado. A microscopia provavelmente ainda é a abordagem padrão de diagnóstico, pois técnicas mais sofisticadas atualmente são caras e raramente disponíveis a não ser nos centros de pesquisa. O isolamento do parasito em cultura em combinação com a eletroforese de enzimas multilocus permite a identificação da espécie do parasito. No entanto, ela exige uma riqueza de conhecimentos técnicos e é demorada, devido à necessidade de obter uma massa grande de parasitos. A sensibilidade do exame direto em lâmina e do isolamento em meio de cultura tende a ser baixa e pode ser altamente variável dependendo do número e dispersão de parasitos

em amostras de biópsia, do processo de amostragem, e acima de tudo da capacidade técnica do pessoal.

No presente trabalho, apesar dos altos índices de infecção detectados pelas diferentes técnicas de PCR em amostras dos pequenos mamíferos, não foram encontradas formas amastigotas do parasito durante os exames de lâminas fixadas, coradas pelo Giemsa e, foram realizados dois isolados de formas flageladas, ambos oriundos de medula óssea de *D. albiventris*. Em um dos exemplares foi identificada infecção mista por *T. cruzi* tipo 1 e *T. rangeli*. Estes baixos índices de positividade do diagnóstico parasitológico em relação ao molecular confirmam a menor sensibilidade do primeiro e podem estar relacionados principalmente a uma carga parasitária baixa que, de acordo com os resultados da RTQ-PCR realizado em pele de pequenos mamíferos a grande maioria apresentou uma carga equivalente a menos de 10 parasitos por miligrama de tecido.

Os resultados de Quaresma *et al.* (2009) sugerem que a prevalência da infecção por *Leishmania* pode ser subestimada quando são utilizados apenas testes sorológicos e parasitológicos nos inquéritos da LVC e que as metodologias baseadas na PCR podem ser especialmente úteis em áreas endêmicas para a leishmaniose visceral que possuem um grande número de cães que apresentem a forma assintomática da doença. Ferreira *et al.* (2007) demonstraram que a sorologia baseada em ELISA e IFI pode apresentar reações cruzadas em soros de cães infectados por patógenos distintos de *Leishmania infantum*, inclusive com outras espécies do gênero *Leishmania*.

Os resultados de Prina *et al.* (2007) indicam que a degradação do DNA nuclear e do cinetoplasto ocorre rapidamente após a morte do parasito. Estes dados adicionam um maior peso ao argumento de que a PCR não representa apenas um método robusto para o diagnóstico, mas também pode ser confiável para a monitorização da taxa de redução da carga parasitária após alguma intervenção, como o tratamento.

Apesar da sucessiva avaliação de diferentes métodos moleculares para o diagnóstico da leishmaniose, técnicas baseadas na PCR atualmente constituem a principal abordagem de diagnóstico molecular de pesquisadores e profissionais de saúde. Vários formatos diferentes de PCR estão disponíveis como, por exemplo, a PCR convencional ou a nested PCR, em que fragmentos

amplificados pela PCR são resolvidos por eletroforese (eventualmente após clivagem com enzimas de restrição, ou seja PCR-RFLP) e visualizados após coloração com brometo de etídio (Cruz *et al.*, 2002; Schönian *et al.*, 2003; Volpini *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2005; De Andrade *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2010); ou ainda, abordagens de alta tecnologia como métodos em que os produtos de PCR são analisados durante a sua amplificação (o chamado real-time PCR), após coloração com fluorogênicos. Neste caso, os ensaios são realizados dentro de um tubo fechado, diminuindo o risco de contaminação por fragmentos presentes no ambiente do laboratório. As aplicações são rápidas e de alto rendimento, mas o equipamento é relativamente caro, e os custos permanecem elevados (Espy *et al.*, 2006; Quaresma *et al.*, 2009).

Segundo Reithinger & Dujardin (2007), em termos de aplicações práticas, seis princípios básicos e/ ou questões biológicas podem ser respondidos por métodos baseados nos ácidos nucleicos. Entre eles, podem ser destacados três diretamente relacionados com o presente estudo: (a) detecção do parasito, altamente sensível e específica, necessária em diagnóstico diferencial; (b) identificação da espécie de *Leishmania* por uma série de ensaios baseados na PCR e (c) quantificação da carga parasitária presente nos tecidos do hospedeiro.

A técnica de PCR por si só é muito simples porem, requer a geração de iniciadores específicos. Nos últimos anos, diferentes ensaios de PCR foram desenvolvidos para a detecção de DNA de *Leishmania* em amostras clínicas, utilizando vários alvos. A sensibilidade da PCR pode ser aumentada pelo uso de iniciadores baseados em seqüências que têm mais de uma cópia por célula; no caso de *Leishmania*, essas seqüências incluem o cinetoplasto e famílias de genes de multicópias, que geram uma vantagem em estudos relacionados à detecção e quantificação do parasito.

Exemplos de tais seqüências alvo são genes do RNA ribossomal, DNA do cinetoplasto (kDNA), genes de RNA derivados do mini-exon e repetições genômicas (Alvar *et al.*, 2004). A especificidade da PCR pode ser adaptada às necessidades particulares pela utilização de alvos em regiões conservadas ou variáveis. Dessa maneira é possível caracterizar o parasito presente na amostra ao nível de gênero, complexo, espécie ou até mesmo isolado (Quaresma, 2007). Para identificação das espécies, a sensibilidade e a

discriminação em um determinado nível taxonômico são necessárias e, portanto, seqüências repetidas e polimórficas são selecionadas (por exemplo, gp63, ITS, hsp70, e cisteína proteinases) (Garcia *et al.*, 2004). Uma das principais preocupações na investigação, desenvolvimento e na implementação de técnicas moleculares é a falta de padronização e controle de qualidade (Reithinger & Dujardin, 2007).

Entre os genes de multicópias, o mais estudado é o SSUrRNA, já tendo sido seqüenciado para mais de 100 espécies, incluindo os kinetoplastídeos *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Crithidia fasciculata*. A comparação de seqüências do SSUrRNA publicadas de humanos (hospedeiro) artrópodes (vetores) e kinetoplastídeos (parasitas) indica que apenas uma região de aproximadamente 800 bases na parte central do gene mostra uma heterologia considerável e foi pra essa região que van Eys *et al.* (1992) desenharam os pares de iniciadores R221 e R332 (neste trabalho R1 e R2) que amplificam uma região de 603 pb presente em kinetoplastídeos (menos específica); e R223 e R333 (neste trabalho R3 e R4) que amplificam uma região de 353 pb somente de espécies do gênero *Leishmania* (menos sensível). Em 2002, Cruz *et al.* sugerem a combinação destes dois pares de iniciadores em uma Nested PCR para detectar *Leishmania* em humanos (diagnóstico e monitoramento), aumentando a sensibilidade e especificidade da reação.

Neste trabalho utilizamos diferentes abordagens moleculares visando otimizar e assegurar uma maior confiabilidade aos resultados. A detecção do parasito foi realizada pelas PCRs dirigidas ao kDNA e ao SSUrRNA de *Leishmania*, a identificação da espécie foi realizada pela análise do perfil de restrição gerado pela PCR-RFLP dirigida ao kDNA e pelo seqüenciamento do produto amplificado pela segunda reação da Ln-PCR dirigida ao gene SSUrRNA, e a quantificação da carga parasitária foi realizada através da touchdown RTQ-PCR dirigida ao kDNA de *Leishmania*.

Poucos estudos têm comparado protocolos de PCR utilizando diferentes iniciadores baseados em alvos variados como por exemplo o DNA do cinetoplasto e o gene do rRNA (Weigle *et al.*, 1991; Ramirez *et al.*, 2000; Reithinger *et al.*, 2000; Lachaud *et al.*, 2002; Bensoussan *et al.*, 2006). As conclusões destes estudos comparativos foram diferentes enquanto um estudo

indicou uma maior sensibilidade do kDNA (Bensoussan *et al.*, 2006), outro relatou sensibilidades semelhantes dos métodos que usam a amplificação do gene rRNA ou o kDNA (Furnkranz *et al.*, 2004).

A comparação entre estudos deve ser feita com extremo cuidado, levando em consideração uma série de fatores dentre eles os critérios clínicos e laboratoriais utilizados para definir os casos e não casos. A ausência de um verdadeiro padrão ouro para diagnóstico de leishmaniose, pode ter conseqüências importantes para as definições de sensibilidade e especificidade. Estudos comparativos de protocolos devem ser incentivados e atualizados para os mais recentes desenvolvimentos tecnológicos no campo e, mais importante, deve ser feito em estudos multicêntricos com tamanho de amostra suficiente para permitir a comparação estatística dos protocolos de avaliação diagnóstica (Reithinger & Dujardin, 2007).

Este foi o primeiro estudo realizado, comparando diferentes técnicas de PCR em amostras de população canina e de pequenos mamíferos oriundos de mesma área endêmica para diferentes formas de leishmanioses. Os resultados obtidos apontam para uma maior sensibilidade da PCR dirigida ao kDNA em relação à Ln-PCR dirigida ao gene SSUrRNA, assim como relatado anteriormente (Lachaud *et al.*, 2002; Bensoussan *et al.*, 2006). Por um lado essa maior sensibilidade obtida pelo uso do kDNA pode estar relacionada com o fato do número de cópias ser mais elevado do que o número de cópias do gene SSUrRNA, 10.000 e 160 cópias respectivamente. Uma positividade tão elevada como a obtida pelo uso do kDNA poderia também estar relacionada com a possibilidade dos iniciadores utilizados estarem amplificando alguma outra seqüência de nucleotídeos, como por exemplo o kDNA de outros kinetoplastídeos que poderiam estar presentes nas amostras biológicas dos animais. Não existem estudos que comprovem a especificidade destes iniciadores, o que já foi realizado para os iniciadores da LnPCR-SSUrRNA por Cruz *et al.* (2002), comprovando que esta reação é específica para o gênero *Leishmania*.

Schallig *et al.* (2007), estudando a infecção por *Leishmania* em *Didelphis* de Belo Horizonte pela PCR realizada em amostras de DNA extraído do sangue, tendo como alvo a região de 603 pb do gene SSUrRNA (Van Eys *et al.*, 1992), observaram uma positividade de 25% em uma amostra de 20

animais. Este índice pode estar subestimado pois, segundo Cruz *et al.* (2002) a sensibilidade e especificidade desta PCR pode ser aumentada por uma segunda amplificação (Ln-PCR) com os iniciadores R3 e R4. Esta metodologia foi empregada no presente estudo resultando uma positividade de 60% em uma amostra de 35 animais do gênero *Didelphis*. Além disso, o fato de avaliar a infecção em diversos tecidos (pele de orelha, pele de cauda, fígado, baço e medula óssea), como realizado em nosso estudo, aumenta a chance de encontro do DNA do parasito, que não se distribui de forma homogênea pelo corpo do hospedeiro.

Em estudos recentes, o seqüenciamento de fragmentos de DNA obtidos pela amplificação de diferentes genes alvo tem sido realizado e utilizado junto com o alinhamento das seqüências obtidas como uma forma de identificar a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (Parvizi & Ready 2008; Parvizi *et al.*, 2008; Medeiros *et al.*, 2008).

Mesmo já tendo sido sugerido por van Eys *et al.* (1992) a possibilidade do uso do seqüenciamento deste produto amplificado para identificar a espécie de *Leishmania*, é a primeira vez que isto é realizado em amostras clínicas de cães e pequenos mamíferos, o que possibilitou a identificação dos parasitos somente até o nível de Complexo devido a ausência de diferenças entre as seqüências de indivíduos do mesmo complexo.

No trabalho de Schallig *et al.* (2007), a identificação da espécie de *Leishmania* parasitando gambás do gênero *Didelphis*, foi realizada pela análise do perfil de restrição do produto amplificado gerado pelas enzimas *Rsa I* e *Cfo I* e entre as cinco amostras positivas pela PCR duas foram caracterizadas como pertencentes ao complexo *L. braziliensis* e uma como pertencente ao complexo *L. donovani*, permanecendo as outras duas amostras sem identificação. Esta mesma proporção foi observada em nossos resultados, para 15 amostras identificadas 10 foram incluídas no complexo *L. braziliensis* e cinco no complexo *L. donovani*, permanecendo seis sem identificação. As análises realizadas no presente estudo sugerem que a partir do momento que se obtém o produto amplificado a identificação da espécie de *Leishmania* por seqüenciamento é mais eficaz do que a análise do perfil de restrição, como pode ser observado nas tabelas 9 e 10.

Em amostras de DNA de sangue de cães foi possível realizar a identificação de 60 (96,7%) entre os 62 positivos pela LnPCR sendo 25 (41,7%) identificados como pertencentes ao complexo *L. braziliensis*, 33 (55%) como pertencentes ao complexo *L. donovani* e 2 (3,6%) como complexo *L. mexicana*. Estes resultados configuram um sucesso na identificação semelhante ao encontrado por Quaresma *et al.* (2009) que identificou a espécie de *Leishmania* em 91,5% das amostras. Entretanto, existe variação as espécies encontradas e quanto a proporção que no trabalho de Quaresma *et al.* (2009) 98,9% das amostras foram identificadas como infectadas por *L. infantum* (complexo *L. donovani*) enquanto em apenas 1,1% das amostras foi identificada como *L. braziliensis*. Tratam-se de animais da mesma área coletados em períodos diferentes, o que pode sugerir que nesta área houve uma mudança quanto à presença, distribuição e predomínio das espécies de *Leishmania* encontradas nestes hospedeiros.

Um problema encontrado freqüentemente na amplificação de seqüências do gene-alvo é o aparecimento de bandas inespecíficas. Este produto é causado geralmente pelo anelamento equivocado de um ou ambos os iniciadores da seqüência molde. Estes produtos alternativos freqüentemente dominam os produtos de reação e são presumivelmente devido ao fato de que produtos mais curtos têm mais facilidade para amplificar durante os ciclos da reação. Este problema é agravado, pelo número crescente de ciclos e, portanto, é mais provável de ocorrer quando o alvo modelo está presente apenas em pequenas quantidades (Don *et al.*, 1991).

Ajustes na concentração de $MgCl_2$ ou aumento da temperatura de anelamento da PCR podem resolver este problema presumindo que as interações espúrias são suficientemente menos estáveis do que as específicas devido a esses graus de incompatibilidade entre as seqüências (Don *et al.*, 1991). Estes ajustes podem levar a uma variação da especificidade e sensibilidade da técnica. Tais determinações empíricas apesar de demoradas, são necessárias para que os experimentos sejam realizados em condições otimizadas, e isto foi realizado neste trabalho para a padronização das PCRs e RTQ PCR.

Durante a padronização da RTQ-PCR dirigida ao kDNA de *Leishmania*, diferentes concentrações de MgCl₂ foram testadas, variando de 1,0 mM a 5,0 mM, e a concentração ótima estabelecida foi a de 2,5 mM

Visando ainda uma otimização na sensibilidade e especificidade da RTQ-PCR, foram testados vários programas, variando o número de ciclos bem como a temperatura de anelamento.

Don *et al.* (1991), aproveitando a natureza exponencial das reações de PCR, sugerem começar acima, da temperatura de anelamento esperado e seguir diminuindo esta temperatura gradativamente ao longo dos ciclos até atingir aquela temperatura esperada, o que favorece a amplificação apenas do alvo desejado. Em nossos experimentos de RTQ-PCR, a temperatura de anelamento da reação diminui 1°C a cada dois ciclos de 70 °C a um 'touchdown' de 65 °C, ocorrendo nos primeiros 10 ciclos, permanecendo em 65 °C nos ciclos restantes. Qualquer diferença entre a T_m corretas e incorretas dará uma vantagem de 2 vezes por ciclo, ou 4 vezes por °C, para o produto correto. Portanto, uma diferença de 5 °C daria uma vantagem de 4⁵ (1024) vezes.

Segundo Alves (2008), a PCR em tempo real mostrou-se mais sensível que a imunistoquímica na quantificação do parasitismo tecidual permitindo a diferenciação da intensidade desse parasitismo entre cães apresentando formas polares da leishmaniose visceral canina, embora estas duas técnicas tenham apresentado correlação positiva em todos os órgãos com exceção do fígado.

Além da alta sensibilidade da técnica de RTQ-PCR, os resultados aqui apresentados, confirmam a possibilidade da identificação da espécie de *Leishmania* através da análise das curvas de dissociação do DNA, como já havia sido descrito por Nicolas *et al.*, (2002), Schulz *et al.*, (2003) e Monbrison *et al.*, (2007) para diferenciação de espécies do velho e do novo mundo. Isto faz da RTQ-PCR uma ferramenta ideal para ser usada em estudos de epidemiologia molecular de *Leishmania*, uma vez que com uma única técnica seria possível detectar, identificar e quantificar a carga de parasitos presentes na infecção em diferentes tecidos de diferentes hospedeiros, com alta sensibilidade e especificidade e menor risco de contaminação.

A velocidade do seqüenciamento de genomas tem sido incrivelmente rápida, gerando um conjunto de informações que variam desde genomas simples tais como o de bactérias até os de organismos superiores (Shendure e Ji, 2008), como o genoma humano. Apesar disso, vários genomas ainda estão em processo de seqüenciamento, enquanto outros podem não ter suas seqüências reveladas tão cedo, devido à relevância para áreas específicas da pesquisa científica.

Por outro lado, algumas seqüências específicas de DNA, de genes altamente conservados entre grupos de espécies já foram bastante estudadas, tais como beta-globina, citocromo b, beta-actina, IRBP e estão disponíveis, mesmo se os genomas não tenham sido inteiramente seqüenciados.

Esta informação pode então ser explorada para o desenho de pares de iniciadores "universais" capazes de amplificar uma seqüência de DNA similar entre várias espécies. Baseado nisso, foi verificada, no GenBank, a disponibilidade de várias seqüências de DNA altamente conservadas entre as espécies de mamíferos encontrados na área de estudo. Esta pesquisa objetivou o desenvolvimento de um protocolo capaz de avaliar a qualidade do DNA nas amostras de tecidos de diferentes espécies de mamíferos incluídos nos estudos realizados em nosso laboratório, uma vez que os diagnósticos baseados em PCR requerem DNA de boa qualidade, não fragmentado ou purificado (Grutzmacher *et al.*, 2006), sem a presença de inibidores da reação (Holden *et al.* 2003).

A obtenção de seqüências de DNA a partir desses dados, bem como a realização de alinhamentos múltiplos da seqüência, como neste estudo, permitem uma seleção mais precisa dos alvos a serem explorados por técnicas moleculares como a PCR.

Portanto, foi desenvolvido um protocolo alternativo de PCR para a amplificação de um gene altamente conservado cujas informações sobre as seqüências de nucleotídeos estão disponíveis para uma grande variedade de espécies de mamíferos, entre elas, todas as encontradas por nosso grupo, em diferentes áreas endêmicas em que realizamos trabalhos.

Esta é uma ferramenta importante para pré-avaliar a qualidade do DNA nas amostras que podem ter seu DNA potencialmente degradado durante os

procedimentos de extração/armazenamento ou a sua eficiência afetada pelos inibidores presentes nos extratos de tecidos. Usando condições de PCR padrão já estabelecidas em estudos que usam beta-actina e beta-globina para a avaliação do DNA (du Breuil *et al.*, 1993; Tohgi *et al.*, 1998; Greer *et al.* 1991; 19 Quaresma *et al.* 2009), a eficiência de amplificação com a utilização de iniciadores para IRBP, beta-actina e beta-globina, foi comparada em amostras de DNA de tecidos provenientes de vários mamíferos que podem estar naturalmente infectados ou não por *Leishmania*, ou outros agentes patogênicos.

A PCR específica para o gene IRBP, aqui introduzida, provou ser um protocolo valioso como um passo inicial para aumentar a confiança sobre a qualidade do DNA obtido a partir de tecidos potencialmente infectados por *Leishmania*. Embora estejamos atualmente dirigindo esforços para melhorar a amplificação de IRBP por PCR em amostras de pele, obtivemos um tremendo avanço em relação as amostras de outros tecidos onde os resultados tinham sido previamente diagnosticados como negativos, devido à baixa eficiência de amplificação com os iniciadores de beta-actina ou beta-globina utilizados. Diante disto, pode ser sugerido que o problema em relação às amostras de pele esteja mais relacionado ao processo de extração do DNA do que com a própria PCR. O pior desempenho observado, quando da utilização das reações dirigidas à beta-actina ou à beta-globina, pode ser atribuído ao desenho dos iniciadores. Existe um déficit de seqüências de nucleotídeos para estes genes no banco de dados, para diversas das espécies de mamíferos encontradas na área de estudo o que provavelmente dificultou a formulação de iniciadores mais eficientes.

Uma vantagem de usar o protocolo de PCR para amplificação do IRBP comparado a outros alvos, tais como beta-actina, beta-globina ou citocromo b é que, além da grande quantidade de informação da seqüência de nucleotídeos nas bases de dados, IRBP é exclusivo para os vertebrados (Pepperberg *et al.*, 1993). Tecnicamente, a alta eficiência da PCR IRBP nos dá um alto grau de confiança quando um resultado negativo para *Leishmania* foi baseado em PCR, afastando a possibilidade de resultados falso-negativos. Importantes fatores adicionais devem ser considerados, tais como: 1) ausência de DNA do

parasito em amostras de tecido, 2) a presença de inibidores nas preparações de DNA, ou 3) a má qualidade do DNA (algum grau de degradação) nas amostras de tecido testadas.

A seqüência do gene IRBP tem sido amplamente utilizada em estudos de filogenia de mamíferos (DeBry e Sagel, 2001; Harada *et al.*, 1995; Poux e Douzery, 2004; Stanhope *et al.*, 1996; Weksler, 2003) e como uma consequência, parte da seqüência do gene é conhecido em muitas espécies, atingindo mais de seiscentas (Nickerson *et al.*, 2006). A análise da variabilidade entre as seqüências de diferentes espécies poderia ser uma ferramenta útil na sua identificação, especialmente para as espécies cuja análise morfológica, por si só dificulta uma identificação segura. Em nosso estudo utilizamos a análise do seqüenciamento do amplicon de IRBP de uma amostra de tecido o que nos permitiu a identificação definitiva de um *Necromys lasiurus*, que tinha sido erroneamente identificado como *Akodon*, devido às semelhanças morfológicas dos dois gêneros.

A transmissão dos parasitos do gênero *Leishmania* envolve uma ampla gama de hospedeiros mamíferos, potenciais reservatórios naturais. O flebotomíneo *Lu. longipalpis*, que tem apresentado grande capacidade de adaptação a ambientes urbanizados, alimenta-se do sangue de uma variedade de animais domésticos e silvestres, incluindo vários mamíferos nas áreas urbanas e periurbanas, assim transmitindo *Leishmania infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral americana. A identificação desses reservatórios naturais de *Leishmania*, próximos a áreas urbanas, teria implicações importantes para uma melhor compreensão do ciclo de vida complexo do parasito (Haouas *et al.* 2007, Sant'Anna *et al.* , 2008).

Estes fatos abrem a perspectiva de utilização da PCR IRBP também em estudos de identificação de fonte alimentar em flebotomíneos ou outros artrópodes hematófagos envolvidos na transmissão de patógenos, uma vez que este procedimento possibilita a identificação de diferentes espécies de mamíferos através da análise do produto amplificado e seqüenciado. Estas informações contribuiriam para o conhecimento dos diferentes cenários eco-epidemiológicos das leishmanioses, sendo estes aspectos de grande valia para o estabelecimento de estratégias eficientes de controle.

O caráter único, não-degenerado e conservado dos iniciadores de IRBP utilizados neste estudo pôde ser comprovado experimentalmente.

Inicialmente pensado para ser uma etapa de pré-avaliação da qualidade do DNA nas amostras de tecido utilizadas em diferentes estudos, este protocolo ultrapassou as expectativas de sua aplicação. Ele irá contribuir significativamente para melhorar a confiança em diagnósticos baseados na PCR de animais infectados com *Leishmania* ou outros agentes patogênicos, permitindo a sua extensão a estudos filogenéticos e moleculares de hospedeiros de *Leishmania* ou outros patógenos.

6 Conclusões

Os resultados obtidos com este estudo associados aos conhecimentos sobre a epidemiologia das leishmanioses na Regional Nordeste do município de Belo Horizonte nos permitem tirar as seguintes conclusões:

1. Foi confirmado o papel do cão como um importante reservatório de *L. infantum*.
2. Considerando o alto índice de cães infectados por *Leishmania* do complexo *L. braziliensis* com expressivo número de parasitos no sangue periférico, é importante levar em conta esta questão no momento da avaliação das medidas de controle da LVC.
3. Os roedores das espécies *Mus musculus*, *Rattus rattus*, *R. norvegicus*, *Necromys lasiurus*, *Cerradomys subflavus* e marsupiais das espécies *Didelphis albiventris* e *D. aurita* são hospedeiros de espécies de *Leishmania* dos complexos *L. braziliensis* e *L. donovani*.
4. Existe a possibilidade da participação de pequenos mamíferos como fonte de infecção para os vetores inserindo-os como elementos ativos no ciclo de transmissão de *Leishmania sp.*
5. A pele de cauda é o tecido mais apropriado para a pesquisa de *Leishmania* em pequenos mamíferos (roedores e marsupiais).
6. No diagnóstico molecular da infecção por *Leishmania* em pequenos mamíferos a utilização de um número maior de amostras de diferentes tecidos aumenta a possibilidade de detecção do parasito.
7. A LnPCR seguida de sequenciamento foi mais eficiente na identificação das espécies de *Leishmania* do que a PCR-RFLP utilizando como alvo o kDNA.
8. A RTQ-PCR mostrou-se uma ferramenta eficiente na detecção, identificação e quantificação de *Leishmania* em amostras de pequenos mamíferos e cães.
9. A detecção da infecção por diferentes espécies de *Leishmania* em cães e pequenos mamíferos comprova a ocorrência de ciclos de transmissão ativos e simultâneos na área estudada.

7 Referências Bibliográficas

Abe A, Inoue K, Tanaka T, Kato J, Kajiyama N, Kawaguchi R, Tanaka S, Yoshiba M, Kohara M. Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2899-2903.

Alencar JE. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil [Tese de Livre Docência]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará; 1959.

Alencar JE. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1961; 3, 175-180.

Alexander B, Lozano C, Barker DC, McCann SHE, Adler GH. Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. *Acta Trop* 1998; 69: 41-50.

Alonso V. Aplicación de RADP para el Diagnóstico y Estudio Molecular de *Leishmania braziliensis* [Ph D Thesis]. Tenerife, España. Universidad de La Laguna; 1999.

Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2004; 57.1 – 87.

Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 2006; 22 (12): 552-557.

Alvarenga JSC. Estudo da variabilidade genética inter e intra-específica de *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) e *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908) [Tese de doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.

Alves CF. Determinação do Perfil de Citocinas e Quantificação da Carga Parasitária em Cães Naturalmente Infectados por *Leishmania (Leishmania)*

chagasi (Cunha & Chagas, 1937) Com e Sem Expressão Clínica da Leishmaniose Visceral [Tese de doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.

Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(5):1933-8.

Arias JR, Naiff RD. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, central Amazon of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1981; 76 (3): 279-286.

Arias JR, Naiff RD, Miles MA, Souza AA. The opossum *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon Basin of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75 (4): 537-5.

Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol* 1996; 14: 523-532.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1269-1281.

Avila-Pires, F.D. Ecologia das Zoonoses. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Guanabara Koogan; 2005 Vol. 1. Cap 5. P. 53-63.

Badaró R, Nakatani M, Chun P, Reed SG. Novo teste rápido (30') para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral. In: 30º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; Salvador. Anais. Salvador: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Rev Soc Bras Med Trop* 1994; 27, Supl. I. p.248.

Barrett TV, Senra MS. Leishmaniasis in Manaus, Brazil. *Parasitol Today* 1989; 5: 255-257.

Barreto MP, Ribeiro RD. Reservatórios silvestres do *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Adolfo Lutz 1979; 39: 25-26.

Bassler HA, Flood SJ, Livak KJ, Marmaro J, Knorr R, Batt CA. Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 1995; 61: 3724—3728.

Bastien P, Blaineau C, Pages M. Leishmaniasis: Sex, Lies and Karyototipe. Parasitol Today 1992 ; 8, 174-176.

Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. J Clin Microbiol 2006; 1435–1439

Bessetti J. (2007). An Introduction to PCR inhibitors. Profiles in DNA, March, p.9-10. Disponível em: <
http://www.promega.com/profiles/1001/ProfilesInDNA_1001_09.pdf >. Acesso em: 10 fev 2009.

Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. Arq Bras Med Vet Zootec 2001; 1: 53, 1-8.

Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 2003; 97, 291-296.

Brandão-Filho SP, Shaw JJ. Molecular tools parasite isolation for evaluating the hosts of *Leishmania braziliensis*. Trends Parasitol 2006; 22(11): 500-501.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Vigilância Epidemiológica. Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2000. 62p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120 p.

Brasil. Ministério do Planejamento Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE Cidades@. Minas Gerais Belo Horizonte. Brasília: MPOG, 2010. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso: 11 jan. 2010.

Brazil RP, Nascimento MDSB, Macau RP. Infecção natural do porco (*Sus scrofa*) por *Leishmania* em foco recente de Leishmaniose Tegumentar na Ilha de São Luís, Maranhão. Mem Inst Oswaldo Cruz 1987; 82: 145.

Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, Vidaud M, Deniau M. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8: 828-831.

Brumpt E, Pedroso AM. Pesquisas epidemiológicas sobre a leishmaniose americana das florestas no estado de São Paulo (Brasil). An paul med cir 1913; 1: 97-136.

Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AVM, Jansen AM. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2003; 45: 79-83.

Carroll NM, Admson P, Okhravi N. Elimination of bacterial DNA from Taq DNA polymerases by restriction endonuclease digestion. J Clin Microbiol 1999; 37: 3402-3404.

Carvalho MR Eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana na zona da mata norte de Pernambuco [Dissertação de mestrado]. Recife (PE). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ ; 2005.

Carvalho, Gustavo Mayr de Lima. (2006) .Flebotomíneos vetores e prevalência da Leishmaniose visceral canina, em área endêmica do município de Santa Luzia, região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais/Brasil. Belo Horizonte: s.n., 129 p. il. Dissertação(Mestrado em Ciências da Saúde - Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa René Rachou. Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde. Orientadora: Alda Lima Falcão; Co-orientadora: Célia Maria Ferreira Gontijo. Disponível em: http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/D_26.pdf . Acesso: 10 jan. 2010. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener - <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phl82/index.html> .

Cavalcanti MP. Desenvolvimento e avaliação de um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães [Tese de Doutorado]. Recife (PE): Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ; 2008.

Chagas E. Primeira verificação em indivíduo vivo da leishmaniose visceral no Brasil. Brás. Méd. 1936; 11: 221-222.

Chagas E, Cunha AM, Ferreira LC, Deane L, Deane G, Guimarães FN, Von Paumgarten MJ, As B. Leishmaniose visceral americana (Relatório dos trabalhos pela Comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937). Mem Inst Oswaldo Cruz 1938; 33: 89-229.

Chang KP, Fong D, Bray RS. Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. In: K.P.Chang & R.S.Bray eds Leishmaniasis, elsevier London 1985; 1-30.

Chaves LF, Hernandez MJ, Dobson AP, Pascual M. Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2007; 23(7), 311-316.

Collantes-Fernandez E, Zaballos A, Alvarez-Garcia G, Ortega-Mora LM. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1194-1198.

Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edward-Jones V, Kaczmanski EB, Fox AJ. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38 : 1747-1752.

Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Peláez D, Díaz A, Montilla M, Paláu MT. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colômbia, South America. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83: 195.

Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s. l.- specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98: 12-17.

Coutinho SG, Nunes MP, Morzochi, MCA. A survey for american cutaneous leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where human diseases occur. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1985; 80: 17-22.

Coutinho MT, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M, Genaro O, Linardi PM. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2005; 128: 149-155.

Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, Jiménez-Mejías M, Sirera G, Videla S, Alvar J. A nested polymerase chain reaction (Ln-

PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in co-infected patients with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 (1): 185-189.

Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Cañavate C, Figueras MC, Alvar J. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2343-2347.

Cunha AM, Chagas E. Estudos sobre o parasito. Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida no homem na América do Sul. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1937; 32, 329-337.

Cunha JCL, Lima JWO, Pompeu MML. Transmissão domiciliar de leishmaniose tegumentar e associação entre leishmaniose humana e canina, durante uma epidemia na Serra de Baturité, no estado do Ceará, Brasil. *Rev Bras Epidemiol* 2006; 9(4): 425-35

Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs or *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 2007; 149 (3-4): 139-146.

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting the paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2006; 48 (3): 151-156.

Dantas-Torres F, de Brito ME, Brandão-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban área of Brazil. *Vet Parasitol* 2006; 31;140(1-2):54-60.

De Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol* 2006; 140 (3-4), 231-238.

Deane LM, Deane MP. Encontro de Leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. O Hospital 1954; 45 (4): 45-47.

Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar, no Ceará. O Hospital 1955; 48 (1): 79-97.

Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores no Estado do Ceará [Tese]. Rio de Janeiro (RJ): Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro ; 1956.

Deane MP, Lenzi HL, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*. Vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host: the opossum *Didelphis marsupialis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79: 513-515.

Deborggraeve S, Laurent T, Espinosa D, Van der Auwera G, Mbuchi G, Wasunna M, El-Safi S, Al-Basheer AA, Arévalo J, Miranda-Verástegui C, Leclipteux T, Mertens P, Dujardin JC, Herdewijn P, Büscher P. A Simplified and Standardized Polymerase Chain Reaction Format for the Diagnosis of Leishmaniasis. J Infect Dis 2008; 198: 1-8

De Bruijn MHL, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta Trop 1992; 52: 45-58.

De Bry RW, Sagel RM. Phylogeny of rodentia (Mammalia) inferred from the nuclear-encoded gene IRBP. Mol Phylogenet Evol 2001; 19, 290-301.

Dedet JP. *Leishmania* et leishmaniose du continent américain. Ann Inst Pasteur 1993 ; 4: 3-25.

- Dedet J, Pratlong F. Taxonomy of *Leishmania* and geographical distribution of leishmaniasis. *Ann Dermatol Venereol* 2000;127(4):421-4.
- Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 463-469.
- De Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP, Michalick MSM. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet. Parasitol* 2006; 137, 159–167.
- De Lima H, De Guglielmo Z, Rodríguez A, Convit J, Rodríguez N. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara state, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(2): 169-174.
- Dias ES, França-Silva JC, Silva JC, Michalsky EM, Paula KM, Gonçalves CM, Barata RA. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40(1):49-52.
- Disch J, Oliveira MC, Orsini M, Rabello A. Rapid clearance of circulating *Leishmania* kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis. *Acta Trop* 2004; 92: 279-283.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 1991; 19 (14):4008.
- Donovan JW, Ladetto M, Zou G, Neuberg D, Poor C, Bowers D, Gribben JG. Immunoglobulin heavy-chain consensus probes for real-time PCR quantification of residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 95: 2651-2658.

du Breuil RM, Patel JM, Mendelow BV. Quantitation of beta-actin-specific mRNA transcripts using xeno-competitive PCR. *PCR Methods Appl* 1993; 3, 57-59.

Dunaiski M. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana na região do vale do ribeira – paraná: cães reservatórios ou hospedeiros acidentais? [Dissertação de mestrado] Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2006.

Dye D. Leishmaniasis epidemiology: The theory catches up. *Parasitology* 1992; 104: 7-18.

Eresh S, McCallum M, Barker DC. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology* 1994; 109: 423-433.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill 3rd FR, Smith TF. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(1):165-256.

Evans DA. *Leishmania*. In: Taylor, A.E.R. & Baker, J.R. (Eds.). *Vitro Methods for Parasite Cultivation*. London: Academic Press 1987; P. 52-75.

Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi FG, Sessa PA, Carias VRD, Jesus, AC, Alencar JTA. Participação do Cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, estado do Espírito Santo, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986; 81: 155-163.

Falqueto A, Sessa PA, Varejão JBM, Barros GC, Momen H, Grimaldi Jr G. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo state, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86(4): 499-500.

Ferreira EC, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, Schallig H, Gontijo CM. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol* 2007; 146 (3-4): 235-241.

Floeter-Winter LM, Shaw JJ. New horizons in the identification and taxonomy of the leishmaniasis: the expansion of molecular techniques. *Res Adv Microbiol* 2004; 4: 63-79.

Forattini OP. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar Americana. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1960; 2(4): 195-203.

Forattini OP, Pattoli DBG, Rabello EX, Ferreira AO. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de Leishmaniose Tegumentar do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Púb* 1972; 6: 255-261.

Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sánchez A, Roura X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2006; 137, p. 214-221.

Furnkranz U, Walochnik J, Grimm F, Deplazes P, Aspöck H. Comparative attempts for the establishment and optimization of a PCR on *Leishmania* for the purpose of diagnosis. *Wien Klin Wochenschr* 2004; 116: (Suppl. 4)30-34.

Furtado I, Aleixo J, Lopes CF. Surto de Leishmaniose tegumentar americana em Minas Gerais. *O Hospital* 1966; 70: 259-266.

Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, Tintaya KWQ, Dujardin JC. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2294-2297.

Genaro O, Costa CA, Williams P, Silva JE, Rocha NM, Lima SL, Mayrink W. Ocorrência de calazar em área urbana da Grande Belo Horizonte, MG. Rev Soc Bras Med Trop 1990; 23(2): 121.

Gontijo CM, Falcão AR, Falcão AL, Coelho Mde V. The development of species of *Leishmania* Ross, 1903 in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). Mem Inst Oswaldo Cruz 1995; 90(3):367-73.

Gontijo CMF, da Silva, ES, de Fuccio MB, de Sousa MCA, Pacheco RS, Dias ES, Andrade Filho JD, Brazil RP, Melo MN. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. Acta Trop 2002; 81: 143-150.

Gontijo CMF. Leishmaniose tegumentar em Minas Gerais: estudos moleculares de amostras de *Leishmania* isoladas de casos humanos [Tese de doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais 2000.

Gontijo B, de Carvalho ML. American cutaneous leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36, 71–80.

Gontijo CMF, Melo MN. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. Rev Bras Epidemiol 2004; 7(3): 338-349.

Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control (Invited review). Int J Parasitol 2005; 35:1169-1180.

Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. Am J Clin Pathol 1991; 95, 117-124.

Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. J Am Acad Dermatol 1996; v. 34, p. 257-272.

Gribben JG, Freedman A, Woo SD, Blake K, Shu RS, Freeman G, Longtine JA, Pinkus GS, Nadler LM. All advanced stage non-Hodgkin's lymphomas with a polymerase chain reaction amplifiable breakpoint of bcl-2 rearrangement at evaluation and after treatment. *Blood* 1991; 78: 3275.

Grimaldi Jr G, David Jr, McMahon-Pratt D. Identification of New World: *Leishmania* species characterization by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36, 270-287.

Grimaldi Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 1993; 230-250.

Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitology* 1999; 118: 375-382

Grutzmacher DD, Loeck AE, Oliveira AC, Fischer S, Elias SAA. Efeito do período de armazenamento em etanol sobre a qualidade e quantidade de DNA extraído de *Acromyrmex heyeri* (forel, 1899) (Hymenoptera: Formicidae). *R. Bras. Agrociência Pelotas* 2006; 12(1) 105-106.

Guarga JL, Lucientes J, Peribáñez MA, Molina R, Garcia MJ, Castillo JA. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Trop* 2000; 77, 203-207.

Gurgel-Gonçalves R, Ramalho ED, Duarte MA, Palma ART, Abad-Franch F, Carranza JC, Cuba Cuba CA. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the federal district of Brazil. *Rev Inst Med Trop. São Paulo* 2004; 46(6): 323-330.

Haouas N, Pesson B, Boudabous R, Dedet JP, Babba H, Ravel C. Development of a Molecular Tool for the Identification of *Leishmania* Reservoir

Hosts by Blood Meal Analysis in the Insect Vectors. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77(6): 1054–1059

Harada ML, Schneider H, Schneider MP, Sampaio I, Czelusniak J, Goodman M. DNA evidence on the phylogenetic systematics of New World monkeys: support for the sister-grouping of *Cebus* and *Saimiri* from two unlinked nuclear genes. *Mol Phylogenet Evol* 1995; 4, 331-349.

Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson K. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (12): 1468-1473.

Hermeto MV, Vieira-Dias D, Genaro O, Rotondo-Silva A, da Costa CA, Toledo VP, Michalick MS, Williams P, Mayrink W. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Doce Valley, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89(4):519-21.

Hermesen CC, Telgt DS, Linders EH, Van de Locht LA, Eling WM, Mensink EJ, Sauerwein RW. Detection of *Plasmodium falciparum* malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR. *Mol Biochem Parasitol* 2001; 118: 247-251.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993; 11: 1026-1030.

Holden MJ, Blasic Jr JR, Bussjaeger L, Kao C, Shokere LA, Kendall DC, Freese L, Jenkins GR. Evaluation of extraction Methodologies for corn Kernel (*Zea mays*) DNA for detection of trace amounts of biotechnology-derived DNA. *J Agric Food Chem* 2003; 51, 2468-2474.

Hu XS, Yang WT, Lu HG, Yan HP, Cheng JP, Ma Y, Jin BQ, Zhang T. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. *J Parasitol* 2000; 86, n. 04, p. 822–826.

Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet Parasitol* 2003; 113: 99-113.

Iñiguez SR, Dea-Ayuela MA, Sanchez-Brunete JA, Torrado JJ, Alunda JM, Bolas-Fernandez F. Real time reverse transcription-PCR quantification of cytokine mRNA expression in golden syrian hamster infected with *Leishmania infantum* and treated with a new amphotericin b formulation. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50 (4): 1195-1201.

Killick-Kendrick R, Molineau DH, Rioux JA, Lanotte G, Leaney AJ. Possible origins of *Leishmania chagasi*. *Ann Trop Med Parasitol* 1980; 74, 563-565.

Killick-Kendrick, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol.* 1990: 4: 1-24.

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Foucheaux C, Delure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1997; 11: 105-111.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Slögreen B, Trömbom L, Stahlberg A, Zoric N. The Real Time Polymerase Chain Reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27 (2-3): 95–125.

Lachoud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, Dedet JP, Bastien P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology* 2002; 125: 197-207.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis – incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1968; 62 (3): 385-395.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso state, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1970 ; 64 (5): 654-667.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *Br Med Bull* 1972 ; 28: 44-48.

Lainson R, Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden, WHR, Evans DA. ed. - *Biology of the Kinetoplastida*. London, Academic Press, 1979, v. 2, P. 1-116.

Lainson R. Our present knowledge of ecology and control of leishmaniasis in the Amazon Region of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1985; 18, 47-56.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R (Eds) *The leishmaniasis in biology and medicine*, Academic Press, London 1987, Vol.1, P.1-120.

Lainson R. Ecological interaction in the transmission of the leishmaniasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1988; 321: 389-404.

Lainson R. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Rev Para Med* 1997; 11,29-40.

Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis - The Neotropical *Leishmania* species. In: FEG Cox, JP Kreier, D Wakelin (eds), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9th ed. London: Arnold, 1998; Vol. 5 *Parasitology*, P. 242-266.

Laveran A, Havet J. Contribution a l'étude de la leishmaniose viscérale naturelle du chien. *Bull Soc Path Exot Filiales* 1917; 10, 386-392.

Leclercq V, Lebastard M, Belkaid Y, Louis J, Milon G. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: A tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. *J Immunol* 1996; 157: 4537-4545.

Le Pont F, Mollinedo S, Mouchet J, Desjeux P. Leishmaniose en Bolivie. IV – Le chien dans les cycles des leishmanioses en Bolivie. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989 ; 84: 391-392.

Logan JMJ, Edwards KJ, Saunders NA, Stanley J. Rapid identification of *Campylobacter* spp. By melting peak analysis of bioprobes in real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2227-2232.

Lopes UG, Momem H, Grimaldi Jr G, Marzochi MCA, Pacheco RS, Morel CM. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol* 1984; 70: 89-98.

Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KWQ, Jirku M, Chocholová E, Haralambous C, Pratlong F, Oborník M, Horák A, Ayala FJ, Miles MA. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(22):9375-9380.

Luppi MM, Malta MCC, Silva TMA, Silva FL, Motta ROC, Miranda I, Ecco R, Santos RL. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. *Vet Parasitol* 2008; 155: 146-151.

Luz ZMP, Pimenta DN, Cabral ALV, Fiúza VOP, Rabello A. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34: 249-254.

Madeira MF, Uchoa CMA, Leal CA, Silva RMM, Duarte R, Magalhães CM Serra CMB. *Leishmania (viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36: 551-555,

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, Marzochi MCA. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100 (5): 442-445.

Marcondes CB. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomol News*. 2007; 118(4): 351-356.

Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH, Pessanha JE, Dias ES. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis in Belo Horizonte municipality, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(1): 31-38.

Martinez E, Mollinedo S, Torrez M, Muñoz M, Bañuls AL, Lê Pont F. Co-infection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum/L. chagasi* in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96:529-532.

Martinez J. Función e Importancia de la Bioinformática en el Desarrollo de las Ciencias, Especialmente en Biotecnología y Medicina Molecular. *Cienc Trab* 2006; 8 (22):159-163.

Martins AV, Barretto MP, Brener Z, Pellegrino J. Observações preliminares sobre um foco de leishmaniose tegumentar americana em Minas Gerais. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 1956; 8 (4), 577-581.

Martins AV, Williams P, Falcão AL. American Sandflies (Diptera): Psychodidae, Phlebotominae. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências 1978; 195p.

Mary C, Feraut F, Lascomb L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. J Clin Microbiol 2004; 42 (11): 5249-5255.

Marzochi MCA. A leishmaniose tegumentar no Brasil. In: Universidade de Brasília. Grandes Endemias Brasileiras. Brasília: UNB, 1989.

Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmanioses in Brazil – Emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. Cad Saude Publica 1994; 10: 359-375.

Marzochi MCA, Marzochi KBF, Carvalho RW. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. Parasitol Today (1994; 10(1): 34-37.

Mattner F, Di Padova K, Alber G. Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against *Leishmania major*. Infect Immun 1997; 65: 4378-4383.

Maurício IL, Stohard JR, Miles M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitol Today 2000; 16, 188-199.

Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, Da Costa CA, Falcão AR, Melo MN, Falcão AL. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. Ann Trop Med Parasitol 1979; 73(2):123-37.

Mazza S, Cornejo AJ. Primeiros casos autoctones de Kala-azar infantil comprovados en el Norte de la Republica. Bol Inst Clin Quir 1926; 11, 140-144.

Medeiros AR, Silva Jr WA, Roselino AM. DNA sequencing confirms the involvement of *Leishmania (L.) amazonensis* in american tegumentary leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. Clinics. 2008; 64:451-6.

Melby PC, Yang YZ, Cheng J, Zhao W. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 1998; 66:18-27.

Mello DA, Rego Jr FA, Oshiro ET, Nunes VLB. *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae) Naturally Infected with *Leishmania donovani chagasi* (Cunha e Chagas1937) in Corumbá (Mato Grosso do Sul State, Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; 83, 259.

Melo, Lutiana Amaral de. (2008). Detecção de *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos no município de Belo Horizonte, MG. Belo Horizonte: s.n., 90 p. Capa dura, 29 cm., il. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde na área de concentração: Biologia Celular e Molecular)-Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Orientação: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo. Disponível em: http://netra.cpqrr.fiocruz.br/download/Dissertacao_Lutiana_Amaral_de_Melo.pdf. Acesso: 10 jan. 2010. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener - <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phl82/index.html>.

Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PFE, Secundino NFC, Dias ES. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2002; 44: 255-259.

Michalsky EM. Aspectos entomológicos associados à transmissão de leishmaniose visceral canina no Município de Montes Claros, Minas Gerais [Dissertação de mestrado]. Uberaba (MG):Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro 2004.

Migone LE. Un caso de Kala-azar a Assuncion (Paraguay). *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1913; 6, 118-120.

Molina R, Amela C, Nieto J, San Andres M, Gonzales F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Med Hyg* 1994; 88, 491-493.

Monbrison F, Mihoubi I, Picot S. Real-time PCR assay for the identification of cutaneous *Leishmania* parasite species in Constantine region of Algeria. *Acta Trop* 2007; 102: 79-83.

Monteiro SP, Lacerda MM, Arias JR. Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1994; 29: 67-72.

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low copy transcripts by continuous SYBR GREEN I monitoring during amplification. *Biotechniques* 1998; 24: 954-962.

Mortarino M, Franceshi A, Mancianti F, Bazzocchi C, Genchi C, Bandi C. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. *Parassitologia* 2004; 46 (1-2): 163-167.

Nascimento MDSB, Costa JML, Fiori BIP, Viana GMC, Filho MSG, Alvim AC, Bastos OC, Nakatani M, Reed S, Badaró R, Silva AR, Burattini MN. Aspectos epidemiológicos determinantes na manutenção da Leishmaniose Visceral no Estado do Maranhão - Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996; 29, 233-240.

Nasereddin A, Eregat S, Azmi K, Baneth G, Jaffe CL, Abdeen Z. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. *J Parasitol* 2006; 92: 178-183.

Nery-Guimarães F, Damasceno R, Azevedo M. Leishmaniose tegumentar – zoonose de roedores silvestres na Amazônia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1968; 66 (2): 151-168.

Nickerson JM, Frey RA, Ciavatta VT, Stenkamp DL. Interphotoreceptor retinoid-binding protein gene structure in tetrapods and teleost fish. *Mol Vis* 2006; 12, 1565-1585.

Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1666-1669.

Nicolle C, Comte D. Origine Canine Du Kalazar. *Bull Soc Pathol Exot* 1908 ; 1, 299-301.

Nicolle C. Isolament et culture des corps de Leishman. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*. 1908 ; 3, 55-56.

Nowak RM, Paradiso JL. Marsupialia. In: _____. *Walker's Mammals of the World*. 5th. ed. London: The Johns Hopkins University Press 1991; P. 10 – 113. Volume I.

Oliveira CL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil, 1994-1997. *Cad Saúde Pública* 2001; 17(5): 1231-1239.

Oliveira CGC, Lacerda HG, Martins DRM, Barbosa JDA, Monteiro GR, Queiroz JW, Sousa JMA, Ximenes MFFM, Jerônimo SMB. Changing epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. *Acta Trop* 2004; 90: 155-162.

Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 129: 219-227.

Oliveira Neto MP, Marzochi MCA, Grimaldi GJ, Pacheco RS, Toledo LM, Momen H. Concurrent human infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Ann Trop Med Parasitol* 1986; 80:587–592.

Organización Mundial de La Salud. Lucha contra las leishmaniosis. Serie de Reports Técnicos, 193. Ginebra, 1990; pp. 29-32.

Orsini O. Leishmaniose em Minas Gerais. *Brás. Med.* 1945; 54: 762-766.

Parvizi P, Ready PD. Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA fragments detect three *Leishmania* species of gerbils in sandflies from Iranian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 2008; 13 (9): 1159–1171.

Parvizi P, Moradi G, Akbari G, Farahmand M, Ready PD, Piazak N, Assmar M, Amirkhani A. PCR detection and sequencing of parasite ITS-rDNA gene from reservoirs host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Parasitol Res* 2008; 103:1273–1278

Passos VMA, Falcão AL, Katz N. Urban american cutaneous leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990; 85 (2): 243-244.

Passos VMA, Falcão AL, Marzochi MCA, Gontijo CMF, Dias ES, Barbosa-Santos EGO, Guerra HL. Epidemiological aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in a periurban área of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993; 88 (1): 103-110.

Passos VMA, Gontijo CMF, Dias ES, Katz N, Falcão AL. Cutaneous leishmaniases in periurbans foci of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. *Proceedings of Workshop “Research and Control of Leishmaniasis in Brazil”* 1998; 81: 83-88.

Penna HA. Leishmaniose visceral no Brasil. *Bras. Med.* 1934; 949-950.

Pennisi MG. Case report of leishmaniasis in four cats. *Vet Res Commun* 2004; 28 Suppl 1:363-6.

Pepperberg DR, Okajima TL, Wiggert B, Ripps H, Crouch RK, Chader GJ. Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP). Molecular biology and physiological role in the visual cycle of rhodopsin. *Mol Neurobiol*. 1993; 7, 61-85.

Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, Toga B, Quilici M. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 746-749.

Pirmez C, Coutinho SG, Marzochi MC, Nunes MP, Grimaldi G Jr. Canine American cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1988 Jan;38(1):52-8. PubMed PMID: 3277465.

Poux C, Douzery EJ. Primate phylogeny, evolutionary rate variations, and divergence times: a contribution from the nuclear gene IRBP. *Am J Phys Anthropol*. 2004; 124, 1-16.

Prefeitura Municipal de Belo Horizonte. Gerência de Epidemiologia e Informação (GEEPI/SMSA-PBHD). Dados da Leishmaniose Visceral no Município de Belo Horizonte 2010. Belo Horizonte: PBH, 2010. Disponível em: <http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/contents.do?evento=conteudo&lang=&idConteudo=35783&chPlc=35783>. Acesso em: 11 jan. 2010.

Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect* 2007; 9: 1307-1315.

Quaresma, Patrícia Flávia. (2007). Diagnóstico molecular da Leishmaniose Visceral Canina e Quantificação da Carga Parasitária através da Reação em Cadeia da Polimerase. Belo Horizonte: s.n., 118 p. il. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde concentração Doenças Infeciosas e Parasitárias) - Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Orientação: Célia Maria Ferreira Gontijo, Co-orientação: Silvane Maria Fonseca Murta. Disponível em: http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/D_29.pdf . Acesso 10 jan. 2010. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener - <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phl82/index.html>.

Quaresma PF, Murta SM, Ferreira EC, da Rocha-Lima AC, Xavier AA, Gontijo CM. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. Acta Trop 2009; 111(3): 289-294.

Ramirez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D, Velez ID. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. J Clin Microbiol 2000; 38: 3768–3773.

Ramirez LE, Lages-Silva E, Alvarenga-Franco F, Matos A, Vargas N, Fernandes O, Zingales B. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic área of Chagas disease in Southeast Brazil. Acta Trop 2002; 84: 189-198.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Corrêa-Oliveira R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. Res Vet Sci 2006; 81: 68-75.

Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. Am J Trop Med Hyg 1999; 61(4): 530-541.

Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Davies CR. Use of PCR to detect *Leishmania (Vianna)* spp. in dog blood and bone marrow. J Clin Microbiol 2000; 38: 748-751.

Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. J Clin Microbiol 2007; 45 (1): 21-25.

Rezende CL, Bastos O. Calazar infantil. Relato de 1 caso ocorrido em Belo Horizonte. J Pediatr 1959; 24: 323-331.

Riça-Capela MJ, Cortes S, Leandro C, Peleteiro MC, Santos-Gomes G, Campino L. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. Parasitol Res 2003; 89:163-169.

Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. Exp Parasitol 1990; 71: 267-275.

Rolão N, Cortes S, Rodrigues OR, Campino L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. J Parasitol 2004; 90: 1150-1154.

Rolão N, Martins MJ, João A, Campino L. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. Parasite 2005; 12: 183-186.

Ross R. (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan (2) Further notes on leishman's bodies. Br Med J 1903; 2, 1261-1401.

Rotureau B. Are new world leishmaniasis becoming anthroponoses? Med Hypotheses 2006; 67(5): 1235-1241.

Roura X, Sanchez L, Ferrer L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet Rec London* 1999; 144: 262–264.

Sant'Anna MRV, Jones NG, Hindley JA, Mendes-Sousa AF, Dillon RJ Cavalcante RR, Alexander B, Bates PA. Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta Trop* 2008; 107: 230–237.

Santa Rosa ICA, Oliveira ICS. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. *Clin Vet* 1997; 2, 24-28.

Saraiva L. Estudos fa fauna Flebotomínica (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE), sua infecção natural por *Leishmania* spp. E aspectos biogeográficos da leishmaniose visceral, na Regional Nordeste do Município de Belo Horizonte, Minas Gerais– Brasil [Dissertação de mestrado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais 2008.

Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Olivry T, Dunston SM, Farmaki R, Koutinas CK, Petanides T. Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniasis. *Vet Dermatol* 2007; 18 (4): 227-233.

Schallig HDFH, Silva ES, Van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CMF. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potencial reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; 7(3): 387-393.

Schoönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, Jaffe C. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47: 349–358.

Schulz A, Mellenthin K, Schonian G, Fleischer B, Drosten C. Detection, Differentiation and Quantitation of pathogenic *Leishmania* organisms by a fluorescence Resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1529-1535.

Sessa PA, Falqueto A, Varejão JBM. Tentativa de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana por meio do tratamento de cães doentes. Cad Saúde Pública 1994; 10: 157-163.

Shaw JJ. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1988; 83: 486-490.

Shaw JJ. The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world. A mini-review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102(5): 541-547.

Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. Nat Biotechnol 2008; volume 26 (10): 1135-1145.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr G. Natural infections of the *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79 (4): 511.

Shlomai J. The assembly of kinetoplast DNA. Parasitol Today 1994; 10, 341-346.

Silva ES, Pirmez C, Gontijo CMF, Fernandes O, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. Vet Rec 2000; 147, 421-422.

Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96: 285-291.

Silva ES, Gontijo CMF, Melo MN. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. Trends in Parasitol 2005; 21(12), 550-552.

Silva ES, Van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CMF, Schallig HDFH, Brazil RP. Diagnosis of canine Leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet Res Commun* 2006; 30: 637-643.

Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Pova MN. Leishmaniasis in Brazil: XVIII Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1982; 76, 830-832.

Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Ribeiro RSM. Leishmaniose cutânea na Amazônia. Registro do primeiro caso humano de infecção mista, determinado por duas espécies distintas de Leishmanias: *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana amazonensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1984; 26, 272-275.

Simon S, Veron V, Carne B. *Leishmania* spp. Identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis and its applications in French Guiana. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010; 66(2):175-80.

Singh S, Dey A, Sivakumar R. Applications of molecular methods for *Leishmania* control. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5:251–265.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology, Spain. *J Clin Microbiol* 2001; 39 (2): 560-563.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 83: 141-152.

Souza CM, Pessanha JE, Barata RA, Monteiro EM, Costa DC, Dias ES. Study on Phlebotomine Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Fauna in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99 (8): 795-803.

Souza AI. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. Vet Parasitol 2005; 128(1-2): 41-5.

Spanakos G, Piperaki ET, Menounos PG, Tegos N, Fliemetakis A, Vakalis NC. Detection and species identification of Old World *Leishmania* in clinical samples using a PCR-based method. Trans R Soc Trop Med Hyg 2007; 102(1): 46-53.

Stanhope MJ, Smith MR, Waddell VG, Porter CA, Shivji MS, Goodman M. Mammalian evolution and the interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP) gene: convincing evidence for several superordinal clades. J Mol Evol 1996; 43, 83-92.

Stauber LA, Franchino EM, Grun J. An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in golden hamster. J Protozool 1958; 5: 269-273.

Sundsford A, Simonsen GS, Haldorsen BC, Haaheim H, Hjelmevoll SO, Littauer P, Dahl KH. Genetics methods for detection of antimicrobial resistance. APMIS 2004; 112: 815-837.

Tafuri WL, Michalick MSM, Dias M, Genaro O, Leitr VHR, Barbosa AJA, Bambilra EA, Costa CA, Melo MN, Mayrink W. Estudo, ao microscópio óptico e eletrônico, do rim de cães natural e experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Rev Inst Med Trop São Paulo 1989; 31,139-145.

Telleria J, Bosseno MF, Tarifa T, Buitrago R, Martinez E, Torrez M, Le Pont F, Brenière SF. Putative reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a sub-andean focus of Bolívia identified by kDNA-polymerase chain reaction. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94(1): 5-6.

Thomaz-Soccol V, Lannote G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. *Ann Parasitol Hum Comp* 1993; 127(4):421-4.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22 (22) 4673-4680.

Tohgi H, Utsugisawa K, Yoshimura M, Nagane Y, Mihara M. Age-related changes in nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha4 and beta2 messenger RNA expression in postmortem human frontal cortex and hippocampus. *Neurosci Lett* 1998; 245, 139-142.

Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Gonçalves A, Vélez ID. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colômbia. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 84: 676-677.

Travi BL, Osório Y, Guarín N, Cadena H. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol* 1998; 88: 73-75.

Tupperwar N, Vineeth V, Rath S, Vaidya T. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 61 23–30.

Van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 51: 133-142.

Vanzeli AC, Kanamura HY. Estudo de Fatores Socioambientais associados à ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no município de Ubatuba, SP, Brasil. *Rev Panam Infectol* 2007; 9(3): 20-25

Versiani O. Leishmaniose visceral americana. *Brasil-Médico* 1943; 57, 268-271.

Vieira JBF, Coelho GE. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31, 85-92.

Vitale F, Reale S, Vitale M, Petrotta E, Torina A, Caracappa S. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1026: 139-143.

Volpini A. PCR-RFLP mkDNA no diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose cutânea no Brasil [Tese de doutorado] Rio de Janeiro (RJ). Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz, 2003.

Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 2004; 90: 31-37.

Walters LL. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly host. *J Euk Microbiol* 1993; 40, 196-206.

Weigle KA, Valderrama L, Arias AL, Santrich C, and Saravia NG. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44:260-271.

Weksler, M. Phylogeny of Neotropical oryzomyine rodents (Muridae: Sigmodontinae) based on the nuclear IRBP exon. *Mol Phylogenet Evol* 2003; 29, 331-349.

Wilson SM. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: Fields applications and practicalities. *Ann Trop Med Parasitol* 1995; 89 (1): 95-100.

Wolinska J, King KC. Environment can alter selection in host-parasite interactions. *Trends Parasitol* (2009; 25(5): 236-244.

World Health Organization – (2002). Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 44(77): 365-372.

Wortmann GW, Romero LI, Paz HM, Ortega-Barria E, Bayard V, Hochberg LP, Ryan JR. Real-time polymerase chain reaction diagnosis of leishmaniasis in Panama from both fresh and frozen tissue. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98: 148-151.

Yang S, Rothman R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. *The Lancet* London, (2004; 4: 337-348.