

Leishmaniose Tegumentar Canina: Diagnóstico molecular através da técnica de HOT-START PCR

Pricilla Castro PASCOAL¹; Francimeire Gomes PINHEIRO ²; Antonia Maria Ramos FRANCO³; Sônia Rolim REIS³

¹Bolsista PIBIC INPA/CNPq; ²Orientador CPCS/INPA ; ³Colaborador CPCS/INPA

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma zoonose causada por um protozoário do gênero *Leishmania* e transmitida por um inseto vetor – flebotomíneo. A doença tem ampla distribuição geográfica e ocorre em 61 países no mundo. No Brasil, a LTA ocorre em todos os Estados, com maior incidência na região Norte (Costa Val, 1994). Recentemente as autoridades científicas brasileiras vêm demonstrando grande preocupação relacionada à exploração da floresta amazônica, principalmente no campo ecológico e de saúde pública. Após desmatamento, os reservatórios silvestres naturais da LTA migram para outras áreas em busca de abrigos naturais e conseqüentemente a fauna flebotomínica que antes realizava sua hematofagia nesses pequenos mamíferos, procura suprir suas necessidades alimentares sugando o homem e os animais domésticos que vão fixar-se nestas áreas desmatadas, produzindo epidemias da doença. As modificações do ambiente causadas pelo homem que vem ocorrendo na periferia da cidade de Manaus podem resultar em uma alteração no padrão epidemiológico da doença nesta região. A epidemiologia das espécies de *Leishmania* é extremamente complexa e pode ser modificada por mudanças em qualquer posição no ciclo vetor-reservatório-homem. A introdução de animais domésticos, tais como o cão, pode possivelmente ocupar o lugar de espécies silvestres neste ciclo, ocorrendo assim uma possível urbanização desta doença (Marzochi *et al.* 1997). Mayrink *et al.* (1981), encontraram seis cães com lesões cutâneas nas orelhas em uma pequena propriedade na área urbana de Manaus. Foram feitas biópsias das lesões para corte histológico e formas amastigotas foram detectadas em ambas as séries de material seccionado. Naiff *et al.* (1996) identificou *Leishmania (Viannia) braziliensis* em uma cadela naturalmente infectada neste mesmo município. A descrição destes casos sugerem a necessidade de uma maior atenção quanto a possível participação de animais domésticos nos ciclos epidemiológicos da LTA no Estado do Amazonas. O objetivo deste trabalho foi diagnosticar LTA através da técnica de Hot Start PCR em cães (*Canis familiaris*) domiciliados da zona leste do município de Manaus-AM, Brasil. Foram coletadas 22 biópsias de lesões de pele de cães suspeitos para ensaios moleculares. Na extração do DNA foram testadas três metodologias: protocolo de Sambrook *et al.* (1989); Pinheiro (2004) e de Tafuri *et al.* (2004). Após extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro a 280 e 260 nm (CARY 50 CONSO/UV – Visible Spectrophotometer) no Centro de Pesquisa Leônidas Deane – FIOCRUZ, Manaus, AM. A técnica utilizada para amplificação foi o Hot Start PCR que é uma modificação simples do processo original, na qual a reação de amplificação é iniciada em uma temperatura elevada (94° C). Os ciclos de amplificação foram: 1 ciclo de 94° C 4 minutos, 33 ciclos de 94° C 30 segundos, 50° C 30 seg., 72° C 30 seg. e 1 ciclo a 72° C por 10 min. As amplificações foram realizadas em termociclador (Px2 Thermal Cycler). Foi utilizado um conjunto de iniciadores gênero específico: *Leishmania* spp. I (5' GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA 3'), *Leishmania* spp. II (5' CCGCCCCTATTTTACACCAACCCC 3') e *Leishmania* spp. III (5' GGCCCACTATATTACACCAACCCC 3') (Michalsky *et al.*, 2002). Foram utilizadas como controle positivo do teste, amostras de cultivo parasitário das espécies *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*.

Tabela. Técnicas de extração de DNA realizados com amostra de pele de cão.

Técnica de extração (metodologia)	Quantificação de DNA (ug/mL)	Pureza do DNA (260/280)
1 Sambrook <i>et al.</i> (1989) *	279,5	3,99
2 Pinheiro (2004)	81	18,73
3 Tafuri <i>et al.</i> (2004)	126,5	2,32

*Metodologia escolhida.

Os resultados obtidos da avaliação das três técnicas de extração estão descritos na tabela e a técnica escolhida foi a de Sambrook *et al.* (1989) por apresentar um grau de pureza e concentração significativos de DNA. Das 22 biópsias de pele de cão, houve amplificação de sete amostras com produtos em torno de 120 pares de bases (Figura), compatíveis com os controles positivos da reação. Material biológico obtido destes animais foram coletados e outros métodos de diagnóstico estão sendo realizados, como o isolamento em cultivo, sorodiagnóstico e intradermoreação de Montenegro. A participação destes animais no ciclo epidemiológico desta zoonose no município de Manaus é discutida. O uso da PCR como ferramenta diagnóstica de leishmaniose canina têm sido utilizada e até o presente momento os resultados parecem satisfatórios, visto que em nossa região, são poucos os trabalhos destinados à este tipo de diagnóstico.

MW 1 2 3 4 5 6 7 8

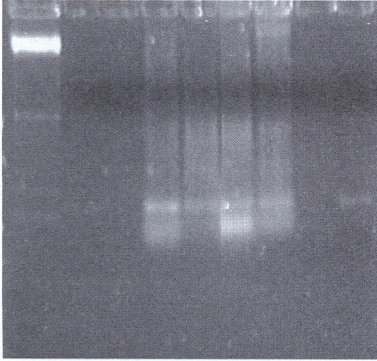


Figura. Gel de agarose 1,5%.MW(peso molecular 100pb). Poços 1 e 2 controles negativos; 3,4,5 e 6 controles positivos; 7 amostra negativa e 8 amostra positiva.

Palavras-chave: Hot Start PCR – *Leishmania* spp – *Canis familiaris*

Bibliografias citadas

- Costa Val, A.P. 1994. *Leishmaniose Tegumentar Canina: estudo clínico e laboratorial em cães experimentalmente infectados com Leishmania (Viannia) braziliensis*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 71 p. Dissertação de Mestrado em Parasitologia Veterinária.
- Marzochi, M.C. A. & Marzochi, K.B.F. 1997. Leishmanioses em áreas endêmicas. *Rev. Soc. Bras. de Med. Trop.*, v. 30 supl.1, p. 162-165.
- Mayrink, W.; Magalhães, P.A.; Melo, M.N.; Dias, M.; Costa, C. A; Michalick, M.S.M.; Willians, P. 1981. Canine cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75:5-757.
- Michalsky, E.M.; Fortes DIAS.;C.L.; Pimenta, P.F.P.: Secundino. N.F.C.; Dias. E.S. 2002. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Rev. Inst. Med. Trop.* 44(5): 255-259.
- 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. Inst. Oswaldo Cruz.* 01, p. 154.
- Pinheiro, F.G. 2004. *Infecção Natural em Lutzomyia umbratilis (Ward Fraiha, 1977) (Diptera: Psychodidae:Phlebotominae) por Leishmania sp (Kinetoplastida:Trypanosomatidea) em áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado do Amazonas, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /Universidade Federal do Amazonas. 99p.
- Sambrook, J.; Fritch, E. F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tafuri,W.L.; Santos, R.L.; Arantes, R.M.E.; Gonçalves,R.;Melo,M.N.; Michalick,M.S.M. 2004. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J. Immunol. Methods*, 292(2):17-23.