

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR CANINA: DIAGNÓSTICO PARASITÓLOGICO DE INFECÇÃO POR *Leishmania* sp. DOMICILIADOS NA ZONA LESTE DO MUNICÍPIO DE MANAUS AM, BR.

Ana Cláudia de Souza GAMA¹; Sônia Rolim REIS²; Luanda de Paula FIGUEIRA³; Francimeire Gomes PINHEIRO⁴

¹Bolsista CNPq/INPA; ²Orientador CPCS/ INPA ; ³Co-Orientador CPCS/ INPA; ⁴Colaborador CPCS/INPA

1.Introdução

A Leishmaniose, doença produzida por protozoários do gênero *Leishmania* incluem vários parasitas biologicamente distintos. A doença tem ampla distribuição geográfica e ocorre ao longo do mundo em 61 países com 200.000.000 de pessoas em risco no qual verifica-se a ocorrência de 300.000 casos anualmente (Ashford *et. al.*, 1995). Existem duas formas de Leishmaniose: a visceral e a tegumentar. Segundo Silveira *et al.* (1996) a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no novo mundo é uma parasitose endêmica das Américas, onde é considerada um sério problema na saúde pública, causando a leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e cutânea difusa (LCD). No Brasil a LTA ocorre em todos os Estados, com maior incidência na região Norte. Esta apresenta dois padrões epidemiológicos característicos. No primeiro, estão os surtos associados à penetração do homem nas matas, sendo neste caso classificada como uma zoonose de mamíferos silvestres que atinge o homem quando em contato com os focos zoonóticos. No segundo padrão epidemiológico, a doença é encontrada em regiões de colonização mais antiga, não associada à penetração nas matas e onde o ambiente natural se encontra profundamente modificado (Marzochi, 1992). Pelo menos 15 espécies distintas de *Leishmania* são reconhecidas como causadoras de doença humana nas Américas. Oito dessas espécies são registradas no Brasil e todas ocorrem na Amazônia, em consequência da maior variedade de flebotomíneos vetores e animais reservatórios silvestres presentes na região (Barrett *et. al.*, 1991). Diversas espécies do gênero *Leishmania* têm sido isoladas de casos humanos, caninos, roedores e marsupiais de diferentes regiões do Brasil, apresentando características biológicas e bioquímicas distintas relacionadas a diferentes aspectos clínico-epidemiológicos (Guerra *et al.*, 2002). A epidemiologia da *Leishmania* é extremamente complexa e pode ser modificada por mudanças em qualquer posição no ciclo vetor-reservatório-homem. O desmatamento e a urbanização são exemplos de alterações que são seguidas por mudanças em reservatórios, na população de insetos vetores (espécies antropofílicas podem predominar), assim como a do parasito que pode ser introduzido em novas áreas, como descrito no caso da *Leishmania (Viannia) braziliensis* no sul do Brasil (Marzochi *et al.*, 1997). As modificações ambientais que vêm ocorrendo no município de Manaus podem levar a diferentes adaptações e mudanças em relação ao padrão epidemiológico da LTA. Estas prováveis mudanças poderiam eventualmente possibilitar a ocorrência de outros ciclos de transmissão, nos quais os homens e os animais domésticos estariam envolvidos (Reis, 2008). Naiff *et al.* (1996) relatam um caso de *Leishmania (V.) braziliensis* em um cão no Município de Manaus. Andrade (1998) estudou 35 cães na Cidade de Deus, bairro periférico de Manaus, dos quais 94,2% não tinham procedência de outra área de risco para LTA. Apenas um cão apresentou RIFI (Reação de imunofluorescência indireta) positiva. Cinco cães, inclusive com RIFI positiva, apresentaram lesão suspeita de LTA, porém não confirmada pelo exame direto. Reis (2008) pesquisou 600 cães proporcionalmente distribuídos nas seis zonas urbanas do município de Manaus no ano de 2006 e verificou maior taxa de cães soropositivos pela técnica de ELISA (17,14%) na zona Leste, corroborando com informações fornecidas pela Fundação de Medicina Tropical do Amazonas onde o maior número de casos humanos (44%) foram diagnosticados nesta mesma região.

O presente trabalho tem como objetivo Geral Diagnosticar através de exames parasitológicos Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em cães (*Canis familiaris*) domiciliados na zona leste do município de Manaus-AM, Brasil e objetivos específicos: Verificar a ocorrência de infecção natural de *Leishmania* sp. em cães domiciliados na zona leste do município de Manaus,AM; Cultivar e isolar meio de cultura apropriado, espécies do gênero *Leishmania* sp.; Identificar as espécies de *Leishmania* sp. isoladas através de análise isoenzimática.

2. Material e métodos

A coleta de material foi realizado em cães domiciliados na zona leste do município de Manaus, onde foram selecionados e cadastrados em fichas clínico-epidemiológicas. Após tricotomia e desinfecção do local da lesão foram retirados fragmentos de pele e introduzidos em eppendorfs contendo solução salina com antibiótico e antifúngico. As amostras coletadas foram submetidas a isolamento em cultivo e inoculação em animais de laboratório (Hamster/*Mesocricetus auratus*) no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas/Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Quando autorizado pelo proprietário retirou-se outra biópsia para o exame direto ao microscópio óptico (imprint).

Cultivo- Os fragmentos de pele foram semeados em meio NNN (meio Agar sangue bifásico) próprio para *Leishmania*, salina estéril solução salina com antibiótico gentamicina (Gentamil®) na concentração de 100 µg/mL e antifúngico 5-fluorocitocina (SIGMA) na concentração de 500µg/mL enriquecido com fase líquida de Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado.

Inoculação em Hamster- A biópsia foi transferida do eppendorf para um cadinho de porcelana e macerado com o auxílio de um pistilo, o material obtido foi aspirado com uma seringa de 1mL, sendo o mesmo inoculado no focinho e pata direito de hamsters.

Imprint- A impressão por aposição foi realizada através da compressão do fragmento de tecido, sobre uma lâmina microscópica de vidro limpa e corado pelo Kit Panótico Rápido.

PCR - A PCR foi processada pela adição de 10 µL a 720ng/µL do DNA de cada amostra de DNA ao "mastermix" contendo: tampão 2mM MgCl₂10X, MgCl₂ 10mM, 10% DMSO 10mM deoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1U/µL de Tth DNA polimerase, 15 pmol/µL de cada iniciador para 50 µL de reação. Os reagentes utilizados foram da Invitrogen/Brasil Os iniciadores foram: S1rev e SL2 (Pinheiro, 2004), os quais anelam nas regiões de mini-exon de *Leishmania* para amplificação dos fragmentos. A reação foi realizada em frascos de eppendorf próprios para evitar a evaporação em 35 ciclos de amplificação realizados em um termociclador automático (Gene Amp. PCR System 9700, Biosystem). As condições das reações foram: desnaturação do DNA a 85°C por 4 min, 94°C por 7 min., 94°C por 20 segundos, anelamento dos iniciadores a 50°C por 30 segs. E extensão a 72° C por 20 segs. (com etapa final de 10 min), terminando a 4°C. Na segunda reação de PCR foram adicionados 2 µL do produto amplificado para um volume final de 50 µL de reação. Os iniciadores foram: SLM1 e SLM2 (Pinheiro, 2004).

3. Resultados e discussão

Foram examinados 42 animais. Deste total 17 cães apresentaram lesões cutâneas. Nestes animais foram realizadas 21 biópsias de acordo com o número de lesões que apresentaram. O material coletado foi semeado em meio semi-sólido NNN específico para o cultivo do parasita. Não foi observado desenvolvimento do parasita em nenhuma das amostras. Houve aproximadamente 05 amostras contaminadas por fungos e/ou bactérias mesmo após o material permanecer 24 horas em solução salina com antibiótico gentamicina (Gentamil®) na concentração de 100 µg/mL e antifúngico 5 fluorocitocina (SIGMA) na concentração de 500µg/mL). No material que não houve contaminação e não foi observado desenvolvimento do parasita. Foram realizadas 17 impressões em lâminas ("imprint") e não houve a visualização do parasita. Foram feitas inoculações em 12 hamster (pata direita e focinho) de biópsias provenientes de 06 animais e não foi observado alteração na região do inoculo até o presente momento. No intuito de confirmar o resultado do exame parasitológico amostras provenientes de 10 animais foram submetidas à diagnóstico molecular através da técnica de PCR e houve amplificação de DNA compatível com o gênero *Viannia* (242 pb) em biópsias de pele de 06 animais. O resultado negativo em relação ao desenvolvimento de parasitas em meio de cultivo condiz com os resultados encontrados por Reis (2008) realizou 52 biópsias de fragmentos de pele de cães não foi observado desenvolvimento do parasita em nenhuma das amostras havendo uma alta taxa de contaminação. Padilla *et al.* (2002) realizaram cultivo de lesões em 31 cães e houve contaminação de todas as culturas. Segundo Coutinho *et al.* (2002) os parasitas do subgênero *Viannia* são difíceis de crescer em cultura e geralmente estão presentes em pequeno número, sendo necessários métodos mais sensíveis para reavaliar esta possibilidade. Os autores consideram inviável isolar e caracterizar parasitas de lesões de pele de cães a partir de cultura em meio NNN devido à facilidade de contaminação das culturas por fungos ou bactérias presentes em grande quantidade nestas lesões. Segundo Silveira *et al.* (1996). O esfregado por aposição em lâmina não constitui processo ideal para diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar principalmente do gênero *Viannia* devido ao baixo número de parasitas presentes nas lesões. Entretanto o diagnóstico molecular associado ao diagnóstico clínico (presença de lesão cutânea) comprova a infecção canina. O cão nº 08 e 09 residem em um domicílio com

mais três cães, tem uma extensa área arborizada ao redor da casa, dois moradores já tiveram LTA. O cão nº10 reside em um domicílio onde não há área verde mas está bem próxima da casa descrita anteriormente onde também já houve 02 casos de LTA humana. Alterações epidemiológicas levaram animais domésticos, a assumirem um papel importante na cadeia de transmissão da LTA em algumas áreas (Campbell-Lendrum *et al.*, 2001). Andrade (1998) observou, com muita frequência, animais como gambás em foco semelhante em Manaus, onde também encontraram cães em ambiente peridomiciliar com sorologia positiva (RIFI) para leishmaniose, entretanto, naquele local, as pessoas e os cães adentravam uma reserva florestal, situação semelhante observada neste estudo. Estudos relacionando a presença de vetores e a possível infectividade dos mesmos nas áreas de transmissão são necessários. O levantamento da fauna flebotomínea nas áreas de foco de infecção canina nesta região está em análise.

Tab. 01

Exames Realizados	Nº de Animais Examinados	Nº de Animais Positivos
Cultivo em NNN	17	0
Imprint	17	0
Inoculação em Hamster	06	0
PCR	14	06

4. Conclusão

- Os resultados sugerem a presença do parasita do gênero *Leishmania* sub gênero *Viannia* circulando entre cães domiciliados na zona leste comprovado pelo diagnóstico molecular;
- Não foram efetivos os métodos parasitológicos aplicados neste projeto, ao contrario do resultado obtido com o molecular. Este fato tem sido observado por outros autores, sugerindo estudos de técnicas que possam atender a necessidade da detecção parasitaria na infecção canina;
- A modificação do ambiente natural onde homem e seu animais domésticos, coabitam com a fauna silvestre favorece a participação destes animais no ciclo epidemiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana no Município de Manaus;

5. Referências

- Andrade, S.L.; Confort, E.M.; Toledo, L.M.; Romero, G. 1998. *Leishmaniose Tegumentar Americana em área de ocupação recente na periferia da cidade de Manaus - AM Brasil*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Medicina Tropical do Amazonas/Instituto Oswaldo Cruz. 206 p.
- Ashford, D.A; Bozza, M.; Freire, M.; Miranda, J.C.; Sherlock I.; Eulálio, C.; Lopes, U; Fernandes, O.; Degraeve, H.; Badaror. 1995. *Comparison of the polymerase chain reaction on the detection of canine visceral leishmaniasis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53:251-255.
- Barret, T.V.; Freitas, R.A.; Naiff M.F.; Naiff, R.D. 1991. *As leishmânias e seus insetos transmissores em relação à saúde na Amazônia*. In: AL Val, R Figliuolo, E Feldberg eds. *Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia: Fatos e Perspectivas v. 1. Manaus Brasil, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia*, p. 105-117.
- Campbell-Lendrum, D.; Dujardin, J.P.; Martinez, E.; Feliciangeli, M.D.; Perez, J.H.; Silans, L.N.M.P.; Desjeux, F. 2001. *Domestic and peridomestic transmission of American Cutaneous Leishmaniasis: Changing epidemiological patterns present new control opportunities*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(2): 159-162.
- Coutinho, S. G.; Pirmez, C.; Da- Cruz, M. A. , 2002. *Diagnosis parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients*. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg*, 96 supl. 1, p. 173 – 178.
- Guerra, J.A.O.; Coelho, L.; Cabral, E.G.; Teixeira, M.R.A.; Moura, M.A.; Paes, M.G 2002. *Comparação entre métodos para coleta de amostra de sangue em inquérito sorológico para leishmaniose em cães procedentes de áreas de transmissão e não transmissão humana de Leishmaniose Tegumentar Americana no Município de Manaus*. *Newslab* , 55:72- 80.

Marzochi, M.C.A. 1992. *Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses Tegumentares. Jornal Brasileiro de Medicina*, 63 (5/6):82-104.

Marzochi, M.C.A.; Marzochi K.B. F. 1997. *Leishmanioses em áreas endêmicas. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30 (suplemento I):162-165.

Naiff, R.D.; Naiff, M.F.; Barret, T. V.; Queiroz, R.G. 1996. *New record of cutaneous leishmaniasis in dogs in Manaus, Amazonas State, Brazil. In: XXII Annual Meeting on basic research in Chagas' Disease, Caxambu/MG. Mem. do Inst. Oswaldo Cruz, (supl. 01): 154.*

Padilla, A M.; Marco, J.D.; Diosque, P.; Segura, M.C.; Fernandez, E.L., Malchiodi E.L.; Basombrío, M.A, 2002. *Canine infection and possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina. Vet. Parasit.*, 110: 1-10.

Pinheiro, F. G. 2004. *Infecção natural em Lutzomymia (Nyssomyia) umbratilis Ward & Fraira, 1977 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) por Leishmania sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado do Amazonas, Brasil. Manaus, UFAM, p. Tese de Mestrado em Entomologia.*

Reis, S.R. 2008. *Diagnóstico biológico e molecular da Leishmaniose Tegumentar Americana em cães domésticos (Canis familiaris) no município de Manaus, AM, BR. Manaus, UFAM, 96 p. Tese de Doutorado em Biotecnologia.*

Silveira, T. G. V.; Teodoro, U.; Lonardoni, M.V.C.; Toledo, M.J.O.; Bertolini, D.A.; Arraes, S.M.A.A.; Filho, V.D. 1996. *Investigação sorológica em cães de área endêmica de Leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, Sul do Brasil. Caderno de Saúde Pública.* , 12 (1).